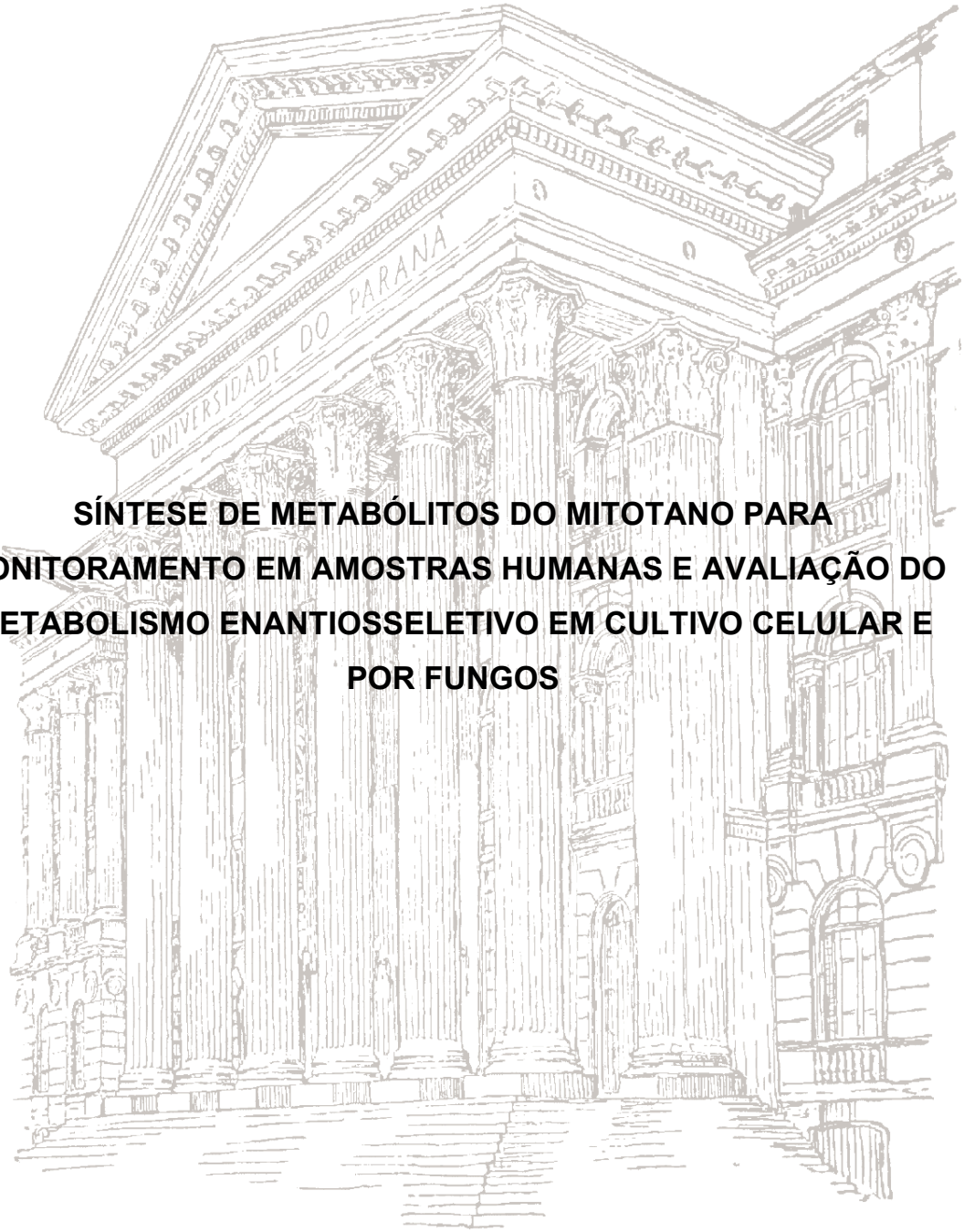
DANIELA FLORÊNCIO MALUF



SÍNTESE DE METABÓLITOS DO MITOTANO PARA MONITORAMENTO EM AMOSTRAS HUMANAS E AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ENANTIOSSELETIVO EM CULTIVO CELULAR E POR FUNGOS

CURITIBA

2012

DANIELA FLORÊNCIO MALUF

SÍNTESE DE METABÓLITOS DO MITOTANO PARA MONITORAMENTO EM AMOSTRAS HUMANAS E AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ENANTIOSSELETIVO EM CULTIVO CELULAR E POR FUNGOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná na área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos – Produção e Qualidade

Orientador: Profa. Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira

CURITIBA

2012

Maluf, Daniela Florêncio
Síntese de metabólitos do mitotano para monitoramento em amostras humanas e avaliação do metabolismo enantiosseletivo em cultivo celular e por fungos / Daniela Florêncio Maluf - Curitiba, 2012.
155 f.: il.; Graf., tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Orientadora: Sandra Mara Woranovicz Barreira

1. Enantiômetros. 2. Células – Cultura e meios de cultura. 3.Células - Metabolismo . I. Barreira, Sandra Mara Woranovicz. II. Título.

CDD 572.4

A Deus, minha família e amigos.

“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas
e insensatas. Perdoe-as assim mesmo!
Se você é gentil, podem acusá-lo de egoísta,
interesseiro. Seja gentil assim mesmo!
Se você é um vencedor terá alguns falsos amigos e
alguns inimigos verdadeiros. Vença assim mesmo!
Se você é bondoso e franco poderão enganá-lo.
Seja bondoso e franco assim mesmo!
O que você levou anos para construir, alguém pode
destruir de uma hora para a outra.
Construa assim mesmo!
Se você tem paz e é feliz, poderão sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo! O bem que você faz hoje,
poderão esquecê-lo amanhã.
Faça o bem assim mesmo!
Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode
nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo!
Veja você que, no final das contas é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e os outros!”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe, Neide Florencio, e família.

Ao meu amor, André Michelotto, e família.

A profa. Dra. Sandra Barreira pelo exemplo, carinho e incentivo.

A profa. Dra. Jaísa Soares, pela ajuda providencial, muito além das análises de cristalografia de raio-X.

Ao Daniel Altino de Jesus, por ter cedido as instalações do Lacen e disposto de seu tempo para as análises de CG-EM.

Ao prof. Dr. Andersson Barison, pelos ensinamentos de espectroscopia de RMN.

Aos professores membros da banca, Dr. Paulo Vitor Farago, Francinete Ramos Campos e José Domingues Fontana, pelas correções.

Aos professores do PPGCF pelo carinho e atenção.

As minhas amigas Grazielle, Fernanda, Suzana, Gracielle, Gilcélia, Priscila, Cláudia, Vanessa, Ricardo, Beatriz e Patrícia.

Às agências de fomento à pesquisa CNPQ e CAPES pelas bolsas concedidas a este trabalho no Brasil e na França.

RESUMO

O mitotano é um medicamento quimioterápico utilizado para o tratamento de um câncer endócrino raro e maligno, denominado carcinoma adrenocortical. O tratamento caracteriza-se por elevada toxicidade e severas reações adversas, como vertigem, cefaléia e distúrbios gastrointestinais. O mecanismo de ação pelo qual o mitotano age ainda não foi completamente elucidado. Acredita-se que um metabólito ativo cloreto de acila seja responsável pela ação adrenocorticolítica. Considerando que os metabólitos do mitotano possam apresentar relação com a toxicidade e/ou com a ação farmacológica, justifica-se o estudo do metabolismo do mitotano incluindo comparação com o metabolismo por fungos e a relação dos enantiômeros deste fármaco com efeitos farmacológicos e rotas metabólicas. A formação de metabólitos do mitotano foi investigada através da biotransformação por fungos, cultivo celular e análise das amostras de pacientes sob tratamento. Os resultados de biotransformação revelaram metabólitos já conhecidos, porém produzidos por espécies de fungos não relatadas anteriormente. O estudo de metabólitos em cultivo celular foi determinante ao demonstrar que, apesar do excesso enantiomérico encontrado em plasma de pacientes, isso não pode ser correlacionado a rotas diferenciais de metabolismo dos enantiômeros, pois ambos produziram os mesmos metabólitos em cultivo celular, sendo que um deles, a cloridrina, sugerida como intermediária à formação do DDE, foi encontrada e, por isso, sua hipótese foi confirmada. A análise de plasma e urina de pacientes, revelou uma série de metabólitos ainda não identificados nestas matrizes, contribuindo com algumas hipóteses de metabolismo deste fármaco.

PALAVRAS-CHAVE: Mitotano, Metabólitos, Enantiômeros e Cultivo Celular

ABSTRACT

Mitotane is a chemotherapy drug widely used for the treatment of a rare and malignant endocrine cancer, called adrenocortical carcinoma. The treatment characterized by high toxicity and severe adverse reactions, such as dizziness, headache, and gastrointestinal disorders. The mechanism of action by which mitotane acts is not fully elucidated. It is believed that an active metabolite acyl chloride is responsible for adrenocorticolytic action. Since metabolites of mitotane can present relationship with toxicity and/or pharmacological action, it is necessary to study the metabolism of mitotane including comparison with the yeast metabolism and the relationship of the enantiomers of this drug with pharmacological effects and metabolic routes. Mitotane's metabolites production was investigated through biotransformation by fungi, cell culture and samples analysis of patients under treatment. Results of biotransformation revealed metabolites already known, but produced by fungi species not previously reported. The study of metabolites in cell culture was crucial to demonstrate that, despite the enantiomeric excess found in plasma of patients, this can not be correlated to differential routes of metabolism, since both enantiomers produced the same metabolites in cell culture, and one of them, the chlorohydrin, suggested as an intermediary to the formation of the DDE, was found and, therefore, his hypothesis was confirmed. Analysis of plasma and urine of patients, revealed a number of metabolites which have not been identified in these arrays, contributing with some hypotheses of this drug metabolism.

KEY-WORDS: Mitotane, Metabolites, Enantiomers, Cell Culture

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC – Adenoma Adrenocortical

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico

AMPc- Adenosina Monofosfato ciclíco

CAC – Carcinoma Adrenocortical

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CYP – Complexo Citocromo P

DAD – Diode Array Detector

DBH – Diclorodifenilmetanol

DDA – Ácido Diclorodifenilacético

DDD – Diclorodifenildicloroetano

DDE – Diclorodifenildicloroeteno

DDMS – Diclorodifenilcloroetano

DDMU- Diclorodifenilcloroeteno

DDNU – Diclorodifenileteno

DDOH – Diclorodifenil1-etanol

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DPM – Diclorodifenilmetano

EM – Espectrometria de massas

HPLC – High Proficiency Liquid Chromatography

IV – Espectrometria no Infravermelho

KOH – Hidróxido de Potássio

NOD – Non Obese Diabetic

Rf – Ratio de front

RMN de ^{1}H – Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

SCID - Severe Combined Immunodeficiency

TAC – Tumores Adrenocorticais

TACs – Tumores Adrenocorticais

TMS – Tetra Metil Silano

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1- CRITÉRIOS PARA DETERMINAÇÃO DO ESTÁGIO DE UM CARCINOMA ADRENOCORTICAL 9
TABELA 2 – SÍNDROMES DE HIPERSECREÇÃO E HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL..... 11
TABELA 3- RELAÇÃO DE CARGA-MASSA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS FRAGMENTOS GERADOS DO *o,p'*-DDT..... 52
TABELA 4- RELAÇÃO DE CARGA-MASSA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS FRAGMENTOS GERADOS DO *o,p'*-DDMU..... 57
TABELA 5- RELAÇÃO DE MASSA-CARGA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS FRAGMENTOS GERADOS DO *o,p'*-DDE..... 60
TABELA 6- INTENSIDADE RELATIVA DA DISTRIBUIÇÃO ISOTÓPICA DOS ÁTOMOS DE CLORO..... 61
TABELA 7 – SUGESTÃO DE ATRIBUIÇÕES DE CARBONOS E HIDROGÊNIOS DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3 DIOXOLANO..... 71
TABELA 8 – DADOS DE COLETA DE RAIO-X E PARÂMETROS DE REFINAMENTO DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO..... 73
TABELA 9- PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO METABÓLITO DO MITOTANO, o,p'- DBH, ENCONTRADO EM AMOSTRA DE URINA..... 89
TABELA 10- RELAÇÃO DE CARGA-MASSA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS FRAGMENTOS GERADOS DO α-OH-*o,p'*-DDCHO..... 92
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO..... 14
FIGURA 2 – HIPÓTESE DE METABOLISMO PARA A FORMAÇÃO DO ÁCIDO *o,p'*- DICLORODIFENILACÉTICO A PARTIR DO MITOTANO..... 16
FIGURA 3 – METABÓLITOS DO MITOTANO ENCONTRADOS EM AMOSTRA DE URINA DE PACIENTES..... 17
FIGURA 4 – REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO *p,p'*-DDA A PARTIR DO *p,p´*-DDT EM MEIO BÁSICO..... 19
FIGURA 5 - REAÇÃO DE DECLORINAÇÃO PROPOSTA PARA O DDT..... 20

FIGURA 6 - REAÇÃO DE DECLORINAÇÃO PROPOSTA PARA O DDD..... 20

FIGURA 7- BIOTRANSFORMAÇÃO DO DDT POR FUNGOS DA CLASSE WHITE ROT FUNGI..... 22

FIGURA 8- BIOTRANSFORMAÇÃO DO DDT POR FUNGOS DA CLASSE BROWN ROT FUNGI..... 23

FIGURA 9- BIOTRANSFORMAÇÃO DO DDT POR *Phlebia lindtneri* e *P. brevispora*..... 24

FIGURA 10 – SEQUÊNCIA DAS REAÇÕES DA SÍNTESE DO CARBINOL (A) E DO *o,p'-DDT* (B) 34

FIGURA 11 – REAÇÕES DE SÍNTESE DO *o,p'*-DDE (A) e do *o,p'*-DDMU (B)..... 36

FIGURA 12 – REAÇÃO DE SÍNTESE DO *o,p'*-DDA..... 37

FIGURA 13 – REAÇÃO DE SÍNTESE DO 2-[(2-CLOROFENIL) (4- CLOROFENIL)METIL]-1,3 DIOXOLANO..... 38

FIGURA 14 – REAÇÃO DE SÍNTESE DO 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)- 1-(4-CLOROFENIL)ETANOL..... 39

FIGURA 15 – ROTA SINTÉTICA DE OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS DO MITOTANO..... 46

FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO 2,2,2-TRICLORO 1-(2-CLOROFENIL)ETANOL..... 47

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO 2,2,2-TRICLORO 1-(2-CLOROFENIL)ETANOL..... 48

FIGURA 18- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO 2,2,2-TRICLORO 1-(2- CLOROFENIL)ETANOL EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 6,01 MINUTOS COM IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 49

FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO *o,p'*-DDT..... 50

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO *o,p'*-DDT..... 51

FIGURA 21- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDT EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 10,88 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO

ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 52

FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO *o,p'*-DDMU..... 55

FIGURA 23 - ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 10,88 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 56

FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO *o,p'*-DDE..... 57

FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO *o,p'*-DDE..... 58

FIGURA 26- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 9,57 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 59

FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO *o,p'*-DDA..... 62

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO *o,p'*-DDA..... 62

FIGURA 29 - ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDA EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 10,42 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 63

FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO *o,p'*-DBP..... 64

FIGURA 31- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 8,08 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 65

FIGURA 32– PRODUTOS FORMADOS DA HIDRÓLISE BÁSICA DO *o,p'*-DDD..... 66

FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO 2-[(2-CLOROFENIL) (4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO..... 67

FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO 2-[(2-CLOROFENIL) (4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO..... 68

FIGURA 35 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DO 2-[(2-CLOROFENIL) (4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO..... 69

FIGURA 36 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC DO 2-[(2-CLOROFENIL) (4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO..... 70
FIGURA 37 – FIGURA 37 – (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 10,87 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 72
FIGURA 38- MAPA DE DENSIDADE DO 2-[(2-CLOROFENIL) (4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO OBTIDO POR ANÁLISE CRISTALOGRÁFICA DE RAIOS-X..... 74
FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL..... 75
FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL..... 76
FIGURA 41 – MAPA DE CORRELAÇÃO 2,2-DICLORO-1- (2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL..... 77
FIGURA 42 – MAPA DE CORRELAÇÃO 2,2-DICLORO-1- (2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL..... 78
FIGURA 43 – ESPECTRO DE MASSAS DO 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL EXTRAÍDO EM 11,17 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 79
FIGURA 44- CROMATOGRAMA DE VARREDURA DO PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO OBTIDO POR GC-EM UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO 81
FIGURA 45- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DPM, METABÓLITO ENCONTRADO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 7,21 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 82
FIGURA 46- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,11 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 83
FIGURA 47- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE, METABÓLITO ENCONTRADO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,60 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO

POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 84
FIGURA 48- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDD (MITOTANO), RECUPERADO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO, EXTRAÍDO EM 9,60 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 84
FIGURA 49- CROMATOGRAMA DE VARREDURA DO URINA DE UM PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO OBTIDO POR GC-EM UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 86
FIGURA 50- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRODE MASSAS DO *o,p'*-DDA, METABÓLITO MAJORITÁRIO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 10,46 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 87
FIGURA 51- CROMATOGRAMA (A) E ESPECTRO (B) DO *o,p'*-DPM, METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 7,22 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 88
FIGURA 52- CROMATOGRAMA (A) E ESPECTRO (B) DO *o,p'*-DBH, METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,61 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 89
FIGURA 53- CROMATOGRAMA (A) E ESPECTRO (B) DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,10 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 90
FIGURA 54- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO α-OH-*o,p'*-DDCHO, EXTRAÍDO EM 10,18 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 91
FIGURA 55- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES

PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO METABÓLITO DE CONJUGAÇÃO, EXTRAÍDO EM 11,77 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO 93
FIGURA 56- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO α-OH-*o,p'*-DDA, EXTRAÍDO EM 10,92 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 94
FIGURA 57- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO METABÓLITO DE HIDROXILAÇÃO AROMÁTICA, EXTRAÍDO EM 8,75 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 95
FIGURA 58- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO METABÓLITO DE HIDROXILAÇÃO AROMÁTICA, EXTRAÍDO EM 11,60 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 96
FIGURA 59- *Cladosporium* sp. CULTIVADO EM MEIO BDA À 28°C COM 15 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 400X. (A, B, D). *Cladosporium* sp. CULTIVADO EM MEIO BDA À 28°C COM 15 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 1000X. (C, E, F)..... 97
FIGURA 60- *Mycelia sterilia* CULTIVADA EM MEIO BDA À 28°C COM 07 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 400X. (A) *Mycelia sterilia* CULTIVADA EM MEIO BDA COM 15 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 400X. (B). *Mycelia sterilia* CULTIVADA EM MEIO BDA À 28°C COM 15 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 1000X..... 98
FIGURA 61- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO *o,p'*-DDD PELO FUNGO *Cladosporium sp.,* EXTRAÍDO EM 8,98 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 98

FIGURA 62- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMS, METABÓLITO ENCONTRADO EM PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO *o,p'*-DDD PELO FUNGO *Cladosporium sp.,* EXTRAÍDO EM 9,41 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 99
FIGURA 63- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO o,p'-DDD PELO FUNGO *Mycelia sterilia,* EXTRAÍDO EM 8,98 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 100
FIGURA 64- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMS, METABÓLITO ENCONTRADO EM PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO o,p'-DDD PELO FUNGO *Mycelia sterilia,* EXTRAÍDO EM 9,41 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 101
FIGURA 65- MECANISMO DE DECLORINAÇÃO REDUTIVA PARA A BIOTRANSFORMAÇÃO DO DDT POR FUNGOS..... 102

FIGURA 66 - CROMATOGRAMA DA MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO UTILIZANDO COLUNA QUIRAL KROMASIL COM MEDIDAS DE 250X10 mm E FASE MÓVEL COMPOSTA DE ACETATO DE ETILA/ HEXANO 5:95 (v/v)..... 103
FIGURA 67 - CROMATOGRAMA DOS ENANTIÔMEROS (*S)-(-)-o,p'*-DDD e (*R)-(+)-o,p*'-DDD DO MITOTANO ISOLADOS ATRAVÉS DE SEPARAÇÃO QUIRAL POR CLAE PREPARATIVA..... 104
FIGURA 68 – RESULTADO DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COMPARANDO MISTURA RACÊMICA E ENANTIÔMEROS EM LINHAGEM CELULAR H295R..... 105

FIGURA 69- ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR NA LINHAGEM H295R COMPARANDO O 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3 DIOXOLANO (A) AO MITOTANO (B)..... 106

FIGURA 70- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DA CLORIDRINA, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO,

EXTRAÍDO EM 11,15 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 110
FIGURA 71- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,55 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 111
FIGURA 72- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,95 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 112
FIGURA 73- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,07 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 113
FIGURA 74- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DA CLORIDRINA, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *R-(+)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 11,15 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 114
FIGURA 75- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *R-(+)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,53 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 115
FIGURA 76- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *R-(+)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,95 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 116

FIGURA 77- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *R-(+)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,08 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 117
FIGURA 78- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DA CLORIDRINA, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 11,15 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 118
FIGURA 79- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,55 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 119
FIGURA 80- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,95 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 120
FIGURA 81- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMS, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,38 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 121
FIGURA 82- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,07 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO..... 122
FIGURA 83- HIPÓTESE DE METABOLISMO DE REIF et al (1974)……..…... 124

FIGURA 84 – HIPÓTESE INICIAL DA ROTA METABÓLICA DO DDT E DO

DDD..... 125

FIGURA 85- HIPÓTESE DE JENSEN et al SOBRE O METABOLISMO DO MITOTANO..... 126

FIGURA 86- MECANISMO DE ATIVAÇÃO METABÓLICA DO CLORANFENICOL POR MICROSSOMAS DE FÍGADO DE RATO……..... 127

FIGURA 87- HIPÓTESE DE CAI SOBRE O METABOLISMO DO MITOTANO VIA α E β- HIDROXILAÇÃO..... 128

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....4
2 OBJETIVOS....5
2.1 OBJETIVO GERAL....5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS....5
2.2.2 Pesquisa de Metabólitos em Amostras Biológicas....6
2.2.3 Estudo da Biotransformação do Mitotano por Fungos....6
2.2.4 Obtenção dos Enantiômeros do Mitotano....6
2.2.5 Cultivo Celular....7
3 REVISÃO DA LITERATURA....8
3.1 TUMORES ADRENOCORTICAIS....8
3.1.1 Carcinoma Adrenocortical....8
3.2 MITOTANO....12
3.3 METABOLISMO DO MITOTANO....15
3.4 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS VIA SÍNTESE ORGÂNICA....18
3.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DO MITOTANO POR FUNGOS....20
3.5.1 Biotransformação do DDT....21
3.6 PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS....24
3.7 METABOLISMO DE COMPOSTOS QUIRAIS....25
3.8 SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS QUIRAIS....28
3.9 CULTIVO CELULAR DO MITOTANO NA FORMA RACÊMICA E DE ENANTIÔMEROS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E METABOLISMO....29
4 MATERIAL E MÉTODOS....31
4.1 MÉTODOS GERAIS....31
4.1.1 Análise de Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear....31
4.1.2 Análise de Cromatografia à Gás Acoplada a Espectrômetro de Massas....32
4.1.3 Análise de Cristalografia de Raio-X....32
4.1.4 Cultivo Celular....33
4.2 SÍNTESE DOS METABÓLITOS E DERIVADOS DO MITOTANO....34
4.2.1 Síntese do 2,2,2-tricloro 1-(2- clorofenil)etanol....34
4.2.2 Síntese do 1,1,1-tricloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etano (*o,p'*-DDT)....35
4.2.3 Síntese do 1,1-dicloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etileno (*o,p'*-DDE) e....36
4.2.4 Síntese do Ácido 2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)acético (*o,p*'-DDA) e do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano....37

4.2.5 Síntese do 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil)-1-(4-clorofenil)etanol 38
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DO MITOTANO EM AMOSTRAS DE PACIENTES SOB TRATAMENTO COM MITOTANO 40
4.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DO MITOTANO POR FUNGOS 41
4.4.1 Biotransformação do Mitotano por Fungos - Triagem das Cepas 41
4.4.2 Biotransformação do mitotano em escala preparativa 41
4.5 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA 43
4.6 CULTIVO CELULAR 44
4.6.1 Avaliação da Viabilidade Celular em Linhagem H295R dos Enantiômeros e Mistura Racêmica do Mitotano Pelo Método *MTS* 44
4.6.2 Estudo do Metabolismo do Mitotano na Forma Racêmica e de seus enantiômeros em Linhagem H295R 45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 46
5.1 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS DO MITOTANO VIA SÍNTESE QUÍMICA 46
5.1.1 Síntese do 2,2,2-tricloro 1-(2- clorofenil)etanol 47
5.1.2 Síntese do 1,1,1-tricloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etano (*o,p'*-DDT) 50
5.1.3 Síntese do 1,1-dicloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etileno (*o,p'*-DDE) 54
e Preparo do 1-cloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil) etileno (*o,p'*-DDMU) 54
5.1.4 Síntese do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano e do ácido 2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)acético (*o,p*'-DDA) 61
5.1.4.1 Análise por cristalografia de raios- X 73
5.1.5 Síntese do 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil)-1-(4-clorofenil)etanol 75
5.2 PESQUISA DE METABÓLITOS DO MITOTANO EM PLASMA E URINA DE PACIENTES SOB TRATAMENTO COM MITOTANO 81
5.2.1 Pesquisa de Metabólitos em Plasma de Pacientes 81
5.2.2 Pesquisa de Metabólitos em Urina de Pacientes 86
5.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DO MITOTANO POR FUNGOS 97
5.4 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO MITOTANO 103
5.5 CULTIVO CELULAR 105
5.5.1 Avaliação da Viabilidade Celular em Linhagem H295R dos Enantiômeros e Mistura Racêmica do Mitotano Pelo Método MTS 105
5.5.2 Avaliação da Viabilidade Celular do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano em Linhagem H295R 106
5.5.3 Pesquisa de Metabólitos dos Enantiômeros do Mitotano em Cultivo Celular 108
5.5.3.1 Resultados do cultivo celular com a mistura racêmica 109
5.5.3.2 Resultados do cultivo celular com o enantiômero *R-(+)* 114
5.5.3.3 Resultados do cultivo celular com o enantiômero *S-(-)* 118

5.6 DISCUSSÃO SOBRE HIPÓTESES METABÓLICAS DO MITOTANO E DOS RESULTADOS OBTIDOS.....124

6 CONCLUSÃO.....130

7 REFERÊNCIAS 132

8 ANEXOS.....147

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma adrenocortical é um distúrbio endócrino maligno de prognóstico obscuro. Apesar de rara, a região sul do Brasil apresenta índices que chegam a atingir 10 vezes a média mundial. O tratamento primário para este câncer consiste na ressecção cirúrgica. Nos casos em que a adrenalectomia não é indicada, devido ao estágio avançado do tumor ou metástase, como nos casos de pós-adrenalectomia, aconselha-se o uso do quimioterápico mitotano.

A utilidade do mitotano no tratamento secundário da síndrome de Cushing e do carcinoma adrenocortical ou hiperfunção adrenal levou a *Food and Drug Administration* a aprovar o uso humano, apesar do conhecimento limitado sobre o modo de ação, efeitos colaterais e metabolismo.

O mitotano é uma substância análoga ao diclorodifeniltricloroetano (DDT), de característica lipofílica e possui um centro estereogênico. Análise quiral por cromatografia líquida de alta eficiência de plasma de pacientes submetidos à terapia com o mitotano mostraram o predomínio de uma das formas enantioméricas da droga, o isômero *R(+)* indicando metabolização preferencial para um dos isômeros. Portanto, é provável que exista uma diferença farmacológica e/ou de metabolismo entre os enantiômeros (ZANCANELLA, 2008).

Devido à elevada toxicidade causada em pacientes sob tratamento com mitotano, faz-se necessária a pesquisa das causas de sua toxicidade e de alternativas que possam aumentar a possibilidade de cura e reduzir os efeitos colaterais.

Este trabalho visa a obtenção e caracterização dos metabólitos do mitotano a fim de investigar suas vias de metabolismo buscando relação entre os metabólitos encontrados em plasma e urina de pacientes em tratamento com este quimioterápico com metabólitos produzidos por biotransformação com fungos e por cultivo celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar metabólitos do mitotano e aplicá-los como padrão na detecção em amostras biológicas humanas, produtos de biotransformação por fungos e produto de cultivo celular dos enantiômeros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Obtenção Via Síntese Química de Metabólitos e Derivados do Mitotano

a. Síntese e Caracterização Espectrométrica do 2,2,2-tricloro 1-(2-clorofenil) etanol

b. Síntese e Caracterização Espectrométrica do 1,1,1-tricloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etano (*o,p'*-DDT)

c. Síntese e Caracterização Espectrométrica do 1,1-dicloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etileno (*o,p'*-DDE)

d. Preparo e Caracterização Espectrométrica do 1-cloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil) etileno (*o,p'*-DDMU)

e. Síntese e Caracterização Espectrométrica do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano

f. Síntese e Caracterização Espectrométrica do ácido 2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)acético (*o,p*'-DDA)

g. Síntese e Caracterização Espectrométrica do 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil)-1-(4-clorofenil)etanol

2.2.2 Pesquisa de Metabólitos em Amostras Biológicas

a. Preparo das amostras biológicas de plasma e urina de pacientes submetidos a tratamento com mitotano

b. Purificação das amostras biológicas

c. Identificação dos metabólitos por CG-EM utilizando como padrão os produtos obtidos por síntese

2.2.3 Estudo da Biotransformação do Mitotano por Fungos

a. Triagem das cepas

b. Experimentos em escala preparativa

c. Purificação das amostras de biotransformação

d. Identificação dos metabólitos por CG-EM utilizando como padrão os produtos obtidos por síntese

2.2.4 Obtenção dos Enantiômeros do Mitotano

a. Padronização das condições de separação da mistura racêmica do mitotano por CLAE preparativa

b. Separação dos enantiômeros por CLAE preparativa em quantidade suficiente para os experimentos de cultivo celular

2.2.5 Cultivo Celular

a. Avaliação da citotoxicidade dos enantiômeros *R(+)* e *S(-)* comparados à mistura racêmica em células H295R

b. Avaliação da citotoxicidade do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano em células H295R

c. Pesquisa de metabólitos do mitotano produzidos em cultivo celular a partir dos enantiômeros e mistura racêmica

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TUMORES ADRENOCORTICAIS

O carcinoma adrenocortical e o adenoma adrenocortical, embora diferentes, são avaliados na literatura juntos sob o título de tumores adrenocorticais (CIFTCI et al., 2001).

Tumores adrenocorticais podem ser hormonalmente silenciosos (não-funcionais) ou secretores de hormônios (funcionais). Tumores funcionais produzem sintomas, como resultado do excesso de secreção de hormônios corticais (PHAN, 2007).

Esses tumores constituem aproximadamente 6% de todos os tumores diagnosticados em crianças, sendo que crianças com tumores adrenocorticais têm melhor prognóstico que adultos, pois a maioria das crianças apresenta sintomas endócrinos enquanto que adultos apresentam tumores não-funcionais (NG, LIBERTINO, 2003).

3.1.1 Carcinoma Adrenocortical

Carcinoma adrenocortical (CAC) é um processo patológico endócrino raro, com incidência mundial estimada entre 1-2 casos/ milhão de habitantes por ano, definida por apresentação clínica heterogênea, de prognóstico obscuro e com escassos regimes terapêuticos. Apesar de ser um câncer de baixa ocorrência, a taxa de CAC pediátrica só no sul do Brasil é 15-20 vezes maior que no resto do mundo (PHAN, 2007; CIFTCI et al., 2001; RIBEIRO et al., 2000).

O carcinoma apresenta distribuição bimodal, podendo ocorrer em todas as idades, com dois picos sendo o primeiro antes dos 10 anos de idade e outro na quarta ou quinta década de vida (CIFTCI et al., 2001).

A maioria dos adultos que sofrem de CAC são bioquimicamente e clinicamente assintomáticos, sendo encontrada uma prevalência no sexo

feminino e na localização do tumor no lado esquerdo, sendo a bilateralidade relatada entre 2 a 10% dos casos (CRAND; BORSON-CHAZOT; BRUE, 2009).

A etiologia ainda é desconhecida. Alterações na comunicação intercelular, produção local de fatores de crescimento, citocinas e expressão anormal de receptores ectópicos nas células adrenais tumorosas têm implicado no crescimento de células adrenais, hiperplasia, formação de tumor e produção hormonal autônoma (ALLOLIO; FASSNACHT, 2006).

Muitos genes relacionados a algumas síndromes hereditárias têm sido implicados nas hiperplasias adrenocorticais, incluindo: CYP21 (hiperplasia adrenal congênita), PRKAR1A (síndrome de Carney), Menin (hiperplasia múltipla tipo I), GNASI (síndrome de McCune-Albright), expressão exacerbada do gene IGF (síndrome de Beckwith-Wiedemann) e a síndrome de Li Fraumeni (gene p53 em 17p13), fortemente relacionados com a tumorigênese do CAC (PHAN, 2007).

Mutações do gene p53 são as mais comuns em câncer humano. Foram encontrados pontos de mutação idênticos em p53 em mais de 90% das crianças que tem CAC no sul do Brasil (BARLASKAR, HAMMER, 2007; RIBEIRO et al., 2000).

3.1.1.1 Estágios

O carcinoma adrenocortical é um neoplasma endócrino com pobre prognóstico. A maior parte dos pacientes é diagnosticada com estágio avançado da doença. A classificação de MacFarlane (Tabela 1) é utilizada para demonstrar o estágio da doença.

TABELA 1- CRITÉRIOS PARA DETERMINAÇÃO DO ESTÁGIO DE UM CARCINOMA ADRENOCORTICAL

ESTÁGIO	**CRITÉRIO**
I	< 5 cm, confinado na glândula adrenal
II	> 5 cm, confinado na glândula adrenal
III	Invasão local ou positiva de linfonodos
IV	Invasão local e positiva de linfonodos ou metástase distante

FONTE: GONZALEZ et al, 2007.

Aproximadamente 60% dos carcinomas diagnosticados são de estágio IV, com apenas 2% sendo do estágio II. Infelizmente, muitos dos carcinomas, em particular o não-funcional, apresentam um extenso tamanho tumoral (GONZALEZ et al., 2007).

Metástase em carcinoma adrenocortical é comum, sendo que os sítios mais comuns são: fígado, pulmões e linfonodos, sendo menos comum nos ossos e diafragma. Apresentação de mitose atípica, necrose, invasão capsular e vascular, grande tamanho do tumor têm elevadas chances de conferir malignidade. Taxas estatisticamente significativas de sobrevivência prolongada são descritas em meninas, com tumores localizados, pacientes que se submeteram a procedimento de ressecção do tumor, e aqueles que tiveram um intervalo livre da doença maior que 12 meses (TERZOLO et al, 2007).

3.1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico precoce não é comum. Quando diagnosticado, o CAC é usualmente extenso e já invade órgãos adjacentes, mesmo se o espalhamento de metástase por órgãos distantes ainda não está presente. A detecção envolve o histórico clínico do paciente e exames físicos, seguidos de testes laboratoriais sobre a hiperprodução de hormônios do córtex adrenal e hipófise, seus metabólitos e precursores de sua biossíntese (WOOTEN; KING, 1993).

A distinção de um tumor maligno ou benigno é muito delicada de ser feita. No entanto, alguns critérios podem ser empregados, como aspectos macroscópicos que incluem: peso do tumor, hemorragia, invasão do tumor pela cápsula e invasão vascular grosseira. Tumores benignos tendem a ser menores e homogêneos em secção cruzada. O tamanho (maior que 5-6 cm^3) e a presença de metástase distante são indicadores absolutos de malignidade (JAROLIM, BREZA, WUNDERLICH, 2003).

Tumores de glândulas adrenais malignos ou benignos estão relacionados com síndromes de hipersecreção dependente do local afetado. Estas síndromes incluem hipersecreção de aldosterona (síndrome de Conn), de cortisol (síndrome de Cushing), andrógenos (síndrome androgenital) e

adrenalina ou noradrenalina (feocromocitoma) (JAROLIM, BREZA, WUNDERLICH, 2003).

O diagnóstico dessas síndromes pode ser feito pela análise laboratorial de quantificação plasmática dos hormônios correspondentes (tabela 2).

TABELA 2 – SÍNDROMES DE HIPERSECREÇÃO E HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

SÍNDROMES DE HIPERSECREÇÃO	**QUANTIFICAÇÃO HORMONAL EM PLASMA**
Corticóides	Cortisol
Mineralocorticóides	Aldosterona, Renina e Angiotensina II
Hormônios Andrógenos	Androstendiona, Dehidroandrostendiona, Testosterona livre e 17-Cetoesteróide

FONTE: JAROLIM, BREZA, WUNDERLICH, 2003

Com exceção ao feocromocitoma, a detecção de mais de 1000 nmol/24 horas de adrenalina e mais de 500 nmol/ 24 horas de noradrenalina em urina é considerado diagnóstico positivo (JAROLIM, BREZA, WUNDERLICH, 2003).

3.1.1.3 Tratamento

O tratamento de primeira escolha do CAC é cirúrgico, por meio de uma adrenalectomia, constituindo a única opção potencialmente curativa (PHAN, 2007; CIFTI et al., 2001; LACROIX, HONTELA, 2003).

Adrenolactomia é indicado para síndromes de hiperfunção tanto do córtex adrenal quanto da medula causada por tumor ou hipertrofia cortical, ou para tumores adrenais maiores que 3 cm de diâmetro sem atividade hormonal, no qual há suspeita de malignidade. Nos casos em que a ressecção completa não é possível, é indicado o uso de mitotano (LIOU; KAY, 2000).

Embora a ressecção cirúrgica completa seja a única opção potencialmente curativa para pacientes com tumores localizados, a reincidência após a cirurgia é comum. A terapia adrenolítica com mitotano, sozinho ou em combinação com quimioterápicos citotóxicos constitui o tratamento primário para pacientes com CAC recorrente (SCHTEINGART, 2007).

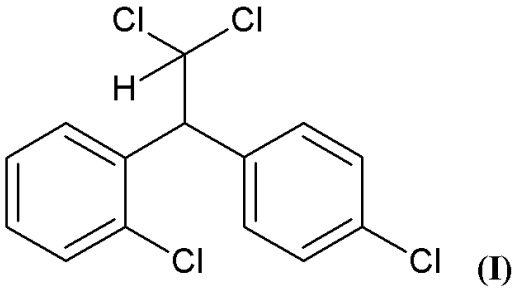
Vários regimes quimioterápicos têm sido combinados com o mitotano, os quais teoricamente incrementam a eficácia ao agente citotóxico por bloqueio celular do efluxo (MALUF, OLIVEIRA, LALLI, 2011).

Os regimes quimioterápicos mais comuns combinados com mitotano são: cisplatina/ etoposídeo e cisplatina/ etoposídeo/ doxorrubicina. O primeiro esquema, associado ao mitotano, tem uma taxa de resposta de aproximadamente 50% com um tempo médio de sobrevivência de 2 anos. Alternativamente um regime de estreptozotocina associado ao mitotano tem induzido a taxa de resposta de 35% com tempo médio de sobrevida de 16 meses (ZANCANELLA et al., 2006; CIFTI et al., 2001; PHAN, 2007).

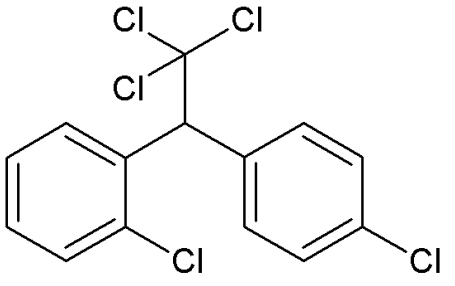
Contudo, nenhum tratamento tem provado ser, unicamente, tão eficaz quanto o mitotano. Pacientes que são responsivos ao mitotano apresentam melhor prognóstico que aqueles nos quais a doença progride (PHAN, 2007; HEILMANN et al., 2001; JAROLIM, BREZA, WUNDERLICH, 2003).

3.2 MITOTANO

O mitotano ou *o,p*'-diclorodifenildicloroetano (*o,p*'-DDD- I), foi caracterizado em 1960 como um metabólito do pesticida organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT- II), revelado ao final da década de 1930 por Paul Müller. Assim como o DDT, o mitotano é uma molécula de baixa polaridade e, por isso, bastante solúvel em solventes apolares, tal como o hexano, além de ser relativamente estável não sofrendo oxidação pelo ar.



(I)



(II)

Banido para uso desde a década de 70 nos Estados Unidos, o DDT e seus metabólitos ainda estão presentes no meio ambiente como resíduos detectáveis no solo, em geleiras e na fauna, devido ao seu efeito persistente e

bioacumulativo nas cadeias alimentares. Ainda assim, este pesticida é utilizado pela América Central e Índia para controle de pestes, notavelmente em áreas de sensibilidade a malária (LACROIX, HONTELA, 2003, HEBERER & DUNNBIER, 1999).

O DDD é o metabólito do DDT mais importante por seus efeitos altamente deletérios na biossíntese de corticoesteroides em várias espécies. Sua alta especificidade para a glândula adrenal tem lhe conferido um papel importante como quimioterápico (PUORNOMO, KAMEI, KONDO, 2008).

Conhecido como medicamento órfão, o mitotano é aprovado pela FDA para o uso específico no tratamento de CAC. Este fármaco exerce uma ação citotóxica específica nas células adrenocorticais produzindo degeneração focal da zona fascicular e particularmente da reticular, enquanto mudanças na zona glomerulosa são mais leves (EMEA, 2007).

O mitotano tem sido usado como terapia de primeira escolha para CAC inoperável, causando necrose tecidual após ser captado pelas glândulas adrenais (BREUNER et al., 2000).

A terapia com mitotano é responsiva entre 34 e 61% dos casos, podendo ser usado como terapia primária e adjuvante no tratamento do CAC assim como no excesso de produção de glicocorticoides devido ao tumor de glândula hipófise e síndrome de Cushing (HERMANSSON et al., 2007).

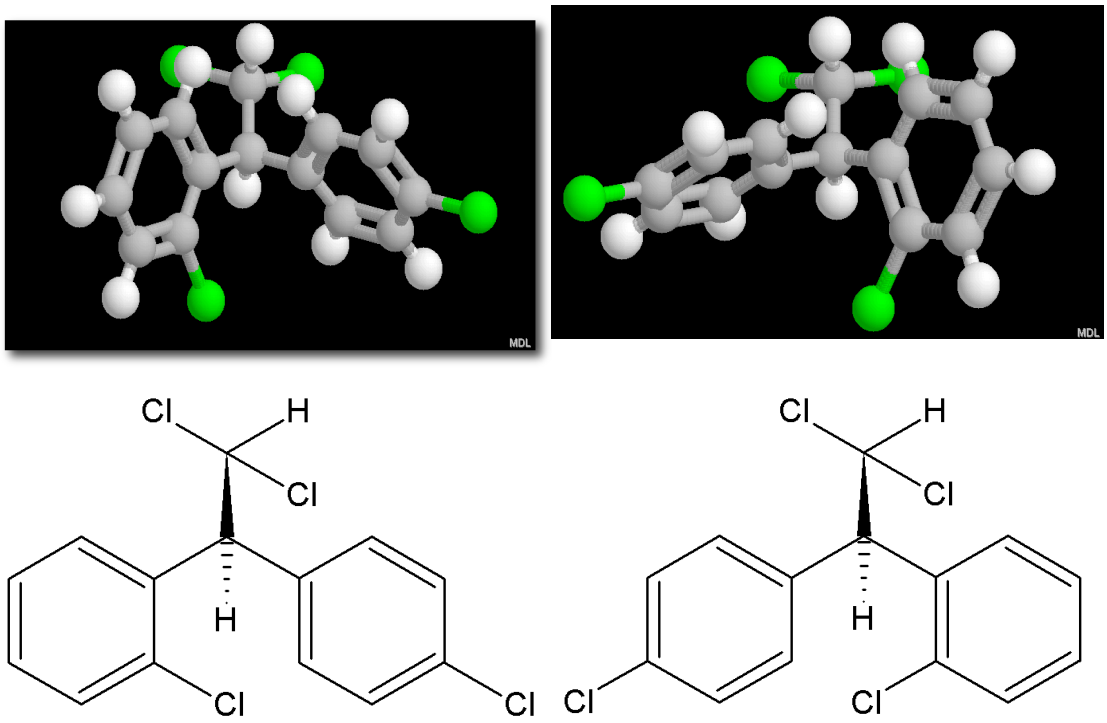
A terapia com mitotano tem sido associada à significativa toxicidade. O intervalo de dose varia de 2 a 16 g por dia atingindo concentrações terapêuticas plasmáticas ótimas entre 14 e 20 μg/mL. Porém, os efeitos tóxicos ocorrem em níveis superiores a 22 μg/mL sendo, portanto, um fármaco de difícil ajuste da dose devido à estreita janela terapêutica (FRANCIA et al., 2006).

Não obstante, devido ao fato do mitotano apresentar meia-vida prolongada e se acumular no tecido adiposo, este funcionará como um reservatório no qual o fármaco poderá ser liberado em altas concentrações quando o paciente apresentar rápida perda de peso. Reações adversas usualmente aumentam com o tempo, mesmo que a dose seja mantida. Como a janela terapêutica é estreita, isso pode resultar em toxicidade de um paciente que tenha alcançado a concentração terapêutica antes de perder peso (NG, LIBERTINO, 2003; PHAN, 2007).

As reações adversas do mitotano, as quais são dose-dependentes, incluem sintomas gastrointestinais (80% dos pacientes), como náusea e anorexia, sintomas de toxicidade neuromuscular (40%), como letargia, fraqueza, sonolência, confusão mental, depressão e dor de cabeça. Quase todos os pacientes em terapia com mitotano apresentam insuficiência adrenal e precisam fazer reposição esteroidal (TERZOLO et al, 2008).

A presença de um estereocentro na molécula do mitotano permite a existência de um par de enantiômeros (Figura 1). A configuração absoluta do mitotano foi obtida através da declorinação redutiva dos enantiômeros do *o,p'*-DDT (BUSER, MULLER, 1995).

Semelhante ao DDT, foi comprovado que o isômero *R* do mitotano é dextrogiro, enquanto que o isômero *S* é levógiro (CANTILLANA & ERIKSSON, 2008).



(S)-(-)- o,p'-DDD *(R)-(+)- o,p'*-DDD

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO

Embora alguns estudos demonstraram a relação entre os enantiômeros do mitotano e a citotoxicidade, um aspecto importante da terapia com o mitotano, ainda não mencionado na literatura, é a possibilidade de cada

enantiômero sofrer uma rota metabólica diferente, produzindo diferentes metabólitos. Como ocorre com várias substâncias biologicamente ativas, a atividade e/ou metabolismo podem não ser iguais para os dois enantiômeros (FANG, 1979; LOANNIDES, 2010).

Em um estudo farmacocinético com *göttingen minipigs,* Cantillana et al. (2009) demonstraram que apesar de encontrado um excesso enantiomérico no plasma animal, este fato não estaria relacionado à absorção preferencial, já que a dosagem plasmática encontrada logo após a administração oral era equivalente para os enantiômeros. Sendo a seletividade enantiomérica possivelmente atribuída ao metabolismo (CANTILLANA et al. 2009).

3.3 METABOLISMO DO MITOTANO

O mitotano é comercializado na forma de racemato com o nome de Lysodren® na forma de comprimidos contendo 500 mg do fármaco. O primeiro tratamento com sucesso de um paciente com carcinoma adrenocortical utilizando mitotano foi relatado em 1960 (BERGENSTAL et al., 1960; EMEA, 2007).

Após a administração oral, 60% da dose é absorvida e 20 a 30% é armazenada nos tecidos, principalmente adiposo. Uma concentração plasmática máxima é obtida entre 3 e 5 horas e um equilíbrio no plasma e tecidos é alcançado no período de 12 horas. Podem ser necessários meses para a saturação da gordura corporal, dependendo do índice de massa corpórea e do perfil metabólico de cada paciente (HEILMANN et al., 2001; PHAN, 2007).

A ação adrenocorticolítica do mitotano não é bem esclarecida, sendo que o efeito farmacológico pode ser atribuído ao próprio mitotano (na forma de mistura racêmica ou a um dos enantiomêros) ou aos metabólitos formados.

A hipótese mais aceita é de que a morte celular induzida pelo fármaco no córtex adrenal ocorre após uma hidroxilação catalisada pela CYP e uma subsequente desidro-halogenação espontânea na cadeia ß-carbônica lateral do *o,p'*-DDD (Figura 2). O metabólito resultante, haleto de acila - altamente

reativo, liga-se covalentemente às proteínas mitocondriais reagindo com macromoléculas de células do córtex adrenal (CAI et al., 1995).

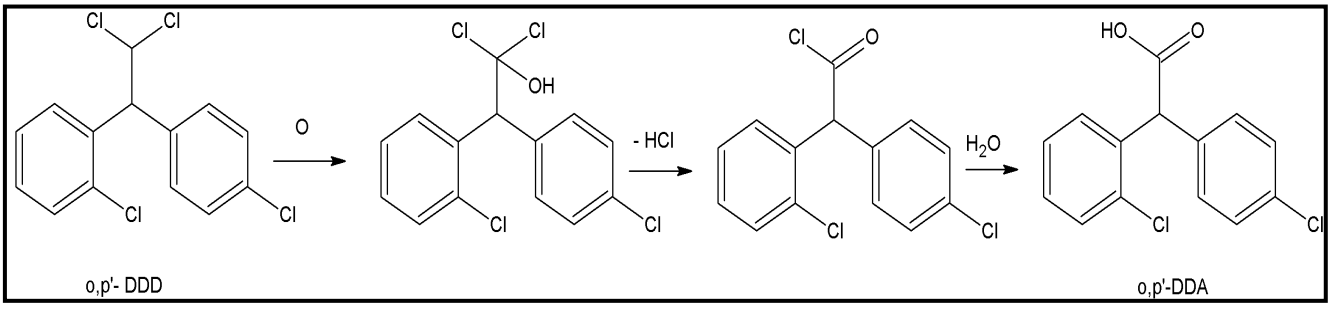


FIGURA 2 – HIPÓTESE DE METABOLISMO PARA A FORMAÇÃO DO ÁCIDO *o,p'*-DICLORODIFENILACÉTICO A PARTIR DO MITOTANO

Este suposto mecanismo adrenolítico do mitotano causaria alterações na função mitocondrial, na qual o mitotano seria metabolicamente ativado por um citocromo P450 adrenal específico. Uma vez em sua forma ativada, ele bloqueia as reações mediadas pelo citocromo P450 como a 11-ß-hidroxilação de esteroides adrenais, alterando o metabolismo extra-adrenal do cortisol e de androgênios, resultando na redução da produção de glicocorticóides e causando necrose seletiva do tecido adrenocortical (REIF et al, 1974; CAI et al., 1995; SCHTEINGART, 2007).

Portanto para o mitotano, subsequente à hidroxilação enzimática da diclorometila, haveria declorinação espontânea gerando o haleto de acila, o qual poderia acilar bionucleófilos adrenocorticais ou fornecer o ácido diclorodifenilacético, *o,p'*-DDA (Figura 2) (CAI et al, 1995, JENSEN et al, 1987).

O mitotano tem efeitos diferentes na córtex adrenal entre diferentes espécies. Ele causa atrofia em cachorros e humanos, mas é inativo em ratos, camundongos, coelhos e macacos (REIF et al. 1974).

Esse fármaco é capaz de inibir a atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase adrenal em cachorros e a estimular a ACTH na esteroidogênese *in vivo*, porém não *in vitro*. Esse dado sugere que o mitotano seja um pró-farmaco e um de seus metabólitos seja responsável pela ação esperada e não o próprio mitotano (REIF et al. 1974).

O sítio de ação do mitotano pode estar localizado entre o receptor de ACTH e a produção do AMPc dentro da cascata sinalizadora que leva à síntese

do cortisol. Esta cascata é composta de receptores de ACTH, os quais ativam a proteína Gs uma vez que o ACTH está ligado, o qual responde estimulando a adenilato ciclase a produzir AMPc. Este, por sua vez, age agudamente estimulando a esteroidogênese por ativação de múltiplos órgãos. A esteroidogênese é continuamente regulada pelo AMPc o qual ativa a transcrição de enzimas esteroidogênicas responsáveis pela conversão do colesterol no esteroide apropriado de acordo com o tecido e a espécie (LACROIX, HONTELA, 2003).

O mitotano (*o,p*'- DDD) apresenta os seguintes metabólitos descritos na literatura: metabólitos hidroxilados em diferentes posições, a olefina correspondente (*o,p*'- DDE) e o metabólito carboxilado (*o,p'*-DDA) (REIF et al.1974; CAI et al, 1995, JENSEN et al, 1987).

Um estudo de metabolização do mitotano revelou a presença de alguns metabólitos na urina de pacientes sob tratamento com a droga. O ácido *o,p'*-diclodifenilacético (Figura 3- IV) é considerado o metabólito principal (REIF et al., 1974).

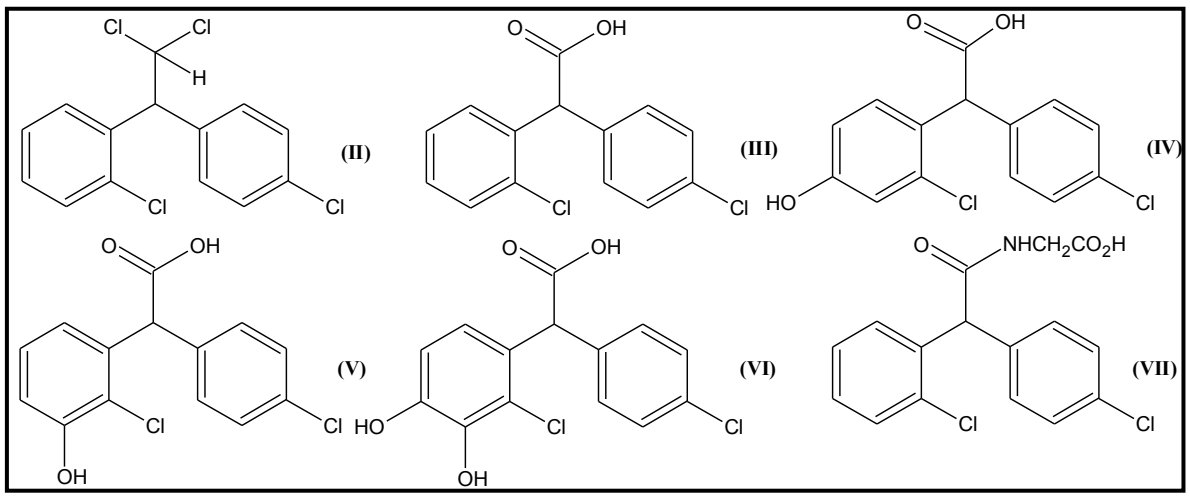
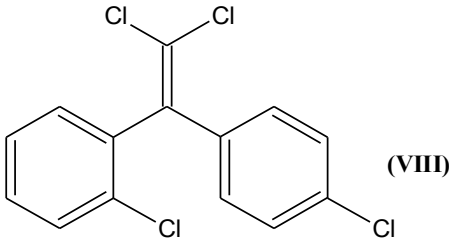


FIGURA 3 – METABÓLITOS DO MITOTANO ENCONTRADOS EM AMOSTRA DE URINA DE PACIENTES

FONTE: REIF et al., 1974.

A rota metabólica do mitotano ainda não está completamente esclarecida, atribuindo-se o efeito farmacológico ao próprio mitotano ou aos seus metabólitos: de hidroxilação, *o,p*'- DDE (VIII) ou *o,p*'- DDA (III) (FRANCIA et al., 2006).



(VIII)

Altas doses que são necessárias em sua administração indicam que o fármaco se converte em um metabólito ativo *in vivo.*

3.4 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS VIA SÍNTESE ORGÂNICA

Alguns metabólitos do mitotano podem ser obtidos por síntese orgânica. O tratamento do *p,p'*-DDT com base forte pode fornecer produtos de desidrohalogenação dentre outros, dependendo das condições reacionais. Em condições mais brandas pode ser obtido o *p,p'*-DDE. Em condições mais enérgicas é provável a obtenção do *p,p'*-DDA (ROLL, BELTRAME, 1971; GRUMMITT et al., 2008).

Cristol e Haller descreveram em 1945 a reação de síntese do ácido *o,p*'-diclorodifenilacético (*o,p*'-DDA) a partir do *o,p'*-DDT (1,1,1-tricloro-2-*o*-clorofenil-2-*p*-clorofeniletano). O produto é obtido através da hidrólise do *o,p'*-DDT em solução de hidróxido de bário octahidratado sob temperatura de 175°C utilizando como solvente de elevado ponto de ebulição o etilenoglicol. A reação ocorre em refluxo por 3 horas e o produto de descarboxilação do ácido, o *o,p*'-diclorodifenilmetano (*o,p'*-DPM) pode ser obtido a temperaturas superiores a 190°C.

Grummitt; Buck e Egan (1955) relatam a reação de formação do ácido *p,p*'- diclorodifenilacético (*p,p'*-DDA) a partir do *p,p'*- DDT utilizando hidróxido de potássio aquoso e como solvente o dietilenoglicol, a temperatura de 134-137°C, em refluxo por 6 horas (Figura 4). A reação descrita envolve a formação de um intermediário olefínico, o 1,1 dicloro 2-p-clorofenil-2-p-clorofeniletileno (*p,p'*- DDE).

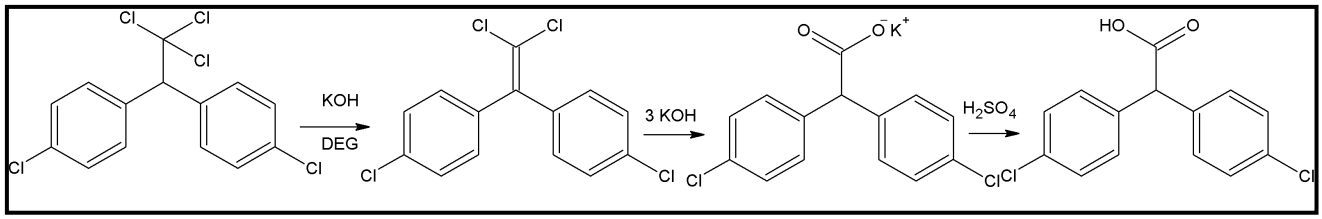


FIGURA 4 – REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO *p,p'*-DDA A PARTIR DO *p,p'*-DDT EM MEIO BÁSICO

Uma alternativa para obtenção do *o,p'*-DDA seria converter o *o,p'*-DDD em um composto de Gringard e tratá-lo com dióxido de carbono (ZEE-CHENG & CHENG, 1948).

O produto da reação obtido (*o,p'*-DDA) pode ser identificado preliminarmente por cromatografia em camada delgada utilizando como fase móvel ácido acético/heptano 1:4 (v/v), conforme artigo de Sinsheimer et al, 1971, para identificação do *o,p'*-DDA como metabólito urinário de pacientes em uso do mitotano.

Dentre as reações descritas na literatura envolvendo transformação do DDT e do DDD foi encontrado um estudo da degradação do DDT, no qual foi observada a fotólise direta por radiação ultravioleta, que ocorre por mecanismo de transferência de carga. Os produtos de desidrohalogenação do DDT (DDE, DDD e DBP- *p,p*'-diclorobenzofenona) são revelados na presença de dietilamina e irradiação por luz UV a 310 nm. Após irradiação por 10 minutos em acetona, 80% do DDT é convertido em DDD, DDE, DDMU, e DBP, respectivamente por declorinação redutiva, oxidação, isomerização e clorinação. Sob irradiação UV certos organoclorados aceitam um elétron de um doador, como trietilamina, para gerar o ânion radical, o qual sofre rapidamente desalogenação (HONG et al., 1997; KAMANAVALLI, NINNEKAR, 2004; CHITSAN, CHANG, 2007).

O DDD e DDE são metabólitos do DDT tão estáveis e persistentes quanto seu precurssor. DDT, DDD e DDE podem ser declorinados a um produto livre de cloro numa reação de fase líquida a 40ºC (Figuras 5 e 6). O processo consiste do tratamento com NaOH e subsequente declorinação catalítica com catalisador de Pd/C. Uma mistura de 2-propanol e metanol é usada como solvente para aumentar a atividade catalítica do Pd/C (UKISU, 2008).

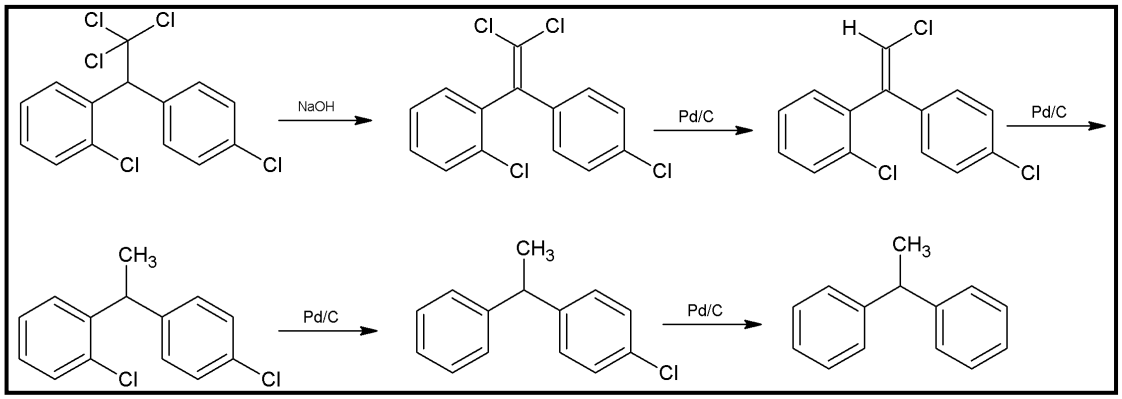


FIGURA 5 - REAÇÃO DE DECLORINAÇÃO REDUTIVA PROPOSTA PARA O DDT
FONTE: UKISU, 2008

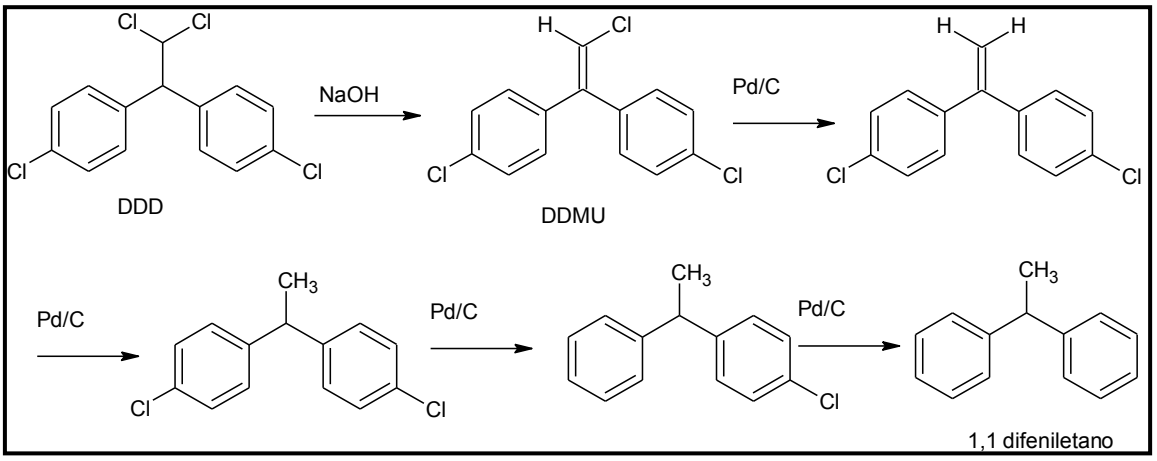


FIGURA 6 - REAÇÃO DE DECLORINAÇÃO REDUTIVA PROPOSTA PARA O DDD
FONTE: UKISU, 2008

3.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DO MITOTANO POR FUNGOS

As enzimas responsáveis pelo metabolismo primário em mamíferos podem ter correspondentes em microrganismos. Dessa forma, é possível teoricamente encontrar metabólitos de um fármaco produzido por mamíferos em produtos de biotransformação por microrganismos (AZERAD, 1999).

O termo biotransformação de fármacos pode ser definido como a conversão química de fármacos em outros compostos no organismo. As propriedades físico-químicas, por exemplo, lipofilicidade, que incapacitam alguns compostos de serem absorvidos prontamente pelo organismo tenderiam

a impedir sua fácil excreção. Consequentemente, eles iriam acumular no tecido adiposo causando efeitos deletérios. Os processos metabólicos têm sido adaptados durante a evolução para converter (biotransformar) compostos estranhos aos organismos em derivados de grande polaridade e fácil excreção (CHASSEAUD, HAWKINS, 2007).

A biotransformação difere dos processos fermentativos comuns porque nestes uma determinada substância de interesse é completamente sintetizada pelo microrganismo, enquanto na biotransformação o micro-organismo realiza poucas transformações na molécula.

O uso de microrganismos ou enzimas para a transformação de compostos orgânicos oferece vantagens importantes sobre os métodos químicos tradicionais. As condições suaves de síntese (por exemplo, pH e temperatura), são particularmente úteis e necessárias para moléculas sensíveis. Outra vantagem importante é a régio e estereoespecificidade de reações enzimáticas. Assim, sítios inativos da molécula podem ser funcionalizados, utilizando-se microrganismos ou enzimas adequadas (FABER, 2004).

3.5.1 Biotransformação do DDT

Biotransformação, ou bioremediação, é um método efetivo e de baixo custo usando bactérias e fungos para o tratamento de pesticidas, incluindo o DDT. O DDT é um poluente ambiental altamente persistente devido à sua toxicidade, hidrofobicidade e bioacumulação. A *Environmental Protection Agency* (EPA) tem classificado DDT e seus metabólitos DDD (mitotano) e DDE como poluentes prioritários e seu uso é proibido desde 1972 (LIN, CHANG 2007).

Após sua introdução no meio ambiente, o DDT é biotransformado, no entanto seus metabólitos (DDE e DDD) são lentamente degradados e permanecem em solos e águas por vários anos e porventura são encontrados na cadeia alimentar (KAMANAVALLI; NINNEKAR, 2004).

Subba-Rao e Alexander (1985) comprovaram que para alguns dos fungos estudados, a degradação do DDT é semelhante ou idêntica ao proposto para bactéria (SUBBA-RAO; ALEXANDER, 1985).

Bumpus e Aust (1987) concluiram que a degradação do DDT em *P. Chrysosporium (white rot fungi)* ocorre por declorinação redutiva e hidroxilação do grupo etano ao DDD, dicofol e FW152 (Figura 7), o qual seria degradado por etapas subsequentes envolvendo declorinação redutiva e oxidação do grupo etano ao DBP. A biotransformação é atribuída ao sistema de degradação de lignina (BUMPUS; AUST, 1987).

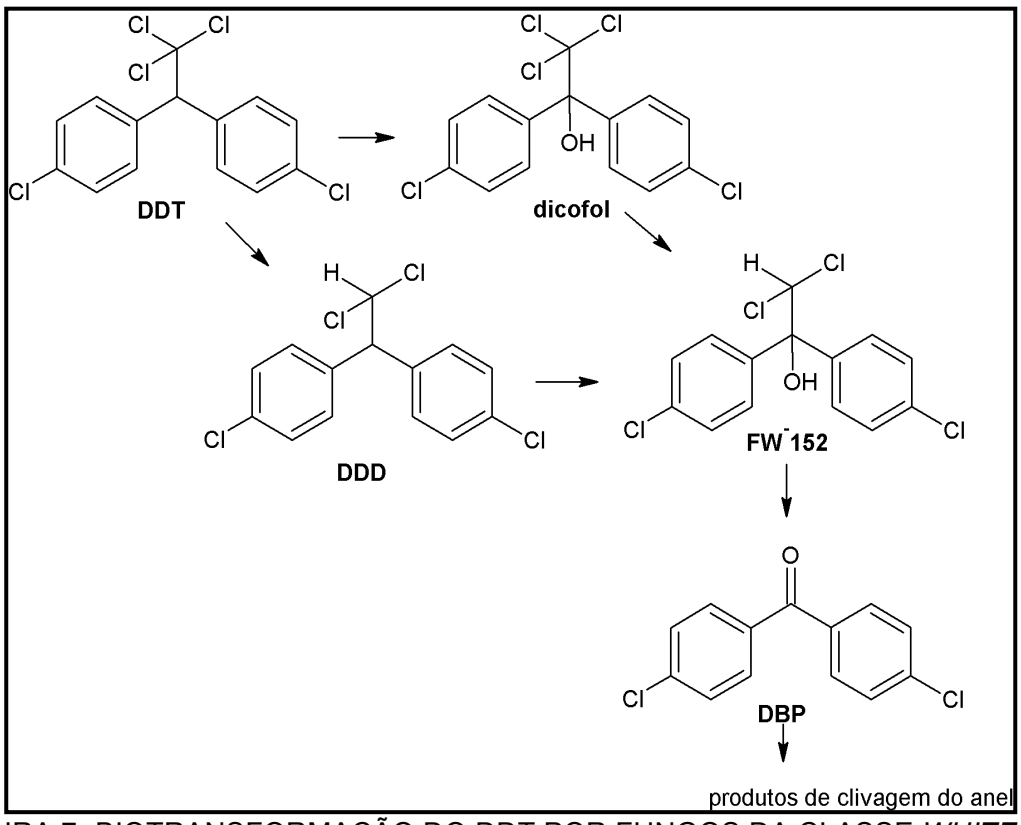


FIGURA 7- BIOTRANSFORMAÇÃO DO DDT POR FUNGOS DA CLASSE *WHITE ROT FUNGI*
FONTE: BUMPUS E AUST, 1987

Já para a classe dos *brown rot fungi* (Figura 8), por não possuírem as enzimas lignolíticas, o mecanismo proposto é uma reação extracelular de H_2O_2 com Fe^{2+} (reação de Fenton), levando à formação de um radical hidroxila (PUORNOMO, KAMEI, KONDO, 2008).

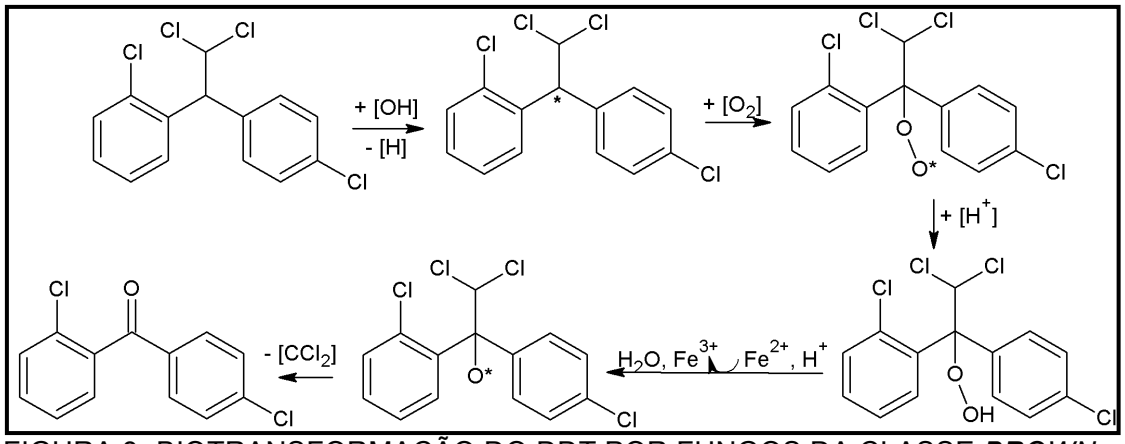


FIGURA 8- BIOTRANSFORMAÇÃO DO DDT POR FUNGOS DA CLASSE *BROWN ROT FUNGI*
FONTE: PURNOMO ET AL, 2008.

Grande parte dos fungos capazes de degradar o DDT o fazem via declorinação redutiva, similar à bactéria, enquanto outros iniciam o ataque através de hidroxilação prévia a declorinação. A levedura *Sacharomyces cerevisae* é uma das primeiras culturas de fungos que reduziu o DDT ao DDD utilizando como condição da cultura: 30ºC e meio ágar batata dextrosada (KALLMAN, ANDREW, 1963; PUORNOMO, KAMEI, KONDO, 2008).

Uma via diferente de biotransformação foi proposta para a bactéria *Alcaligenes eutrophus* A5, que oxidou o DDT ao DDT-2,3 dihidrodiol e este foi posteriormente degradado ao ácido 4-clorobenzoico via produto de clivagem em meta-anel aromático (KAMANAVALLI, NINNEKAR, 2004).

Xiao et al (2010), testaram os fungos *Phlebia* das espécies *P. lindtneri* e *P. brevispora*, os quais foram capazes de degradar o DDT. Quando utilizaram o DDD encontraram como metabólitos o DDA e DBP para ambos os fungos. Para a espécie *P. lindtneri* foi também encontrado o DBH, DBP hidroxilado e DBH hidroxilado. O metabolismo do DBP ocorreu por duas rotas: hidroxilação para formar o DBP hidroxilado e redução para formar o DBH. Em *P. lindtneri* o DBH foi subsequentemente hidroxilado a DBH monohidroxilado (Figura 9). Foi considerado que DBP/DBH foram posteriormente quebrados em anéis aromáticos individuais.

Neste estudo foi encontrado que a degradação do DBP foi parcialmente inibida pela adição do inibidor de citocromo P-450 butóxido de piperonila. A formação de DBP hidroxilado e DBH do DBP foi igualmente associada com uma monooxigenase do citocromo P-450 por causa da produção destes

compostos que foi eficientemente inibida pelo butóxido de piperonila (XIAO et al, 2010).

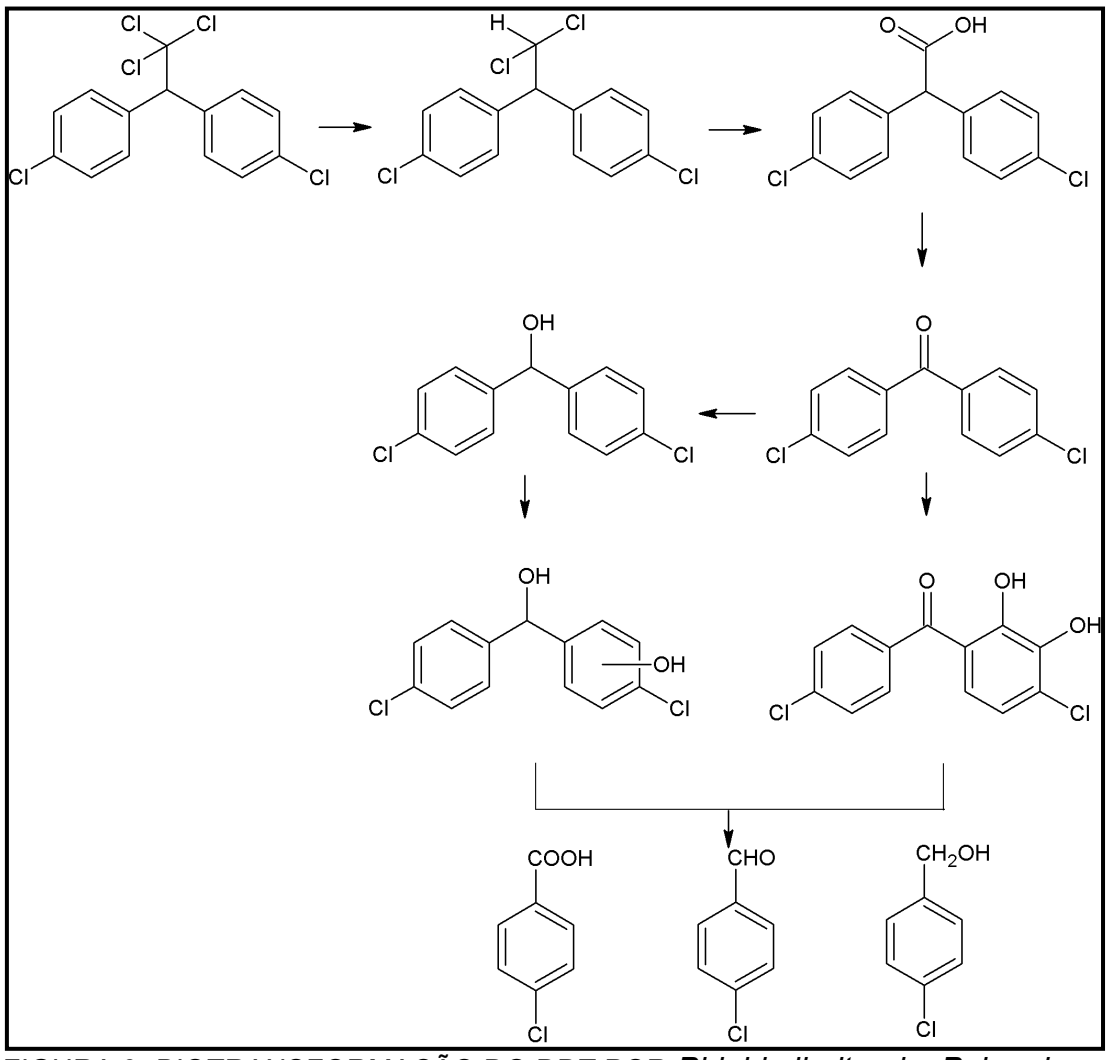


FIGURA 9- BIOTRANSFORMAÇÃO DO DDT POR *Phlebia lindtneri* e *P. brevispora*
FONTE: XIAO, P. et al, 2010

3.6 PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Considerando que CAC é uma doença rara, pouca pesquisa tem sido focada no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Há uma forte necessidade de agentes terapêuticos mais específicos e com menores efeitos colaterais (HERMANSSON et al., 2008)

O estudo de metabólitos é uma etapa importante no desenvolvimento de novas drogas. Além de auxiliar no estabelecimento da cinética e mecanismo da

metabolização eles podem também ser úteis para a determinação de toxicidade. Oitenta por cento de todos os candidatos a novos fármacos são abandonados, não devido a problemas com a substância por si só, mas sim devido à produção de seus metabólitos. Este fato levou a uma preocupação em se estudar efeitos colaterais e interações medicamentosas desses metabólitos antes do início do estudo em humanos (MAYEHEW, BUI, ROZZELL, 2004).

Produzir metabólitos *in vitro* por meio de citocromos humanos (CYP) em quantidades suficientes para desenvolver estudos preliminares de toxicidade e atividade biológica é uma tarefa árdua. Esses complexos enzimáticos somente estão disponíveis em pequenas quantidades e são extremamente caros e difíceis de manipular. Citocromos idênticos aos dos complexos em humanos seriam a solução ideal para a produção de metabólitos *in vitro (*MAYEHEW, BUI, ROZZELL, 2004).

Levando em conta a dificuldade da obtenção *in vitro* de metabólitos, uma alternativa simples, eficaz e menos dispendiosa usada neste trabalho é a síntese química dessas moléculas

A técnica mais utilizada e apropriada para elucidação estrutural de metabólitos é a espectrometria de massa devido à alta sensibilidade e à versatilidade para introdução de amostras no espectrômetro de massa. A obtenção destes metabólitos para estudos de toxicidade ou para uso como padrões cromatográficos pode ser um desafio (CHASSEAUD, HAWKINS, 2007).

3.7 METABOLISMO DE COMPOSTOS QUIRAIS

Compostos quirais que apresentam um ou mais estereocentros, também conhecidos como enantiômeros (*R* e *S*), são idênticos na sua constituição atômica e ligação, porém, por se tratar de imagens especulares não podem ser sobrepostos. Enantiômeros são designados como *(+)* ou *(-)* conforme a direção de rotação do plano da luz polarizada, direita e esquerda, respectivamente (MARTIGNONI, GROOTHUIS, KAMTER, 2006).

Desde que enantiômeros possuem as mesmas propriedades físicas e químicas em um ambiente isotrópico, frequentemente apresentam

propriedades biológicas diferentes, pois organismos vivos são ambientes anisotrópicos. Em processos biológicos, incluindo a quebra metabólica e eliminação, estereoseletividade é a regra, e não a exceção (ARMSTRONG et al., 1993).

A maioria das reações biológicas distingue diferentes estereoisômeros. A interação de dois enantiômeros com uma macromolécula, como uma enzima ou um receptor, é por natureza tridimensional, formando complexos diasteroisoméricos que resulta em reconhecimento quiral. O metabolismo mediado por enzimas frequentemente apresenta preferência por um dos enantiômeros ao outro, resultando em enantioseletividade (LU, HONG, 2007).

As diferenças entre as atividades biológicas dos enantiômeros são ainda maiores considerando as diferenças entre ligação de proteínas e transporte, mecanismo de ação, taxa de metabolismo e de depuração e bioacumulação. O caráter enantiosseletivo do processo farmacocinético produz diferentes perfis de concentrações plasmáticas para os enantiômeros constituintes (HEFNAWY, SULTA, SHEHRI, 2007).

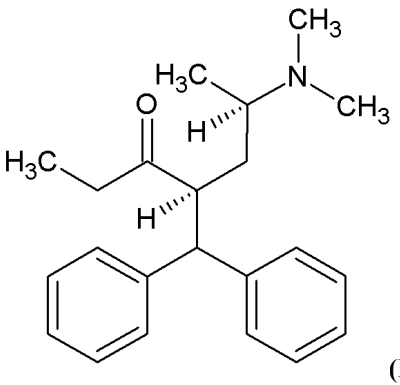
A administração de um racemato pode ser considerada como a administração de dois fármacos diferentes ao mesmo tempo. Dois enantiômeros na mistura racêmica não devem ser considerados como componentes passivos e podem interagir um com o outro, resultando em interação enantiomérica devido à competição pelo mesmo caminho metabólico que é mediado pela mesma enzima (GIBLADI, 1993).

Em função da quiralidade, fármacos podem diferir em suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas; a ação dos enantiômeros separados representa prova farmacológica útil para desvendar mecanismos de ação, assim como rotas metabólicas. É possível que um enantiômero possa ser inativo, ao passo que o outro seja responsável pela ação farmacológica. Ou também, um enantiômero pode inibir ou modificar os efeitos adversos ou tóxicos do outro isômero. A relevância clínica do fenômeno é particularmente importante para fármacos de baixo índice terapêutico administrados como racematos. A substituição de fármacos racêmicos pelo enantiômero puro vem crescendo gradativamente (BROCKS, 2006).

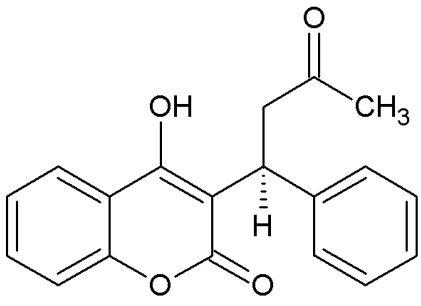
As vantagens do tratamento utilizando fármacos enantiomericamente puros incluem a possível redução na dose a ser prescrita, que reflete no fato de

poder oferecer maior eficácia por dose; o uso de enantiômeros puros pode reduzir variações farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre diferentes pacientes, além de reduzir a toxicidade do estereoisômero terapeuticamente inativo.

Um exemplo é o isômero levógiro da metadona (IX) que exibe afinidade 10 vezes maior para receptores opióides u e k e mais de 50 vezes mais atividade antinociceptiva em estudos clínicos e modelos animais comparado com o isômero dextrógiro (BAUMANN, ZULLINO, EAP, 2002).



(IX)



(X)

A estéreo e regiosseletividade em metabolismo de fármacos pode ser exemplificado pela Warfarina (X). O carbono assimétrico na posição 9 da warfarina é responsável pelas formas enantioméricas (*R)* e (*S*) da Warfarina, porém a atividade farmacológica reside principalmente na forma de (*S*)-warfarina (KAMINSKI, ZHANG, 1997).

O *o,p'*-DDT, que constitui 25% do DDT técnico, têm mostrado uma atividade estrogênica diferencial para os enantiômeros em ratos, sendo que o *(-)-o,p'*-DDT aparentemente tenha maior efeito estrogênico. Estes estudos sugerem que o *(-)-o,p'*-DDT é responsável pela atividade estrogênica *in vivo* (HOEKSTRA, BURNISON, 2001).

O uso do *o,p'*-DDD em casos de câncer de adrenal sugere uma investigação dos enantiômeros e metabólitos hipotéticos destes compostos (INOI, GERICKE, HORTON, 1962).

3.8 SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS QUIRAIS

A separação de enantiômeros tem sido vista como uma importante ferramenta analítica, sobretudo na área farmacêutica, na qual diferentes propriedades enantiosseletivas podem ter forte impacto na farmacocinética, farmacodinâmica e toxicologia do fármaco. A cromatografia líquida de alta eficiência é reconhecida como uma técnica rápida, seletiva e altamente eficiente, empregada com sucesso na separação enantiomérica. A técnica mais comumente utilizada para resolução de enatiômeros por CLAE envolve o uso de uma fase estacionária quiral ou direta (HEFNAWY, SULTA, SHEHRI, 2007).

A separação enantiomérica direta pode utilizar uma fase estacionária quiral, constituída principalmente de polissacarídeos e derivados de ciclodextrinas. Ciclodextrinas são frequentemente utilizadas em cromatografia gasosa enantioseletiva e ß-ciclodextrinas podem ser modificadas pela substituição de grupos 3-*hidroxi* por diversos grupos acílicos como: butiril, valeril, hepatanoil. A separação enantiomérica indireta mais importante é aquela que derivatiza os enantiômeros a diasteroisômeros, através de reagentes quirais, convertendo misturas racêmicas em misturas diasteroisoméricas que diferem em propriedades físico-químicas, sendo assim separadas (LU, HONG, 2007).

Cass et al. (2003) estudaram a enantioseparação de diferentes fármacos como omeprazol, lanzoprazol e pantoprazol em diferentes modos de eluição nas colunas compostas de celulose e amilose, e encontraram que diferenças em enantiosseletividade e enantioresolução dependem somente dos efeitos na fase móvel.

Interações não-polares entre a fase estacionária quiral e os enantiômeros têm o maior efeito na enantioresolução e o comprimento do substituinte alcóxi e sua posição em relação ao carbono assimétrico tem efeito dominante na enantioseparação (BOJARSKI, ABOUL-ENEIN, GHANEM, 2005).

3.9 CULTIVO CELULAR DO MITOTANO NA FORMA RACÊMICA E DE ENANTIÔMEROS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E METABOLISMO

Culturas primárias de células adrenocorticais têm provado ser um método útil para examinar mecanismos que controlam os vários aspectos da fisiologia adrenal. Contudo linhagens de células adrenais, as quais permitem um extenso número de células funcionais a serem propagadas sem a necessidade do sacrifício animal ou aquisição de tecido humano, tem rendido um progresso considerável na definição de mecanismos básicos envolvendo a função adrenal (MORISHITA et al., 2001).

No córtex adrenal humano a síntese de esteroides envolve as ações coordenadas de cinco formas de CYP P450 e da enzima 3β-hidroxiesteroide-desidrogenase, (3-β HSD). As enzimas são distribuídas entre as mitocôndrias e o retículo endoplasmático. A expressão diferencial dessas enzimas nas três diferentes zonas adrenocorticais permite a grande variedade de hormônios esteroidais secretados por essa glândula (WOOD; HAMMER, 2011).

A expressão das enzimas envolvendo a biossíntese de hormônios esteroidais podem mudar sob condições de cultivo. Os esteroides produzidos por cultivo de células pode ser diferente daqueles encontrados *in vivo*. Portanto, este critério deve ser considerado no desenvolvimento ou avaliação de linhagens celulares (KROISS et al, 2011)

Em 1980, usando tomografia computadorizada assistida, um carcinoma adrenocortical foi identificado em uma mulher negra de 48 anos que apresentou perda de peso, acne, hirsutismo, edema e diarréia. O tumor extraído tinha 14x13x11 cm e foi usado para estabelecer a linhagem original NCI-H295 (RAINEY, SANER, CHIMMER, 2004).

Estas células pareceram conter todos os sistemas enzimáticos os quais presumivelmente estavam presentes no tumor original incluindo: CYP11A, HSD3B2, CYP11B1, CYP21, CYP17, CYP11B2, 3β-hidroxiesteroide sulfotransferase e baixos níveis de aromatase (CYP19) (RAINEY, SANER, CHIMMER, 2004).

NCI-H295 é uma linhagem celular de carcinoma adrenocortical que produz uma variedade de hormônios. P450c21 é uma única enzima codificada

pelo gene P450c21B no cromossomo 6p21 que é expressa somente no córtex adrenal. O metabolismo final da desoxicorticosterona a aldosterona requer 11- e 18-hidroxilações e 18-oxidação, todas mediadas pela única enzima mitocondrial expressada somente na zona glomerulosa (STAELS, HUM, MILLER, 1993).

NCI-H295 é, portanto, um modelo de adrenal humana. Essas células fornecem evidências para a existência da maioria das vias de esteroidogênese na adrenal. Essas vias são baseadas na expressão das mesmas enzimas encontradas na adrenal normal e os genes que codificam estas enzimas respondem a mensageiros intracelulares secundários de maneira fisiológica e representável (WU et al., 2001).

Citogeneticamente, a linhagem H295 é altamente aneuplóide, hipertriplóide com 30% das células contendo cromossomo modal de número 62. Não há cromossomos Y. O meio de cultivo de suprimento de crescimento Ultroser G (2%-Biosepra AS, Villeneuve La Garenne Cedex, France) é relativamente definido como substituto do derivado sérico bovino o qual foi usado para aumentar a taxa de crescimento celular. NCI-H295 cresce em meio de cultivo suplementado com Ultroser demonstrando aumento da taxa de crescimento, mas as células continuam a crescer como agregados flutuantes ou células aderidas perdidas (RAINEY, SANER, CHIMMER, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Mitotano, *o,p'*-DDD, foi adquirido de Yick-Vic Chemicals and Pharmaceuticals® padrão USP27, CAS: [53-19-0] lote: 20050501, Hong Kong.

Os reagentes e solventes utilizados para síntese são reagentes comerciais para análise (grau PA). Todas as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como fase estacionária placas de sílica gel 60 F254 (Merck®).

As amostras de plasma foram obtidas da soroteca do laboratório de produtos naturais da Universidade Federal do Paraná. Essas amostras foram utilizadas em trabalho anterior sob aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, certificado número 268. As amostras de urina de pacientes com carcinoma adrenocortical sob tratamento com mitotano, são provenientes do hospital Erasto Gaertner.

4.1 MÉTODOS GERAIS

4.1.1 Análise de Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear

Análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C foram obtidas de espectrômetro Bruker Avance DRX-200 operando a 4,7 T, observando ^{1}H e ^{13}C a 200,13 e 50,5 MHz. Análises bidimensionais (HSQC e HMBC) foram obtidas de equipamento Bruker Avance DRX-400 operando a 9,4 T, observando ^{1}H em 400,13 e ^{13}C em 100,61. Este espectrômetro estava equipado de uma sonda multinuclear de detecção direta de 5 mm de campo em z. Todos os deslocamentos químicos estão relacionados com o deslocamento do TMS (δ=0 ppm), como referência interna. Todos os solventes deuterados utilizados foram obtidos de Sigma-Aldrich®. Os dados obtidos foram tratados pelo programa Bruker TopSpin®.

4.1.2 Análise de Cromatografia à Gás Acoplada a Espectrômetro de Massas

As análises de cromatografia à gás acoplada a espectrômetro de massas com ionização por impacto de elétrons, CG-EM (EI) foram realizadas no laboratório central de medicamentos LACEN, adquiridas no equipamento Thermo Scientific - Trace GC Ultra/TSQ Quantum Instrument operando nas seguintes condições: Full Q1MS, MicroScans 1, Tempo Scan 1,00, Q1 PW 0,70, [20.000 - 450.000]; Emissão de corrente de 50 μA. Energia: 70 eV. Parâmetros de coluna: Thermo TR- 5MS SQC (15 m x 0,25 mm ID x 0,25 μm). 5% fenil polisilfenileno-siloxano. Analisador de massas: triplo quadrupolo. Volume de injeção: 1 μL. Programa do Forno: T_0 80ºC por 1 min.; 80ºC a 160ºC at 20ºC/min.; 160º a 250ºC, a 10ºC/min.; 250ºC por 6 min.; tempo: 20 min.

4.1.3 Análise de Cristalografia de Raio-X

As coletas dos dados de difração de raios X dos compostos foram realizadas no Instituto de Química da UnB em um difratômetro SMART APEX II CCD (Charge Coupled Device Detector – Bruker) com monocromador de grafite que possui fonte de radiação Mo-Kα (I = 0,71073 Å), a temperatura ambiente (20°C).

Um total de 3846 quadros frames foram coletados. O tempo total de exposição foi de 10,68 horas. Os quadros foram integrados com o software Bruker SAINT utilizando um algorítimo quadro-janela.

A estrutura foi resolvida e refinada usando o software Bruker SHELXTL usando o grupo espacial P-1, com Z=2 para fórmula unitária, $C_{16}H_{14}Cl_2O_2$.

Os dados foram corrigidos para absorção dos efeitos usando o método multi-scan (SADABS).

A integração dos dados utilizando uma unidade de célula triclínica rendeu um total de 24953 reflexões a um ângulo máximo de 30,66° (0,70 Å resolução), dos quais 4556 foram independentes (redundância média de 5,477, integralidade (*completeness)* = 99,6%, Rint = 2,23%, Rsig = 1,50%) e 3654 (80,20%) foram maiores que 2σ(F2).

As constantes finais das células de a = 7,5728(2) Å, b = 10,2268(2) Å, c = 11,2858(2) Å, α = 63,3570(10)°, β = 84,0210(10)°, γ = 71,1940(10)°, volume = 738.68(3) Å3, foram baseadas sobre o refinamento das centróides XYZ de 116 reflexões sobre 20 σ(I) com 4,233° < 2θ < 57,42°. O ratio do mínimo ao máximo da transmissão aparente foi de 0,906. Os coeficientes mínimo e máximo calculados (baseado no tamanho do cristal) foram de 0,7832 e 0,8830.

4.1.4 Cultivo Celular

Células H295R foram comercialmente obtidas da "*American Type Culture Collection*". As células H295R foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F-12 (1:1) com L-glutamina obtidos da empresa Sigma-Aldrich® suplementado com NuSerum e ITS Plus obtidos da Becton Dickinson® e mistura de antibióticos Penicillina (10000 U/mL) e Estreptomicina (10000 µg/mL) da Gibco Life Technologies®. O número de células viáveis foi determinado pelo reagente CellTiter 96 AQueous Onesolution adquirido da Promega® pelo método do MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetóxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- tetrazolium).

4.2 SÍNTESE DOS METABÓLITOS E DERIVADOS DO MITOTANO

4.2.1 Síntese do 2,2,2-tricloro 1-(2- clorofenil)etanol

Visando a obtenção do *o,p'*-DDT, reagente de partida para síntese do *o,p*'-DDE, foi realizada previamente a síntese do carbinol, conforme mostra a Figura 10 (AGGARWAL; MEREU, 2000; HALLER et al., 1945).

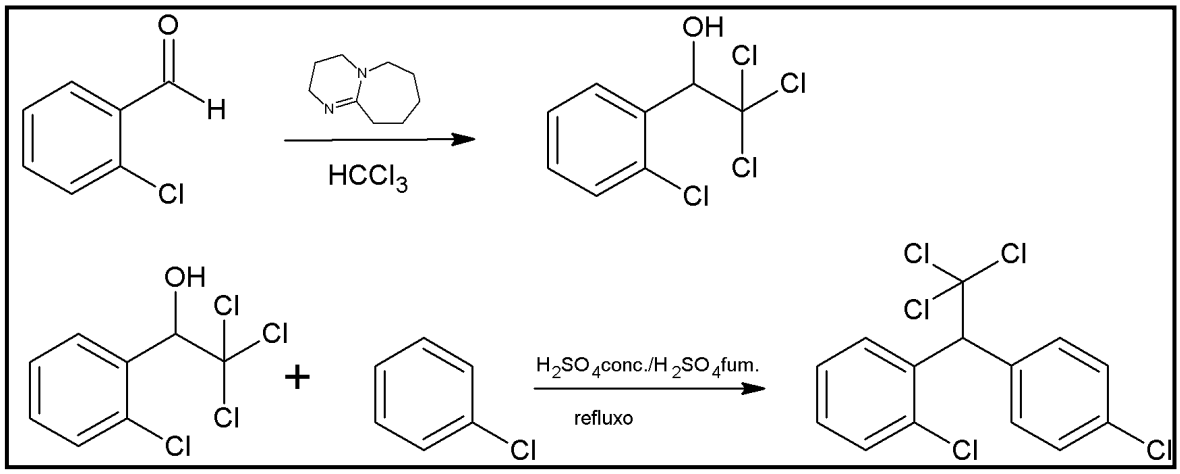


FIGURA 10 – SEQUÊNCIA DE REAÇÕES PARA OBTENÇÃO DO *o,p*'-DDT

Em um balão com saída lateral, foi colocado 0,06 mol (6 mL) de clorobenzaldeído (Sigma-Aldrich®) e 0,12 mol (10 mL) de clorofórmio. Sob atmosfera de argônio e agitação, foi adicionado 0,07 mol (10 mL) da base orgânica, 1,8-diazobiciclo [5.4.0] undec-7-eno, ou DBU, (Sigma-Aldrich®) gota à gota. A reação foi mantida sob agitação por 2 horas.

Ao final da reação, a solução foi neutralizada com ácido clorídrico 2 N, para reagir com o catalisador (DBU), gerando o sal de amônia correspondente, solubilizado na fase aquosa. Foram acrescentados água destilada e acetato de etila para a extração, que ocorreu sucessivamente até que não mais DBU fosse observado pela CCD (fase móvel: acetato/hexano 1:10).

A fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador e o carbinol foi purificado através de cromatografia circular centrífuga (Chromatotron®)

utilizando placa de sílica gel 7749 (Sigma-Aldrich®) com espessura de 1 mm e fase móvel constituída de acetato de etila/ hexano 1:10 (v/v).

O carbinol purificado foi dissolvido em clorofórmio deuterado contendo TMS para caracterização por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e de ^{13}C e também foi dissolvido em acetona grau HPLC para caracterização por CG-EM com ionização por impacto de elétrons.

4.2.2 Síntese do 1,1,1-tricloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etano (*o,p'*-DDT)

O *o,p*'-DDT foi sintetizado por meio da reação entre o carbinol e o clorobenzeno, em meio ácido, conforme esquema na figura 11 (HALLER et al., 1945).

Para 0,04 mol (10 g) do carbinol foram utilizados 0,08 mol (8,2 mL) de clorobenzeno; 5,5 mL de ácido sulfúrico fumegante e 16,6 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura de ácidos sulfúrico concentrado e fumegante e o clorobenzeno foram colocados lentamente em um balão acoplado a um condensador e então mantido à temperatura de 60ºC, sob agitação.

Quando a temperatura foi atingida, o carbinol foi adicionado gota à gota, através de um funil de separação, durante uma hora. Após a adição, a reação permaneceu sob agitação e aquecimento por mais 6 horas.

A mistura reacional foi disposta em funil de separação, onde foi deixada por uma noite, para melhor separação das fases, evitando a formação de emulsão. Após este período foi possível separar a fase orgânica, que foi evaporada em rotaevaporador e purificada por cromatografia em coluna.

A coluna foi empacotada com sílica gel 9385 (Merck®) e três frações de 70 mL de hexano foram coletadas sob vácuo. Posteriormente, uma fração da mesma quantia de acetato de etila e outra de metanol foram coletadas para lavagem da coluna.

O *o,p*'-DDT foi dissolvido em clorofórmio deuterado contendo TMS para identificação por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C, bem como, dissolvido em acetona grau HPLC para caracterização por CG-EM com ionização por impacto de elétrons.

4.2.3 Síntese do 1,1-dicloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etileno (*o,p'*-DDE) e Síntese do 1-cloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etileno (*o,p'*-DDMU)

A reação de síntese do *o,p'*-DDE, metabólito majoritário na amostra de plasma de pacientes, foi obtida partindo-se do *o,p*'-DDT (1,0 g) na presença 12,5 mL de solução de soda alcoólica 1M (0,8g NaOH/ 20 mL etanol) e refluxo por 1 hora.

Da mesma maneira, porém, partindo-se do mitotano (*o,p*'-DDD) (1,0 g) adicionado à solução de soda alcoólica 1M, foi sintetizado o *o,p*'-DDMU (Figura 11) metabólito que já foi encontrado em matrizes animais, porém não encontrado em humanos (ROLL, BELTRAME, 1971).

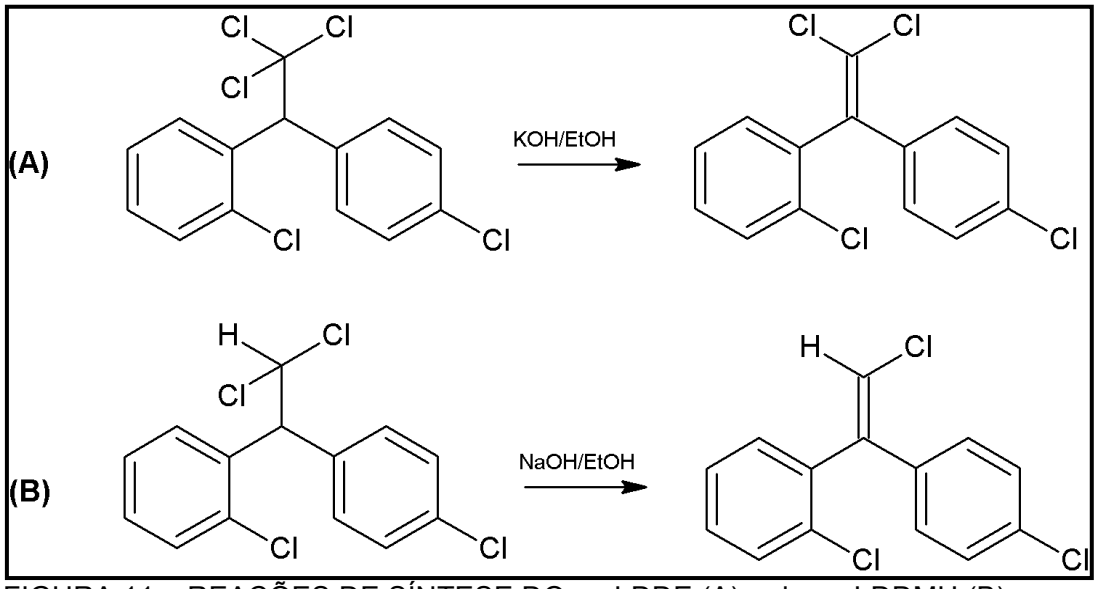


FIGURA 11 – REAÇÕES DE SÍNTESE DO *o,p*'-DDE (A) e do *o,p*'-DDMU (B)

O *o,p*'-DDE foi purificado através de recristalização em metanol e os cristais foram filtrados. Já o *o,p'*-DDMU, apresentado na forma de olefina, foi purificado por cromatografia em coluna, como detalhado a seguir.

Após consumo total do material de partida (*o,p'*-DDD) observado na CCD (fase móvel: hexano), a mistura foi resfriada, diluída com água e extraída com hexano. A amostra foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel 9385 (Merck®) utilizando como fase móvel o hexano.

Os produtos foram então caracterizados por espectrometria de RMN de ^{1}H e ^{13}C utilizando clorofórmio deuterado contendo TMS e por CG-EM com ionização por impacto de elétrons utilizando acetona grau HPLC.

4.2.4 Síntese do Ácido 2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)acético (*o,p*'-DDA) e do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano

O ácido carboxílico, *o,p'*-DDA (Figura 12), é o principal metabólito encontrado na urina de pacientes sob tratamento com mitotano (SINSHEIMER; GUILFORD; BOBRIN, 1971; ANDERS; ZALUSKA; WARREN, 1999).

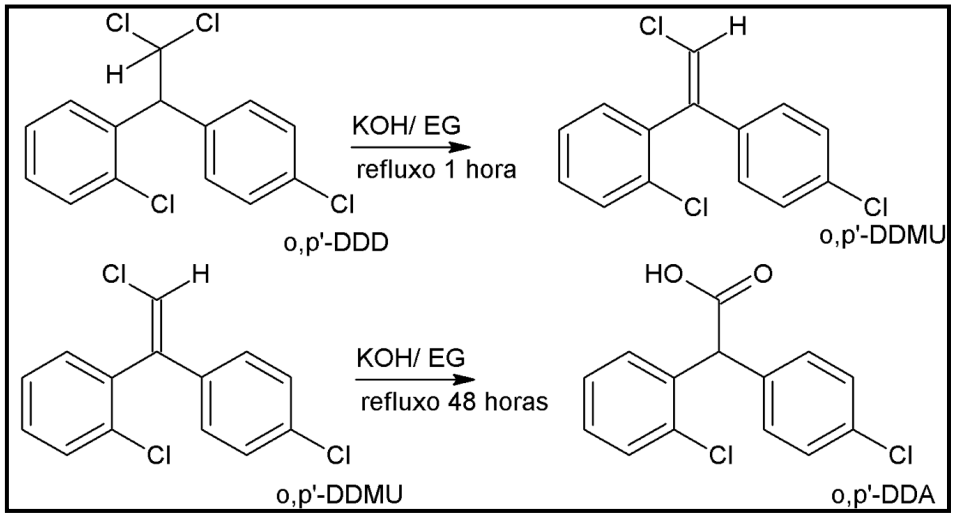


FIGURA 12 – REAÇÃO DE SÍNTESE DO *o,p*'-DDA

Para obtenção do ácido carboxílico, partiu-se da hidrólise básica do mitotano, *o,p'*-DDD, da mesma maneira que já descrito na literatura a partir do *o,p*'- DDT (CRISTOL & HALLER, 1945; GRUMMITT; BUCK & EGAN, 1955).

A primeira etapa da síntese foi feita em um balão, onde foi adicionado 0,02 mol (5,0 g) do *o,p'*-DDD grau farmacêutico; 0,9 mol (50 mL) de etilenoglicol e 0,11 mol (6,3 g) de KOH dissolvido em 3,5 mL de água purificada. A mistura ficou em aquecimento por 48 horas com a temperatura mantida a 130 ºC (Figura 13).

A extração foi feita após a neutralização do excesso da base com ácido sulfúrico concentrado, até que fosse verificada acidez em papel indicador de pH. Posteriormente, houve a extração dos produtos polares com acetato de etila em funil de separação. A fase orgânica foi reduzida por rotaevaporação.

O produto bruto da reação foi dissolvido em metanol a quente e purificado primeiramente por recristalização e em seguida por cromatografia em coluna de sílica gel 9385 (Merck®) utilizando como fase móvel um gradiente de polaridade de solventes: hexano, hexano/ acetato de etila 1:1 (v/v), hexano/acetato de etila 2:1 (v/v), acetato de etila e metanol.

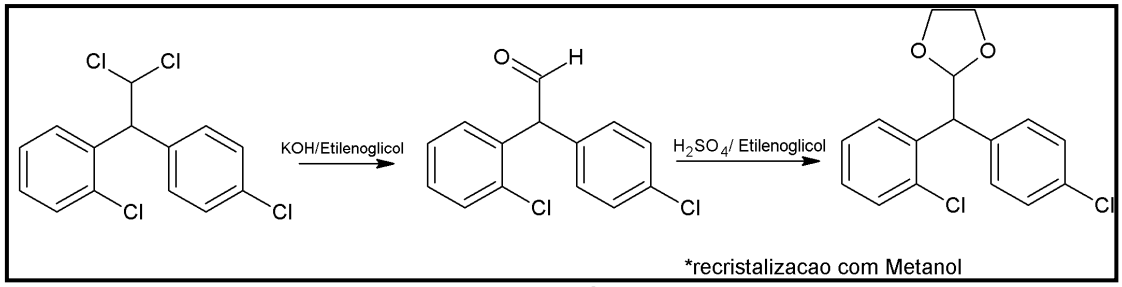


FIGURA 13 – REAÇÃO DE SÍNTESE DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO

Os cristais obtidos de recristalização em metanol e os outros produtos separados por cromatografia circular centrífuga foram identificados por espectrometria de RMN de ^{1}H, ^{13}C, métodos de correlação direta e a longa distância e também por CG-EM com ionização por impacto de elétrons em modo positivo.

4.2.5 Síntese do 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil)-1-(4-clorofenil)etanol

Em um balão de refluxo, foi introduzida uma solução de 0,002 mol (0,5 g) do DDMU sintetizado em 5 mL de solvente água/acetona 1:5 (v/v) e gotejada 2 mL de uma solução 2,15 M de ácido tricloroisocianúrico (0,25 g/mL) (Figura 14).

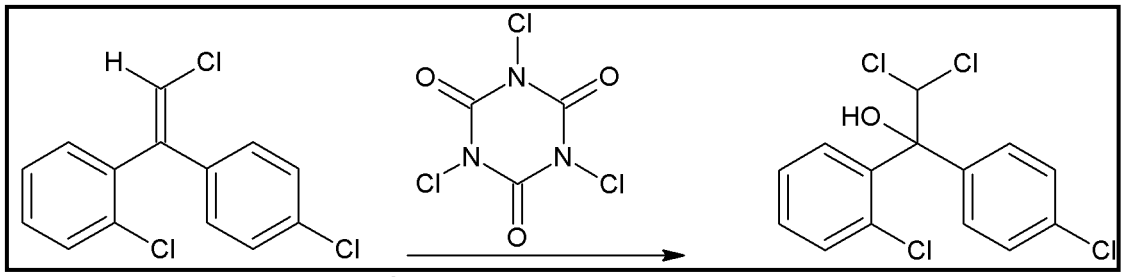


FIGURA 14 – REAÇÃO DE SÍNTESE DO 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL

A reação foi mantida em refluxo por 7 horas e o produto bruto extraído com solução de sulfato de sódio 10% e clorofórmio (WENGERT; SANSEVERINO; MATTOS, 2002).

O produto foi separado por cromatografia circular centrífuga aplicando os seguintes parâmetros: placa de sílica gel 7749 (Sigma-Aldrich®) com espessura de 1 mm e fase móvel gradiente: hexano, hexano/acetato de etila (1:3), acetato de etila e metanol, com acompanhamento da separação através de lâmpada ultravioleta.

O produto encontrado na fração hexano/acetato de etila (1:3) foi identificado por espectrometria de RMN de ^{1}H, ^{13}C e também experimentos de correlação bidimensional (HSQC e HMBC) utilizando como solvente o clorofórmio deuterado contendo TMS. O produto foi dissolvido em acetona grau HPLC para caracterização por CG-EM com ionização por impacto de elétrons.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DO MITOTANO EM AMOSTRAS DE PACIENTES SOB TRATAMENTO COM MITOTANO

Os metabólitos sintetizados foram utilizados como padrões para a identificação em amostras biológicas de plasma e urina de pacientes, além de produtos de biotransformação.

As amostras de plasma (400 uL) foram tratadas com acetona (600 uL), para precipitação das proteínas plasmáticas, homogeneizadas em vórtex durante um minuto e centrifugadas em microcentrífuga a 2500 x g durante 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e nele adicionado 400 uL de acetato de etila para a extração em triplicata, em seguida adicionado o hexano e repetido o procedimento. As fases orgânicas foram misturadas e levadas à evaporação, para posterior redissolução em 2 mL de acetona grau CLAE para análise por CG-EM.

Dois litros de urina coletados durante uma semana de 2 pacientes sob tratamento (armazenada a 4 ^{o}C) foram acidificados com HCl 1 M até pH 3,0; em seguida a amostra foi centrifugada e efetuada a extração do sobrenadante por partição líquido-líquido com acetato de etila e hexano. Foi adicionado Na_2SO_4 à fase orgânica, até atingir limpidez e então filtrada.

O volume foi reduzido até completa eliminação do solvente por rotaevaporação e o extrato bruto foi pré-purificado por cromatografia em coluna com extração sob pressão reduzida, utilizando sílica Sigma-Aldrich® 9385. A coluna foi condicionada com hexano e então a amostra dissolvida em metanol foi aplicada sendo coletadas em balão alíquotas (70 mL) da fração hexânica, acetato de etila e metanol.

Os eluatos foram levados à evaporação, feita análise das alíquotas por CCD utilizando como fase móvel a mistura de acetato de etila e hexano 5:8 (v/v) e posteriormente dissolvida a amostra em acetona grau HPLC para análise por CG-EM.

4.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DO MITOTANO POR FUNGOS

4.4.1 Biotransformação do Mitotano por Fungos - Triagem das Cepas

Trinta cepas de fungos não identificadas disponíveis no laboratório de produtos naturais foram utilizadas em uma pré-seleção em pequena escala. Foram feitos repiques em erlenmeyers de 200 mL contendo 50 mL de meio de cultura composto de: glucose 20 g/L; extrato de malte 8 g/L e extrato de levedura 2 g/L.

Após o crescimento, 1 mg de mitotano, previamente dissolvido em quantidade mínima de etanol (S.E. 10 mg/ mL), foi adicionado em cada frasco experimento e 100 µL de etanol foram acrescentados nos frascos controle. Após agitação de 125 rpm a 28 ± 1°C por 7 dias, os fungos foram repicados para um novo meio de cultura distribuídos em erlenmeyers controle (etanol) e experimento (mitotano dissolvido em etanol) e incubados por mais 7 dias no agitador orbital horizontal. Este processo foi repetido por 5 semanas consecutivas.

Após o término deste período, o conteúdo dos frascos controle e experimento foi filtrado e extraído com hexano e acetato de etila. O extrato experimento foi então comparado com o extrato controle na CCD, utilizando como fase móvel acetato de etila/hexano 1:5 (v/v).

Os microrganismos que aparentemente promoverem a formação de metabólitos, visualizados na CCD pela comparação com o controle, foram selecionados para experimentos em maior escala.

4.4.2 Biotransformação do mitotano em escala preparativa

Sete cepas selecionadas na etapa de triagem (*Cladosporium sp.; Penicilium sp*; *Mycelia sterilia*; PL2EN 9.6.4/1; *Aspergilus sp*; PL2EN 7.7.1/1 e PL1EP 9.5.2/1) foram escolhidas para experimentos em maior escala.

Nessa etapa, foram preparados 200 mL de meio de cultura por frasco, distribuídos em erlenmeyers de capacidade de 1 L, para cada cepa.

Após autoclavagem do meio, as cepas foram inoculadas no meio de cultura, sendo cada cepa dividida em frascos controle (com etanol) e em frascos experimento nos quais foram adicionados 60 mg de mitotano dissolvidos em etanol (S.E 10 mg/mL).

Todas os erlenmeyers foram incubados sob agitação de 125 rpm a 28 ± 1°C em agitador orbital horizontal. Após uma semana, o micélio foi repicado para um novo meio de cultura controle (sem mitotano) e experimento (60 mg de mitotano) e incubados por mais 7 dias no agitador orbital horizontal. Este processo foi repetido por 5 semanas consecutivas.

O micélio foi separado do meio por filtração à vácuo, lavado rapidamente com acetona e no filtrado foi adicionada solução salina para evitar formação de espuma para então ser efetuada a extração por partição líquido-líquido com hexano e acetato de etila, sucessivamente.

O solvente foi removido por rotaevaporação e as frações foram identificadas por CCD em comparação com o mitotano e os derivados obtidos por síntese.

O extrato obtido em cada experimento preparativo foi fracionado por cromatografia circular centrífuga, utilizando sílica Sigma-Aldrich® 9385 como fase estacionária e fase móvel composta de acetato de etila/hexano 1:5 (v/v).

Após fracionamento do extrato, as alíquotas foram levadas a evaporação, dissolvidas em 2 mL de acetona e analisadas por CG-EM com ionização por impacto de elétrons para pesquisa e identificação dos metabólitos formados.

4.5 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA

A separação dos enantiômeros *R-(+)* e *S-(-)* do *o,p'*-DDD, mitotano, foi reproduzida a partir de trabalho anterior, utilizando-se uma coluna quiral (Kromasil®) com medidas de 250 mm x 10 mm, diâmetro da partícula 5 µm (DIAS; SANTANA, 2007).

A fase móvel é composta por solventes acetato de etila/ hexano 5:95 (v/v) de pureza grau CLAE em cromatógrafo preparativo.

Os parâmetros da separação quiral se constituíram de: volume de injeção da amostra de 50 µL; Fluxo isocrático de 2 mL/min; detecção no UV em 239 nm e duração da corrida de 20 min.

Foram preparadas soluções do padrão de mitotano dissolvido em hexano, com concentração de 100 mg/mL. A fim de dissolver completamente a amostra, foram acrescentadas duas à três gotas de acetato de etila para dissolução total do fármaco, em banho de ultrasom.

Em seguida, com o auxílio de uma seringa em cromatógrafo preparativo, foram realizadas injeções da solução previamente preparada de mitotano e tão logo surgia o pico no cromatograma foi feita a coleta em erlenmeyer.

As injeções foram repetidas inúmeras vezes para acumular alguns miligramas de cada enantiômero, quantidade mais que suficiente para os experimentos de cultivo celular.

Por fim, a quantidade total obtida de cada enantiômero foi repurificada pelo mesmo método.

4.6 CULTIVO CELULAR

4.6.1 Avaliação da Viabilidade Celular em Linhagem H295R dos Enantiômeros e Mistura Racêmica do Mitotano Pelo Método *MTS*

As células de H295R foram cultivadas em meio DMEM/F-12 suplementado com NuSerum (2%), ITS Plus (1%) e mistura de antibióticos (1%). As células foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de CO_2 5%.

Para o ensaio de viabilidade celular, as células foram tripsinizadas, contadas pelo método azul de trypan para então serem diluídas para a concentração desejada e semeadas em duas placas de 96 poços na densidade de 8 x 10^3 células/poço. As placas foram incubadas por 24 horas antes do ensaio.

Após a aderência, as células foram tratadas com concentrações crescentes da mistura racêmica do mitotano e dos enantiômeros (5.0 10^{-6} – 1.0 10^{-4} M) dissolvidos em DMSO. O controle positivo foi avaliado em poços com células tratadas com DMSO dissolvido em meio de cultura na mesma concentração usada para dissolver o fármaco (0,1%). Poços com células tratadas apenas com o meio de cultura foram empregados para avaliar o efeito tóxico do DMSO nas condições utilizadas. Poços sem células foram lidos apenas com o reagente dissolvido em meio de cultura, como forma de controle negativo.

Após 3 dias, uma placa foi lida e na outra foi reposta o meio de cultivo para leitura em 6 dias. Na placa de 3 dias, o meio foi aspirado com posterior adição do reagente MTS dissolvido em meio de cultura (20 µL/100 µL de meio/poço).

A placa foi incubada por 3 horas para permitir o metabolismo do reagente pelas células vivas com viragem nítida de cor. A leitura da absorvância foi feita em leitora de placa de ELISA a 490 nm.

Na placa de 6 dias, o meio foi aspirado e um novo meio recém-preparado foi adicionado com as mesmas concentrações do fármaco nos

mesmos poços, após 3 dias, e o mesmo procedimento descrito anteriormente para leitura foi feito após 6 dias.

4.6.2 Estudo do Metabolismo do Mitotano na Forma Racêmica e de seus enantiômeros em Linhagem H295R

Inicialmente, foi feito um estudo preliminar com a presença de cada enantiômero, *R-(+)-o,p'*-DDD e *S-(-)-o,p'*-DDD, e da mistura racêmica no cultivo das seguintes células humanas: fibroblasto, hepatócito e célula do tumor de córtex adrenal (H-295R).

Neste primeiro momento, procurou-se avaliar a relação entre uma concentração utilizada que fosse recuperável e detectada por CLAE, mas que não fosse tóxica às células. E ainda avaliar a interferência de componentes do meio de cultivo que pudessem prejudicar a análise cromatográfica.

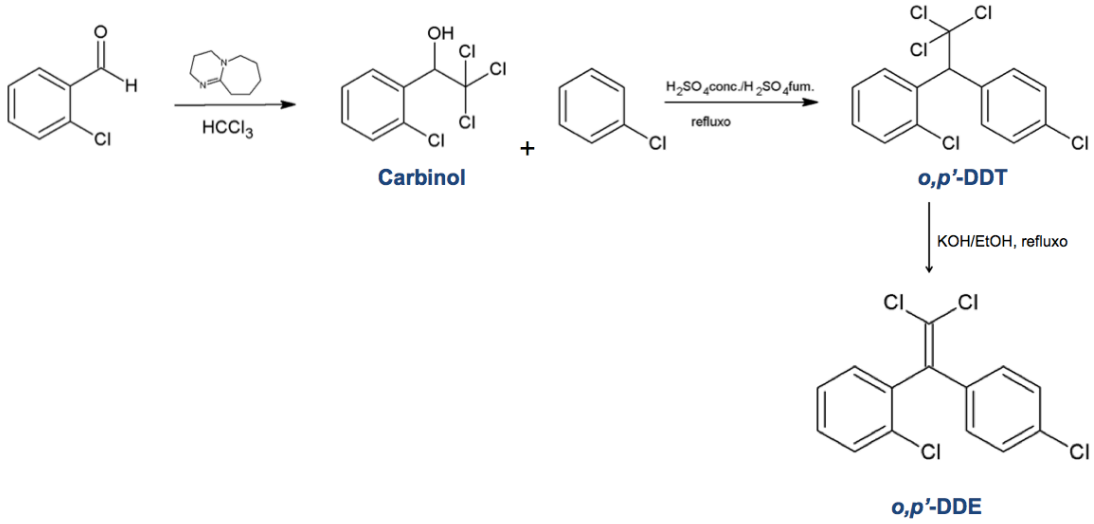
Desta forma, foi realizado um experimento no qual foram utilizadas as linhagens de células humanas (fibroblasto, hepatócito e de tumor) já cultivadas em garrafas de capacidade de 50 mL contendo 35 mL do meio de cultivo DMEM (contendo os antibióticos estreptomicina e penicilina) e confluência próxima a 90%.

As culturas de cada linhagem de células foram submetidas à presença de cada um dos enantiômeros e da mistura racêmica dissolvidos em acetona díluida em meio DMEM (concentração final = 15 µg/mL), durante 4 dias, com coletas nos tempos: 0, 24, 48, 58, 72 e 96 horas.

Ao final do cultivo foram separados os *pellets* celulares de cada linhagem e estes foram, juntamente com o material das coletas, extraídos por partição líquido-líquido com acetato de etila e hexano, evaporação total do solvente e redissolução em DMSO. As soluções preparadas foram então lidas no cromatógrafo CLAE Varian modelo, conforme método já descrito e analisadas por CG-EM com ionização por impacto de elétrons.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS DO MITOTANO VIA SÍNTESE QUÍMICA



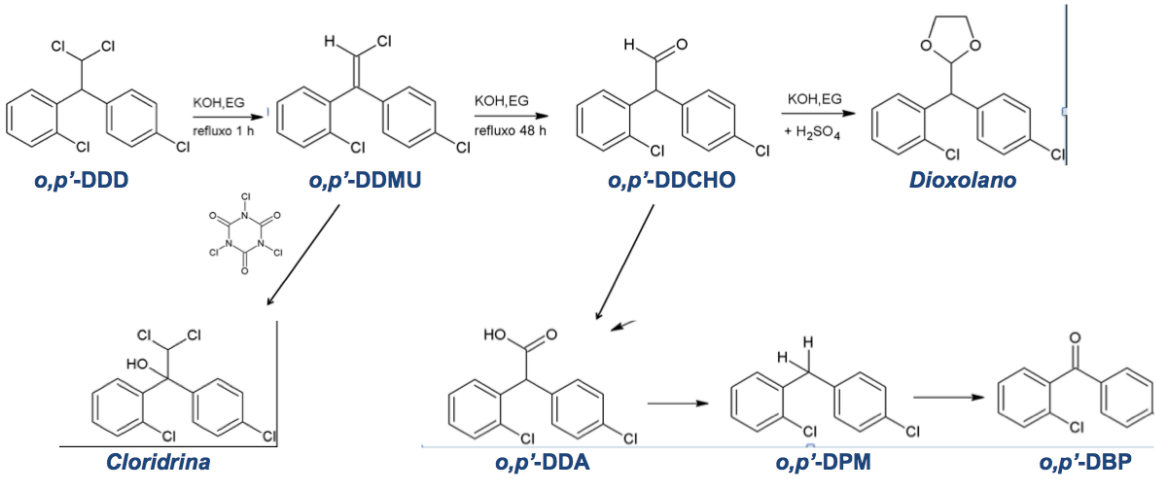


FIGURA 15 – ROTA SINTÉTICA DE OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS DO MITOTANO

5.1.1 Síntese do 2,2,2-tricloro 1-(2- clorofenil)etanol

O carbinol 2,2,2-tricloro 1-(2- clorofenil)etanol foi obtido através da reação entre clorobenzaldeído e clorofórmio utilizando catálise básica sob agitação.

A síntese apresentou rendimento de 75,5% e o produto foi revelado sob luz ultravioleta na CCD, utilizando como fase móvel acetato de etila/ hexano 1:10 (v/v), visualizado no Rf de 0,31.

A análise confirmatória foi obtida com as espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{1}H e ^{13}C) e CG-EM.

O carbinol foi identificado no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 16) pelo sinal multipleto dos hidrogênios do anel aromático, com deslocamento químico entre δ 7,24 e δ 7,85 ppm e pelos picos em δ 5,82 ppm e singleto largo em δ 4,03 ppm, do hidrogênio ligado ao C-2 e da hidroxila, respectivamente.

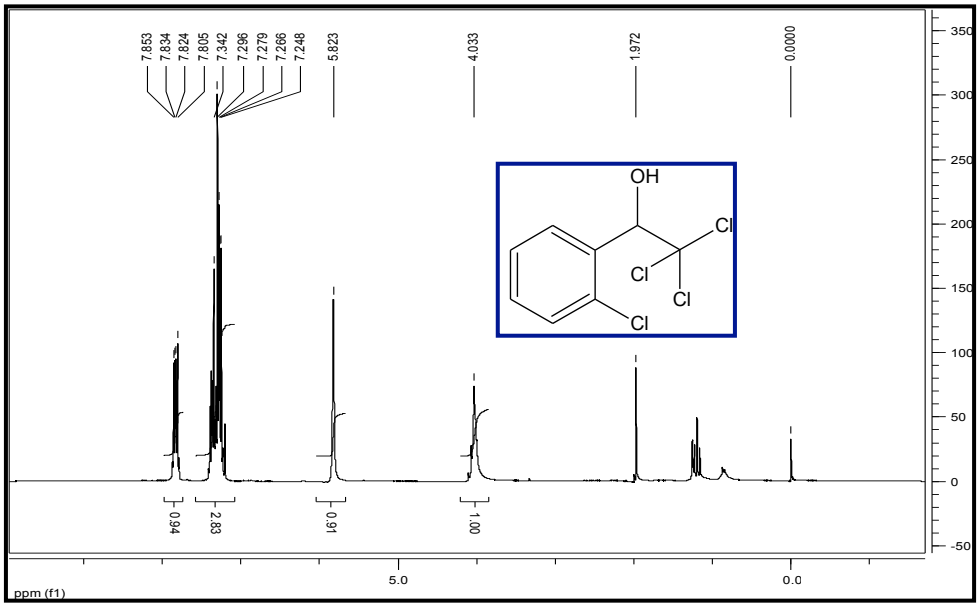


FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO 2,2,2-TRICLORO 1-(2-CLOROFENIL)ETANOL

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 17) complementou o espectro de ^{1}H, no qual foi possível identificar os picos referentes aos carbonos do anel aromático entre δ 126,6 e δ 135,0 ppm e os C-1 e C-2 em δ 102,7 ppm e δ 79,5 ppm, respectivamente.

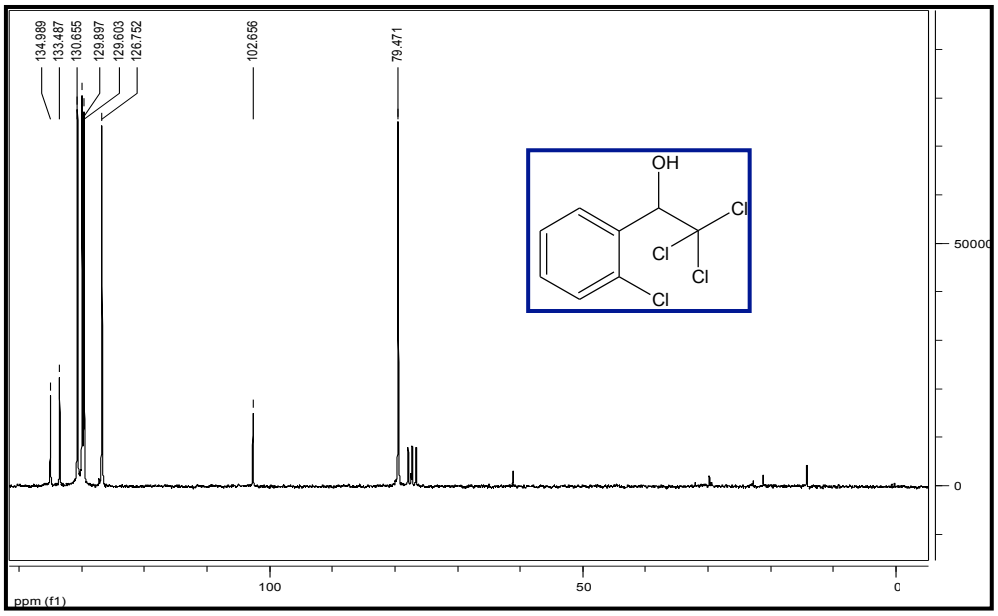


FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO 2,2,2-TRICLORO 1-(2-CLOROFENIL)ETANOL

A molécula do 2,2,2-tricloro 1-(2- clorofenil)etanol $C_8H_6OCl_4$, tem massa molecular isotópica de 259,9795 Da. No espectro de massas com ionização por impacto de elétrons na figura 18, foi possível identificar o íon base de *m/z* 141 resultante da perda do grupo $-CCl_3$, além dos íons de *m/z* 113 correspondente à fragmentação $[M-(CHOH)-(CCl_3)]^+$ (19,5%), e consequentemente perda de um átomo de cloro para gerar o radical fenílico de *m/z* 77 (37,8%).

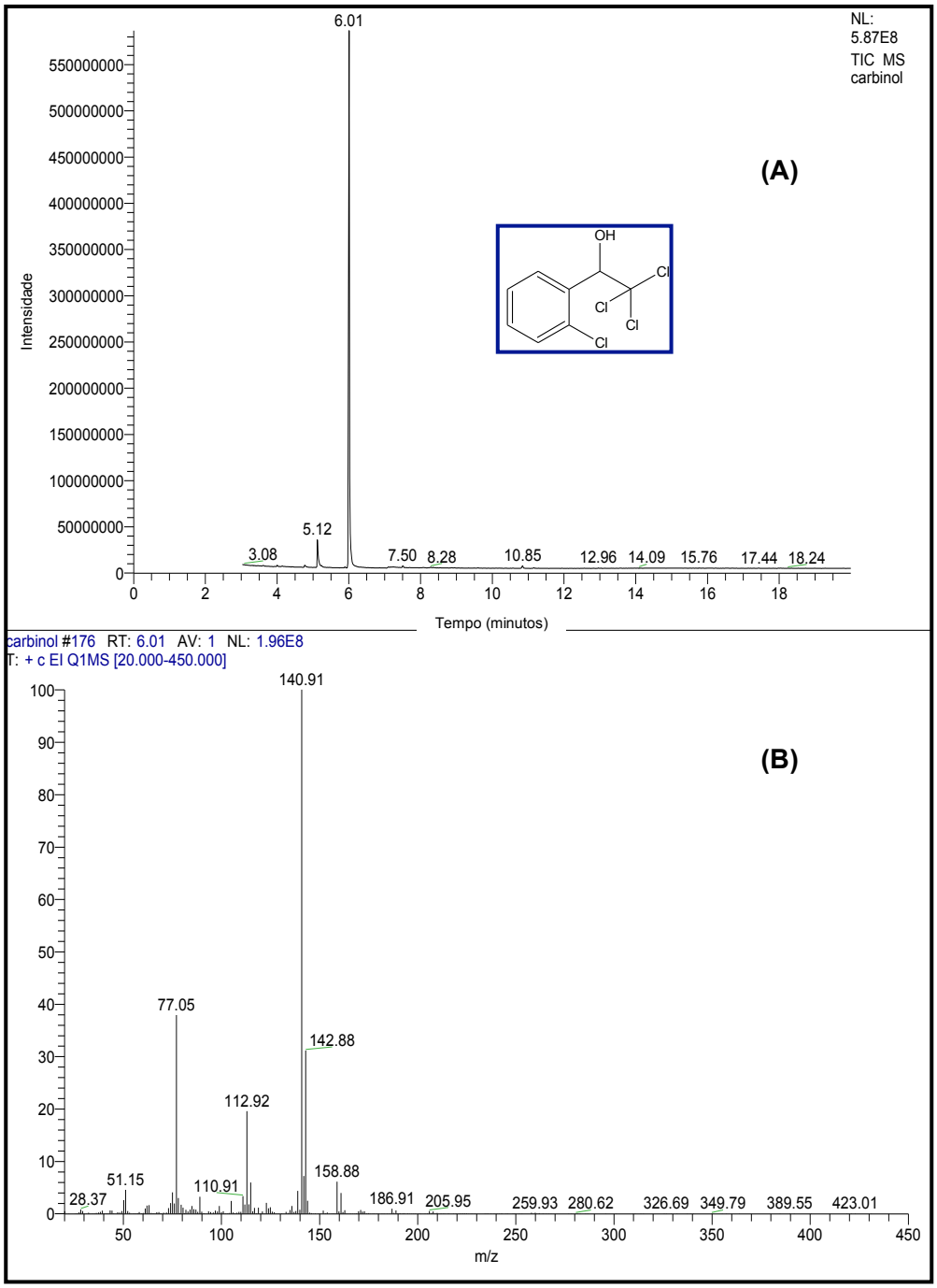


FIGURA 18- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO 2,2,2-TRICLORO 1-(2- CLOROFENIL)ETANOL EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 6,01 MINUTOS COM IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

5.1.2 Síntese do 1,1,1-tricloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etano (*o,p'*-DDT)

O *o,p*'-DDT foi sintetizado através da reação entre o carbinol previamente obtido e o clorobenzeno na presença de catálise ácida sob aquecimento e agitação.

A reação apresentou rendimento de 77,65% e o produto foi revelado sob luz ultravioleta na CCD, utilizando como fase móvel hexano. O produto foi visualizado nesta fase móvel no Rf de 0,76.

A caracterização do produto foi feita através dos resultados obtidos das espectroscopias de RMN de ^{1}H e ^{13}C e CG-EM que confirmaram também o teor de pureza da amostra.

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 19), o produto foi identificado através dos sinais dos hidrogênios aromáticos entre δ 7,25 e δ 8,17 ppm e do pico em δ 5,75 ppm do hidrogênio ligado ao C-2.

O espectro de RMN de ^{1}H apresentou sinais característicos de uma dissubstituição 1,4 em anel aromático, através do sinal em δ 7,49 ppm e outro sinal sobreposto na região de δ 7,53 ppm, característicos de acoplamento de segunda ordem.

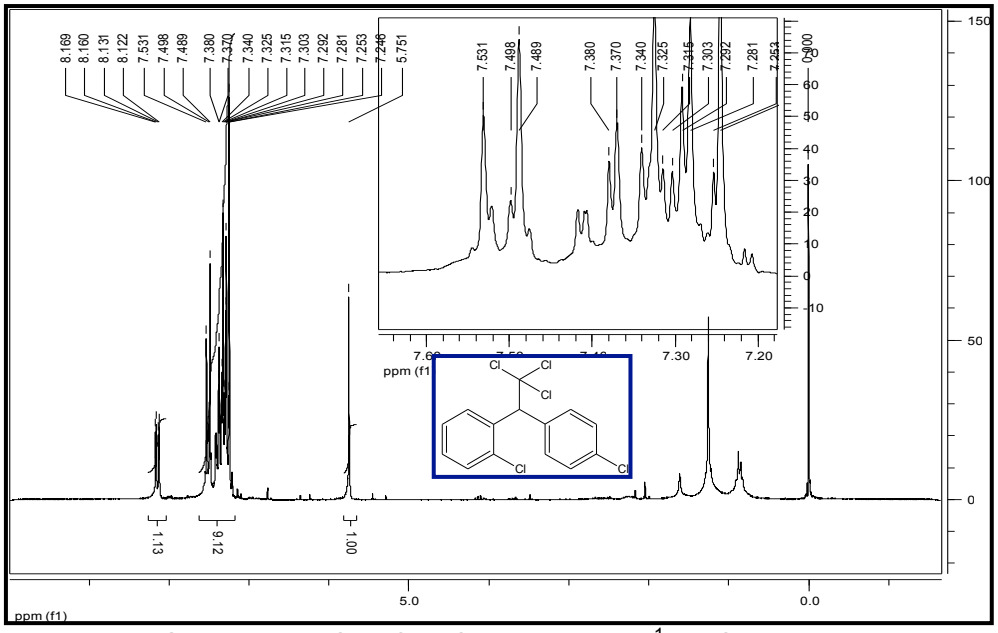


FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO *o,p'*-DDT

Além do anel 1,4 disubstituído, o espectro de RMN de ^{1}H mostrou sinais característicos de um anel 1,2 dissubstituído. Esta informação pode ser facilmente acessada pelo sinal em δ 8,14 dd confirmando que este hidrogênio acopla com outros dois hidrogênios, um em para e outro em meta. Os sinais dos outros hidrogênios aromáticos aparecem sobrepostos na região de δ 7,25 a δ 7,42 ppm.

Os carbonos do *o,p*'-DDT são observados na Figura 20 no qual os carbonos dos anéis aromáticos apresentam deslocamento entre δ 126,8 ppm e δ 136,0 ppm e os carbonos C-1 e C-2 apresentam deslocamento em δ 100,8 ppm e δ 64,7 ppm, respectivamente.

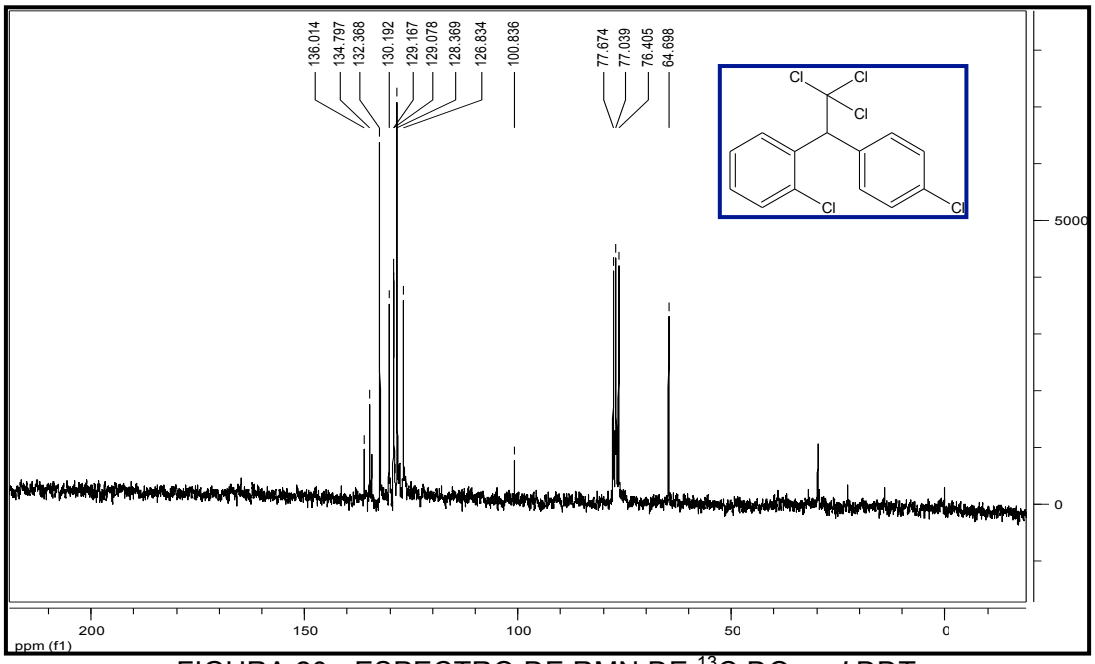


FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO *o,p'*-DDT

A Figura 21 apresenta o espectro de massas do *o,p'*-DDT, $C_{14}H_9Cl_5$, obtido por CG-EM com impacto eletrônico em modo positivo em 10,88 minutos.

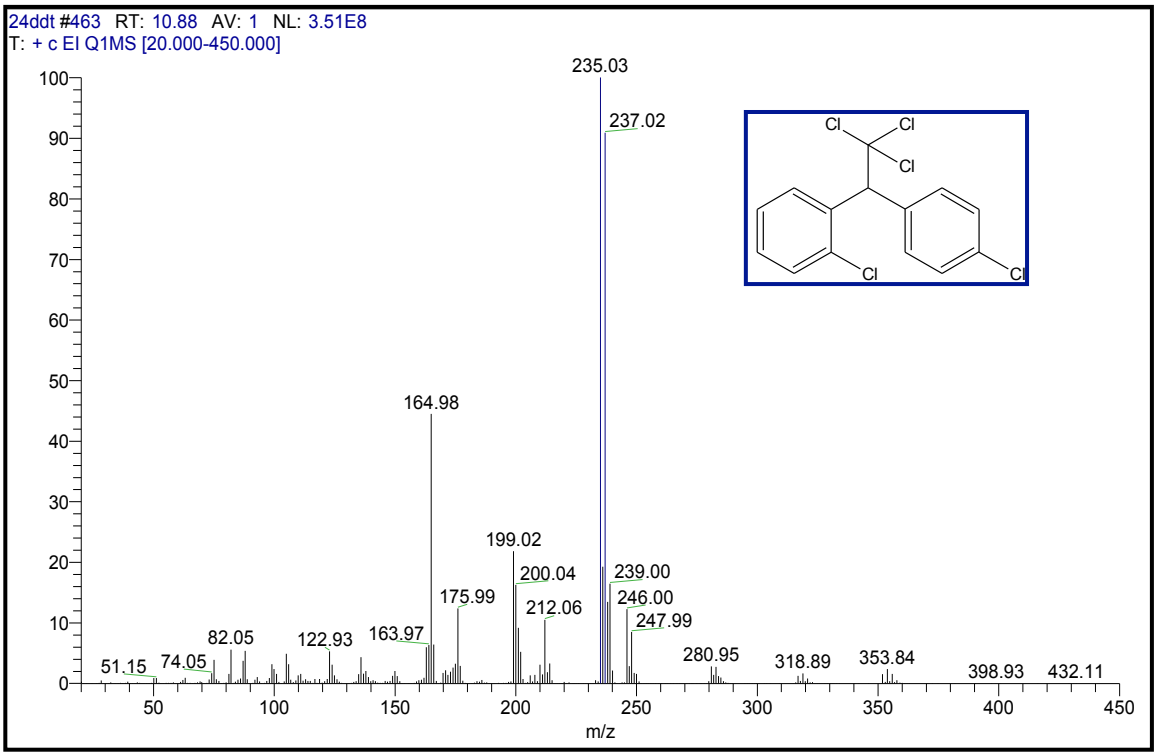


FIGURA 21- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDT EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 10,88 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

A tabela 3 mostra a atribuição da relação *m/z* aos íons gerados e à porcentagem em relação ao íon base de *m/z* 235. Foi possível identificar, dentre outros fragmentos, o íon molecular de *m/z* 354 (massa molecular isotópica: 354,5313 Da) e o íon base $[M-(CCl_3)]^+$ de *m/z* 235.

TABELA 3- RELAÇÃO DE CARGA-MASSA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS FRAGMENTOS GERADOS DO *o,p'*-DDT

ÍONS	***m/z***	**ABUNDÂNCIA RELATIVA (%)**
$[M]^{+\cdot}$	354	2,4
$[M-(Cl)]^+$	319	1,2
$[M-(Cl)-(HCl)]^+$	282	2,4
$[M-(2\ Cl)-(HCl)]^+$	246	12,0
$[M-(CCl_3)]^+$	235	100
$[M-(CCl_3)-(Cl)]^+$	199	9,7
$[M-(3\ Cl)-(Cl)]^+$	212	21,9
$[M-(CCl_3)-\ (2Cl)]^+$	164	43,9

.

A síntese descrita foi específica para a formação do produto *o,p'*-DDT em relação ao produto *o,o'*-DDT em virtude do impedimento estérico causado pela presença dos cloros nas proximidades deste sítio reativo da molécula.

Este resultado pôde ser verificado no espectro de ^{1}H através do acoplamento dos sinais e também no espectro de ^{13}C, o qual apresenta um único conjunto de sinais correspondente ao produto *o,p'*- substituído, bem como pela análise por CG-EM no aparecimento de um único pico no cromatograma.

A síntese específica do *o,p'*-DDT ainda não foi descrita na literatura e é muito vantajosa quando comparada ao método tradicional de Bayer, de condensação do cloral e clorobenzeno na presença de ácido sulfúrico. Esta última, exige a etapa preliminar laboriosa de desidratação do cloral e sua purificação. Imediatamente após a produção do cloral, ele deve ser utilizado na condensação com o clorobenzeno produzindo uma mistura de isômeros *o,p'* e *p,p'.*

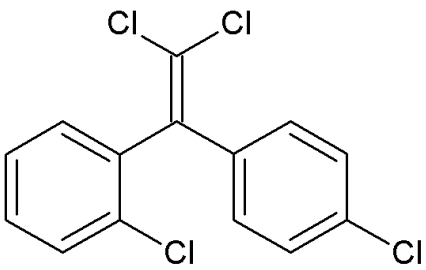
Um estudo de relação estrutura-atividade feito com cachorros demonstrou que o *p,p'*- DDD é relativamente inativo. Uma diferença na lipossolubilidade do isômero *p,p'*-DDD, ou uma posição livre em para, ou o metabolismo que gerem espécies p'-hidroxiladas, segundo os autores, podem ser responsáveis por esta diferença (HART, REAGEN, ADAMSON, 1973).

Para o objetivo deste trabalho que é a síntese do DDT como intermediário da síntese do DDE (metabólito do mitotano), o produto de interesse é somente o *o,p'*-DDT, pois o isômero *o,p'*- é o único farmacologicamente ativo.

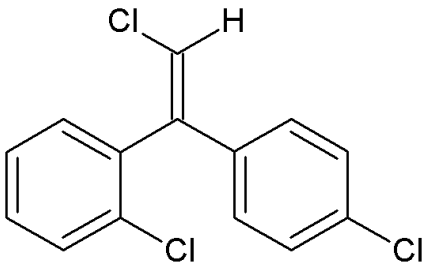
Portanto, pela síntese clássica onde há a formação de uma mistura de isômeros, seria necessário acrescentar ainda uma laboriosa etapa de separação do *o,p'*-DDT, sendo que ao final, a reação apresentaria baixo rendimento do produto desejado, pois a reação favorece a formação do isômero *p,p'*- substituído, cerca de 75% do rendimento total (MOSHER et al., 1946, SCHILLAWSKI, 1985).

5.1.3 Síntese do 1,1-dicloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)etileno (*o,p'*-DDE)

e Preparo do 1-cloro-2-(2-clorofenil)(4-clorofenil) etileno (*o,p'*-DDMU)



DDE



DDMU

O preparo do *o,p'*- DDMU a partir do mitotano, foi reproduzido conforme a artigo publicado por Roll e Beltrame (1971) e o produto foi submetido à análise por espectrometria em infravermelho na qual os dados encontrados foram semelhantes aos do *o,p*'-DDE e *o,p'*-DDT.

A caracterização foi feita por espectroscopia de ressonância magnética nuclear que, para o caso do *o,p'*-DDMU, possibilitou a interpretação dos isômeros *E* e *Z*.

Os rendimentos obtidos para o *o,p*'-DDMU e para o *o,p*'-DDE foram de 90,35% e 92,27%, respectivamente. Revelados sob luz ultravioleta na CCD utilizando como fase móvel hexano, os produtos foram visualizados nos Rfs de 0,56 e 0,66, respectivamente.

Os dois picos encontrados em δ 6,77 ppm e δ 6,41 ppm (Figura 22) caracterizam os isômeros *Z* e *E* do *o,p*'-DDMU, respectivamente. Este resultado é concordante com os valores de deslocamento químico descritos na literatura em δ 6,73 ppm e δ 6,37 ppm (ROLL, BELTRAME,1971).

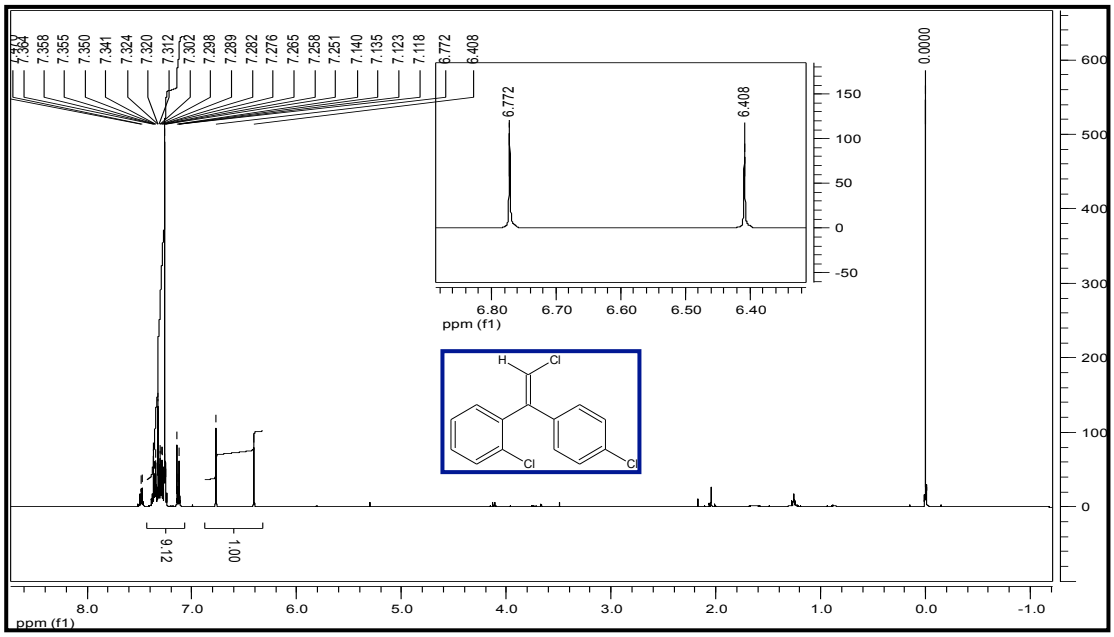


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO *o,p'*-DDMU

O tempo de retenção do *o,p'*-DDMU, $C_{14}H_9Cl_3$, no cromatograma obtido por CG-EM com ionização por impacto de elétrons em modo positivo foi de 9,02 minutos (Figura 23).

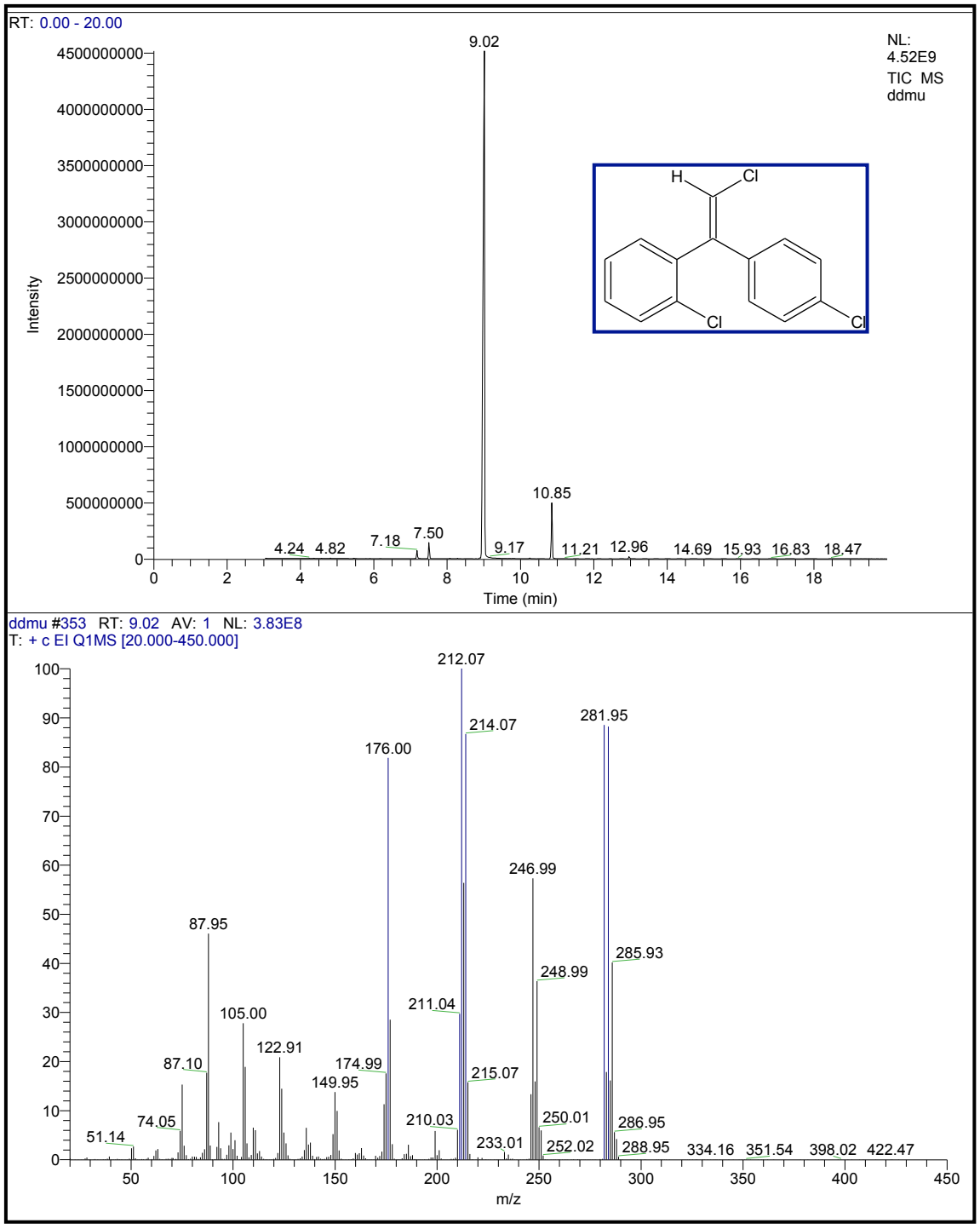


FIGURA 23 - ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 10,88 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

O pico do íon molecular foi visto com relação massa/carga de 283 (massa molecular isotópica: 283,6093 Da) (Tabela 4).

TABELA 4-RELAÇÃO DE CARGA-MASSA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS FRAGMENTOS GERADOS DO *o,p'*-DDMU

ÍONS	*m/z*	ABUNDÂNCIA RELATIVA (%)
$[M]^{+\cdot}$	283	89,0
$[M-(Cl)]^{+}$	247	57,3
$[M-(2\ Cl)]^{+}$	212	100
$[M-(2\ Cl)-(HCl)]^{+}$	176	81,7
$[M-(HCl)-(Cl)-(C_6H_4Cl)]^{+}$	105	28,0
$[M-(CHCl)-(Cl)-(C_6H_4Cl)]^{+}$	88	46,3
$[M-(C=CHCl)-(Cl)-(C_6H_4Cl)]^{+}$	74	14,6

No espectro de RMN de ^{1}H do *o,p*'-DDE (Figura 24) não foram observados outros sinais relevantes além daqueles dos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos na região entre δ 7,26 e δ 7,40 ppm, como previsto. Entretanto, este fator compromete a integração dos sinais.

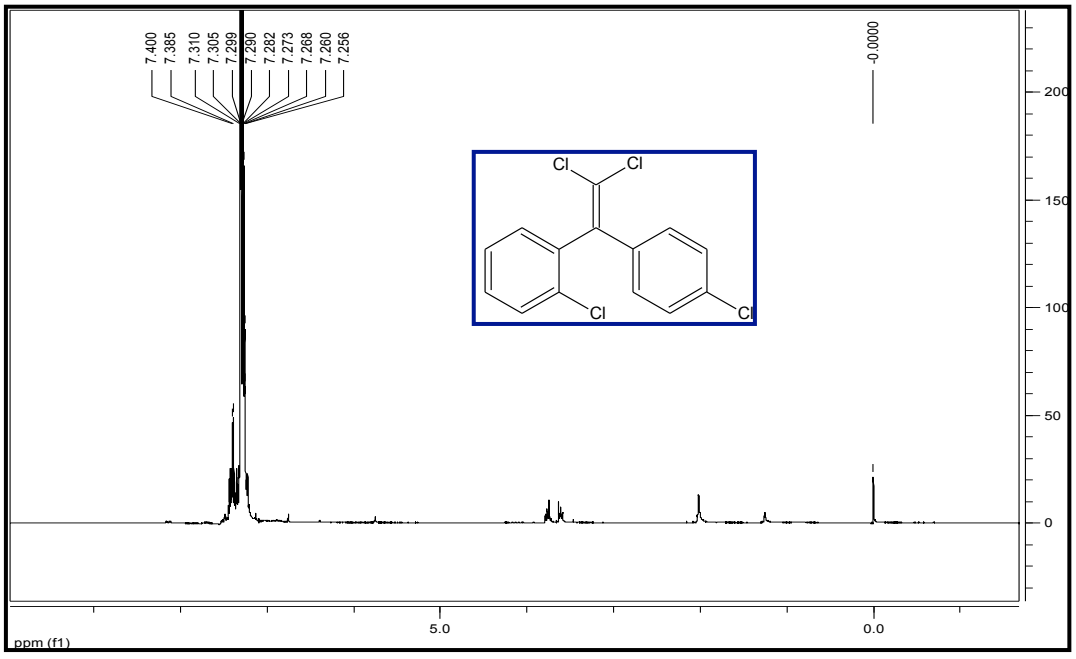


FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO *o,p*'-DDE

Complementar ao espectro de RMN de ^{1}H, o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25) identifica os carbonos na região de aromáticos, entre δ 127,1 ppm e δ 138,2 ppm. Este sinal foi concordante com a estrutura do *o,p*'-DDE já que o anel aromático 1,4-dissubstituído apresenta 2 pares de carbonos em mesmo

ambiente químico, sendo que cada par foi representado por apenas um sinal intenso, em δ 128,49 e δ 130,53 ppm.

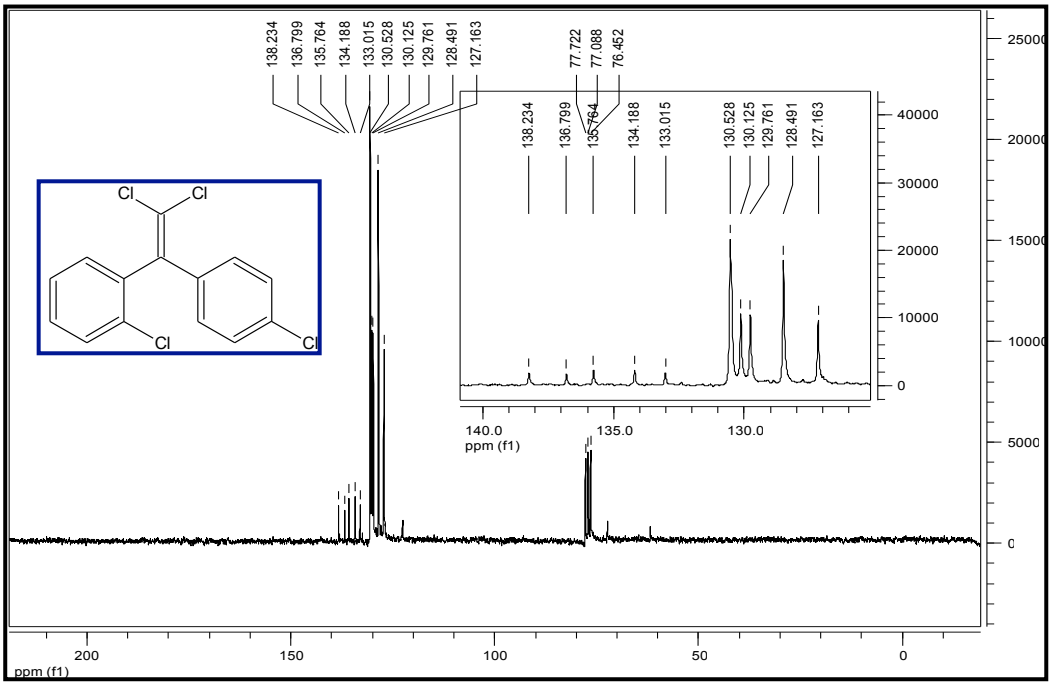


FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO *o,p*'-DDE

A análise de CG-EM, além de complementar a caracterização de *o,p'*-DDE considerado como um importante metabólito do mitotano, vem a confirmar também a especificidade da síntese do *o,p'*-DDT, já que é observado apenas um pico no cromatograma, no tempo de retenção de 9,57 minutos, Figura 26 (A).

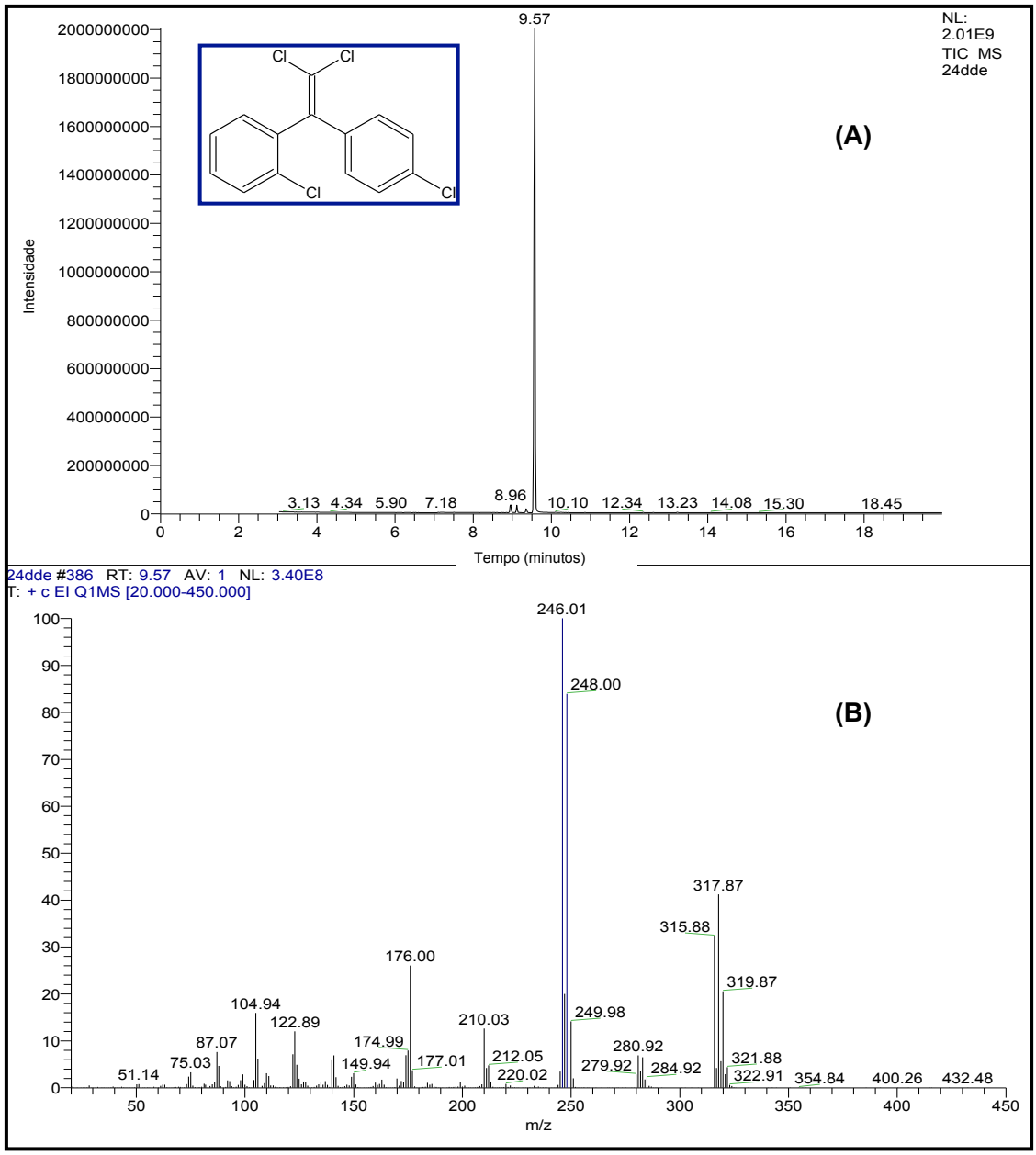


FIGURA 26- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 9,57 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Os resultados obtidos por espectrometria de massas forneceram informações sobre a massa molecular do composto investigado, assim como seu perfil de fragmentação (Tabela 5). Após a extração do espectro de massas (Figura 26, B) no tempo de retenção de 9,57 minutos (Figura 26, A), pode-se observar dois picos abundantes de relações massa/carga (*m/z*) iguais a 318 e 246 referentes ao íon molecular e íon base, respectivamente. Esta informação é coerente com a estrutura química do *o,p'*-DDE, que possui massa molecular

isotópica de 318,0623 Da ($C_8H_8Cl_4$). Vale ressaltar que a distribuição isotópica dos cloros M+2, M+4, M+6 e M+8 na região do íon molecular do *o,p'*- DDE apresenta valores de intensidade aproximados daqueles encontrados na literatura para compostos contendo 4 átomos de cloro (131%, 63,9%, 14% e 1,2% em relação ao pico do íon molecular) (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRIL, 1991).

TABELA 5- RELAÇÃO DE MASSA-CARGA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS FRAGMENTOS GERADOS DO *o,p'*-DDE

ÍONS	***m/z***	**ABUNDÂNCIA RELATIVA (%)**
$[M]^{+\cdot}$	318	41,4
$[M-(Cl)]^{+}$	281	6,1
$[M-(2Cl)]^{+}$	246	100
$[M-(3Cl)]^{+}$	210	12,2
$[M-(4Cl)]^{+}$	176	25,6

Os compostos que contem apenas um átomo de cloro contem um pico M+ e outro pico M+2, sendo que este último apresenta intensidade aproximadamente igual a um terço da intensidade do pico do íon molecular M+, devido a menor abundância do isótopo ^{35}Cl. Os compostos que apresentam dois átomos de cloro, apresentam ainda o pico M+4, devido a diferentes combinações da massa do composto com os isótopos dos átomos de cloro (^{37}Cl+^{37}Cl, ^{37}Cl+^{35}Cl e ^{35}Cl+^{35}Cl). Desta forma, moléculas que contém três átomos de cloro serão observados picos M+2, M+4 e M+6. Em compostos policlorados, o pico de massa mais elevada pode ser muito fraco e não ser detectado (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRIL, 1991).

As atribuições das intensidades dos picos dos isótopos estão relacionadas na tabela 6 para compostos com 1 até 6 átomos de cloro.

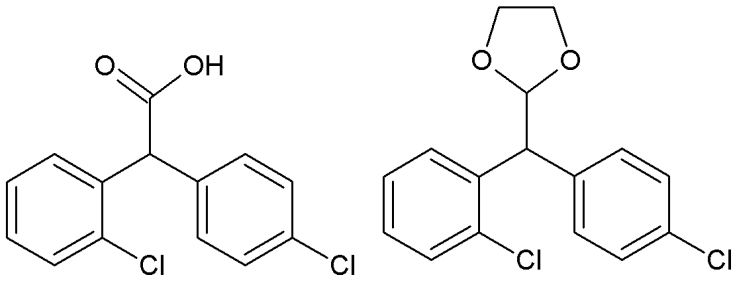
O *o,p'*- DDE foi escolhido para discussão da contribuição isotópica em razão de se tratar de um alqueno em que é facilmente observado o pico do íon molecular. A distribuição isotópica dos demais compostos sintetizados segue a mesma regra da tabela 6.

TABELA 6- INTENSIDADE RELATIVA DA DISTRIBUIÇÃO ISOTÓPICA DOS ÁTOMOS DE CLORO

	% (M+2)	% (M+4)	% (M+6)	% (M+8)	% (M+10)	% (M+12)
Cl_1	32,6					
Cl_2	65,3	10,6				
Cl_3	97,8	31,9	3,47			
Cl_4	131,0	63,9	14,0	1,15		
Cl_5	163,0	106,0	34,7	5,66	0,37	
Cl_6	196,0	161,0	69,4	17,0	2,23	0,11

FONTE: SILVERSTEIN, BASSLER, MORRIL, 1991

5.1.4 Síntese do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano e do ácido 2-(2-clorofenil)(4-clorofenil)acético (*o,p*'-DDA)



O espectro de RMN de ^1H do DDA (Figura 27) revelou como sinais importantes um singleto em 9,9 ppm (1H, COOH) e outro em 5,2 ppm (1H, C-H). No espectro de carbono (Figura 28), o pico relevante foi encontrado em 171 ppm, representante de carbono de carboxila. Os sinais encontrados no espectro de massas foram coincidentes com os descritos na literatura (JENSEN et al, 1987).

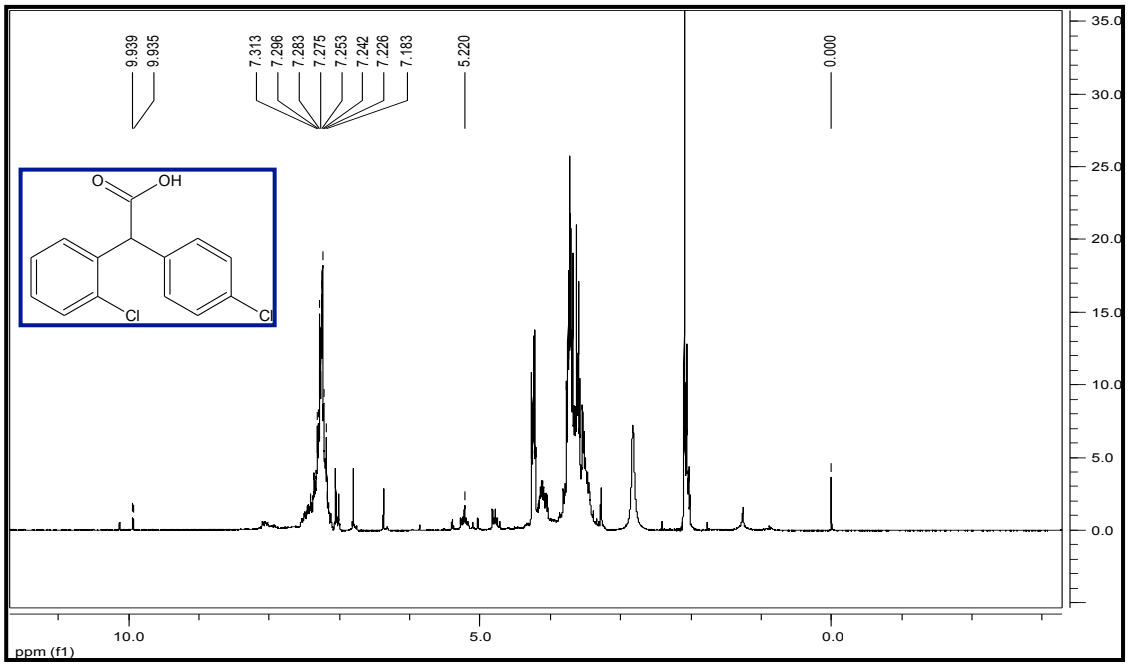


FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO *o,p*'-DDA

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28) foi possível observar um sinal em δ 171,1 ppm, de deslocamento referente a carbono carboxílico.

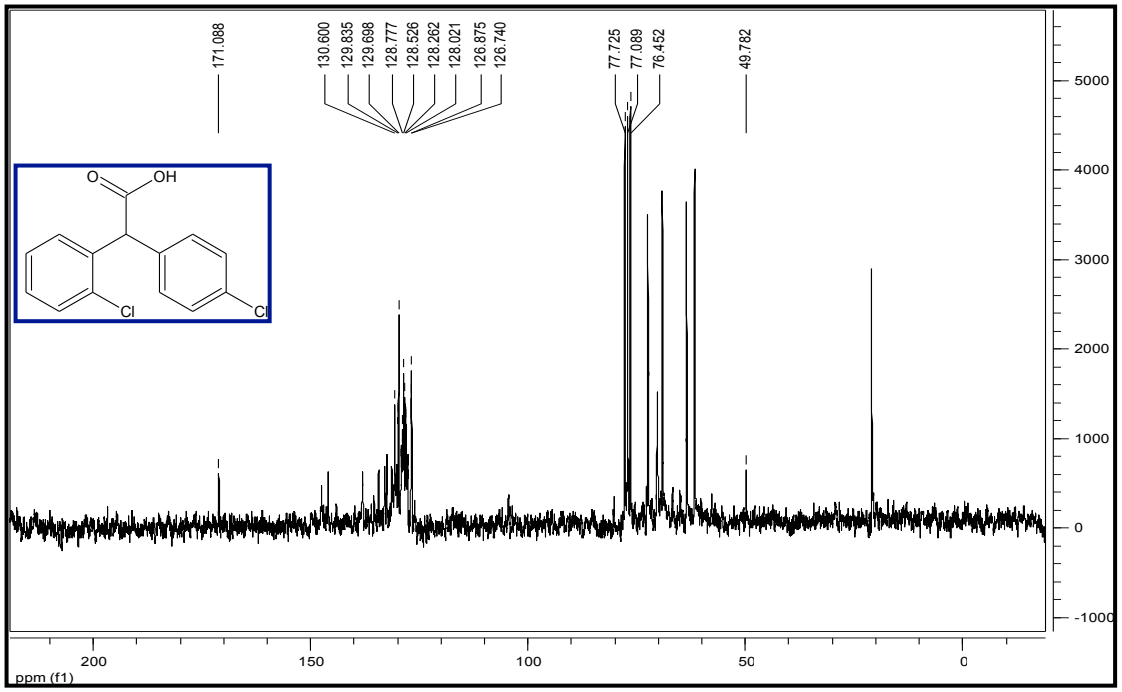


FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO *o,p*'-DDA

O espectro de massas (Figura 29) confirma a formação do *o,p'*-DDA através do pico no cromatograma em 10,42 minutos. O íon molecular, $C_{14}H_{10}O_2Cl_2$, de *m/z* 280 (massa molecular isotópica: 281,1549 Da) apresentou 25% de abundância relativa ao íon base $[M-(COOH)]^+$ de m/z 235. Outros íons encontrados relativos a perda de um e dois átomos de cloro a partir do íon base são de: *m/z* 199 (20%) e *m/z* 164 (57,5%), respectivamente (JENSEN et al, 1987).

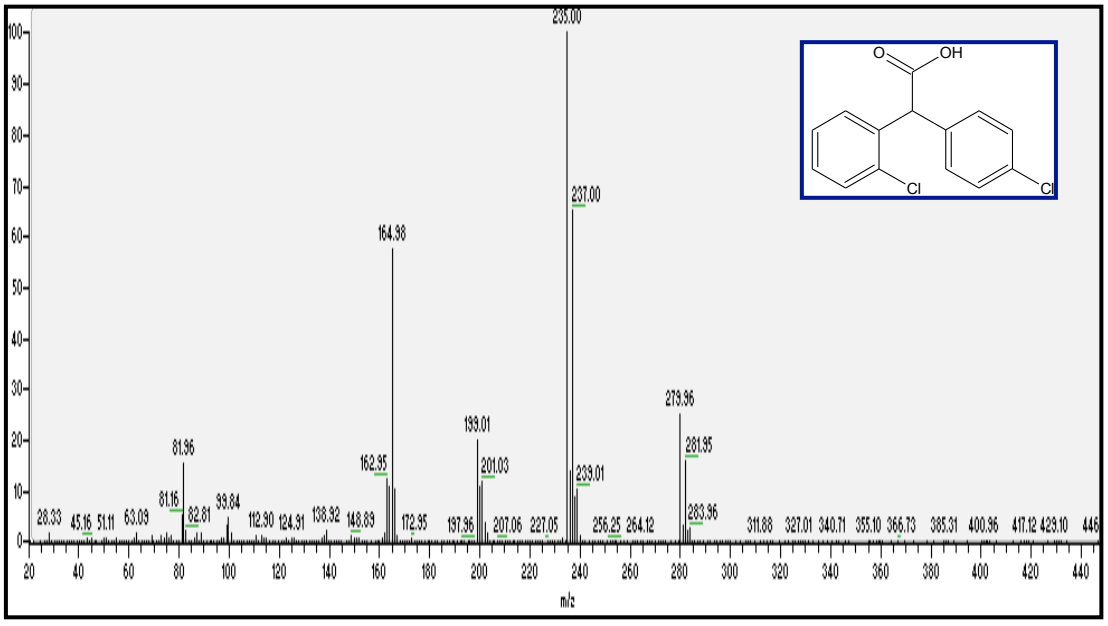


FIGURA 29 - ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDA EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 10,42 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

No entanto, dessa mesma reação, houve formação de uma mistura de produtos mais polares que o mitotano, como a *o,p'*-diclorodibenzofenona (*o,p'*-DBP) também considerada produto do metabolismo do mitotano, identificados por RMN de ^{13}C correspondente conforme figura 30.

Foram observados os sinais característicos desta cetona em δ 197,1 ppm no espectro de carbono, respectivamente, concordantes com os valores descritos na literatura (GOLD et al.,1981; JENSEN et al 1987).

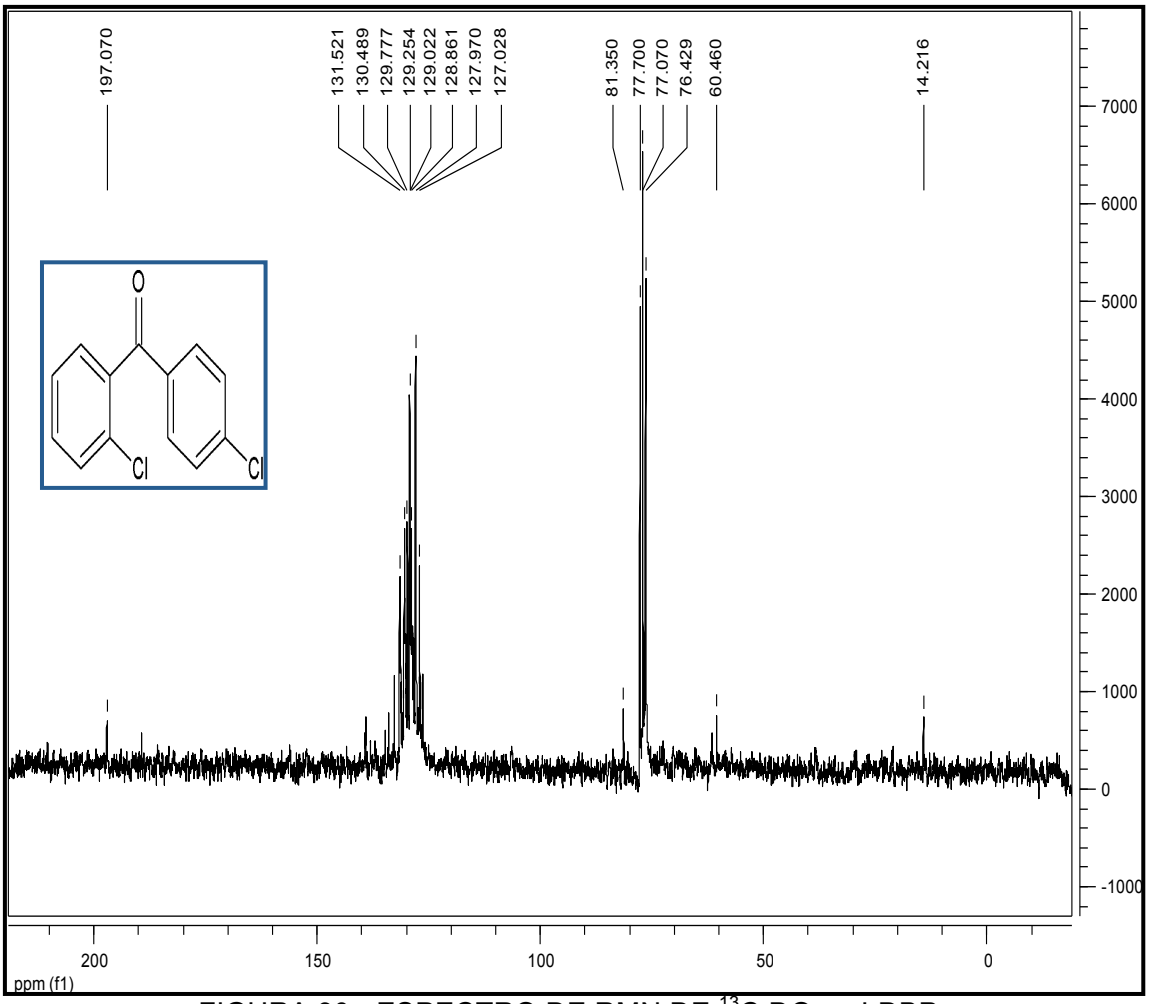


FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO *o,p'*-DBP

A *o,p'*-diclorodibenzofenona (*o,p'*-DBP), considerada também um metabólito do mitotano, foi caracterizada por espectrometria de RMN e CG-EM (Figura 31), como um dos produtos formados na reação de oxidação do mitotano.

O pico do íon molecular das cetonas aromáticas é intenso *m/z* 250 (29,3%). A quebra das alquil-aril-cetonas ocorre na ligação β ao anel, com a formação de um íon fragmento característico $ClArC\Xi O^+$de *m/z* 139 (100%), que usualmente leva ao pico base. A eliminação de CO deste fragmento dá o íon de *m/z* 111 (25,6%), coincidente com os dados descritos na literatura (JENSEN et al 1987).

A quebra da ligação adjacente ao anel para formar um fragmento $RC\Xi O^+$ é favorecida pela presença de grupos que atraem elétrons colocados na posição *para* do anel, como é o caso da *o,p'*-DBP.

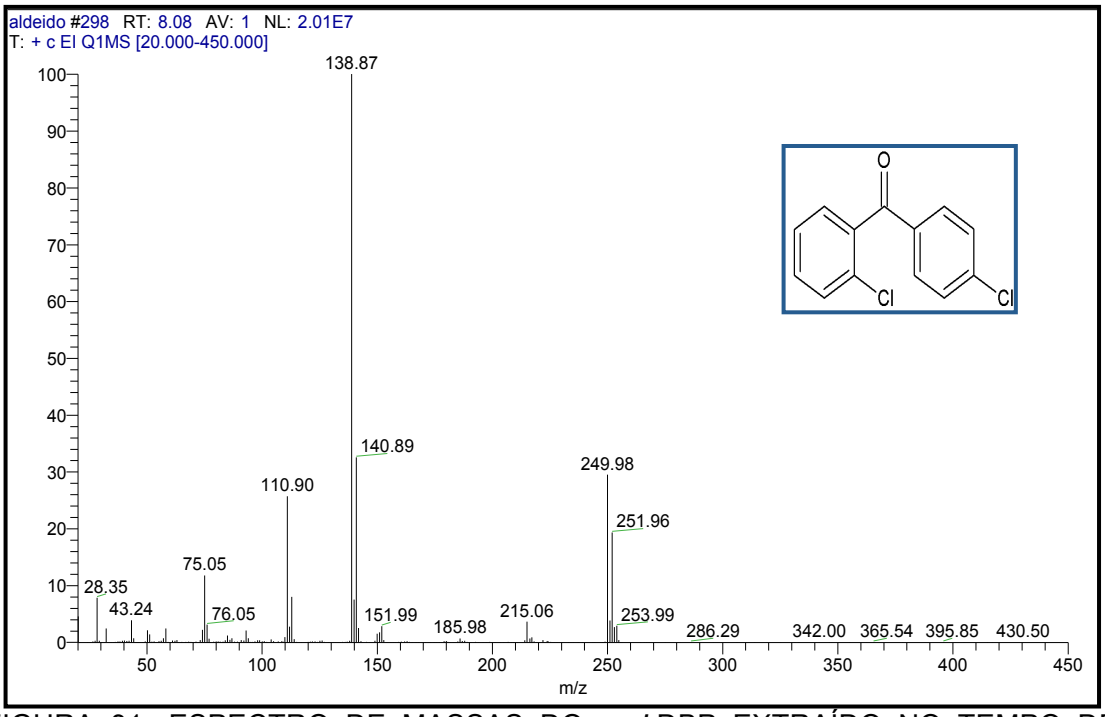


FIGURA 31- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 8,08 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Além do *o,p'*-DBP, um aldeído formado na reação foi o *o,p'*-diclorodifeniletanal (o,p'-DDCHO) (Figura 32), que durante a etapa de neutralização da base (KOH) com ácido sulfúrico, reagiu prontamente com o etilenoglicol (solvente) resultando no 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano. Este produto é muito estável, e sendo o produto majoritário da reação, cristalizou quando dissolvido em metanol e evaporado lentamente em capela de exaustão.

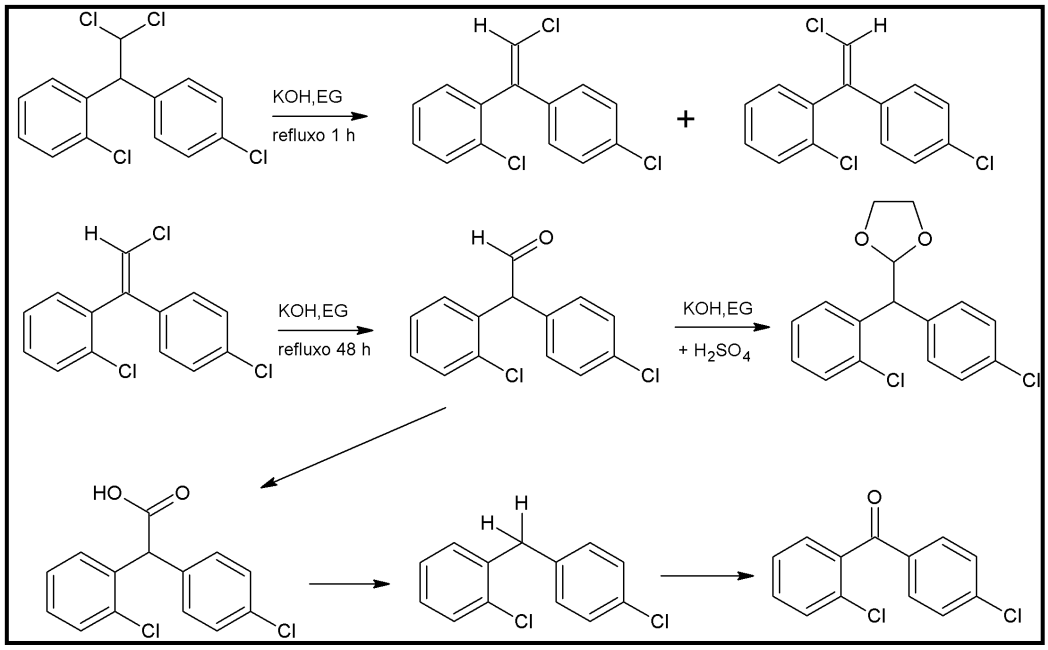


FIGURA 32– PRODUTOS FORMADOS DA HIDRÓLISE BÁSICA DO *o,p'*-DDD

Os cristais do dioxolano foram separados e lavados com metanol a frio e posteriormente foi elucidada sua estrutura por espectroscopia de RMN de ^{1}H e de ^{13}C e correlação bidimensional direta e a longa distância, espectrometria de massas e cristalografia de raios X.

No espectro de RMN de ^{1}H dos cristais obtidos (Figura 33) foi possível identificar os sinais de hidrogênios pertencentes aos anéis aromáticos na região entre δ 7,23 e δ 7,67 ppm, além de dois dubletos em δ 5,52 e δ 4,73 ppm, ambos com constante de acoplamento igual a J = 4,413 Hz, indicando o acoplamento vicinal entre estes dois hidrogênios.

Ainda foi possível observar um multipleto na região de δ 3,80 ppm que, até então, não poderia ser confirmado como parte da molécula apenas através da integração. Estes dados vieram a ser confirmados por experimentos bidimensionais.

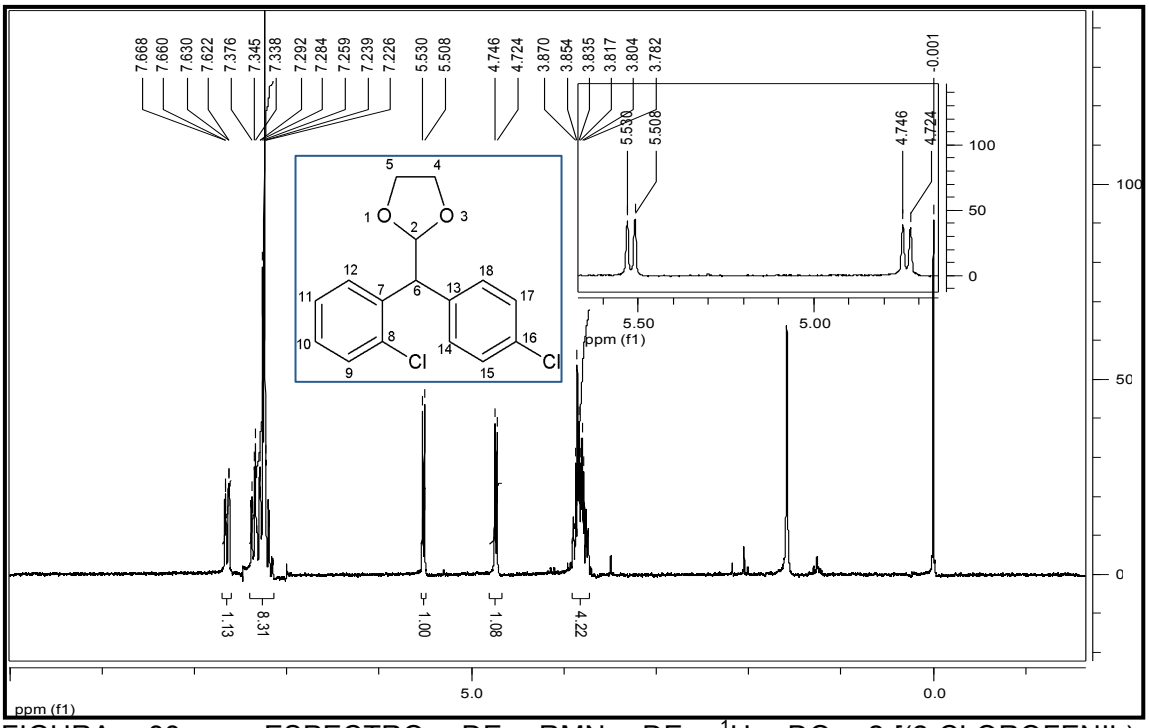


FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO 2-[(2-CLOROFENIL) (4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO

O espectro de ^{13}C do cristal obtido da reação entre mitotano e KOH utilizando como solvente etilenoglicol (Figura 34), revelou o mesmo perfil de sinais na região de anel aromático que os outros derivados do mitotano.

O dioxolano apresentou sinal em δ 105,1 ppm correspondente ao C-2 e outro em δ 50,7 ppm correspondente ao C-6, sinais análogos aos da estrutura química do mitotano. Ainda apareceram outros dois sinais, em δ 65,1 e δ 65,5 ppm, característicos de carbonos ligados a oxigênio. No entanto, a confirmação da estrutura só pôde ser realizada após experimentos de correlação bidimensional.

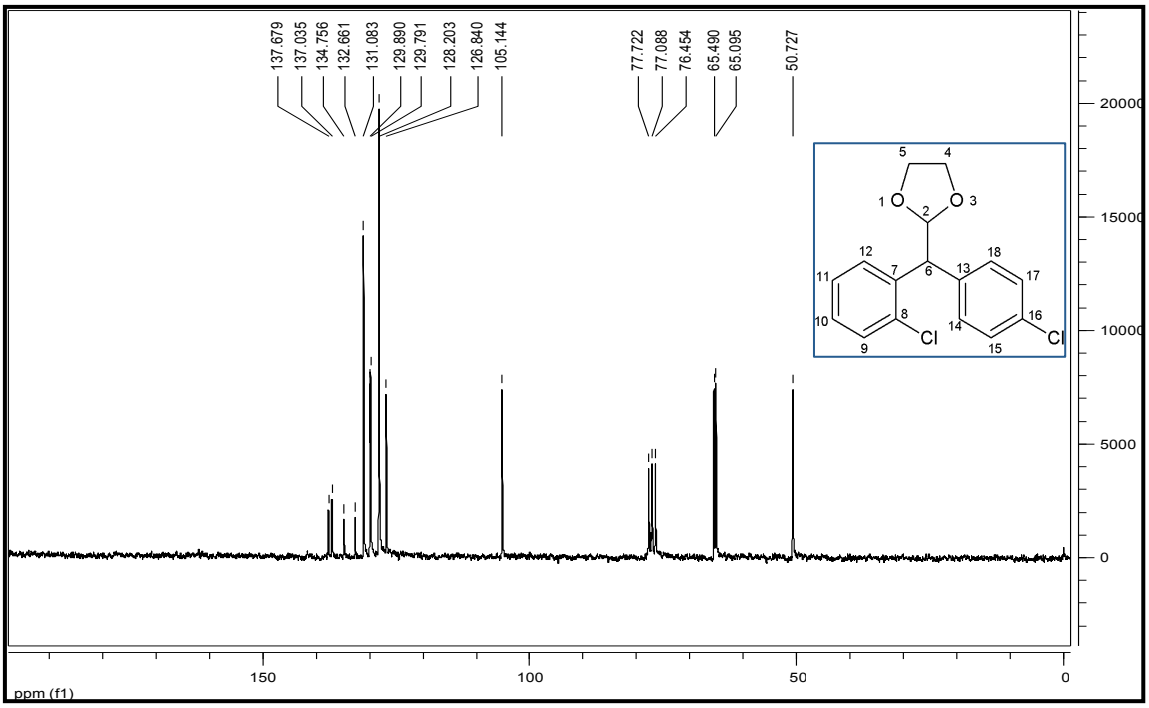


FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO 2-[(2-CLOROFENIL) (4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO

O experimento de correlação direta ^{1}H – ^{13}C determinou a correlação heteronuclear direta entre núcleos de hidrogênio e de carbono ($^{1}J_{CH}$ com ^{13}C) por meio da detecção da frequência de carbono através da frequência de hidrôgenio.

O mapa de correlação do produto (Figura 35) correlacionou os hidrogênios entre δ 7,23 e δ 7,67 ppm com os carbonos entre δ 126,8 e δ 137,7 ppm, como esperado para o deslocamento de hidrogênios e carbonos dos anéis aromáticos.

O dubleto em δ 5,52 ppm foi correlacionado diretamente com o carbono em δ 105,1 ppm concordante com a posição C-2, análogo à posição C-1 da estrutura química do mitotano.

A constante de acoplamento revelou que o hidrogênio em δ 5,52 ppm acopla com um hidrogênio vicinal, em δ 4,73 ppm, e este por sua vez, foi correlacionado no experimento de correlação direta com o carbono em δ 50,7 ppm, sendo este sinal, portanto, atribuído ao C-6 da molécula.

O multipleto na região de δ 3,80 ppm obteve correlação com os carbonos em δ 65,1 e δ 65,5 ppm, região característica de ligação carbono-oxigênio. No entanto, somente o experimento de correlação à longa distância

poderia confirmar o multipleto como parte da estrutura química do produto através de sua correlação com algum carbono da estrutura.

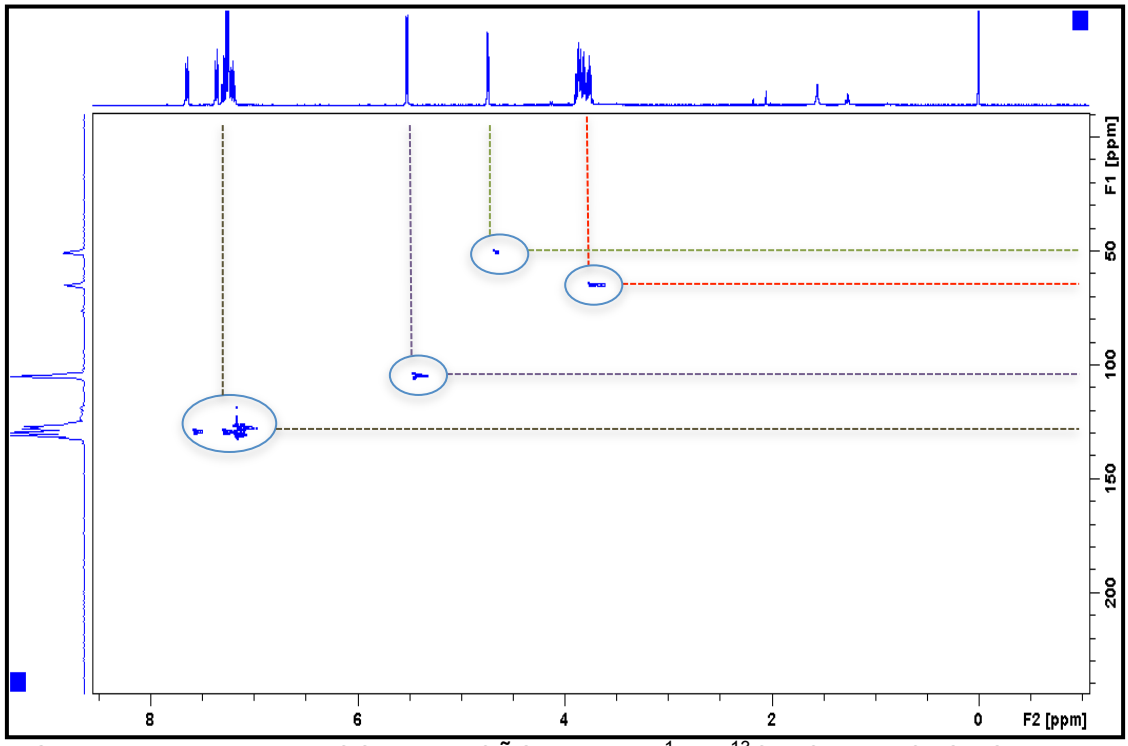
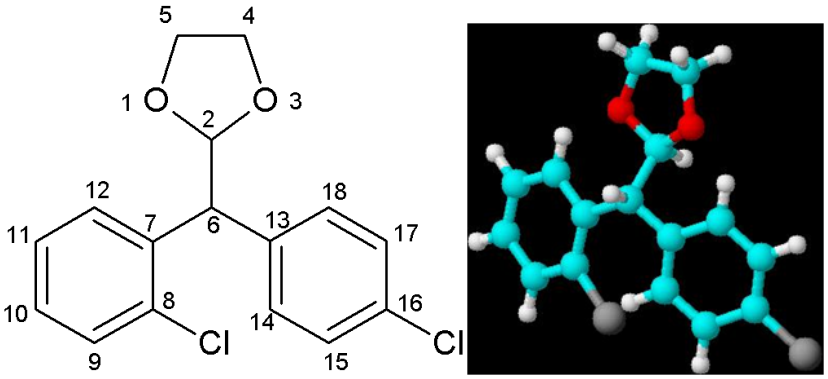


FIGURA 35 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^{1}H – ^{13}C DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO

O experimento decisivo na confirmação da estrutura química dos cristais, formados na reação de oxidação do mitotano, foi o experimento de correlação heteronuclear a longa distância.

O mapa de correlação (Figura 36) revelou uma correlação forte entre o dubleto δ 4,73 ppm e o C-2 (δ 105,1 ppm) e correlação forte também entre esse mesmo dubleto e os carbonos na região de aromático. Este resultado é concordante com a suposta estrutura (XI), já que a distância entre o hidrogênio de C-6 em δ 4,73 ppm e o C-2 é de duas ligações.



(XI)

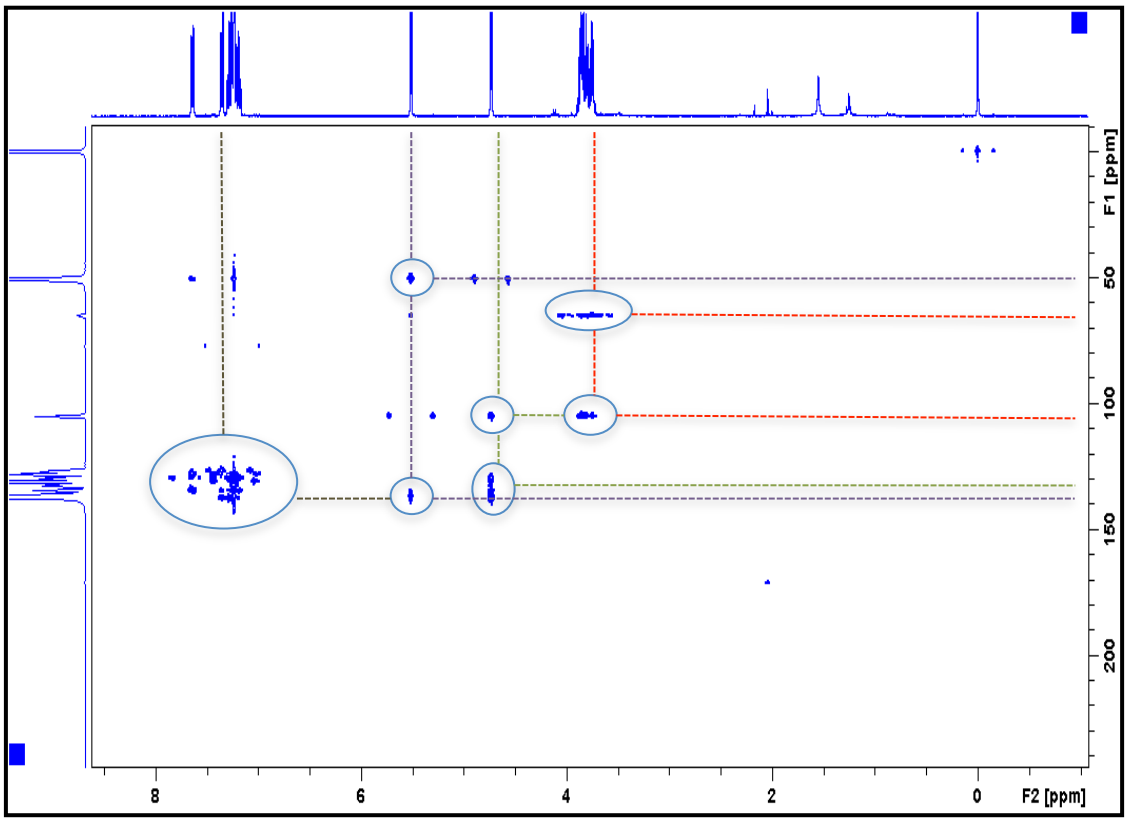


FIGURA 36 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^{1}H – ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO

Complementarmente, foi observado também uma correlação forte entre o dubleto em δ 5,52 ppm com o C-6 em δ 50,1 ppm, distância de 2 ligações; correlação forte também com os carbonos na região de aromático, distância de 3 ou mais ligações; e correlação fraca com os carbonos C-4 e C-5 em δ 65,1 e δ 65,5 ppm, carbono ligado à oxigênio.

Por fim, o multipleto em δ 3,80 ppm apresentou correlação forte com o carbono em δ 105,1 ppm, correspondente ao C-2 da molécula, concluindo que este sinal definitivamente faz parte da molécula. De posse de todas as

evidências dos experimentos descritos, concluiu-se que no momento da neutralização do KOH com ácido sulfúrico, o aldeído (DDCHO), que havia sido formado, reagiu prontamente com o etilenoglicol, para formar o 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano (Tabela 7).

TABELA 7 – SUGESTÃO DE ATRIBUIÇÕES DE CARBONOS E HIDROGÊNIOS DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO

Posição	$^{13}C\{^{1}H\}$	^{1}H (mult, *J* em Hz)	correlações com C (HMBC)
2	105,1	5,52 (1H, *d,* 4,4)	6, 4, 5 e C-Ar
4	65,5	3,80 (2H, *m*)	2
6	50,7	4,73 (1H, *d,* 4,4)	2 e C-Ar
5	65,1	3,80 (2H, *m*)	2
7	134,7	-	
13	137,7	-	
8	137,0	-	
14	132,6	7,19 (1H, *d* 7,4)	
9	131,1	7,23 (1H, *dd* 7,7; 1,6)	
15	128,2	7,15 (1H, *d* 7,4)	
10	129,9	7,24 (1H, *ddd*)	C-Ar
16	137,0	-	
11	129,8	7,34 (1H, *ddd*)	
17	128,2	7,62 (1H, *d* 7,5)	
12	126,8	7,38 (1H, *dd* 7,7; 1,5)	
18	132,6	7,66 (1H, *d* 7,5)	

O produto (massa molecular isotópica: 309,2089 Da) foi caracterizado também por espectrometria de massas, $C_{16}H_{14}O_2Cl_2$, (Figura 37) onde foi possível ser identificado no tempo de retenção de 10,87 minutos. As perdas do anel dioxolano e de um átomo de cloro pode ser vista no fragmento de *m/z* 199

(7,4%) e a consequente perda de mais um átomo de cloro no íon de *m/z* 165 (23,4%). O íon base de *m/z* 73 (100%) constitui o fragmento cíclico dioxolano.

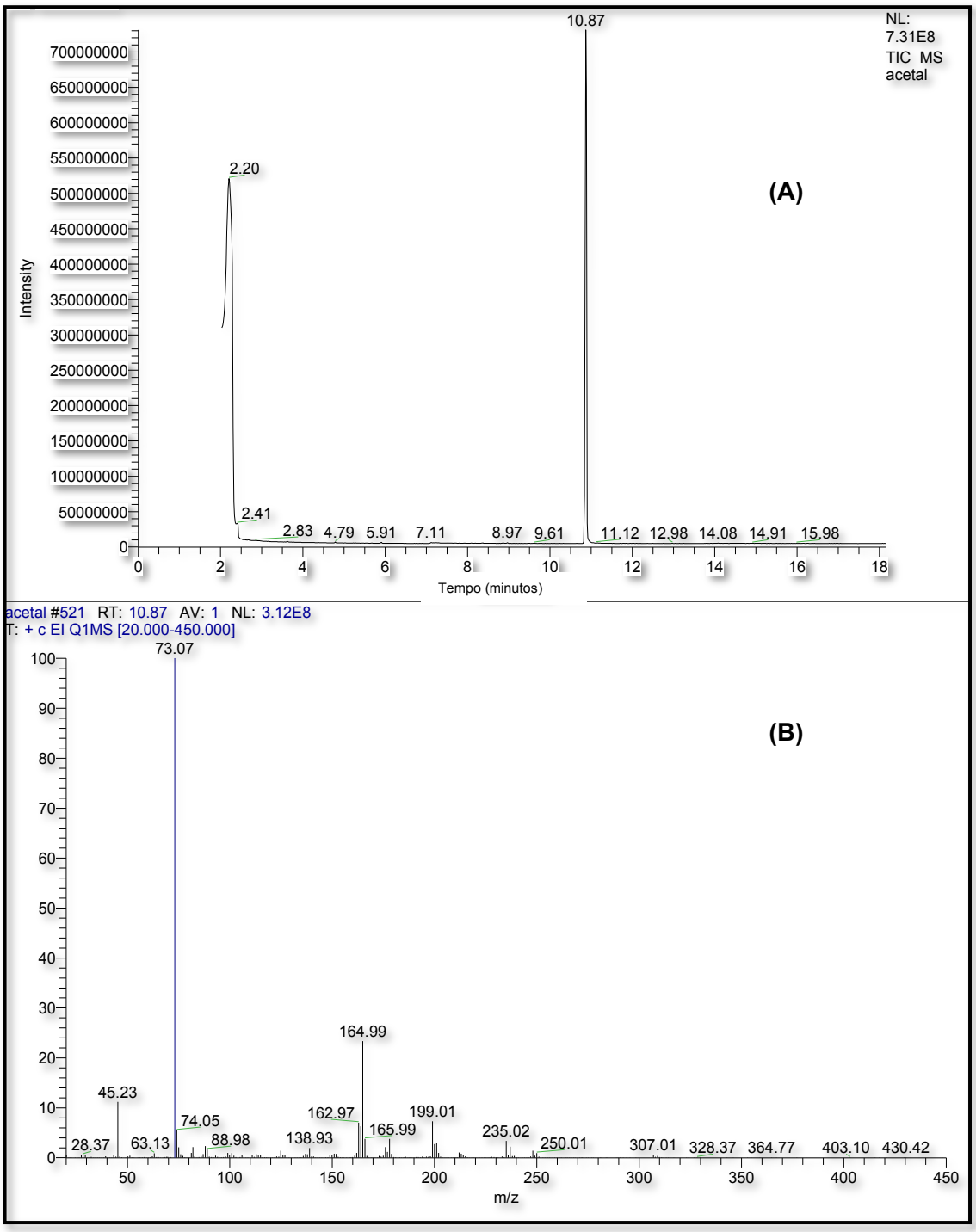


FIGURA 37 – (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 10,87 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Considerando a formação não esperada deste produto, foi realizada uma pesquisa bibliográfica, incluindo a base de dados SciFinder Schoolar e a base de dados cristalográfica *Cambridge Structural Database* (CSD), através da qual não foi encontrada nenhum artigo de síntese ou caracterização desta molécula e tampouco sua estrutura de raios X resolvida, significando que trata-se de uma molécula cuja a estrutura cristalina é inédita.

5.1.4.1 Análise por cristalografia de raios- X

A amostra de cristais incolores de formato de placas do $C_{16}H_{14}Cl_2O_2$ de dimensões aproximadas de 0,290 mm x 0,560 mm x 0,590 mm, foi usada para a análise cristalográfica de raio X. Os dados de intensidade do raio-X foram medidos.

TABELA 8- DADOS DE COLETA DE RAIOS-X E PARÂMETROS DE REFINAMENTO DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO

Fórmula Molecular	$C_{16}H_{14}Cl_2O_2$
Massa Molecular	309,17
Temperatura	296(2) K
Comprimento de Onda	0,71073 Å
Tamanho do Cristal	0,290 x 0,560 x 0,590 mm
Aspecto do Cristal	Placas incolores
Sistema do Cristal	triclínico
Grupo Espacial	P-1
Dimensões da unidade de célula	a= 7,5728(2) Å α = 63,3570(10)° b = 10,2268(2) Å β = 84,0210(10)° c = 11,2858(2) Å γ = 71,1940(10)°
Volume	738,68(3) $Å^3$
Z	2
Densidade	1,390 g/cm^3
Coeficiente de absorção	0,437 mm^{-1}
F (000)	320

A matriz completa anisotrópica com refinamento dos mínimos quadrados em F2 com 181 variáveis convergiram em R1 = 4,02%, para os dados observados e wR2 = 11,73% para todos os dados.

A qualidade do ajuste (*goodness-of-fit*) foi de 1,045. O pico mais largo na diferença final na síntese de densidade eletrônica foi de 0,370 e-/Å3. E o buraco mais largo foi de -0.285 e-/Å3 com um desvio RMS de 0,042 e-/Å3. Na base do modelo final, a densidade calculada foi de 1,390 g/cm^3 e F(000), 320e- (Figura 38).

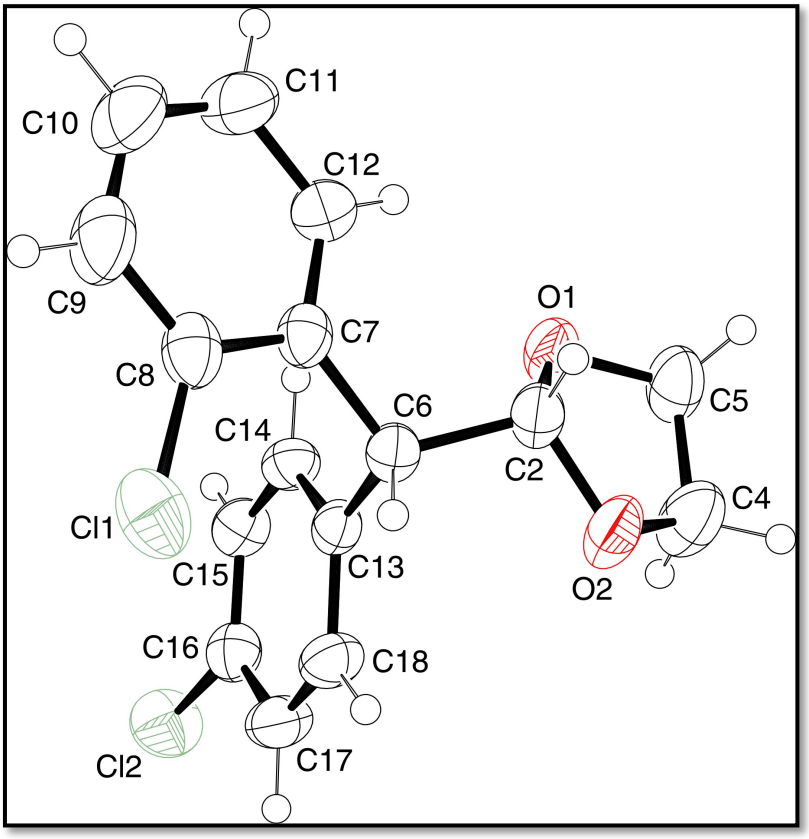


FIGURA 38- MAPA DE DENSIDADE DO 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3-DIOXOLANO OBTIDO POR ANÁLISE CRISTALOGRÁFICA DE RAIOS-X

5.1.5 Síntese do 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil)-1-(4-clorofenil)etanol

A cloridrina 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil)-1-(4-clorofenil)etanol foi obtida através da reação entre o DDMU e ácido tricloroisocianúrico sob refluxo.

A síntese apresentou rendimento de 67,4% e o produto pode ser revelado sob luz ultravioleta na CCD, utilizando como fase móvel o hexano no Rf de 0,31.

O produto foi caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{1}H e ^{13}C), experimentos bidimensionais e espectrometria de massas.

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 39) foi possível visualizar sinais na região de aromático, e um singleto em δ 3,5 ppm referente ao hidrogênio ligado à hidroxila. O singleto do hidrogênio ligado ao C-1 se encontra em meio ao sinal de aromáticos, provavelmente em δ 7,2 ppm (YONEMURA; NISHINO; KUROSAWA, 1986; CHANDRASEKHAR; MURTHY, 1987).

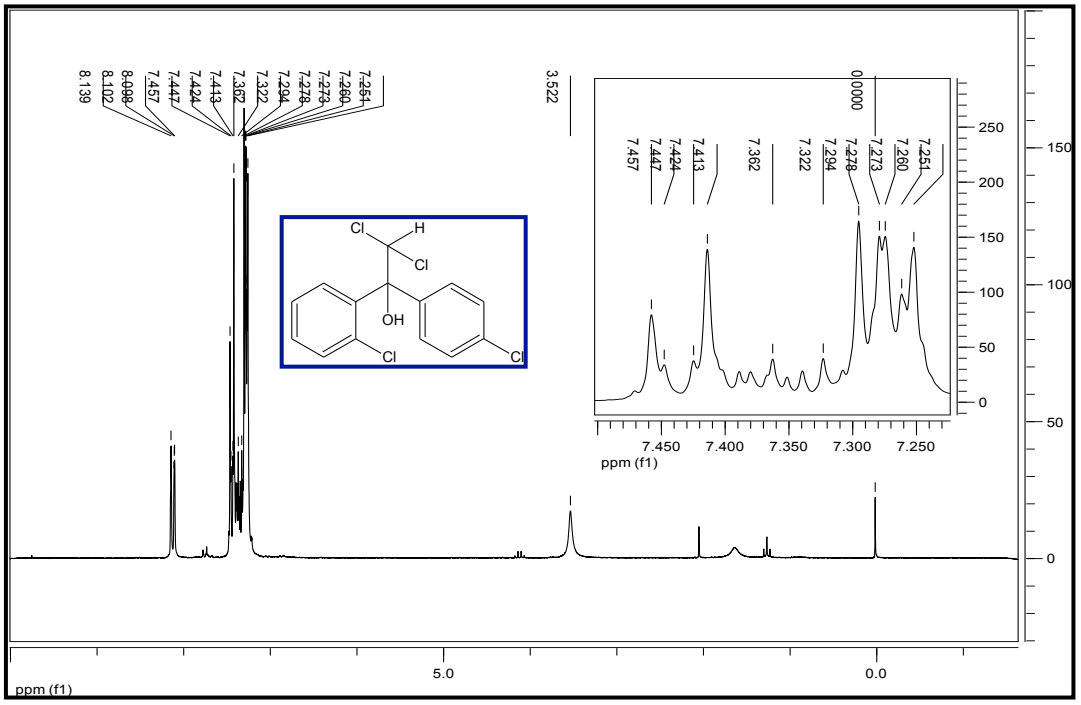


FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL

No espectro de RMN de ^{13}C, aparecem 10 picos na região entre δ 127,0 ppm e δ 139,2 ppm referentes aos carbonos dos anéis aromáticos e um pico em δ 81 ppm, atribuído ao C-1.

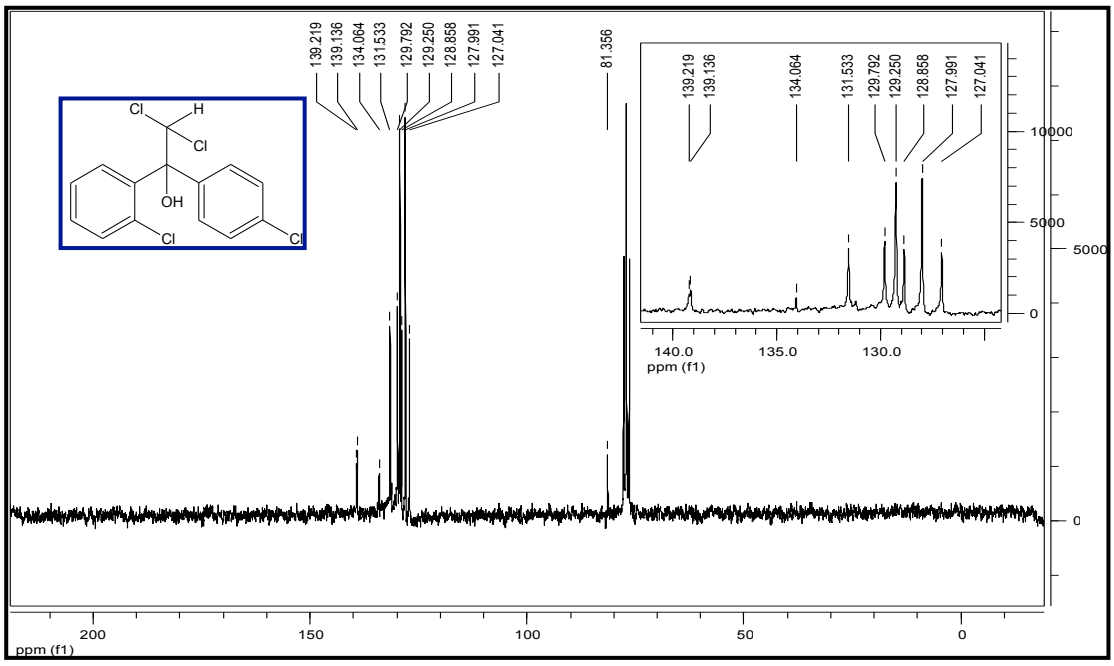


FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL

O mapa de correlação direta ^{1}H -^{13}C (Figura 41) apresenta, além das correlações de hidrogênios de anéis aromáticos com carbonos aromáticos, a correlação direta de um hidrogênio em aproximadamente δ 7,2 ppm com o carbono em δ 81,3 ppm, confirmando que esta correlação é da ligação H-C-Cl no C-1. Não foram encontradas outras correlações diretas, já que o hidrogênio da hidroxila não faz ligação com carbono.

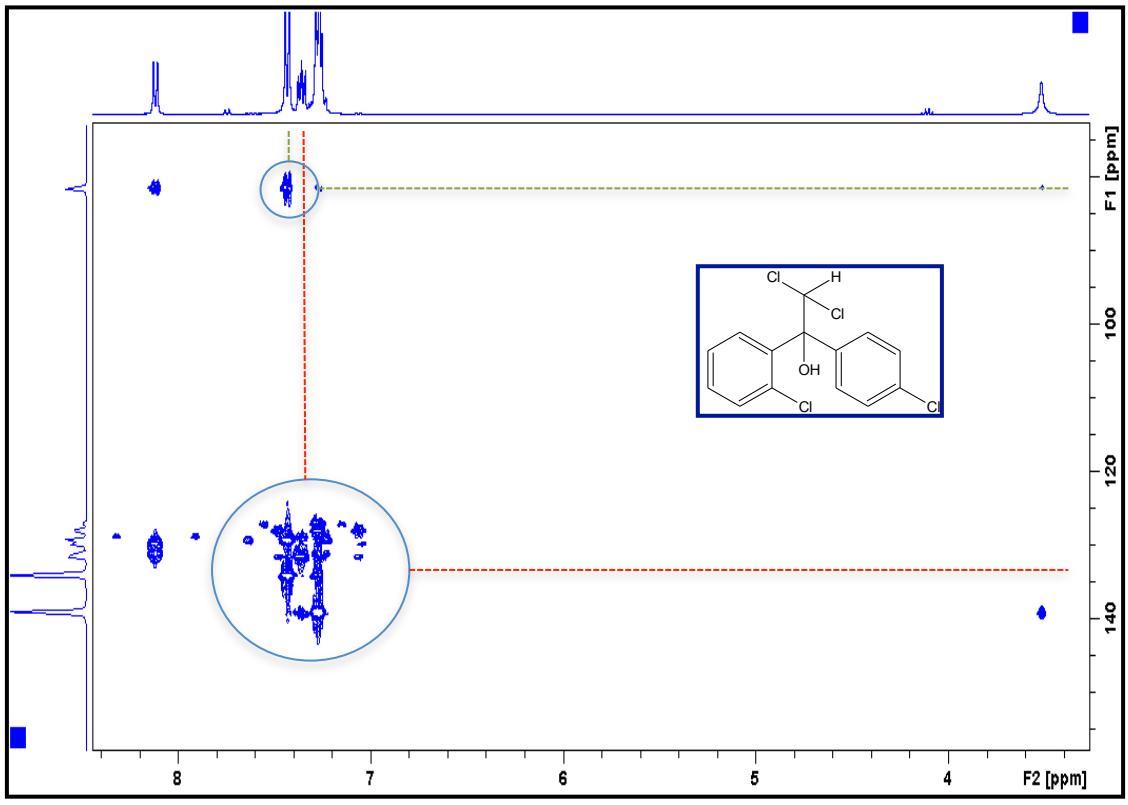


FIGURA 41 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^{1}H -^{13}C 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL

O experimento de correlação a longa distância (Figura 42) mostra que o hidrogênio em δ 3,5 ppm apresenta correlação com o carbono em δ 139,2 ppm, o que indica uma correlação a distância do hidrogênio da hidroxila com um carbono aromático, coincidindo com a estrutura química da cloridrina.

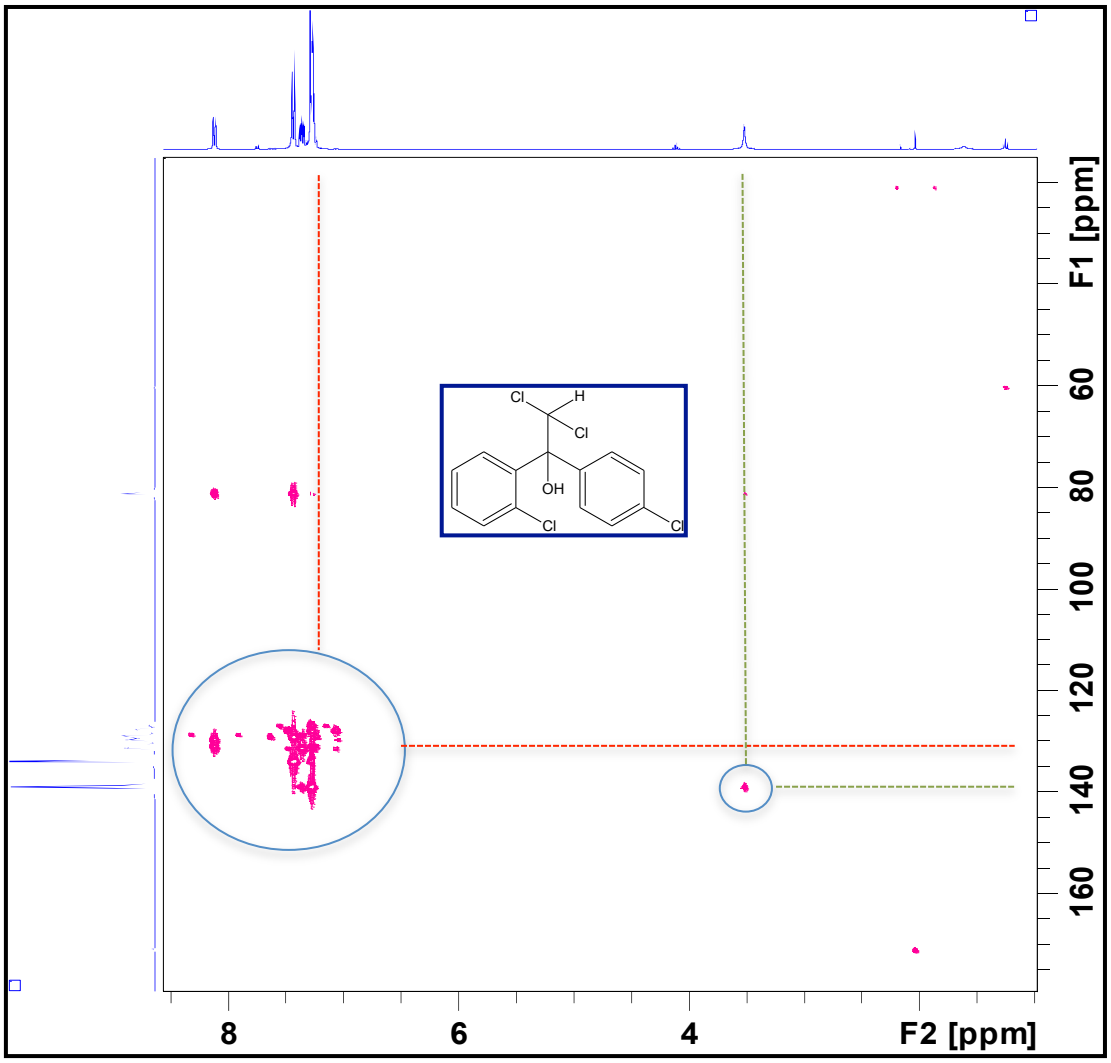


FIGURA 42 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^{1}H -^{13}C A LONGA DISTÂNCIA 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL

A análise por CG-EM da cloridrina (Figura 23), $C_{14}H_{10}OCl_4$, massa molecular isotópica de 336,0776 Da, mostra o produto sendo retido em 11,17 minutos.

O espectro de massas confirma a identidade do produto, onde é possível observar o íon base de *m/z* 251 que representa a perda de -$CHCl_2$. Este fragmento confirma que, durante a síntese, a adição do cloro ocorreu em carbono 1 e da hidroxila em carbono 2, e não o contrário.

Ainda é possível observar os íons de *m/z* 139 (87,8%) referente a [M-($CHCl_2$)-(C_6H_4Cl)]$^+$ e *m/z* 111 [M-($CHCl_2$)-(C_6H_4Cl)-(CO)]$^+$ (23,2%).

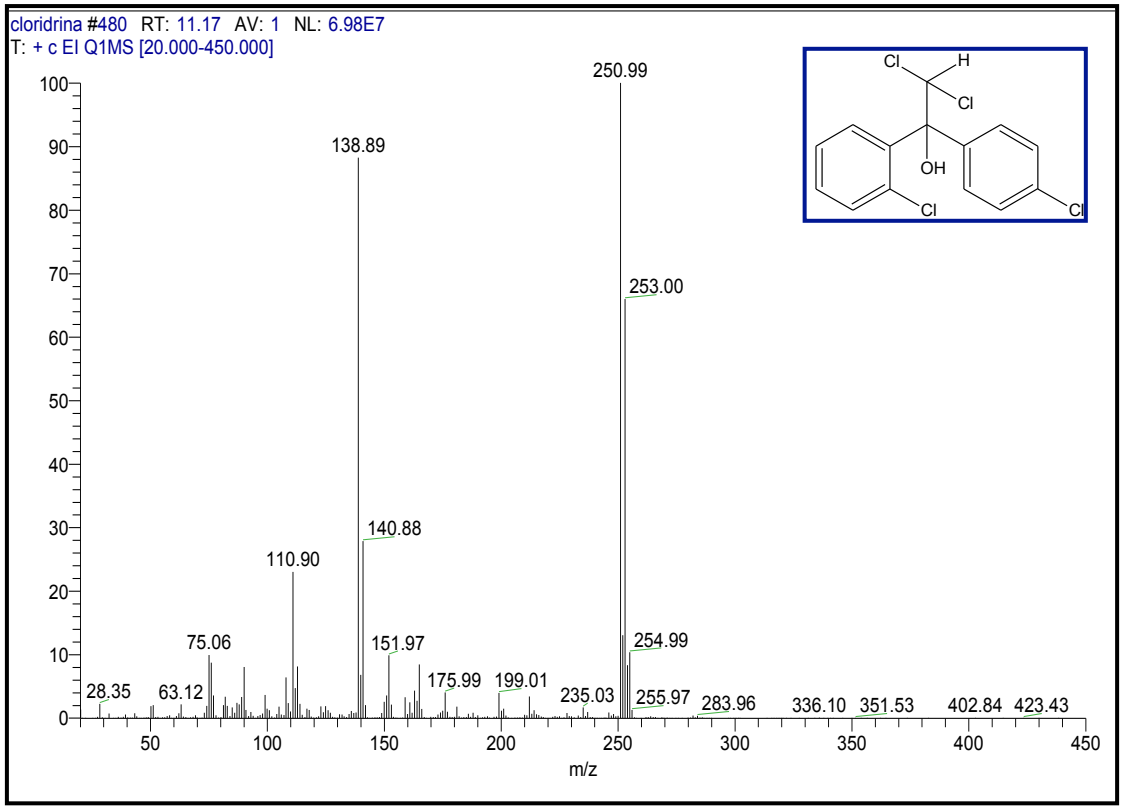


FIGURA 43 – ESPECTRO DE MASSAS DO 2,2-DICLORO-1-(2-CLOROFENIL)-1-(4-CLOROFENIL)ETANOL EXTRAÍDO EM 11,17 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

A síntese do 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil)-1-(4-clorofenil)etanol não está descrita na literatura, assim como sua caracterização espectroscópica. Esta substância também não é comercialmente disponível.

A cloridirina é considerada um suposto intermediário da formação do *o,p'*-DDE em humanos e também é um produto da biotransformação do DDT por fungos (PURNOMO, KAMEI, KONDO, 2008).

De acordo com a hipótese de CAI et al (1994), a cloridrina seria um metabólito humano formado da *α*-hidroxilação do mitotano, o qual por conseguinte, formaria o *o,p'*-DDE.

O objetivo de sintetizar esta cloridrina, é de pesquisá-la tanto em produtos de biotransformação por fungos (conhecida como FW-152) quanto em amostras biológicas humanas, principalmente em plasma onde encontra-se o *o,p'*-DDE, para fornecer maiores indícios que confirmem esta hipótese de rota metabólica do mitotano.

5.2 PESQUISA DE METABÓLITOS DO MITOTANO EM PLASMA E URINA DE PACIENTES SOB TRATAMENTO COM MITOTANO

5.2.1 Pesquisa de Metabólitos em Plasma de Pacientes

Os metabólitos do mitotano foram pesquisados em cinco amostras de plasma de pacientes pediátricos. As amostras foram analisadas por CG-EM (Figura 44) devido aos baixos limites de detecção dos metabólitos e os picos foram comparadas aos das substâncias sintetizadas.

Os picos cromatográficos observados em 8,30 min; 9,76 min, 14,85 min e 19,00 min, bem como outros picos minoritários de menor tempo de retenção, foram identificados após extração de seus expectros de massas como sendo derivados de ácidos graxos e lipídeos plasmáticos.

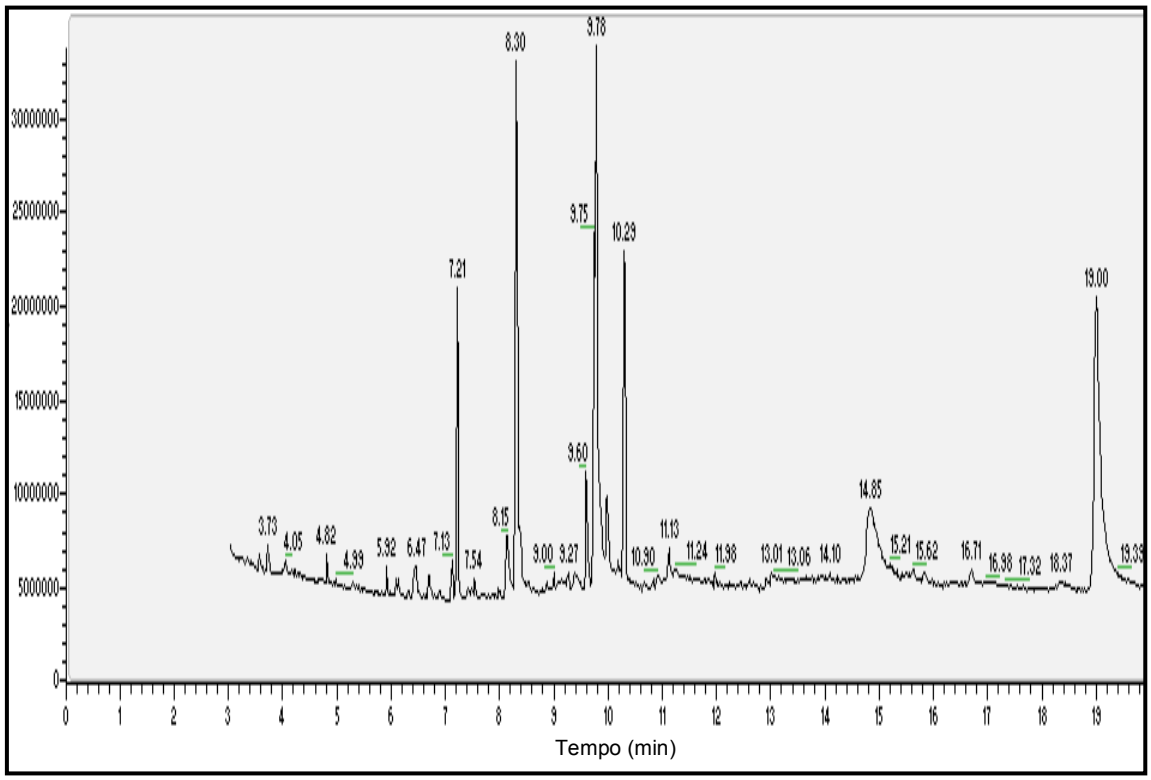


FIGURA 44- CROMATOGRAMA DE VARREDURA DO PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO OBTIDO POR GC-EM UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Após a extração dos espectros de massas nos tempos de retenção de 7,21 minutos 8,11 minutos e 9,6 minutos, foram identificados os metabólitos do mitotano *o,p'*-DPM, *o,p'*-DBP e *o,p'*-DDE, respectivamente. O pico em 10,29 minutos corresponde ao próprio mitotano.

O *o,p'*- DPM, $C_{13}H_{10}Cl_2$, (Figura 45) foi confirmado pelo íon molecular (massa molecular isotópica: 237,1452 Da), e pelos mesmos fragmentos (*m/z* 201 e 164,4) descritos na literatura (JENSEN et al, 1987).

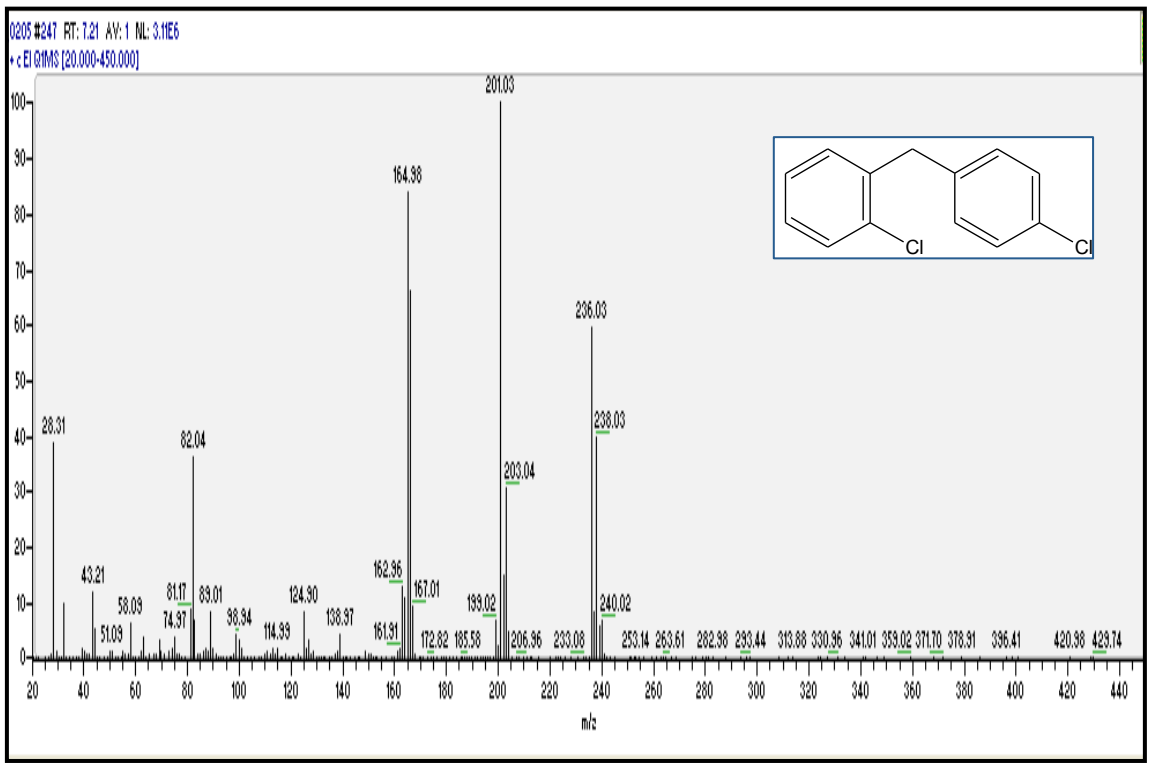


FIGURA 45- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DPM, METABÓLITO ENCONTRADO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 7,21 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

O *o,p'*-DBP foi confirmado em 8,11 minutos (Figura 46) como metabólito do mitotano presente no plasma através das seguintes informações: íon molecular de *m/z* 252 (massa molecular isotópica: 252,1366 Da), fragmentos de *m/z* 139 e 111 correspondentes com o produto sintetizado e dados encontrados na literatura (JENSEN et al, 1987).

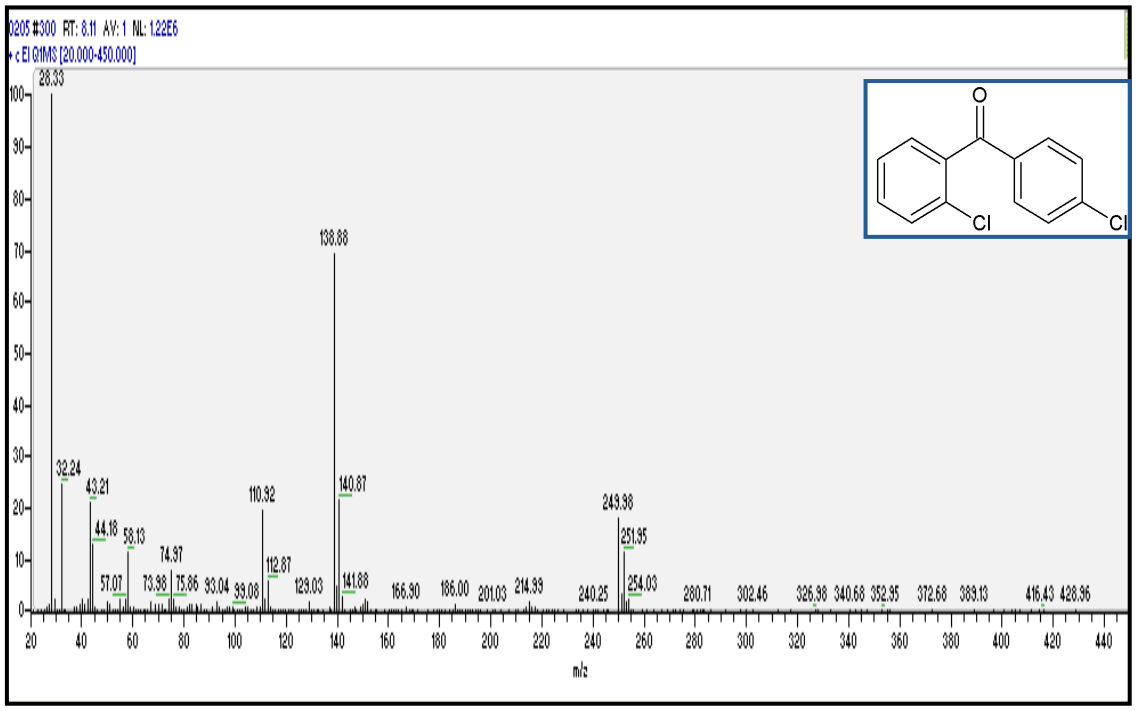


FIGURA 46- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,11 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Os espectros de massas (Figura 47) das amostras de plasma, extraídos no mesmo tempo de retenção (9,6 minutos) do produto sintetizado, foram comparados e apresentaram perfil espectral semelhantes tanto em fragmentos formados como abundância relativa.

O espectro de massas do mitotano foi confirmado pela comparação ao espectro do padrão. (Figura 48).

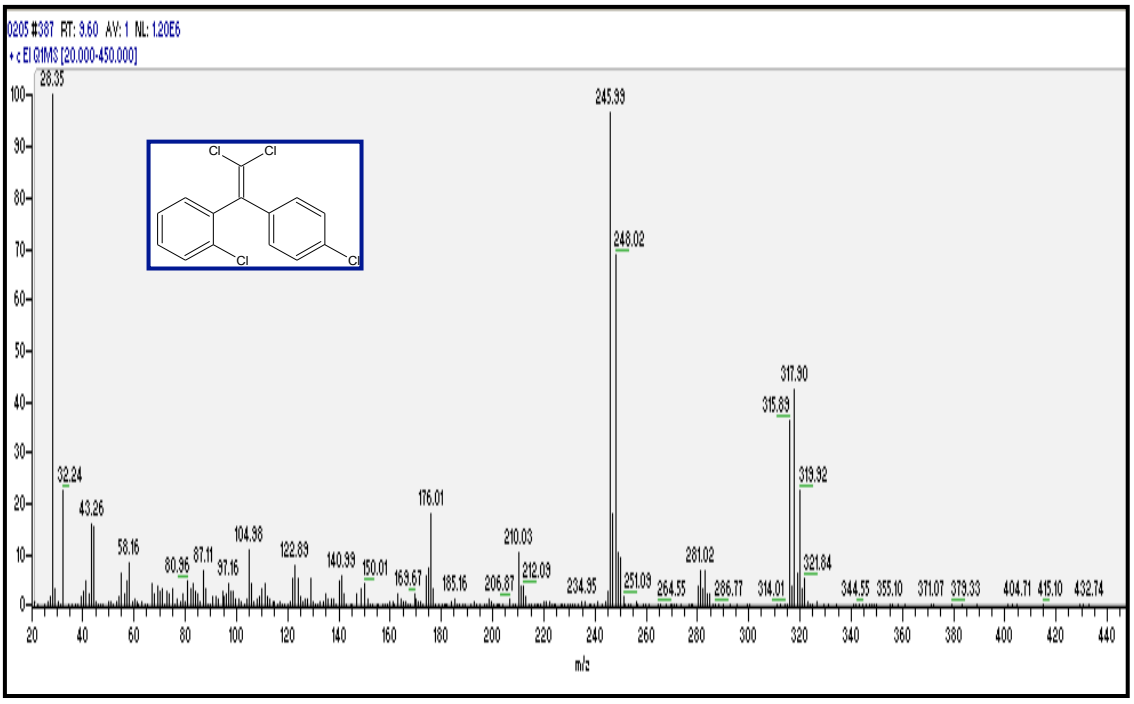


FIGURA 47- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE, METABÓLITO ENCONTRADO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,60 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

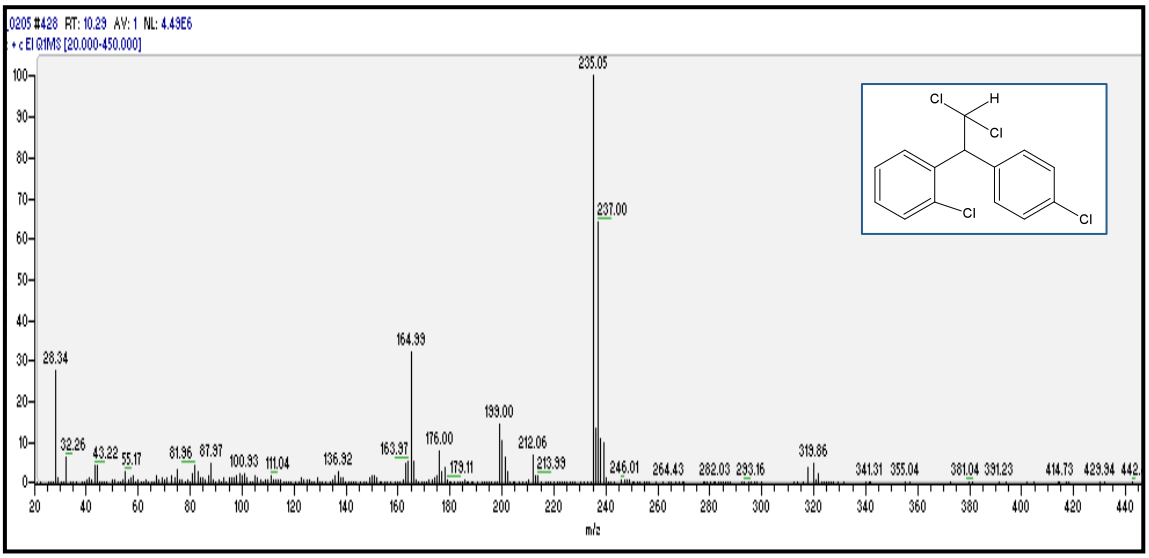


FIGURA 48- ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDD (MITOTANO), RECUPERADO EM PLASMA DE PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO, EXTRAÍDO EM 9,60 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Não foi possível estabelecer uma correlação confiável entre a concentração de cada metabólito formado e a do mitotano, devido a variabilidade inter-pessoal de metabolismo do fármaco.

Para três pacientes as concentrações relativas dos metabólitos encontrados em plasma formaram a seguinte ordem: *o,p'*-DPM > *o,p'*-DDD > *o,p'*-DBP > *o,p'*-DDE. Porém, para dois pacientes, o mitotano apresentou a maior concentração e o o,p'-DDE também aumentou sua porcentagem relativa: *o,p'*-DDD > *o,p'*-DPM > *o,p'*-DDE > *o,p'*-DBP.

A variação no rendimento dos metabólitos pode ser atribuída ao método de análise, a oscilação de saúde debilitada ou a uma terapia adicional recebida pelo paciente.

Um estudo retrospectivo publicado recentemente abrangendo um grande número de pacientes (n=91) buscou correlacionar as concentrações dos metabólitos *o,p'*-DDE e *o,p'*-DDA encontrados em plasma com a responsividade ao tratamento com mitotano. Mesmo considerando que a concentração encontrada para os metabólitos apresentou uma imensa variabilidade (*o,p'*-DDE: de 0,39- 6,55 mg/L e *o,p'*-DDA: 3,79- 136,0 mg/L) os autores afirmam que houve uma correlação significativa entre o *o,p'*-DDD, o *o,p'*-DDE e o *o,p'*-DDA. Neste estudo, foi usado como método de detecção a CLAE, pelo qual que não é possível detectar metabólitos minoritários ou ainda concentrações de *o,p'*-DDE e *o,p'*-DDA na ordem de nanogramas (HERMSEN, et al 2011).

Curiosamente, este estudo revela identificar o metabólito *o,p'*-DDA em plasma, enquanto que em nenhuma amostra de plasma de nosso estudo, mesmo utilizando um método de detecção mais sensível (GC-EM), não conseguimos encontrar o *o,p'*-DDA em plasma. Vale ressaltar que os autores assumem não terem disponível o padrão de *o,p'*-DDA e usaram como referência o *p,p'*-DDA. E ainda, que o número de amostras (n=5) do presente trabalho foi bastante inferior ao desse estudo (n=91).

Os autores afirmam que houve uma correlação direta entre concentração do *o,p'*-DDA e resposta do tumor ao tratamento em um subgrupo de pacientes (n=27) (HERMSEN, et al 2011).

O resultado mais consistente, porém deveras conhecido, é da correlação da concentração plasmática do mitotano de 14 µg/mL com a eficácia terapêutica (TERZOLO, et al 2007).

O estudo de HERMSEN et al (2011) não apresentou resultados concordantes com o estudo a longo prazo de Zaluska-Kasperlik e Cichocki (2005), onde propuseram uma relação entre a maior sobrevida do paciente com valores mais elevados do metabólito *o,p'*-DDE encontrado em plasma, podendo este ser considerado como fator de bom prognóstico.

5.2.2 Pesquisa de Metabólitos em Urina de Pacientes

As amostras de urina, mesmo tendo sido pré-purificadas através de centrifugação e partição líquido-líquido, felizmente apresentaram uma variedade de metabólitos encontrados por CG-EM (Figura 49) já que se trata de uma matriz própria para a excreção da maioria dos metabólitos gerados pelo corpo humano.

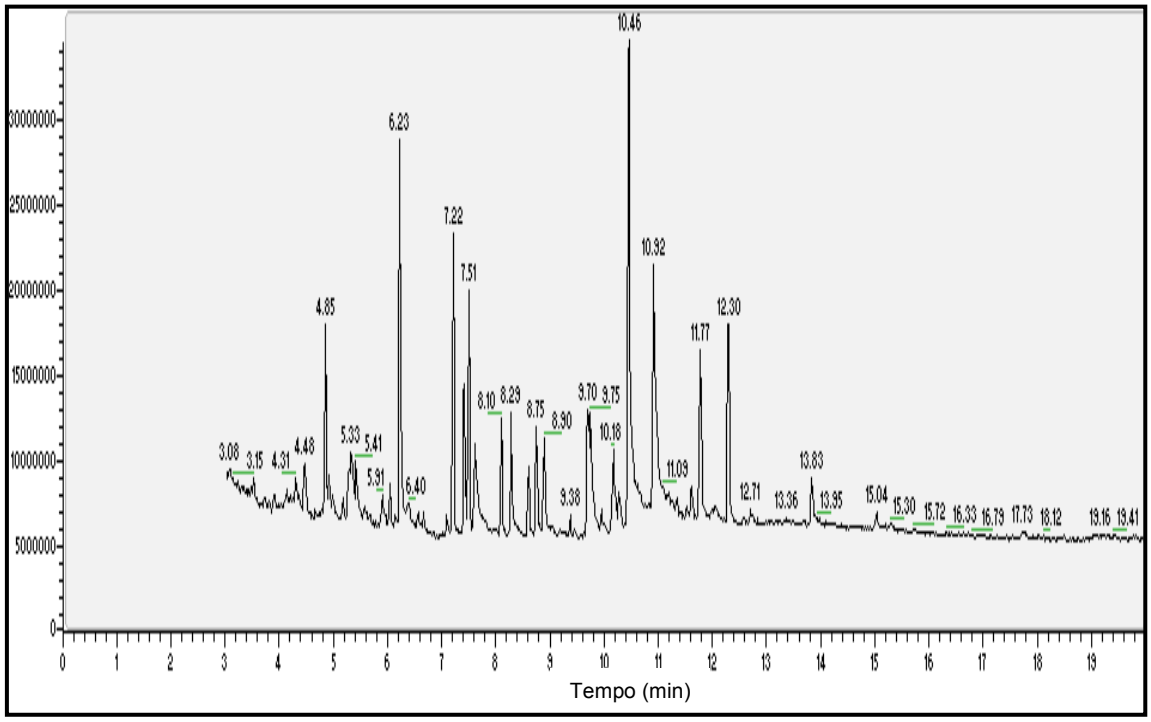


FIGURA 49- CROMATOGRAMA DE VARREDURA DO URINA DE UM PACIENTE PEDIÁTRICO SOB TRATAMENTO COM MITOTANO OBTIDO POR GC-EM UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

O espectro de massas do pico em 10,46 minutos da amostra de *pool* urinário revela o metabólito mais conhecido, o *o,p'*-DDA (Figura 50), com o íon molecular de *m/z* 281 (massa molecular isotópica: 281,1549 Da) e que quando comparado ao espectro do *o,p'*-DDA obtido por síntese apresentou coincidência dos fragmentos formados, intensidade relativa e similaridade de tempo de retenção, além disso, houve a confirmação pelos dados descritos na literatura (JENSEN et al, 1987).

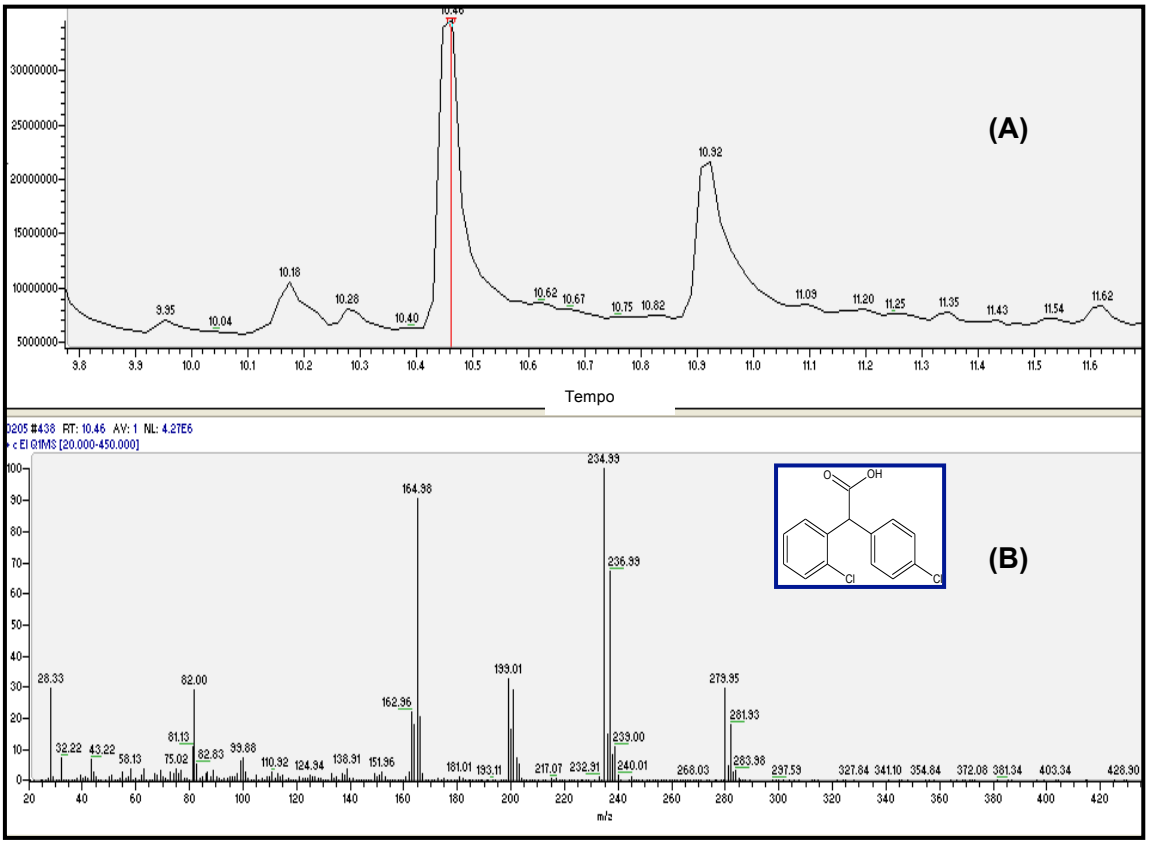


FIGURA 50- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRODE MASSAS DO *o,p'*-DDA, METABÓLITO MAJORITÁRIO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 10,46 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Com a introdução da carboxila no C-1 do DDA espera-se que a ligação carbono-carbono do grupo etano se torne mais lábil à clivagem. Por isso, o produto de descarboxilação do DDA, *o,p'*-DPM foi encontrado na amostra de urina, bem como na de plasma, como um dos metabólitos majoritários em 7,22 min. (Figura 51).

O *o,p'*- DPM, $C_{13}H_{10}Cl_2$, foi confirmado (Figura 51) pelo íon molecular (massa isotópica média: 237,1452 Da) e pelos fragmentos (*m/z* 201 e 165) descritos na literatura (JENSEN et al, 1987).

De acordo com Jensen et al (1987), o *o,p'*-DPM seria formado por uma terceira via, diferente da do *o,p'*-DDA, diretamente a partir do mitotano. No entanto, acredita-se que possivelmente se trata da continuação da via de formação do *o,p'*-DDA e que o *o,p'*-DPM é o produto de descarboxilação do *o,p'*-DDA.

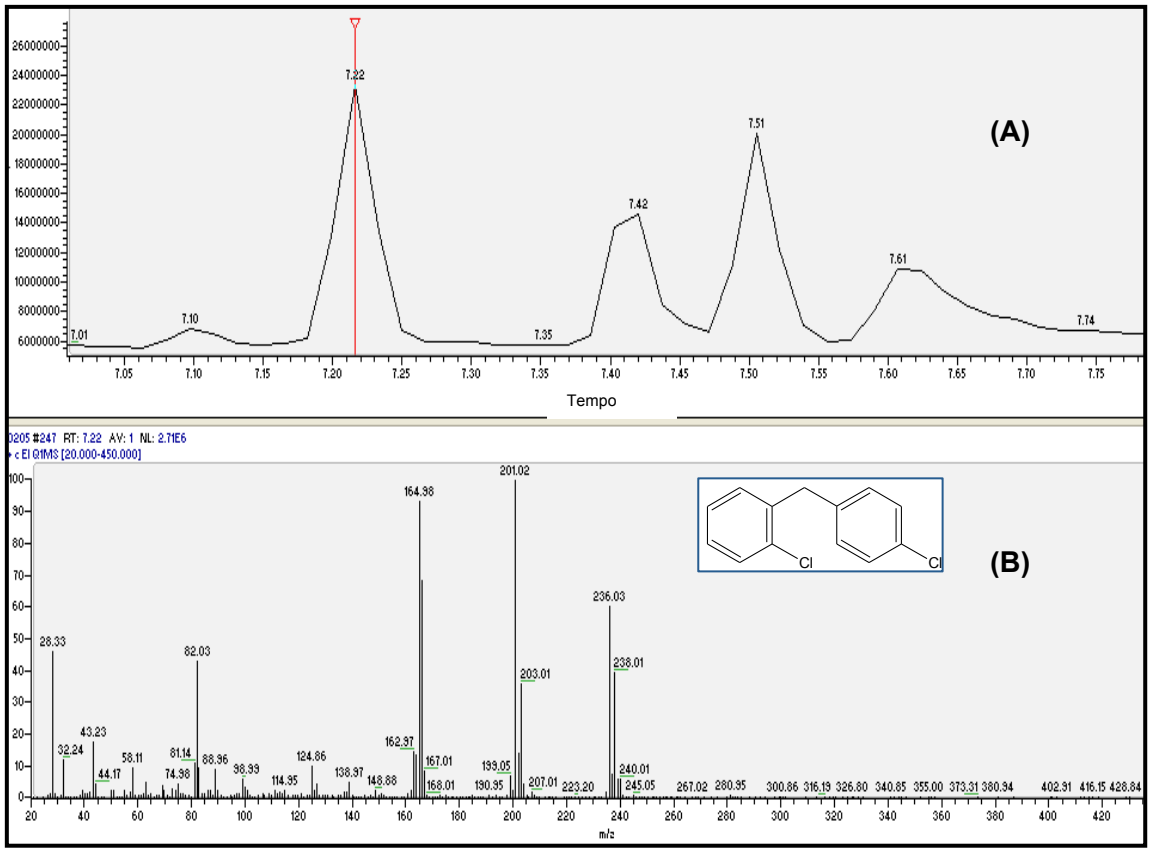


FIGURA 51- CROMATOGRAMA (A) E ESPECTRO (B) DO *o,p'*-DPM, METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 7,22 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

O próximo metabólito da sequência da oxidação do *o,p'*-DPM é conhecido como *o,p'*-diclorobenzidrol (*o,p'*-DBH) $C_{13}H_{10}OCl_2$. Este metabólito foi encontrado em 8,61 min. (Figura 52) e confirmado pelo íon molecular de m/z

252 (massa molecular isotópica: 253,1445 Da) e pelos fragmentos representados na figura 52 e tabela 9.

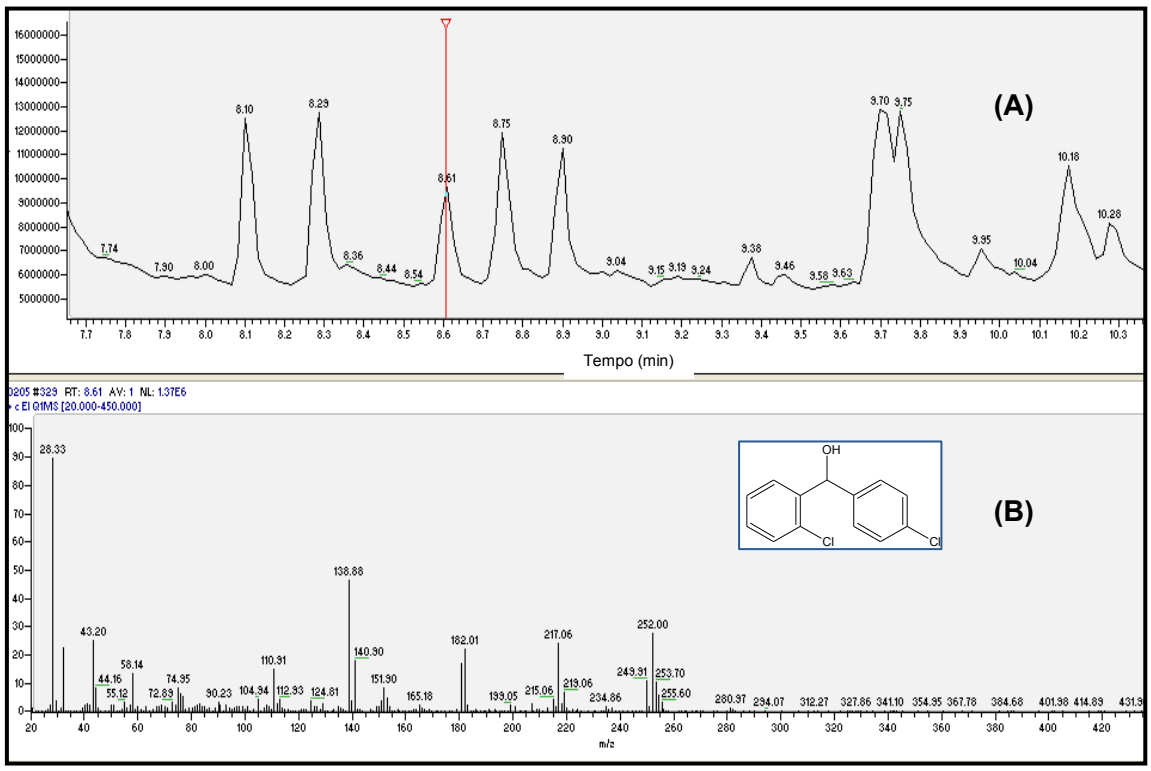


FIGURA 52- CROMATOGRAMA (A) E ESPECTRO (B) DO *o,p'*-DBH, METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,61 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

TABELA 9- PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO METABÓLITO DO MITOTANO, *o,p'*- DBH, ENCONTRADO EM AMOSTRA DE URINA

ÍONS	*m/z*	ABUNDÂNCIA RELATIVA (%)
$[M]^{+\cdot}$	252	55,0
$[M - Cl]^{+}$	217	50,0
$[M – 2Cl]^{+}$	182	45,0
$[M – C_6H_4Cl]^{+}$	139	100,0

O último produto conhecido desta via de metabolização por oxidação da cadeia alifática é o *o,p'*-DBP. Este é provavelmente um produto resultante do processo de oxidação do metabólito anterior, o *o,p'*-DBH, observado em amostra urinária em 8,10 min (Figura 53).

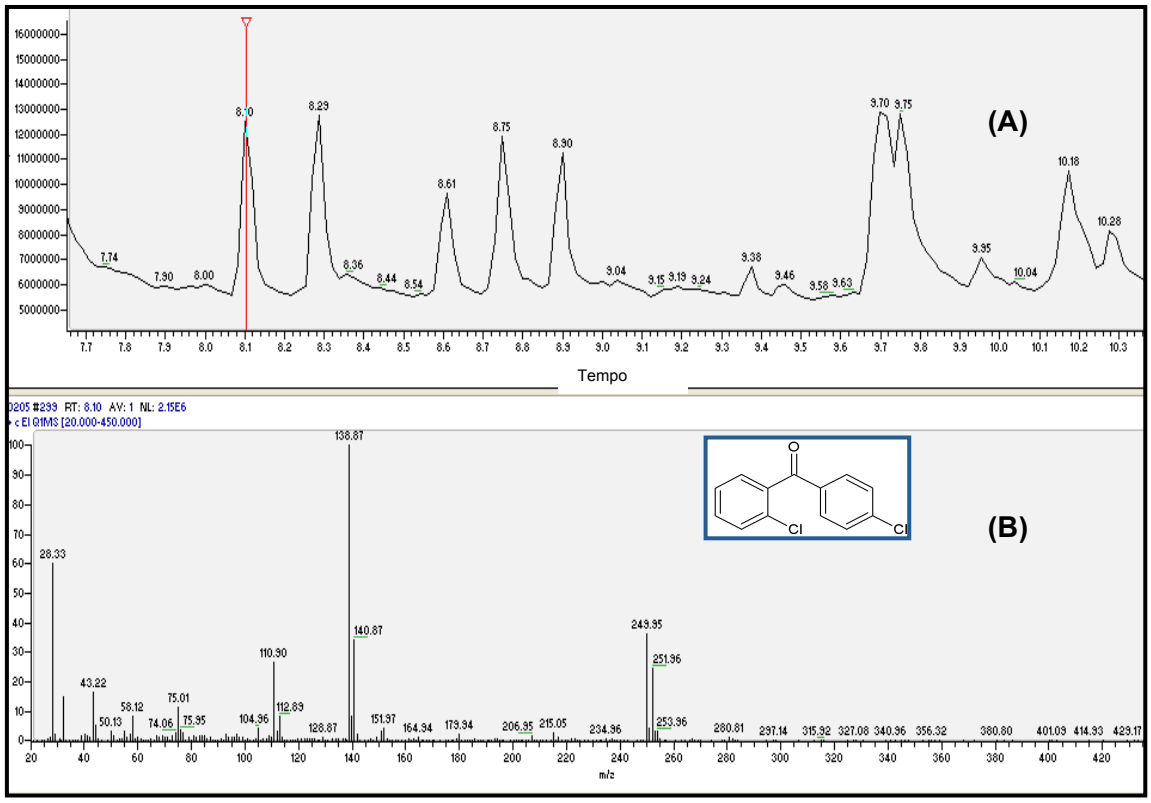


FIGURA 53- CROMATOGRAMA (A) E ESPECTRO (B) DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,10 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

O *o,p'*-DBP pôde ser confirmado, assim como no plasma, pelo íon molecular de *m/z* 252 (massa molecular isotópica: 252,1366 Da), pelos fragmentos de *m/z* 139 e *m/z* 111, pela comparação com o produto de síntese e pelos dados encontrados na literatura (JENSEN et al, 1987).

Na amostra de urina foi encontrado um pico com tempo de retenção de 10,18 minutos numa concentração expressiva (Figura 54) , onde é possível sugerir a identificação de um metabólito ainda não descrito, através do espectro de massas.

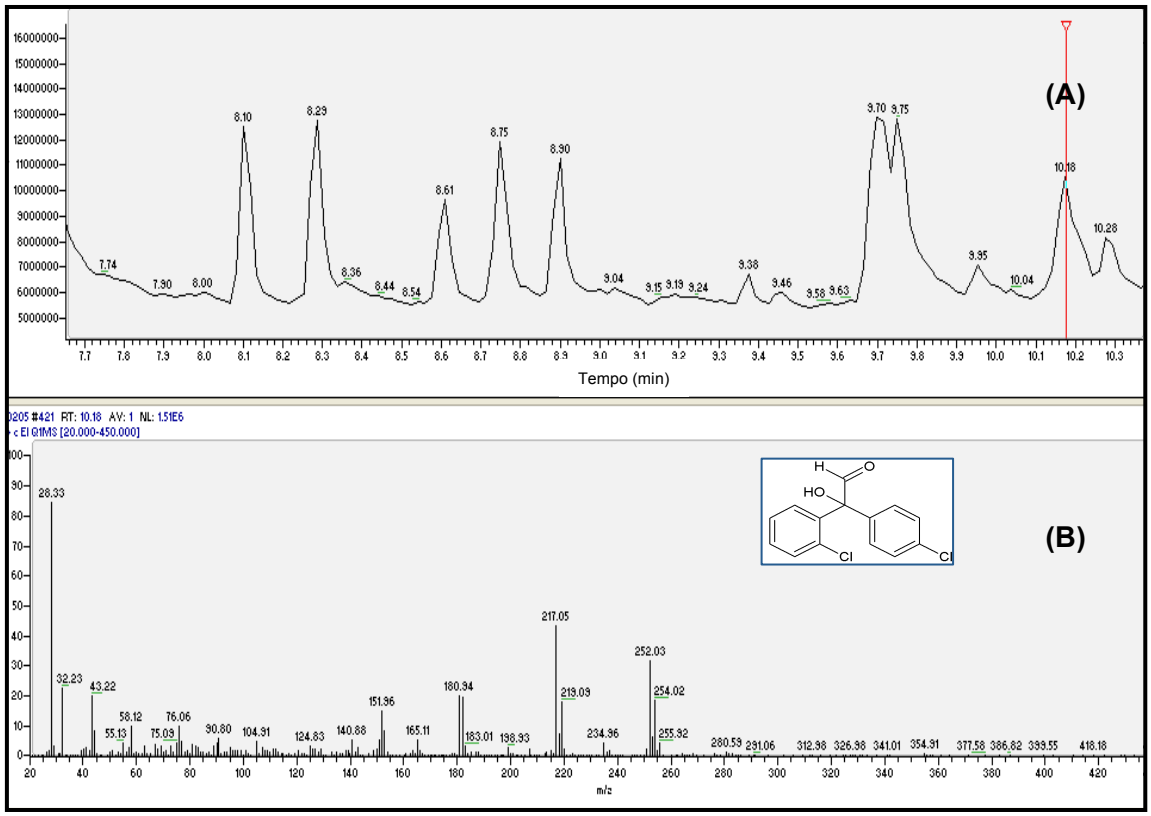
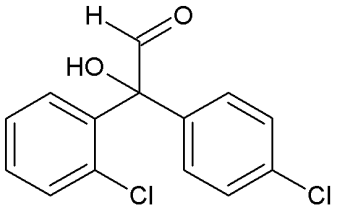


FIGURA 54- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO α-OH-*o,p'*-DDCHO, , EXTRAÍDO EM 10,18 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Destaca-se o fragmento de *m/z* 152, que representa a perda de um anel aromático ligado ao cloro e de água, coincidente com a estrutura sugerida.



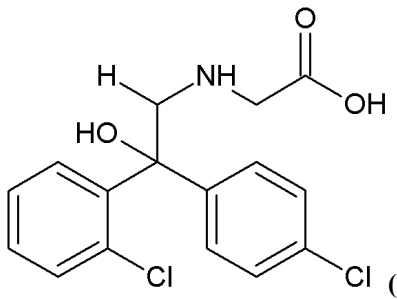
(XII)

TABELA 10- RELAÇÃO DE CARGA-MASSA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS FRAGMENTOS GERADOS DO α-OH-*o,p'*-DDCHO

ÍONS	***m/z***	**ABUNDÂNCIA RELATIVA (%)**
$[M]^{+\cdot}$	281	5,5
$[M-(CHO)]^{+}$	252	72,2
$[M-(CHO)-(H_2O)]^{+}$	217	100
$[M-(CHO)-(H_2O)-(Cl)]^{+}$	180	44,4
$[M-(C_6H_4Cl)-(H_2O)]^{+}$	152	33,3

Outro suposto metabólito encontrado (Figura 55) que também não foi relatado na literatura, indica se tratar de uma amida derivada da conjugação do α-OH-*o,p'*-DDCHO e glicina (XIII), muito semelhante a um metabólito da conjugação do o,p'-DDA com o aminoácido glicina, descrito anteriormente (REIF et al, 1974; SINSHEIEMER E FREEMAN,1986).

No espectro de massas é possível observar o íon molecular de *m/z* 337, e a perda de toda a cadeia alquílica no íon de m/z 250 $[M-(H\text{-}C\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}COOH)]^{+}$, além dos íons relativos a perda de água (m/z 235), perda de um e dois átomos de cloro de (m/z 216 e 165).



(XIII)

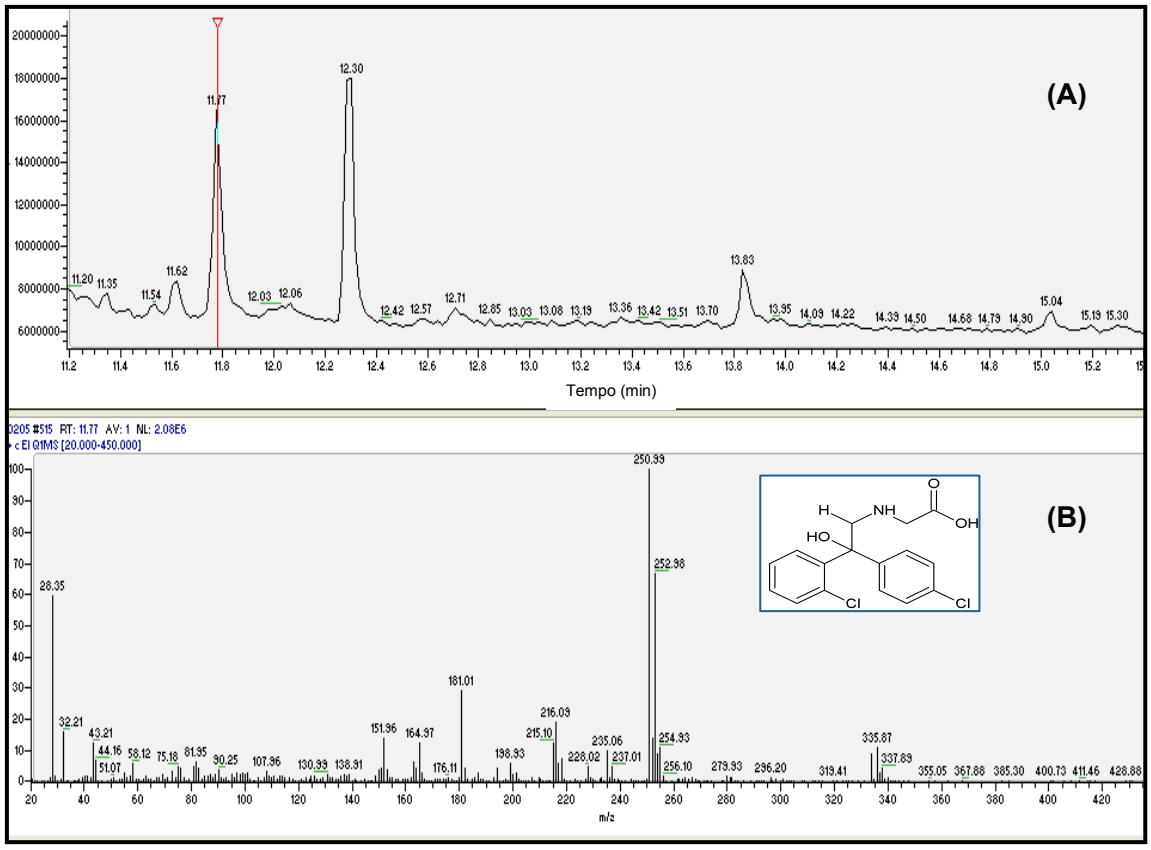


FIGURA 55- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO METABÓLITO DE CONJUGAÇÃO, EXTRAÍDO EM 11,77 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Apesar do α-OH-*o,p'*-DDA ser um metabólito já relatado na literatura por Sinsheimer e Freeman (1986), não foi possível fazer a identificação confiável no espectro de massas deste produto. Suspeita-se de um pico retido em 10,92 minutos com espectro muitíssimo semelhante ao do *o,p'*-DDA, porém que apresenta dois sinais quase imperceptíveis de m/z 297 (podendo eventualmente ser atribuído como o íon molecular) e de m/z de 251 (ao fragmento resultante da perda da carboxila), que nem sequer aparecem no espectro de massas do *o,p'*-DDA. A confirmação pode ser feita através do GC-EM com ionização química.

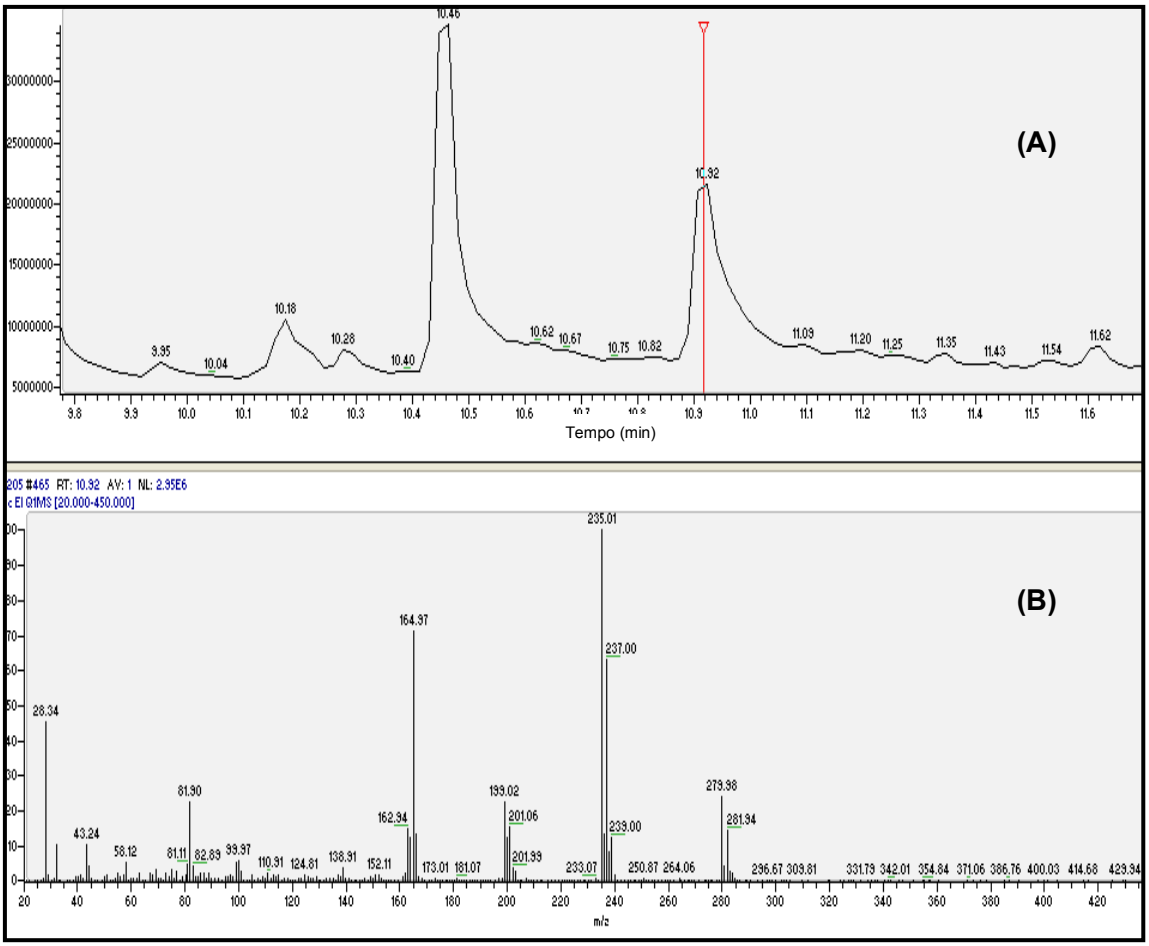
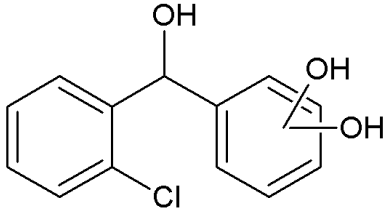


FIGURA 56- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO α-OH-*o,p'*-DDA, EXTRAÍDO EM 10,92 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

A terceira via relatada na literatura, é a de hidroxilação em anel aromático. A figura 57, mostra o espectro de massas de um metabólito do mitotano sugerido como sendo proveniente de hidroxilação aromática, após a formação do *o,p'*-DBH (XIV).



(XIV)

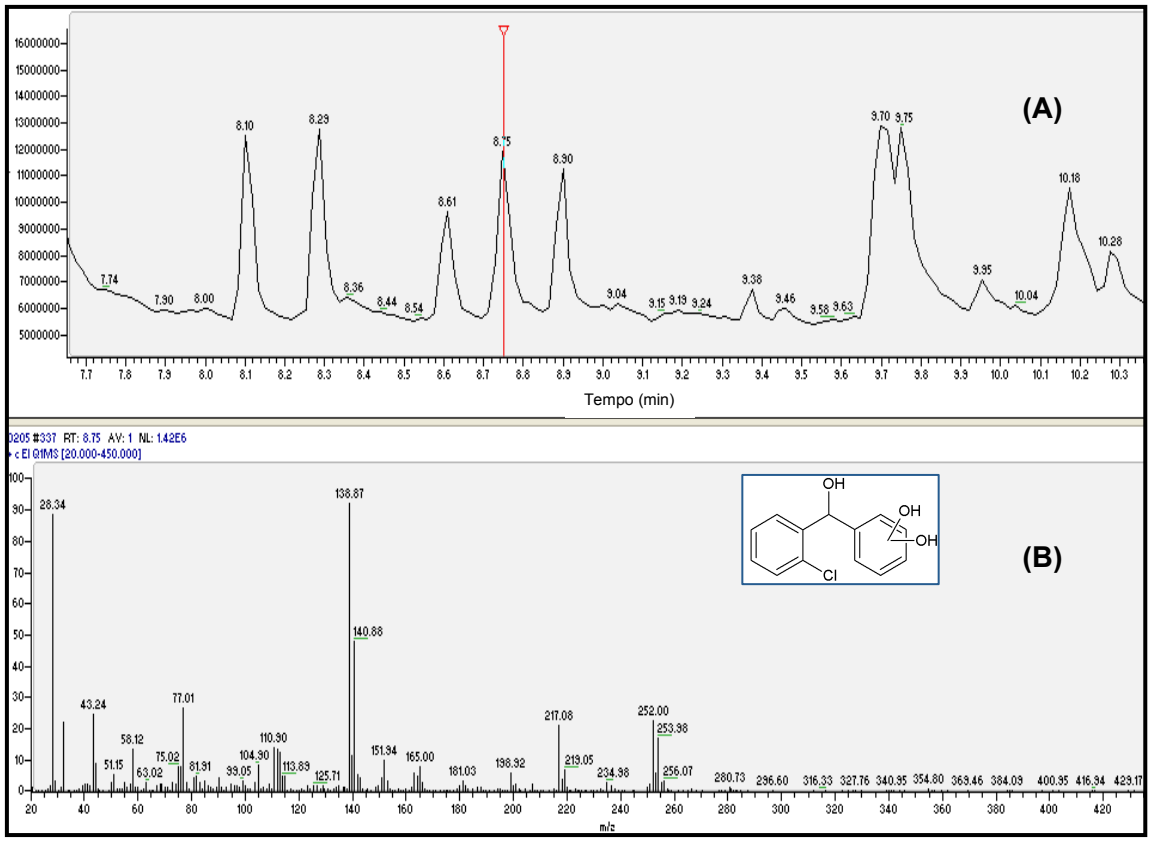


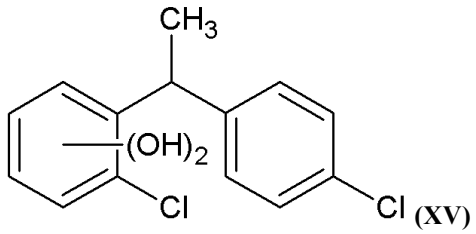
FIGURA 57- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO METABÓLITO DE HIDROXILAÇÃO AROMÁTICA, EXTRAÍDO EM 8,75 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

A elucidação aproximada desta estrutura foi feita considerando o pico de *m/z* 252 como íon molecular (massa molecular isotópica: 250,6902 Da); o fragmento de *m/z* 217, referente a perda de um átomo de cloro; *m/z* 199, perda de um átomo de cloro e água; *m/z* 181 perda de um átomo de cloro e duas moléculas de água; *m/z* 163 perda de um átomo de cloro e três moléculas de água.

A literatura relata que a hidroxilação ocorre primeiramente nas posição 4 e 3 do anel orto-substituído. Dihidroxilação ocorre em um isômero 3-4 disubstituído, porém a presença de isômeros 5-hidróxi e 4,5-hidróxi já foi indicada. Contudo, neste estudo só foram relatados metabólitos provenientes da hidroxilação do *o,p'*-DDA, e não a partir do *o,p'*-DBH como acima proposto (REIF et al, 1974).

Aparentemente, houve a formação também de outro metabólito proveniente de dihidroxilação, como mostra o pico retido em 11,60 minutos na figura 58.

Considerando que o íon de *m/z* 283 seja o íon molecular, o fragmento de *m/z* 247 representa a perda de 2 moléculas de água, o íon de m/z 235 perda do C-1 e os íons restantes a perda sucessiva de cloro.



(XV)

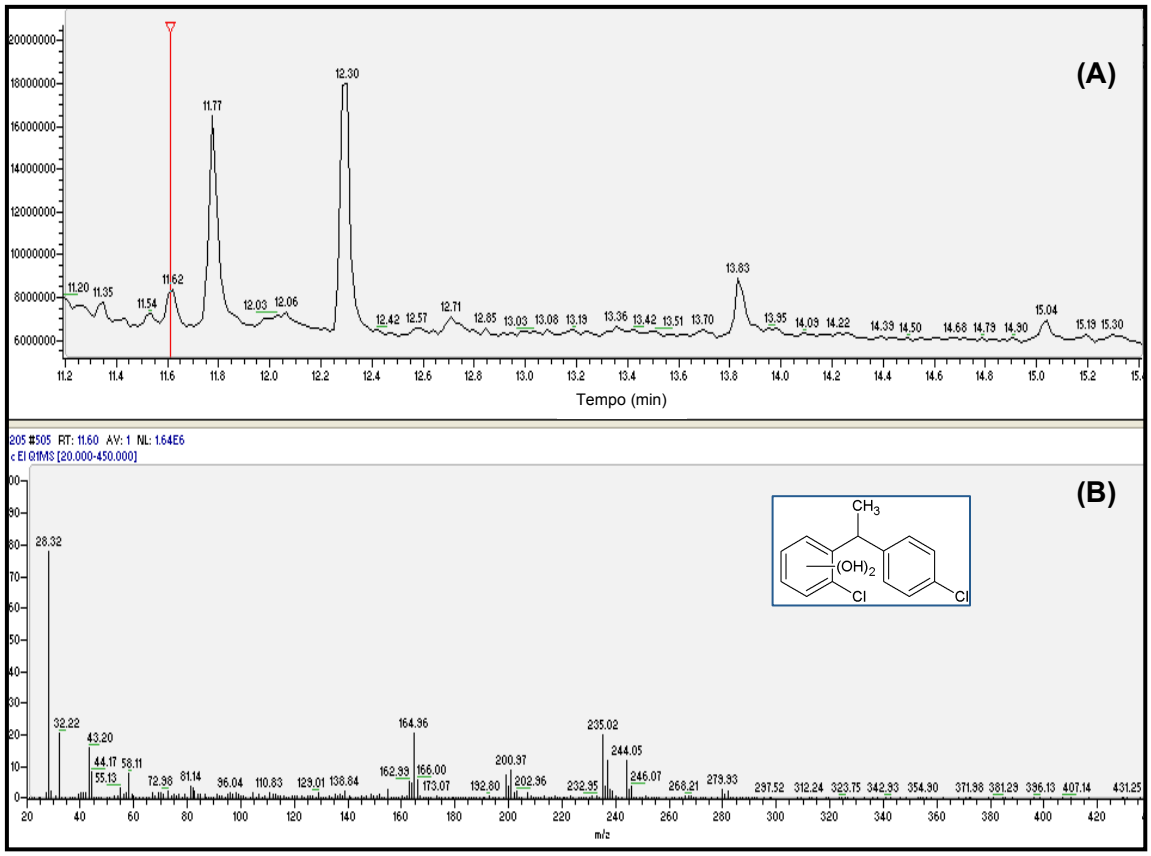


FIGURA 58- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DE UM METABÓLITO ENCONTRADO EM URINA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS SOB TRATAMENTO COM MITOTANO, SUGERIDO COMO METABÓLITO DE HIDROXILAÇÃO AROMÁTICA, EXTRAÍDO EM 11,60 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

5.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DO MITOTANO POR FUNGOS

A triagem feita com 20 tipos de fungos indicou, por comparação da CCD das amostras controle e experimento, que sete espécies aparentemente produziram metabólitos. Porém, somente duas espécies foram efetivamente capazes de metabolizar o mitotano. A caracterização por RMN de ^{1}H não foi bem sucedida em função da quantidade diminuta de metabólitos, mesmo utilizando maiores escalas de biotransformação. No entanto, a caracterização por CG-EM revelou que alguns fungos biotransformaram o mitotano num processo de redução.

A CCD das cepas que biotransformaram o mitotano foi feita comparando-se respectivamente os extratos controle e experimento (no qual foi inserido mitotano no meio de cultura).

Os fungos isolados que demonstraram habilidade de biotransformação do mitotano na CCD, foram identificados por microscopia óptica, conforme as figuras 59 e 60.

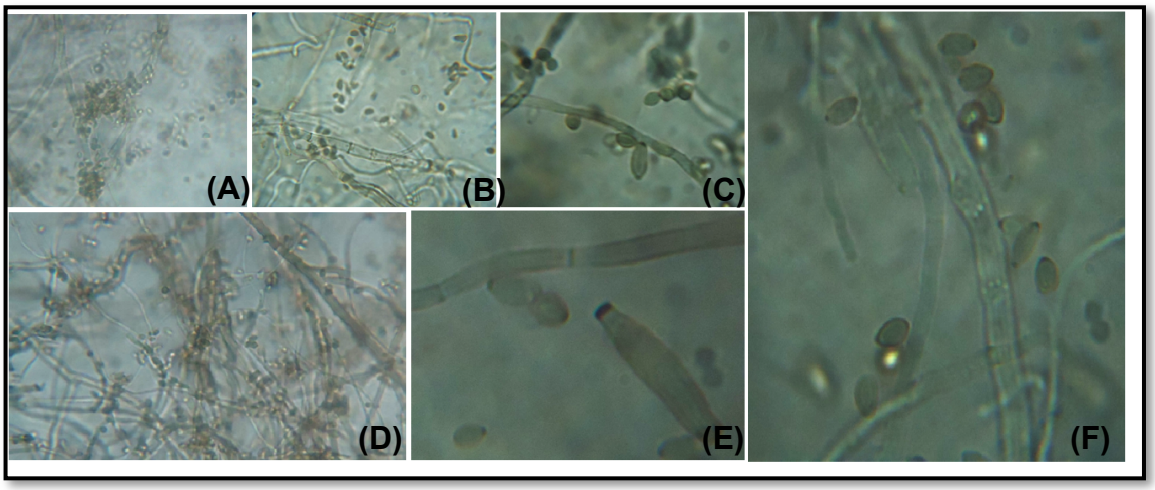


FIGURA 59- *Cladosporium* sp. CULTIVADO EM MEIO BDA À 28°C COM 15 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 400X. (A, B, D). *Cladosporium* sp. CULTIVADO EM MEIO BDA À 28°C COM 15 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 1000X. (C, E, F)

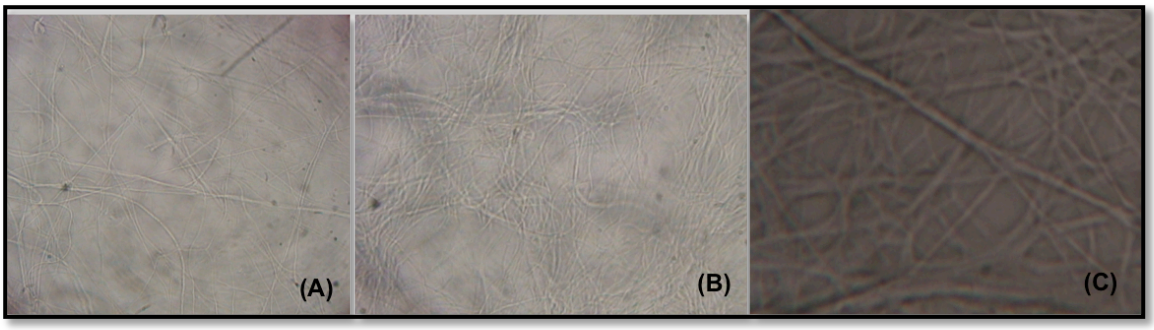


FIGURA 60- *Mycelia sterilia* CULTIVADA EM MEIO BDA À 28°C COM 07 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 400X. (A) *Mycelia sterilia* CULTIVADA EM MEIO BDA COM 15 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 400X. (B). *Mycelia sterilia* CULTIVADA EM MEIO BDA À 28°C COM 15 DIAS DE CRESCIMENTO. AUMENTO: 1000X.

Em ambas as culturas dos fungos *Cladosporium sp*. e *Mycelia sterilia* foram encontradas quantidades muito ínfimas, porém detectáveis, dos mesmos metabólitos, DDMU (Figura 61) e DDMS (Figura 62). O mitotano foi recuperado em altas concentrações, em relação aos metabólitos, em ambas as culturas.

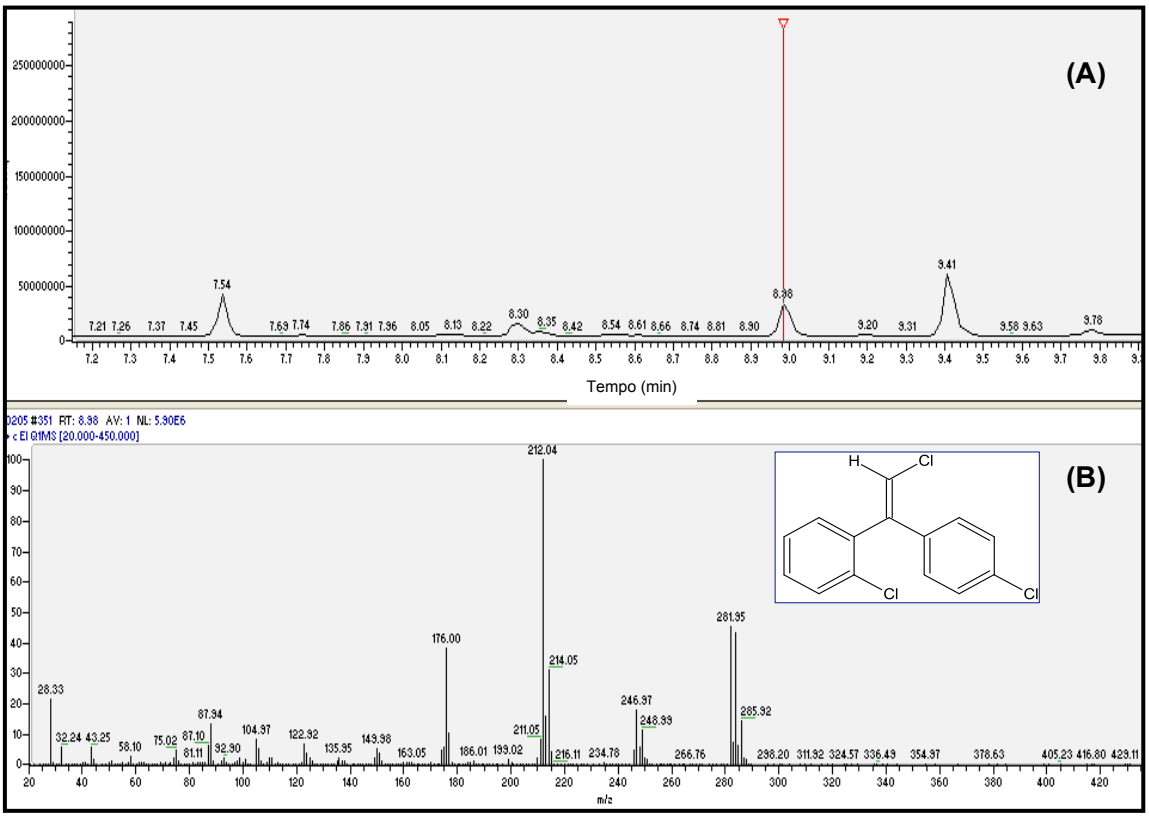


FIGURA 61- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO *o,p'*-DDD PELO FUNGO *Cladosporium sp.,* EXTRAÍDO EM 8,98 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

O *o,p'*-DDMU foi caracterizado pela comparação ao espectro do padrão sintetizado no início do trabalho. O íon molecular de m/z 283 está presente no espectro, como previsto pelo espectro do padrão.

O DDMS é um metabólito subsequente a formação do DDMU. O produto foi caracterizado pelo pico majoritário de *m/z* 235 resultante da clivagem da ligação alifática C_1-C_2, e pelo íon molecular de *m/z* 284, descritos na literatura (LIN, CHANG 2007).

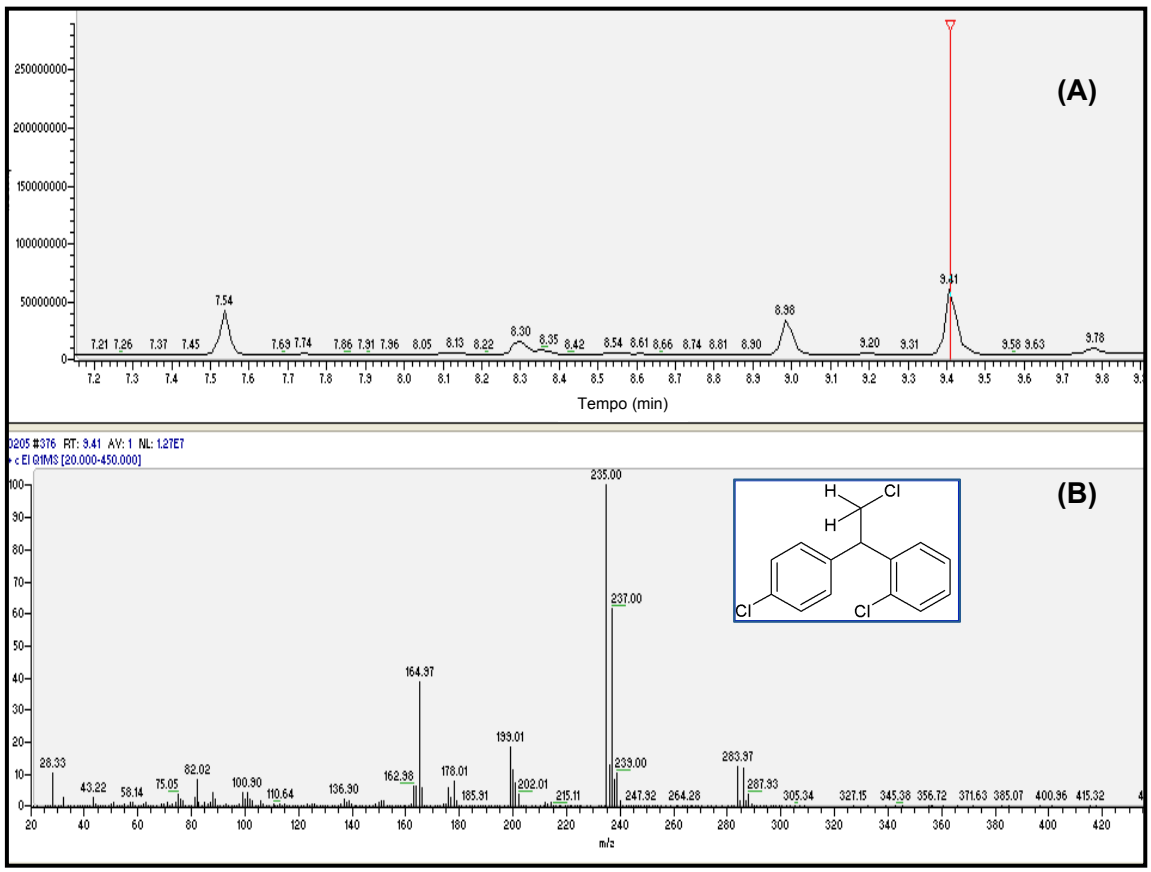


FIGURA 62- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMS, METABÓLITO ENCONTRADO EM PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO *o,p'*-DDD PELO FUNGO *Cladosporium sp.,* EXTRAÍDO EM 9,41 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Assim como para as culturas do *Cladosporium sp,* nas culturas de *Mycelia sterilia* também foram identificados os metabólito DDMU (Figura 63) e DDMS (Figura 64), em concentração traço em comparação com o mitotano recuperado.

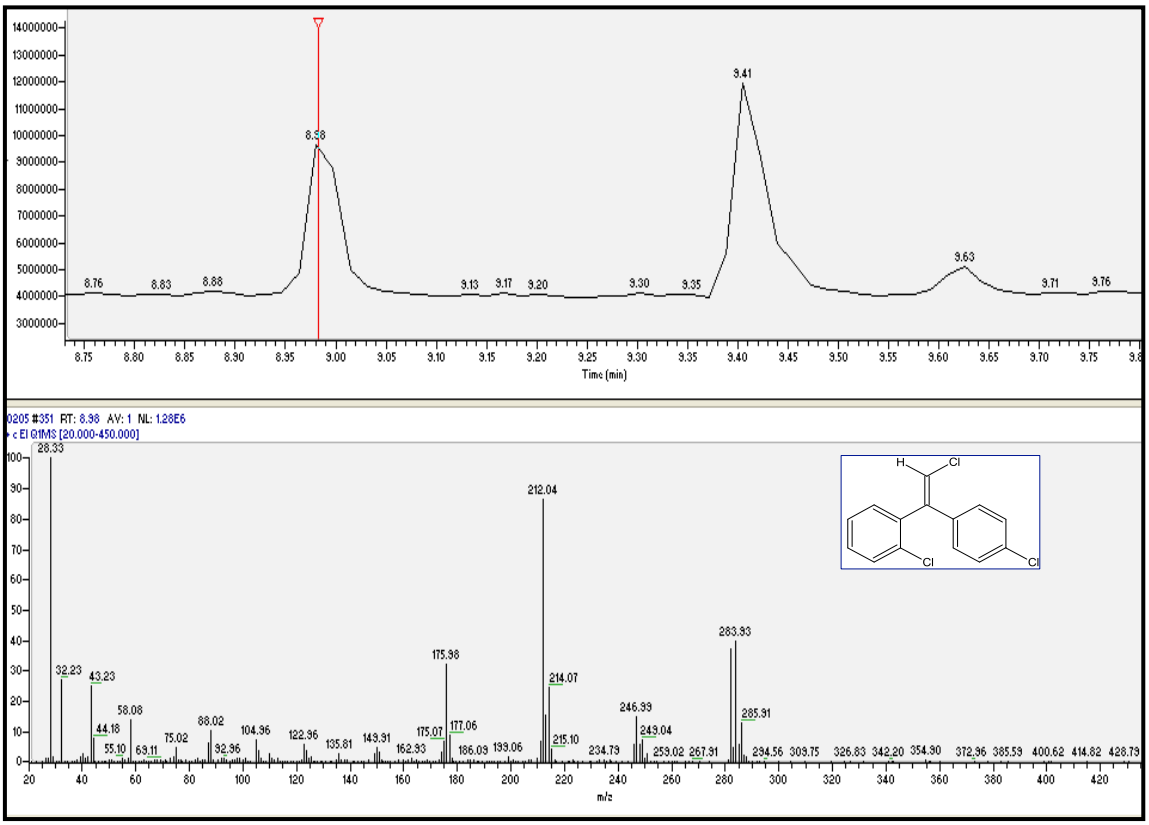


FIGURA 63- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO o,p'-DDD PELO FUNGO *Mycelia sterilia,* EXTRAÍDO EM 8,98 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

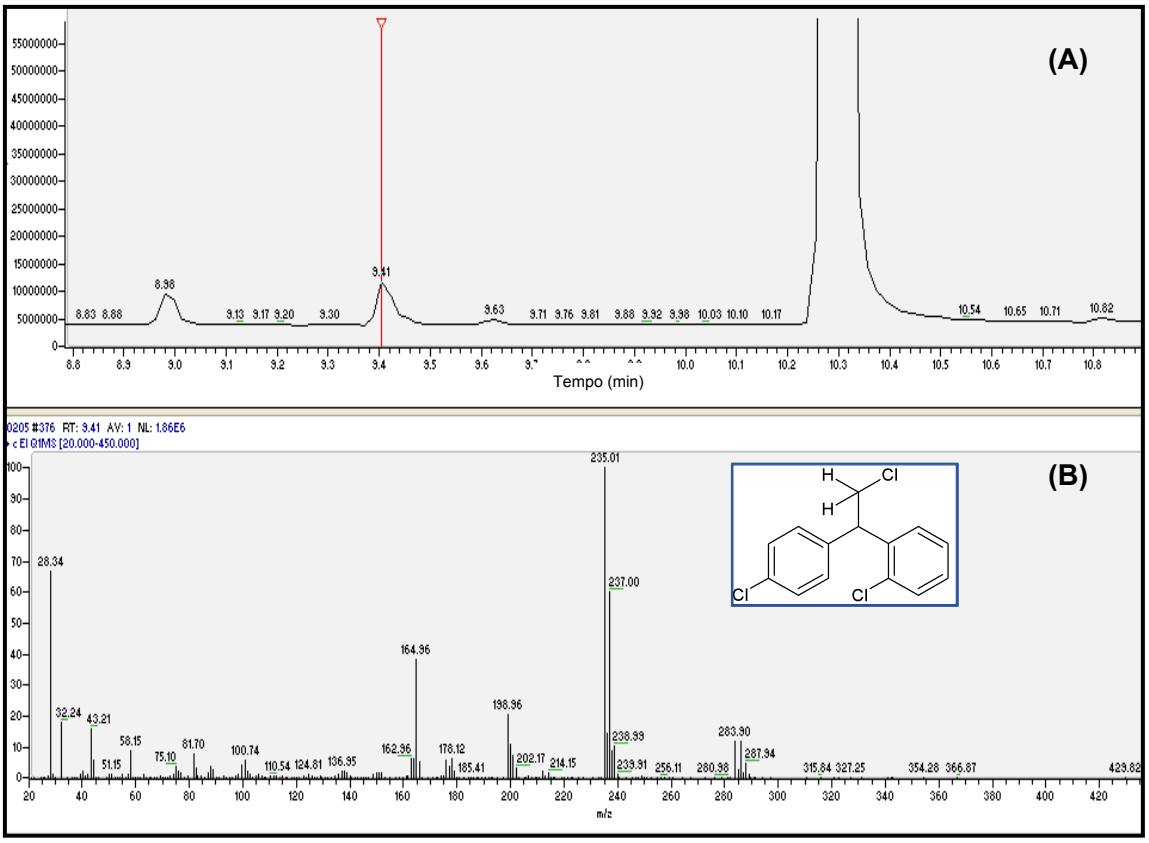


FIGURA 64- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMS, METABÓLITO ENCONTRADO EM PRODUTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO o,p'-DDD PELO FUNGO *Mycelia sterilia,* EXTRAÍDO EM 9,41 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Os baixos rendimentos da biotransformação do mitotano é algo já conhecido e relatado na literatura. A biotransformação de haletos aromáticos, embora estudados no meio ambiente, apresentam taxas de degradação muito lentas para ter significância ambiental (LIN, CHANG 2007).

Termodinamicamente, compostos mais clorados são mais susceptíveis a declorinação anaeróbica, enquanto que compostos menos clorados que o DDT são mais susceptíveis a declorinação aeróbica (YOU et al, 1996).

O mecanismo proposto para biotransformação do DDT (Figura 65), por bactéria e alguns fungos sob condições anaeróbicas, por exemplo o *Proteus vulgaris*, mostra que o DDT sofre declorinação redutiva a DDD, DDMU e DDNU o qual é sucessivamente oxidado a β-OH-DDD e DDA. O DDA é descarboxilado a DDM o qual é oxidado a DBP. Sob condições aeróbias, é observado a degradação do DDT ao DDD, o qual é então desidrogenado a

DDE, seguido de declorinação a DDMU (BARKER, MORRISON, WITHAKER, 1997).

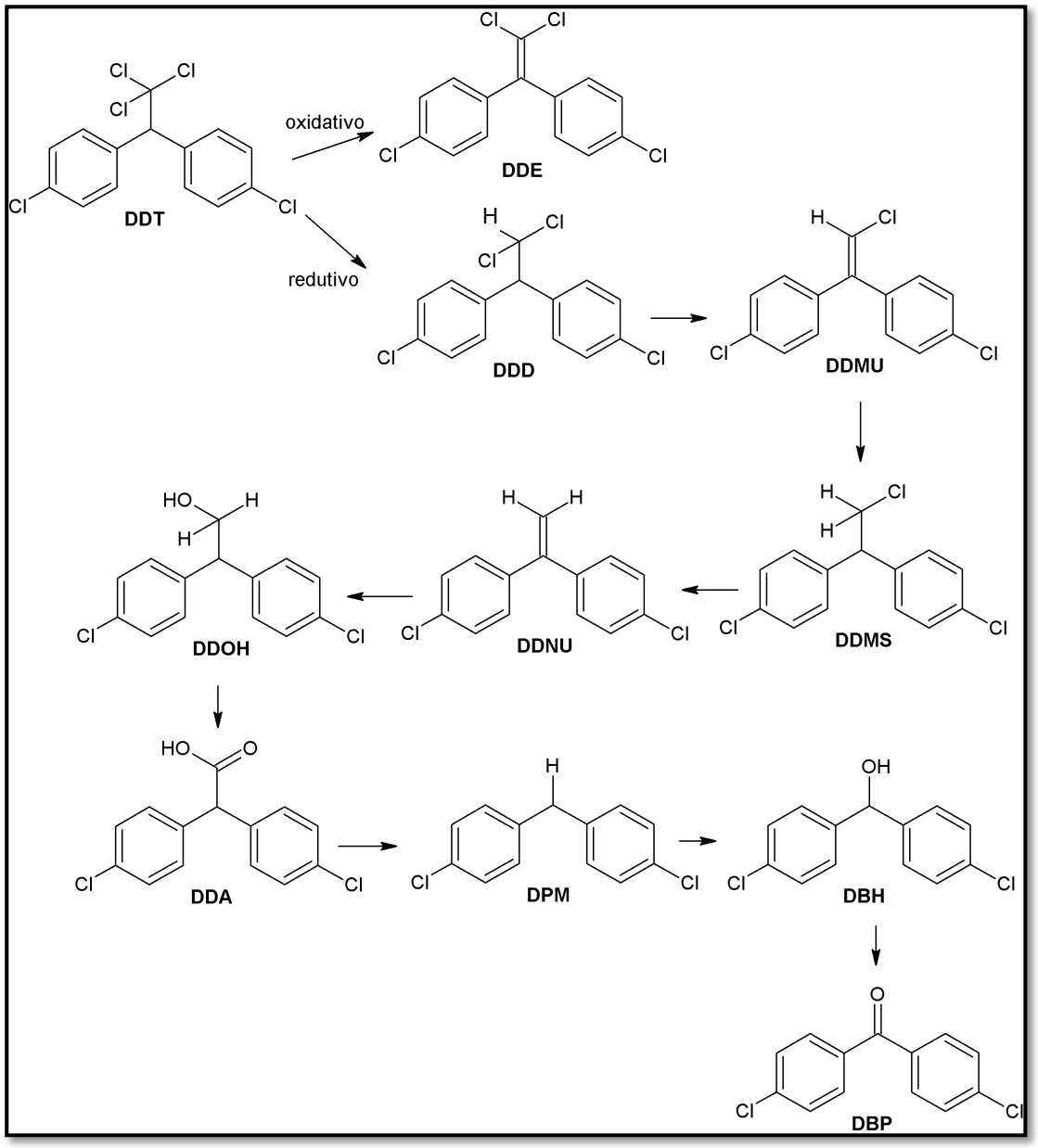


FIGURA 65- MECANISMO DE DECLORINAÇÃO REDUTIVA PARA A BIOTRANSFORMAÇÃO DO DDT POR FUNGOS

FONTE: YOU et al, 1996

5.4 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO MITOTANO

Os enantiômeros *R-(+)* e *S-(-)* da mistura racêmica do mitotano analisados segundo o método de separação descrito no item 4.5 são apresentados na figura 66:

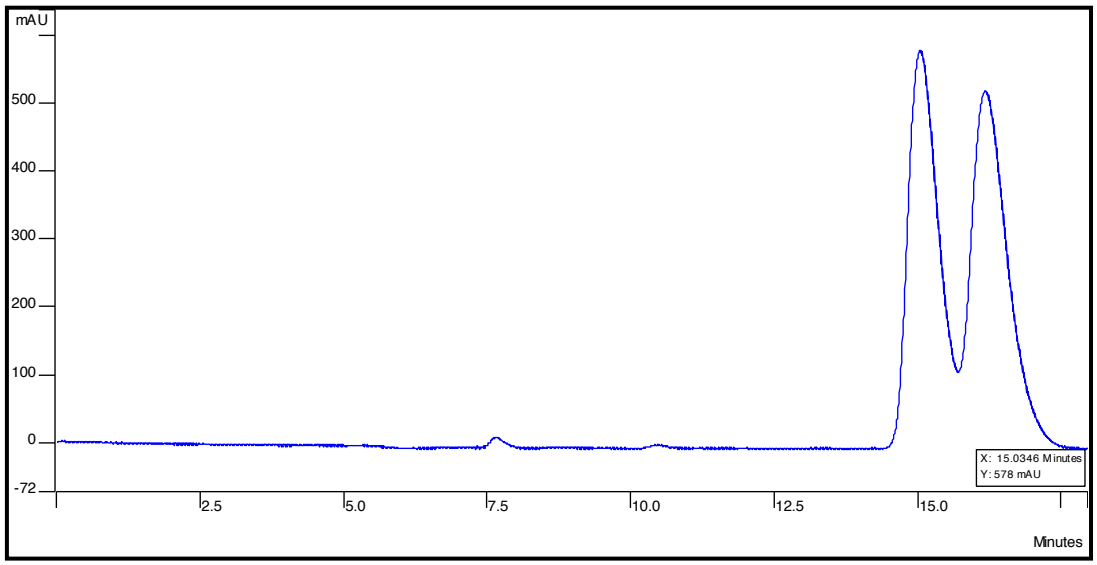


FIGURA 66 - CROMATOGRAMA DA MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO UTILIZANDO COLUNA QUIRAL KROMASIL COM MEDIDAS DE 250X10 mm E FASE MÓVEL COMPOSTA DE ACETATO DE ETILA/ HEXANO 5:95 (v/v)

Foi obtido através de sucessivas separações o total de 32,2 mg do enantiômero *S-(-)-o,p*'-DDD, primeiro a ser eluído, e 10,9 mg do enantiômero *R-(+)-o,p*'-DDD. O cromatograma dos enantiômeros isolados e puros está apresentado na figura 67.

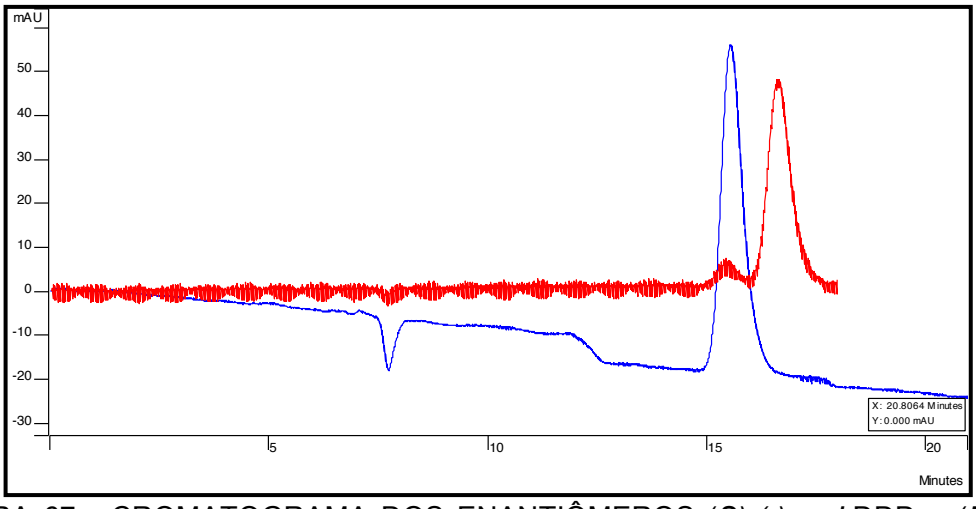


FIGURA 67 - CROMATOGRAMA DOS ENANTIÔMEROS (*S)-(-)-o,p'*-DDD e (*R)-(+)-o,p*'-DDD DO MITOTANO ISOLADOS ATRAVÉS DE SEPARAÇÃO QUIRAL POR CLAE PREPARATIVA

O tempo de retenção observado para o primeiro enantiômero, identificado através de análise em polarímetro como *(S)-(-),* foi de 15 minutos, já o segundo enantiômero, *(R)-(+)* apresentou absorção máxima em 17,5 minutos, conforme dados encontrados na literatura (CANTILLANA & ERIKSSON, 2009).

As análises foram satisfatórias quanto aos parâmetros cromatográficos: número de pratos teóricos, fator capacidade e caudamento.

5.5 CULTIVO CELULAR

5.5.1 Avaliação da Viabilidade Celular em Linhagem H295R dos Enantiômeros e Mistura Racêmica do Mitotano Pelo Método MTS

Raros estudos relatam a ação dos enantiômeros (*R*) e (*S*) do mitotano em cultivo celular. Recentemente, Loannides (2010) avaliou o efeito destes na secreção de cortisol, comparado ao da mistura racêmica, concluindo que cada enantiômero estimularia a secreção de cortisol, assim como a mistura racêmica.

Apesar de demonstrar que a citotoxicidade na viabilidade celular foi maior para a mistura racêmica, este estudo constata que as diferenças encontradas ainda não garantem o desenvolvimento de uma terapia utilizando somente um dos enantiômeros (LOANNIDES, 2010).

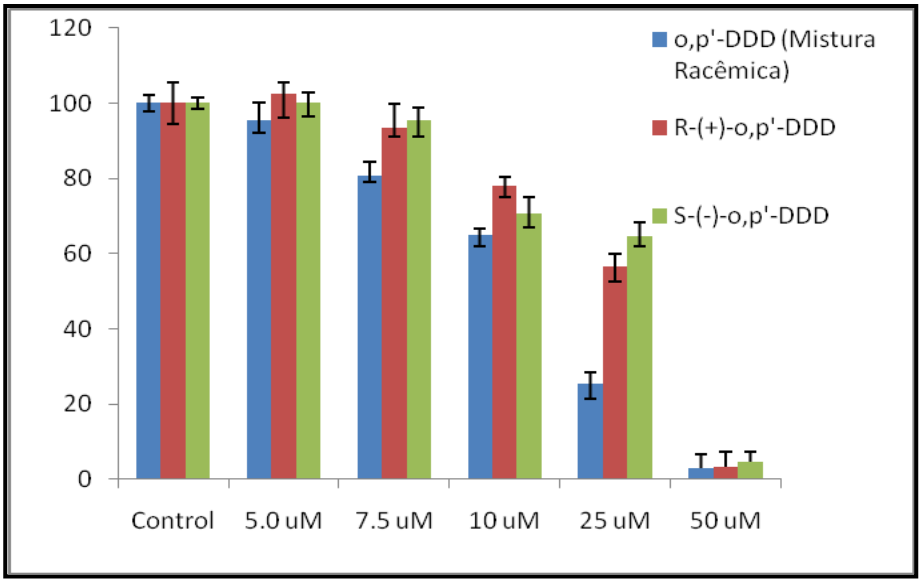


FIGURA 68 – RESULTADO DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COMPARANDO MISTURA RACÊMICA E ENANTIÔMEROS EM LINHAGEM CELULAR H295R

Os resultados aqui obtidos (Figura 68) são concordantes com os de Loannides et al, 2010, no fato que numa mesma concentração, a mistura racêmica é significativamente mais tóxica que os enantiômeros isolados.

5.5.2 Avaliação da Viabilidade Celular do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano em Linhagem H295R

Considerando a formação inesperada do 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano na reação de síntese do DDA e que este novo produto atende às necessidades de relação estrutura-atividade para o efeito adrenocorticolítico, foi realizado o ensaio de citotoxidade celular na linhagem H295R (Figura 69).

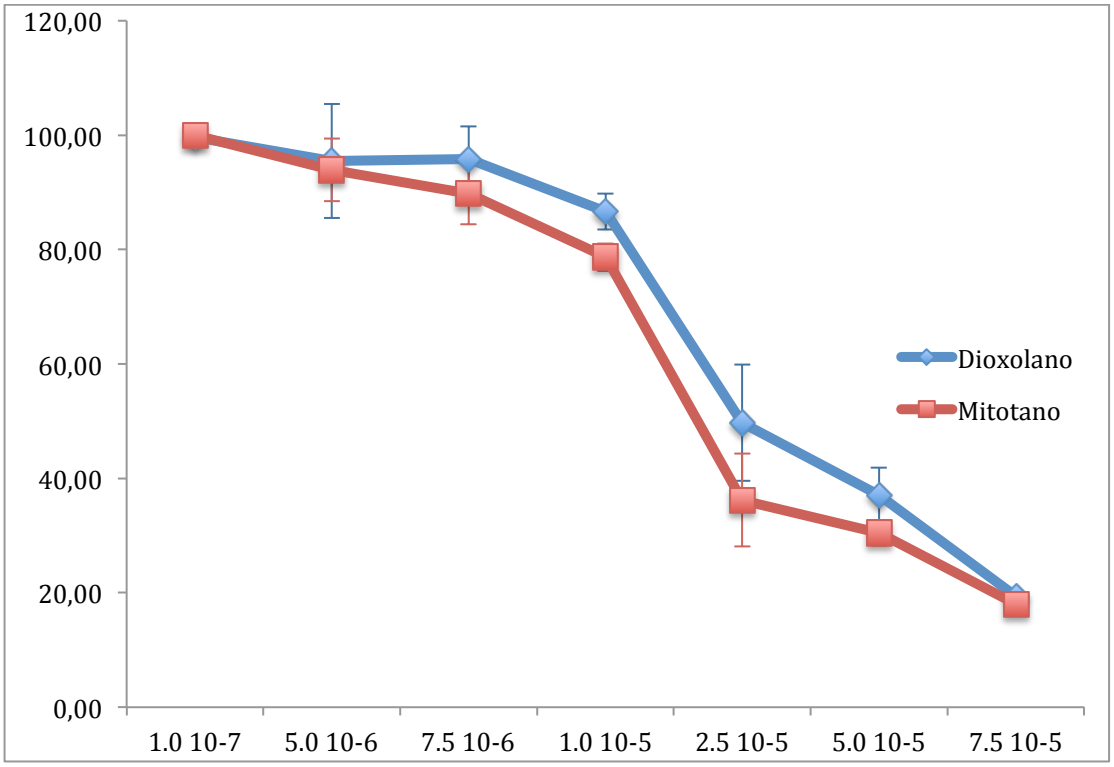


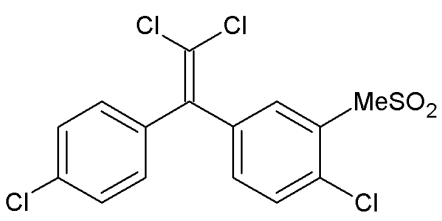
FIGURA 69- ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR NA LINHAGEM H295R COMPARANDO O 2-[(2-CLOROFENIL)(4-CLOROFENIL)METIL]-1,3 DIOXOLANO AO MITOTANO

É possível destacar uma correlação entre a dose plasmática considerada terapêutica, entre 15 e 20 µg/mL (~ $5{,}0.10^{-5}$ M), e a dose tóxica obtida no cultivo celular, próxima de $2{,}5.10^{-5}$ M.

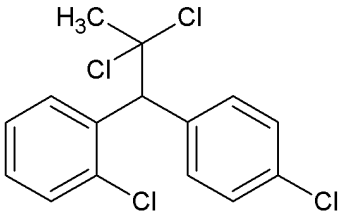
Em busca de alternativas terapêuticas menos tóxicas e mais potentes para o tratamento do CAC, alguns análogos do mitotano foram estudados para que a relação estrutura-atividade do mitotano fosse obtida. A importância da

ligação C-H na posição C-1 da porção alifática foi testada em um estudo com 26 análogos do DDD. A atividade adrenolítica do mitotano é perdida se o H é substituído por uma cloro como o *o,p'*-DDT. Substituições nos anéis aromáticos são menos críticas para o efeito adrenocorticolítico (BLEIBERG; LARSON, 1957; COBEY, TALIAFERRO, HAAG, 1956).

Contudo, um análogo testado que não obedece esta regra, o 3-$MeSO_2$-DDE (2-(4-cloro-3-metilsulfonilfenil)-2-(4-clorofenil)-1,1-dicloroeteno) (XVI) é um derivado do mitotano estudado em ratos e foi identificado como um agente tóxico celular potente e tecido específico que induz a morte celular marcada na zona fasciculada. Porém o mecanismo de ação adrenocorticolítico é diferente. A elevada toxicidade é mediada pela CYP45011B1 que catalisa a formação do metabólito metiltiol reativo que se liga covalentemente nas células que expressam CYP11B1 em ratos. Esta substância parece ser ativada e covalentemente ligada também no córtex adrenal humano *in vitro* e tem sido proposto como um composto para melhorar a farmacoterapia para hipersecreção adrenocortical e crescimento tumoral (HERMANSSON et al., 2008).



(XVI)



(XVII)

Um outro estudo que comparou os efeitos de um homólogo do mitotano, metilado em C-1 denominado Mitometh (XVII), aos efeitos do mitotano em caninos, releva a importância de se manter o hidrogênio em C-1. Enquanto que o mitotano causou necrose e hemorragia nas glândulas adrenais, os animais tratados com mitometh não apresentavam nenhum dano. Apesar da falta de atividade adrenolítica, o mitometh manteve sua toxicidade como demonstrado pela microscopia que evidenciou necrose hepática e aumento de enzimas hepáticas. Os efeitos adrenolíticos de ambos os agentes foram também

testados *in vitro* usando células H295R. Enquanto mitotano suprimiu fortemente o crescimento celular, mitometh teve um efeito fraco.

Desde que mitometh, ao contrário do mitotano, não é capaz de formar o ácido carboxílico DDA, estudos de Jensen et al (1987) pareceram ignorar a importância do metabolismo da porção $–CHCl_2$ como um requisito fundamental para a atividade adrenocorticolítica. Estudos *in vitro* usando mitocôndria de células adrenais sugeriram que a atividade do mitotano requer metabolismo e ligação covalente a macromoléculas, mas isso nunca foi demonstrado *in vivo* (SCHTEINGART et al., 1993).

Considerando os aspectos acima descritos, a molécula sintetizada, o 2-[(2-clorofenil)(4-clorofenil)metil]-1,3-dioxolano, apresenta uma potencialidade terapêutica, tendo em vista que:

a) obedece as necessidades de relação estrutura-atividade conhecidas; haver *o,p'*-substituição e manter um hidrogênio ligado ao C-1;

b) apresentou ação citotóxica em linhagem da célula tumoral H295R comparável ao efeito do mitotano;

É possível sugerir que esta molécula seja menos tóxica, tendo em vista que é mais polar, ou seja, menos lipofílica que o mitotano e assim seria necessária uma menor dose da substância para ser melhor absorvida. Maiores estudos com essa substância são necessários para investigar sua possível aplicação terapêutica.

5.5.3 Pesquisa de Metabólitos dos Enantiômeros do Mitotano em Cultivo Celular

Com base em resultados, obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa, sobre o excesso enantiomérico encontrado em amostras de plasma, este estudo procurou revelar se cada enantiômero poderia produzir metabólitos diferentes passando por vias de metabolização diferentes ou ambos produziriam os mesmos metabólitos, considerando que essa correlação ainda não foi descrita na literatura.

As culturas celulares foram observadas diariamente em microscópio invertido. Após a extração, foi observado que as amostras extraídas dos pellets, de uma maneira geral, apresentaram maior concentração do fármaco

do que as alíquotas de meio de cultivo coletadas. Resultado esse justificável pelo fato de que o *pellet* tem maior caráter lipofílico que o meio de cultura.

O fármaco adicionado ao meio de cultivo após o tempo zero (enantiômero *R-(+)* ou *S-(-)* ou mistura racêmica), foi recuperado satisfatoriamente em todas as amostras em todos os diferentes tempos.

5.5.3.1 Resultados do cultivo celular com a mistura racêmica

Analisando as amostras de cultivo celular com a mistura racêmica, foram encontrados metabólitos do mitotano em concentrações bastante baixas.

O primeiro a ser identificado foi a cloridrina, que é um metabólito do mitotano ainda não encontrado nos estudos publicados anteriormente em amostras de plasma e urina. Esse metabólito dá suporte para a teoria de Cai et al, que diz se tratar de um precurssor do *o,p'*-DDE, formado da α-hidroxilação do mitotano.

O pico cromatográfico eluído em 11,15 minutos (Figura 70), apresentou mesmo tempo de retenção do produto sintetizado, assim como coincidência dos fragmentos no espectro de massas.

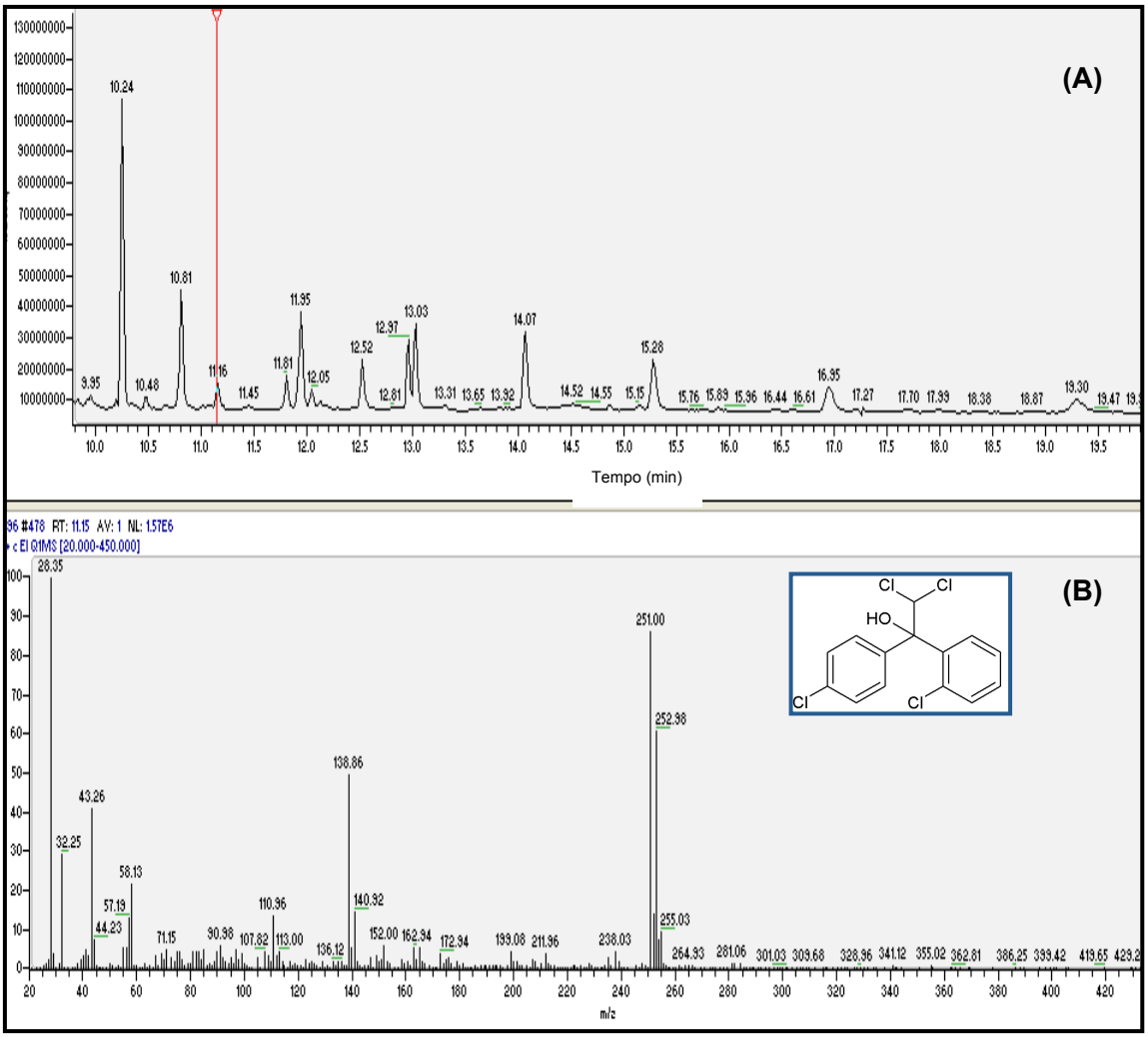


FIGURA 70- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DA CLORIDRINA, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO, EXTRAÍDO EM 11,15 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

O *o,p'*-DDE (Figura 71) é identificado em um pico pouco relevante, mas que mostra o espectro de massas idêntico ao do produto de síntese, incluindo o íon molecular de *m/z* 318.

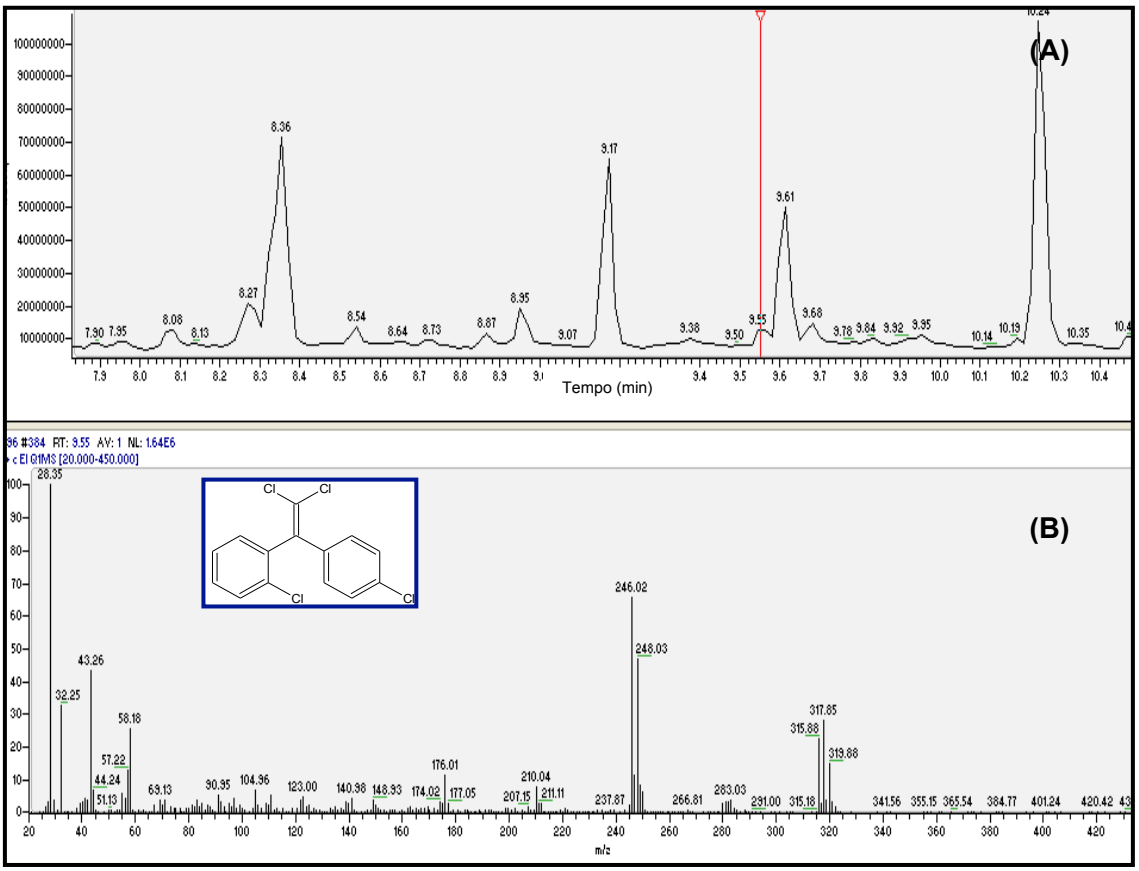


FIGURA 71- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*- DDE, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,55 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Um metabólito não esperado de ser encontrado, pois fora jamais descrito na literatura como metabólito humano do mitotano é *o o,p'*-DDMU (Figura 72). Seu tempo de retenção é coincidente com o do produto de síntese e os fragmentos gerados pelo espectro de massas também.

Em fungos, o DDMU é encontrado como metabólito de biotransformação do DDT e DDD, onde é responsável pela formação do DDA a partir da declorinação redutiva do DDMU e posterior oxidação. No entanto, em humanos, essa hipótese é contrária a hipótese de formação do intermediário

haleto de acila, teoricamente responsável pela ação farmacológica, para formar o *o,p'*-DDA.

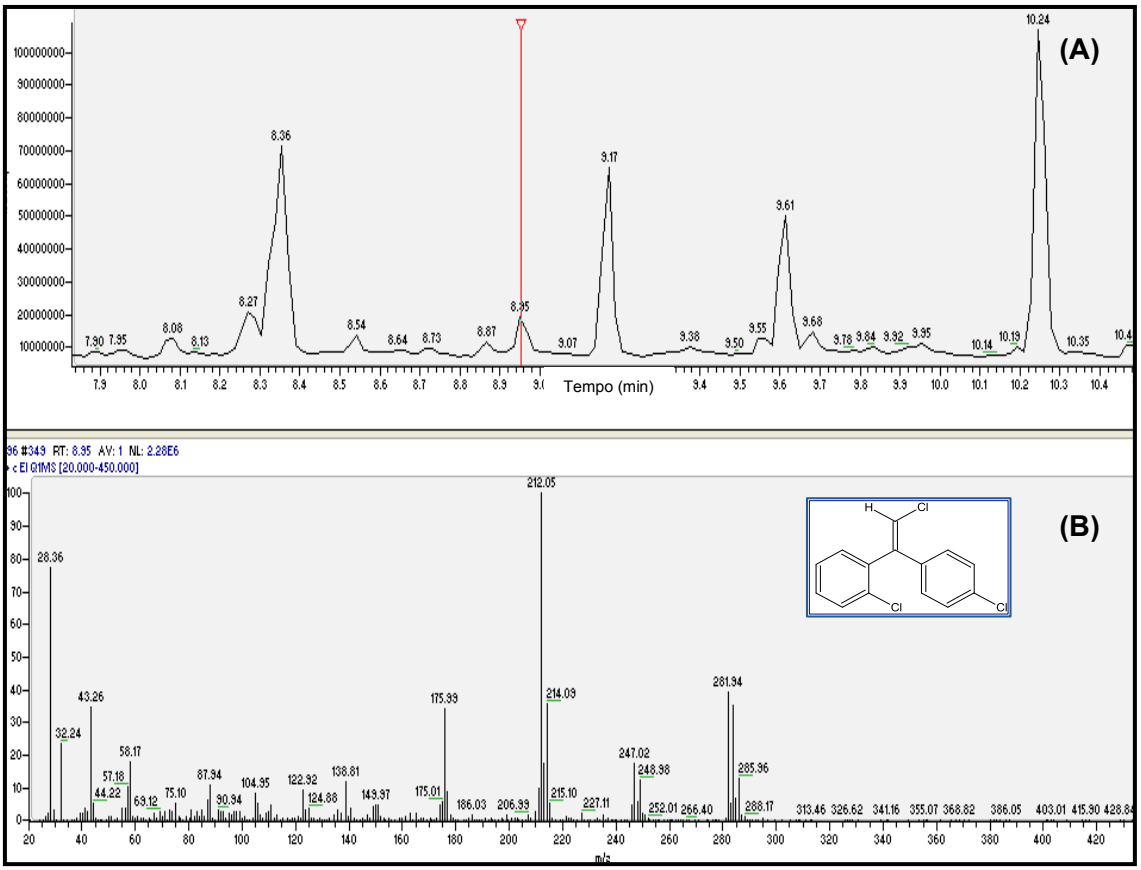


FIGURA 72- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*- DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,95 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Apesar de não ter sido possível encontrar o *o,p'*-DDA, foi encontrado o produto de descarboxilação do ácido, seguido de oxidação, o *o,p'*-DBP, que sugere que o *o,p'*-DDA foi formado.

O *o,p'*-DBP (Figura 73) foi identificado pela comparação dos cromatogramas e espectros de massas ao produto de síntese, pela qual apresentou mesmo tempo de retenção e fragmentação coincidente. Esse metabólito foi também encontrado, neste trabalho, em amostras de plasma e urina.

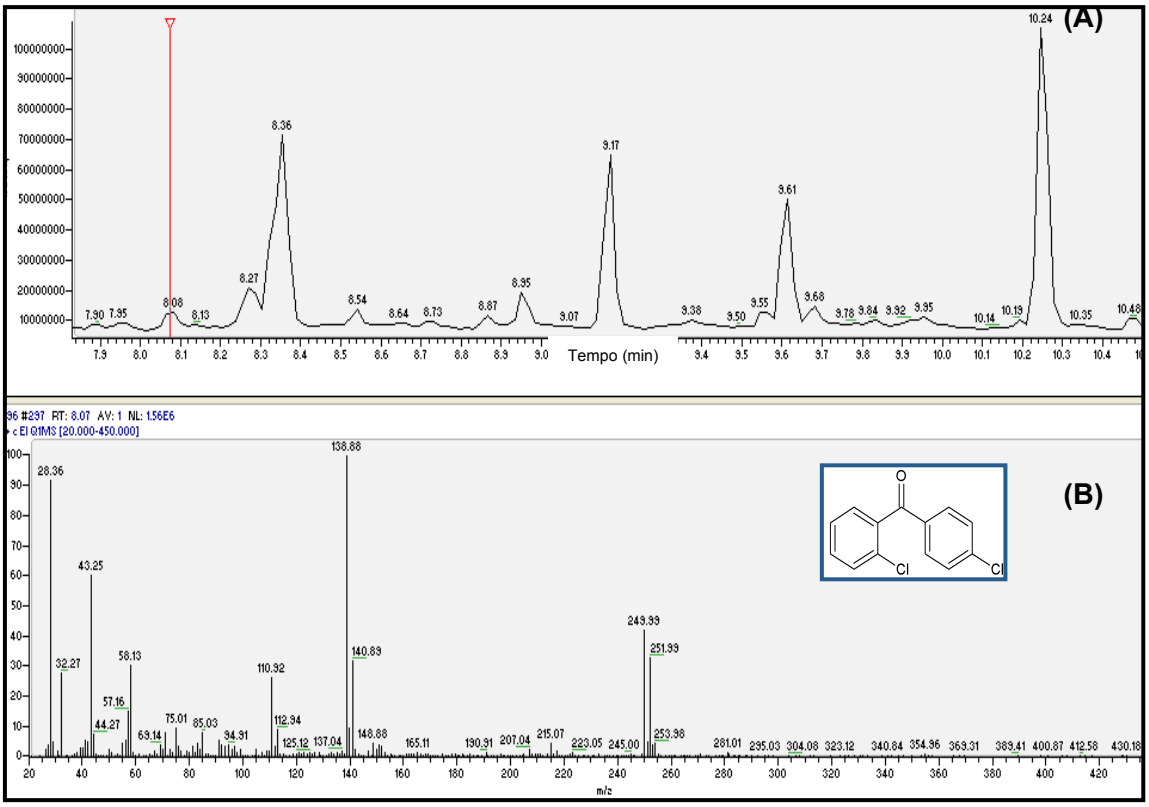


FIGURA 73- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM MISTURA RACÊMICA DO MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,07 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

5.5.3.2 Resultados do cultivo celular com o enantiômero *R-(+)*

A proposta de realizar o cultivo celular comparando os enantiômeros à mistura racêmica, é de descobrir se cada enantiômero sofre uma rota metabólica diferente, considerando que a ação farmacológica ocorre após metabolização do mitotano.

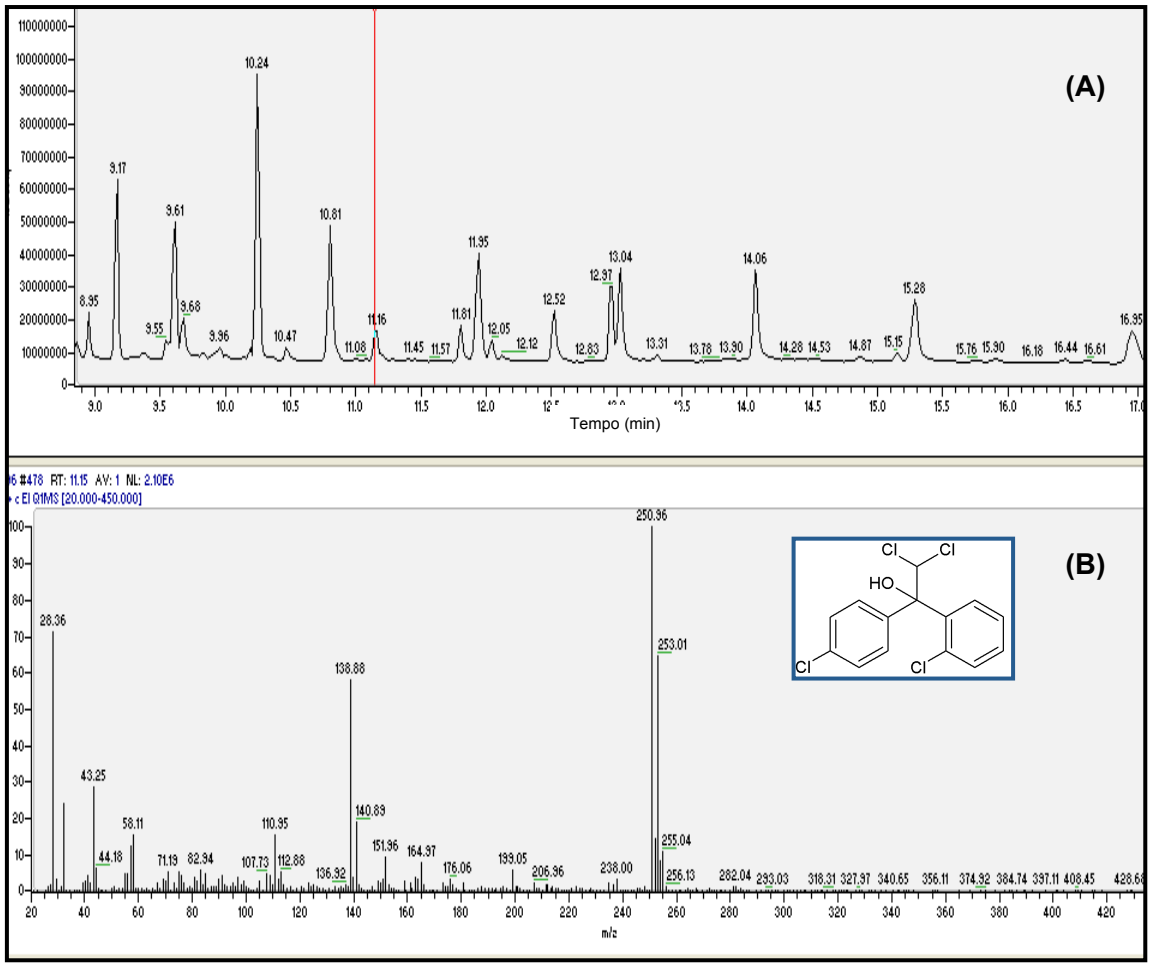


FIGURA 74- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DA CLORIDRINA, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *R-(+)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 11,15 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Na cultura celular do enantiômero R-*(+)* foram encontrados os mesmos metabólitos da cultura da mistura racêmica: cloridrina, *o,p'*-DDE, *o,p'*-DDMU e *o,p'*-DBP (Figuras 74 a 77)

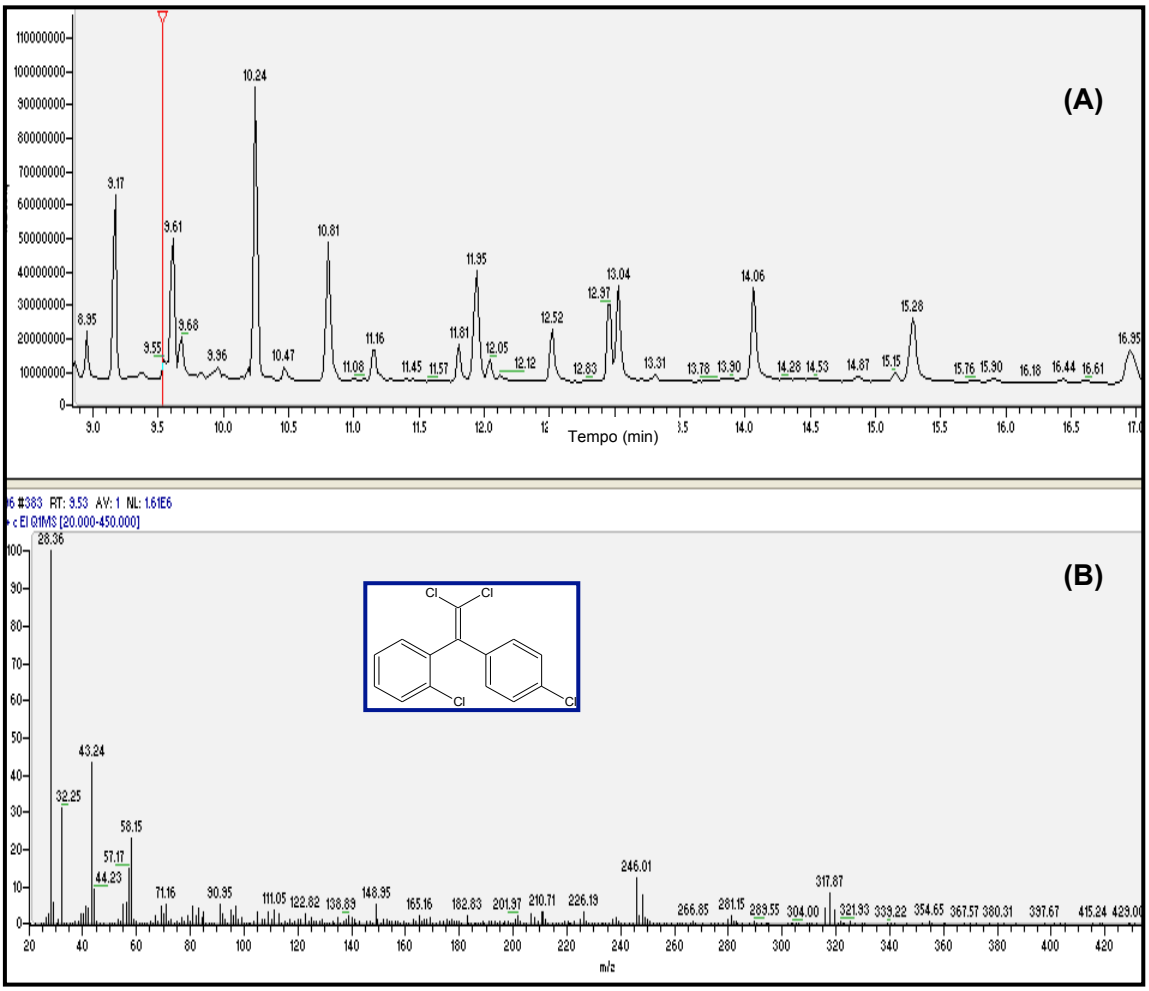


FIGURA 75- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *R-(+)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,53 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

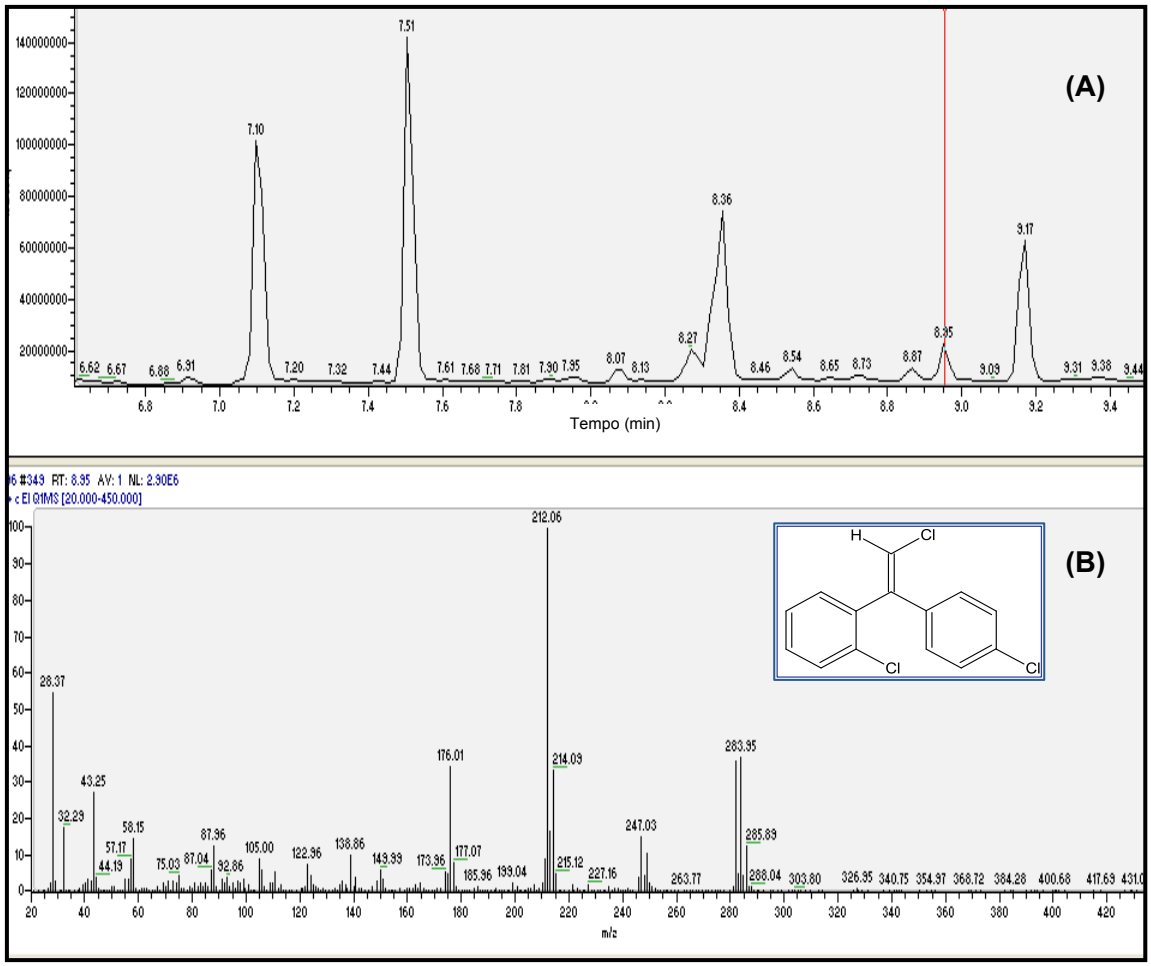


FIGURA 76- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *R-(+)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,95 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

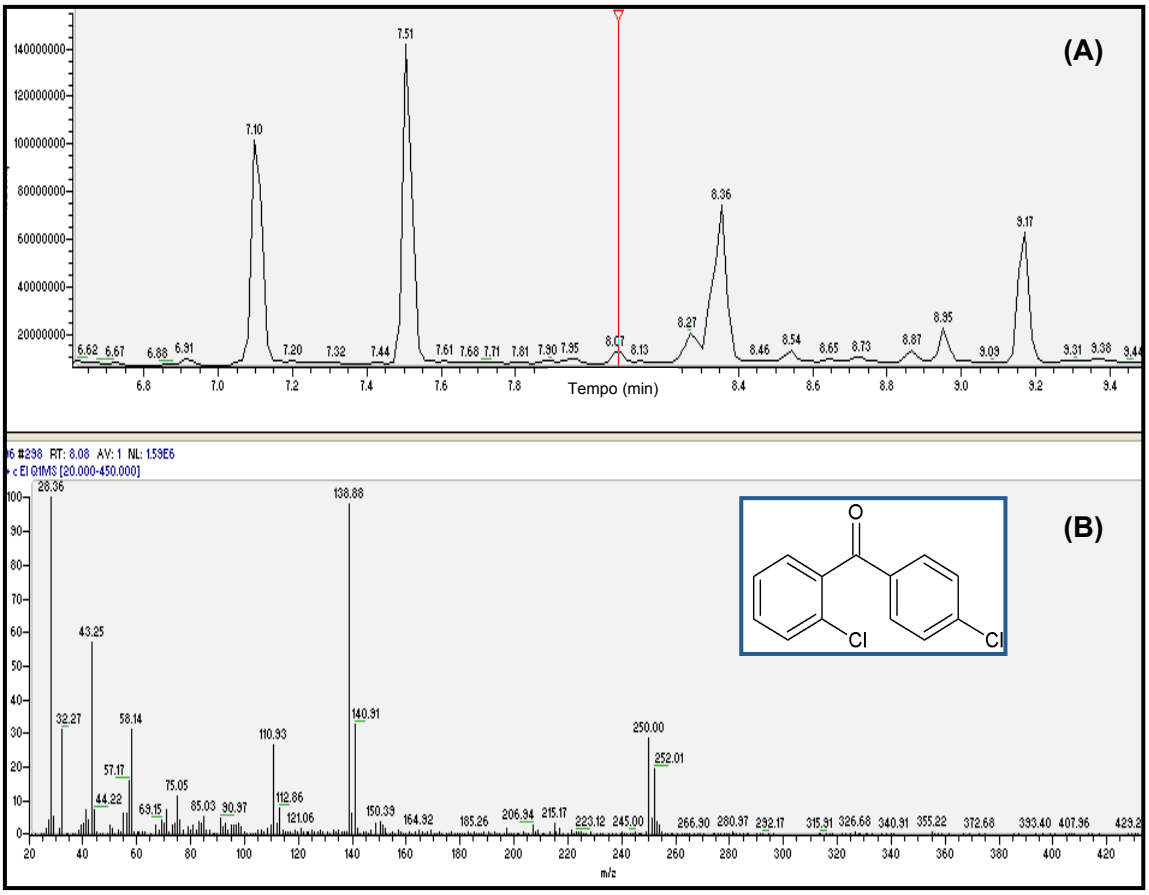


FIGURA 77- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *R-(+)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,08 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

5.5.3.3 Resultados do cultivo celular com o enantiômero *S-(-)*

Assim como nas culturas celurares testadas com a mistura racêmica e enantiômero R-*(+),* os metabólitos encontrados na cultura do enantiômero S-(-) são os mesmos (Figuras 78 a 82).

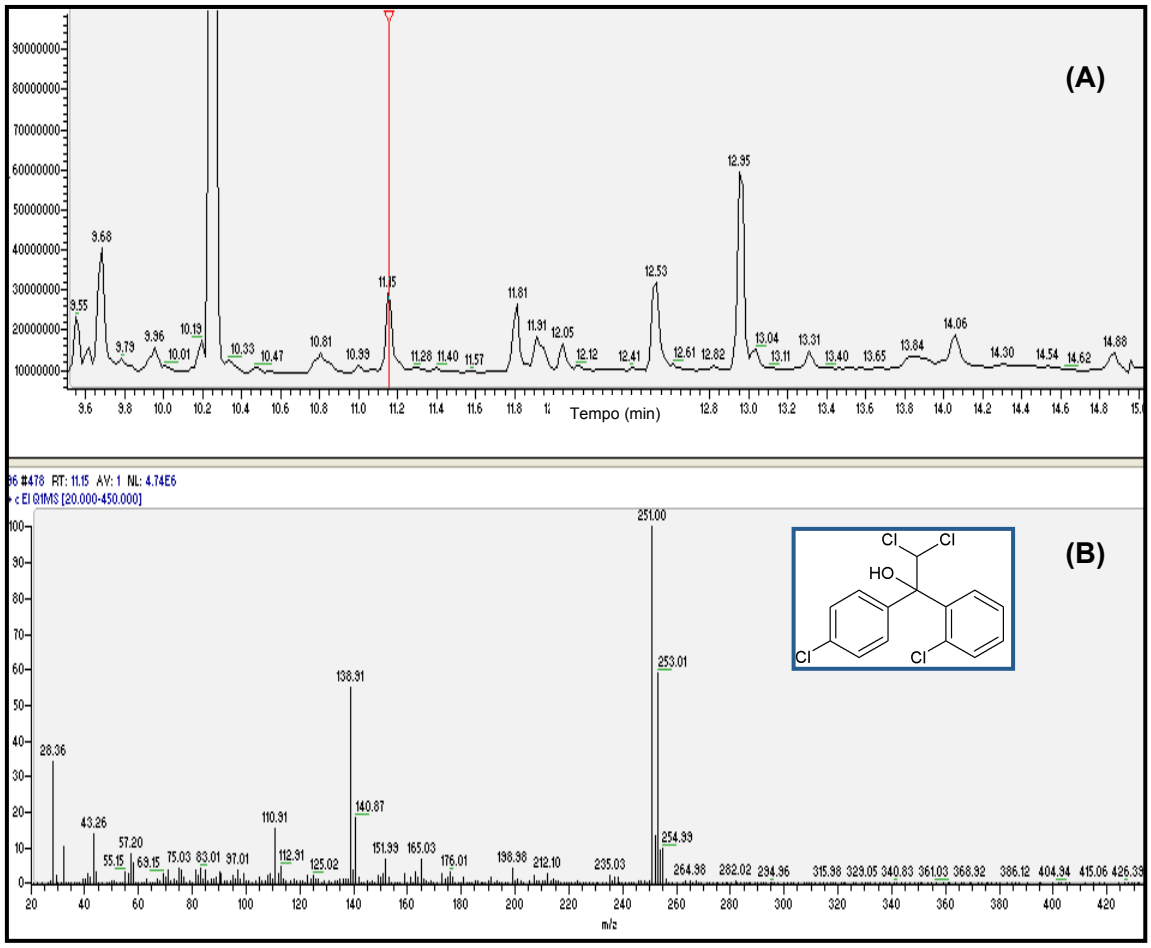


FIGURA 78- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DA CLORIDRINA, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 11,15 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Estes experimentos em cultivo celular foram importantes na complementação dos resultados obtidos, já que foi confirmada a produção do cloridrina, importante intermediário para se entender a formação do *o,p'*-DDE,

que não foi encontrado nem por outros autores, nem nas amostras de plasma e urina deste estudo.

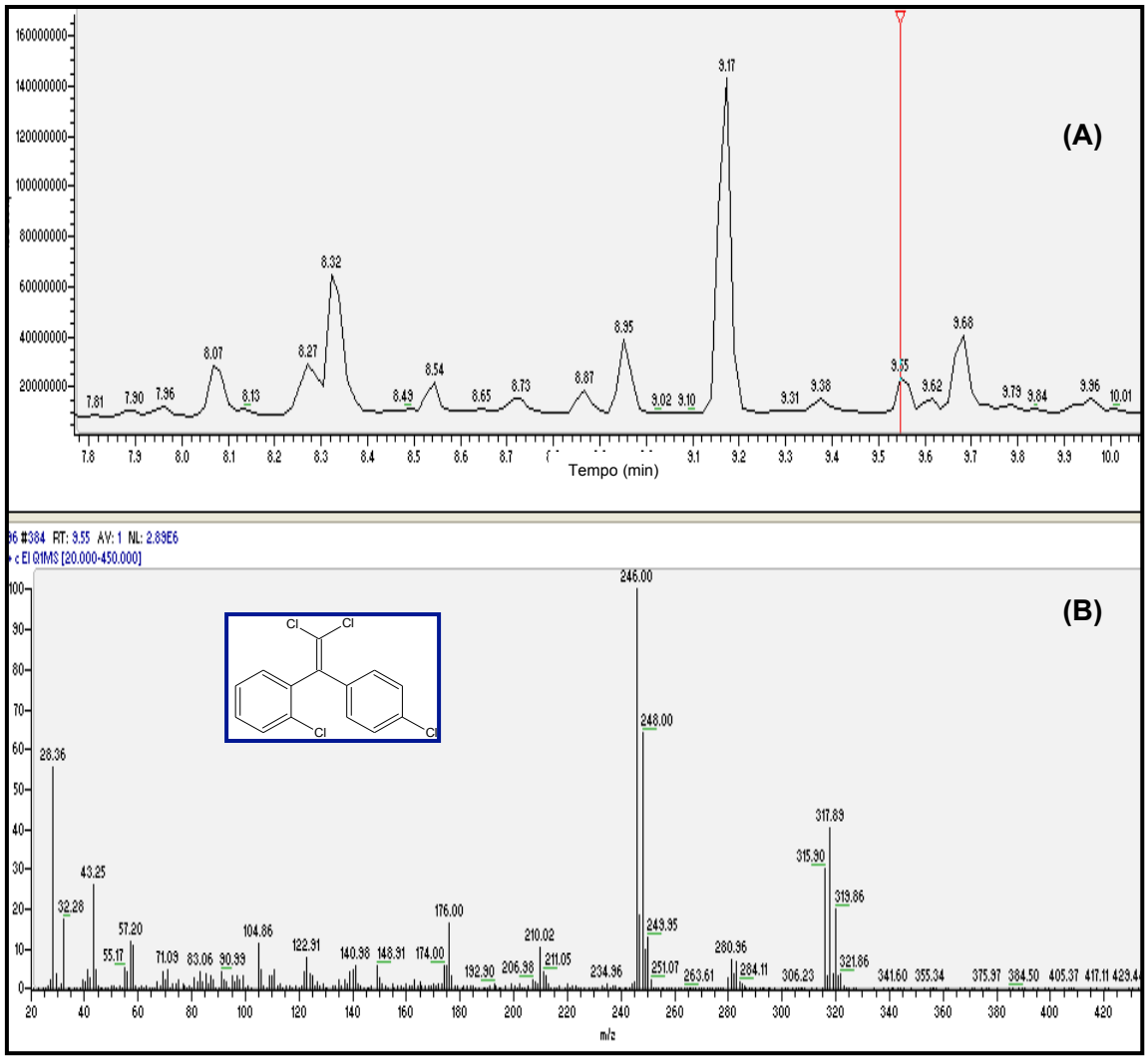


FIGURA 79- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDE, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,55 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

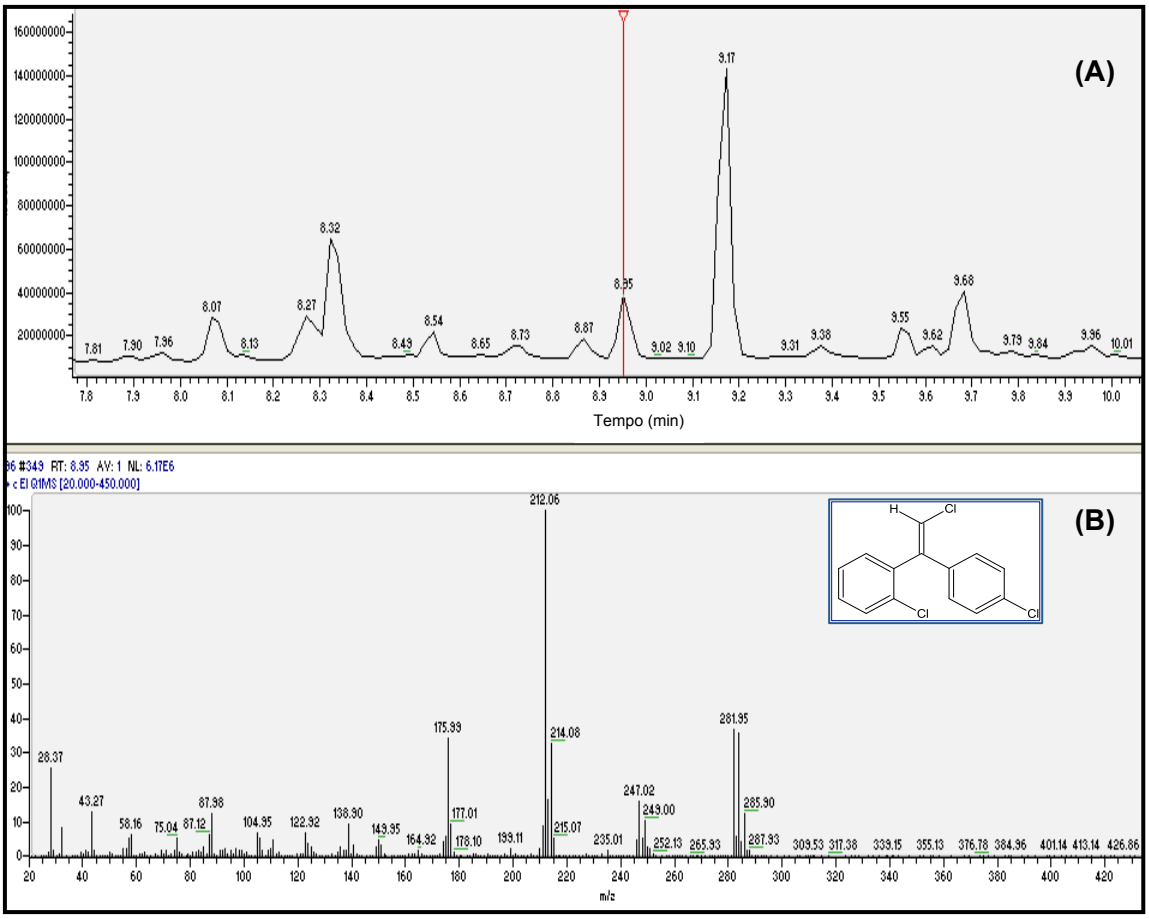


FIGURA 80- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMU, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,95 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

Foi possível detectar no cultivo do enantiômero S-(-) um metabólito de declorinação redutiva subsequente à formação do *o,p'*-DDMU, que é o *o,p'*-DDMS (Figura 81). Esse metabólito já foi encontrado em cultura de fungos, nos produtos de biotransformação do mitotano, confirmando a semelhança do metabolismo de mamíferos e fungos.

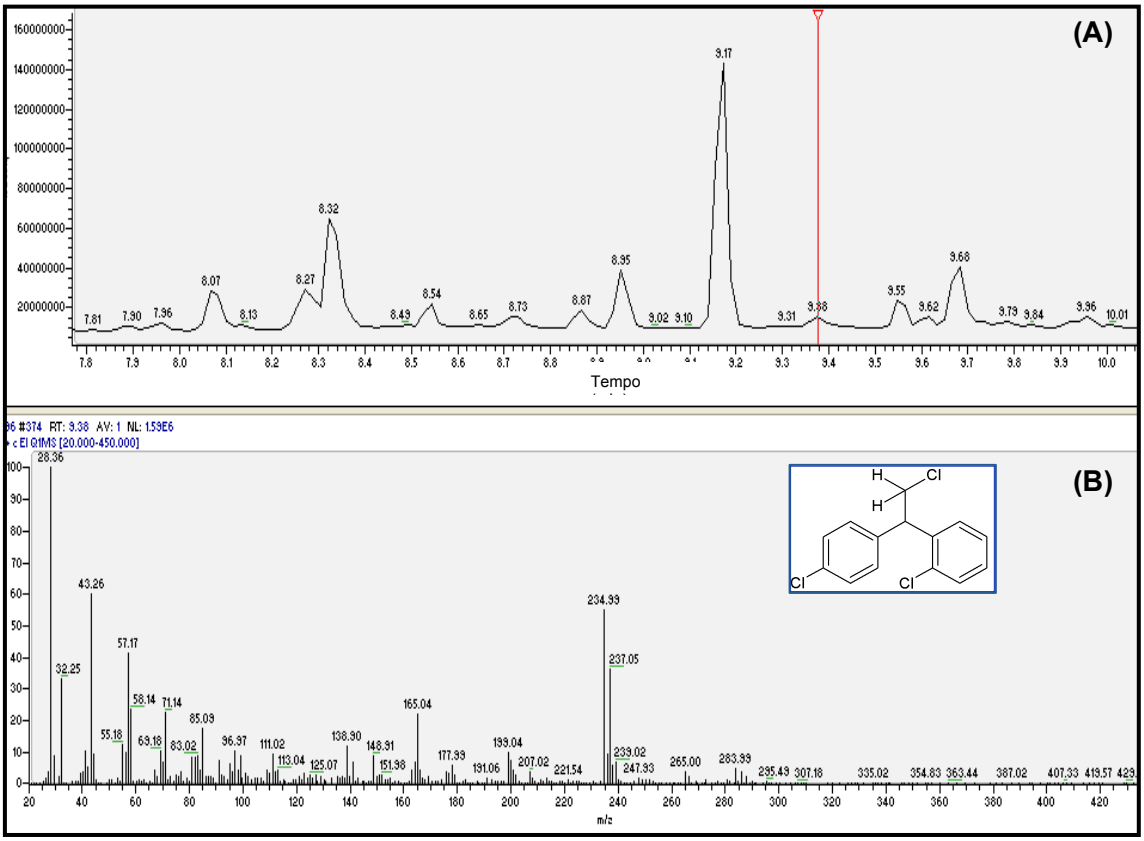


FIGURA 81- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DDMS, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 9,38 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

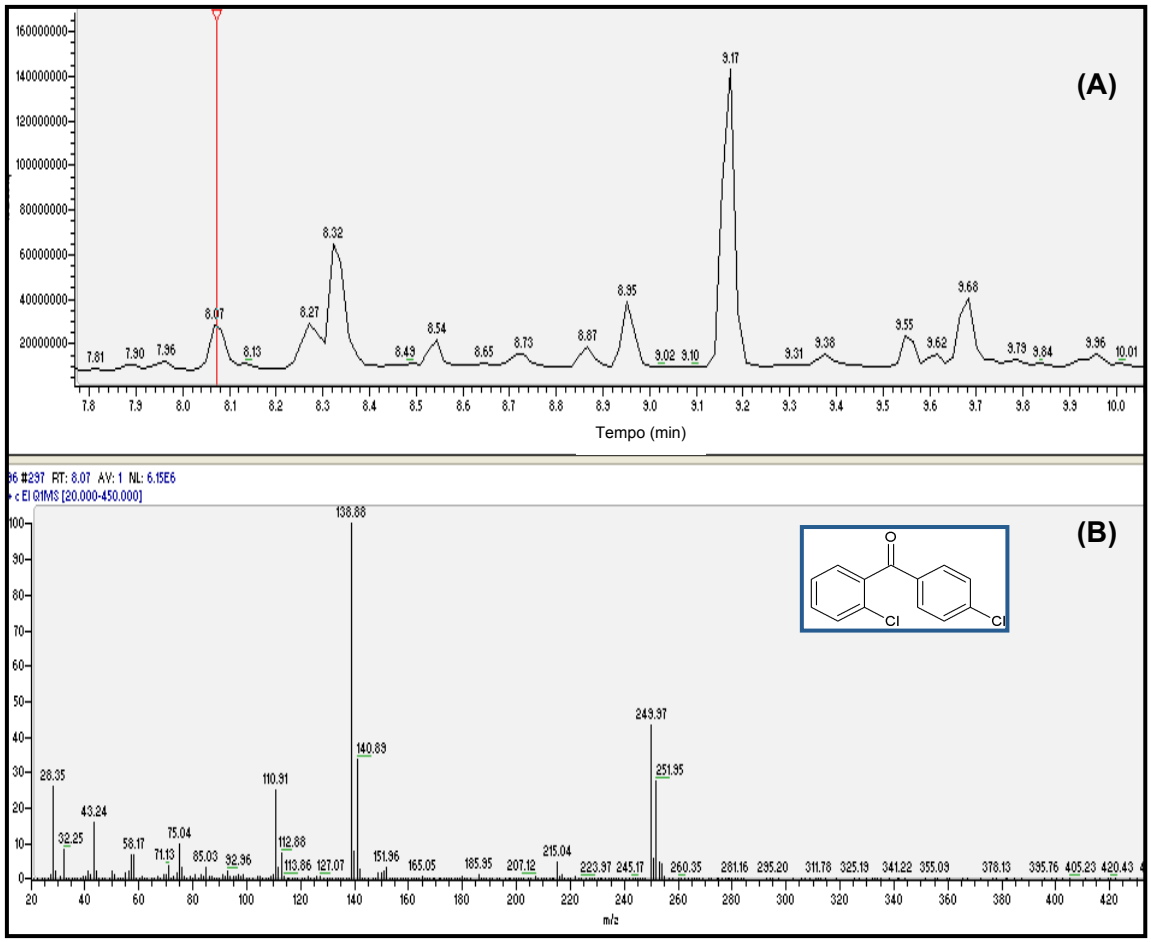


FIGURA 82- (A) CROMATOGRAMA E (B) ESPECTRO DE MASSAS DO *o,p'*-DBP, METABÓLITO ENCONTRADO EM CULTIVO CELULAR DA LINHAGEM H295R TRATADA COM O ENANTIÔMERO *S-(-)*-MITOTANO, EXTRAÍDO EM 8,07 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR IMPACTO ELETRÔNICO EM MODO POSITIVO

O resultados obtidos confirmam que os enantiômeros não sofrem rotas metabólicas diferentes como sugerido inicialmente neste trabalho. Essa hipótese é baseou-se em resultado de um trabalho anterior (Zancanella, 2008), onde foi encontrado o excesso enantiomérico do isômero R-(+) em plasma de pacientes.

Estes resultados revelam que esse excesso não é devido a diferentes rotas metabólicas, mas provavelmente porque, quando administrado o mitotano na forma de mistura racêmica, o enantiômero S-(-) é preferencialmente metabolizado do que o R-(+), porém, através das mesmas enzimas e processos de metabolismo.

Esse resultado corrobora com o estudo de citotoxicidade celular dos enantiômeros, no qual a mistura racêmica produziu maior citotoxicidade celular, comparada aos enantiômeros isolados. Pois, se um enantiômero formasse por α-hidroxilação o *o,p'*-DDE, e o outro formasse por β-hidroxilação o *o,p'*-DDA, considerando que a formação do *o,p'*-DDA está relacionada com a a atividade farmacológica, somente um dos enantiômeros apresentaria atividade citotóxica, e o outro não.

5.6 DISCUSSÃO SOBRE HIPÓTESES METABÓLICAS DO MITOTANO E DOS RESULTADOS OBTIDOS

Inicialmente, foi proposto um mecanismo de metabolismo do mitotano semelhante ao do DDT, envolvendo uma combinação sequencial de etapas de: declorinação redutiva, dehidroclorinação, redução, hidroxilação e oxidação, conforme a Figura 83 (REIF et al, 1974).

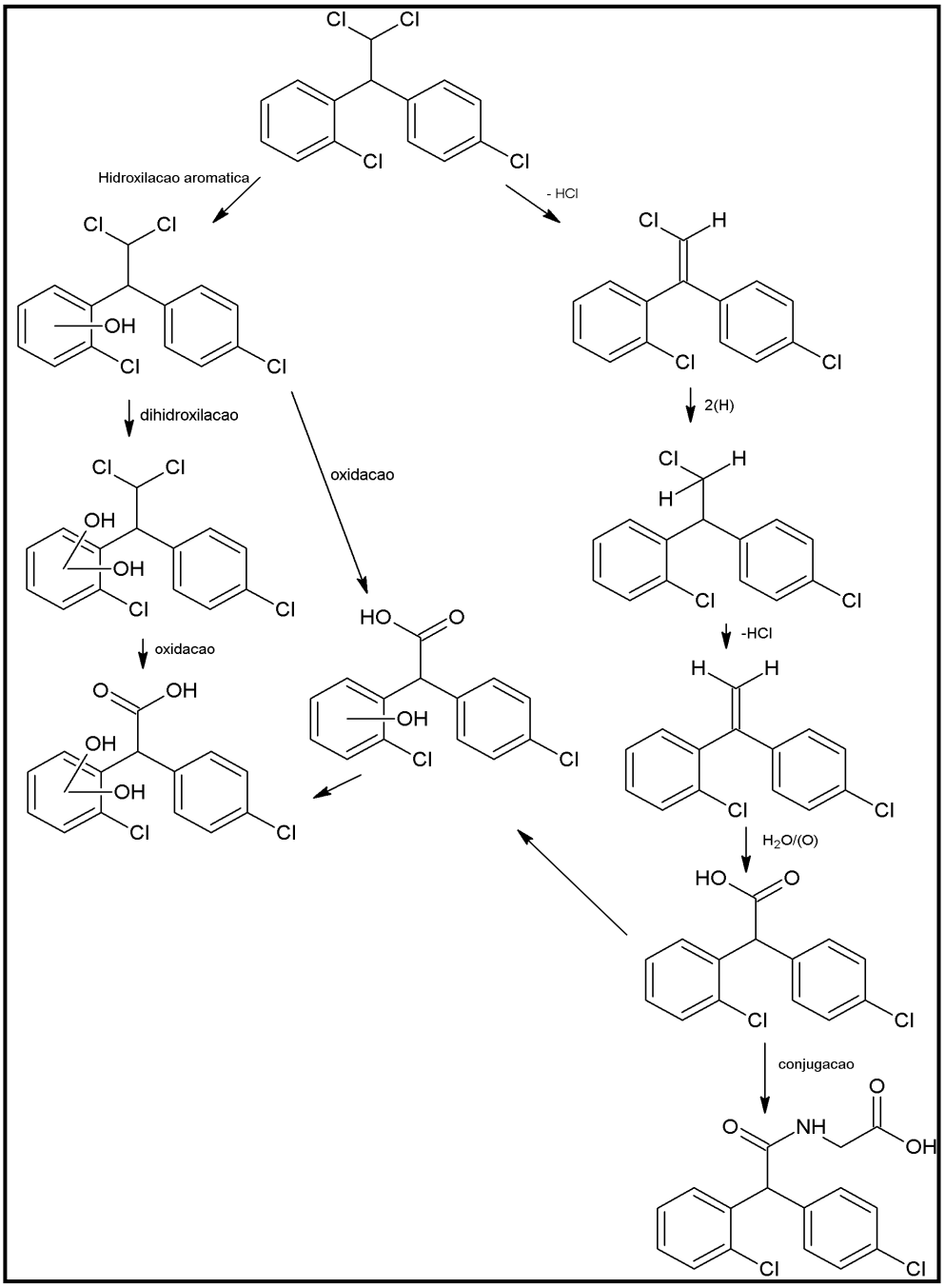


FIGURA 83- HIPÓTESE DE METABOLISMO DE REIF et al (1974)

Todavia, essa hipótese foi revogada por indícios de que o DDA resulta da hidroxilação do DDD no C-1 (Figura 84).

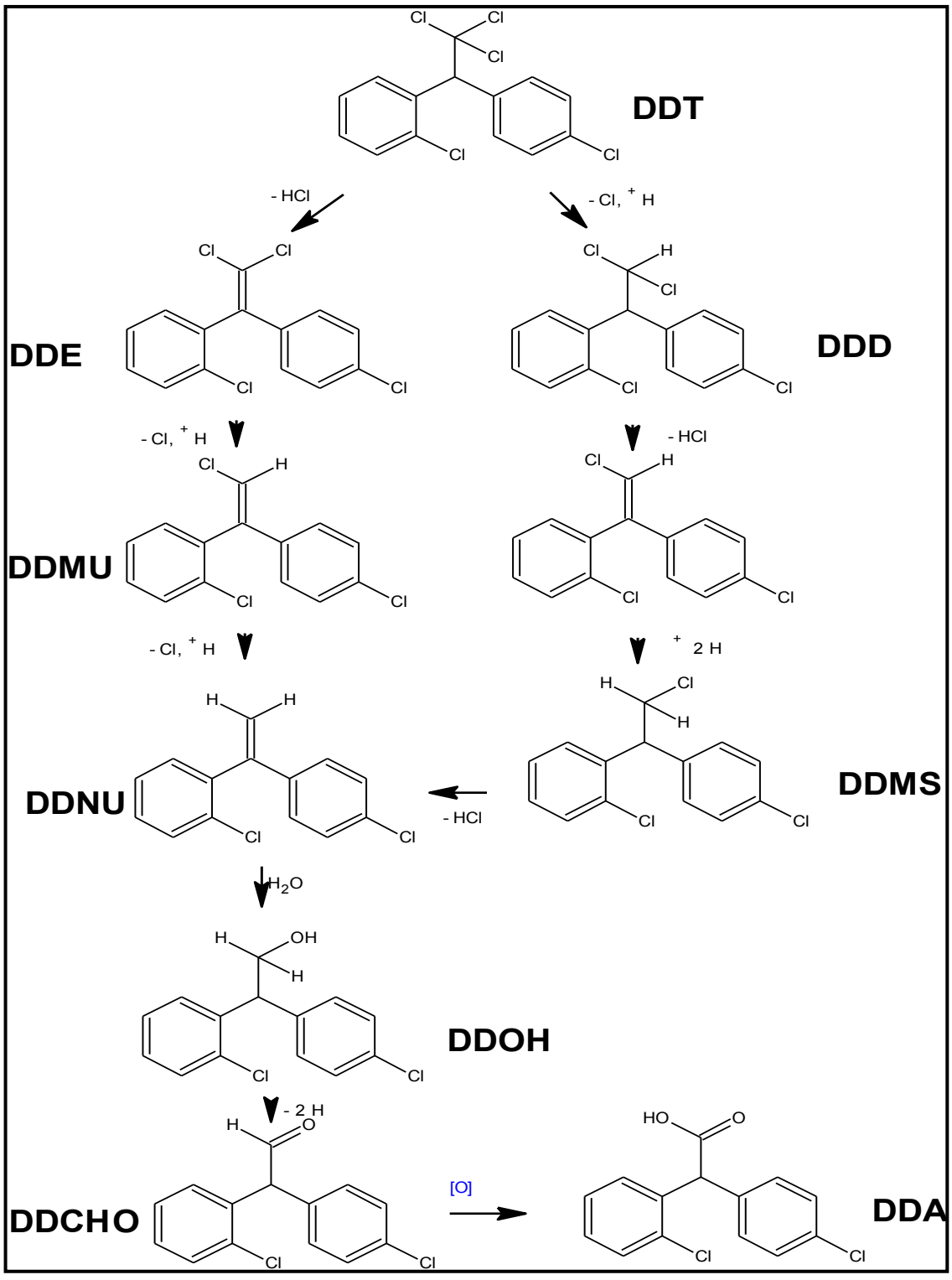


FIGURA 84 – HIPÓTESE INICIAL DA ROTA METABÓLICA DO DDT E DO DDD

FONTE: GOLD et al., 1981; GOLD & BRUNK, 1983

A base para esta afirmação é que animais em que foram administrados o mitotano excretaram apenas quantidades traços de DDOH e grandes quantidades de DDA comparado aos animais nos quais foram administrados qualquer outro metabólito lipofílico do DDT. No metabolismo do DDT foi encontrada uma menor quantidade de DDA excretada. Em contraste o DDMU e DDMS renderam DDA e DDOH numa proporção de 1:2 (GOLD & BRUNK, 1983).

Posteriormente, Jensen et al (1987), com base em um trabalho de Hart e Straw (1971) em que foi demonstrado a importância da integridade da cadeia lateral na relação estrutura-atividade, propuseram um novo fármaco, o *Mitometh* (análogo metilado do mitotano) em um estudo pelo qual concluíram que a ação farmacológica do mitotano não estaria relacionada a necessidade de formação de um metabólito, e que o DDA provavelmente seria responsável pela toxicidade (Figura 85).

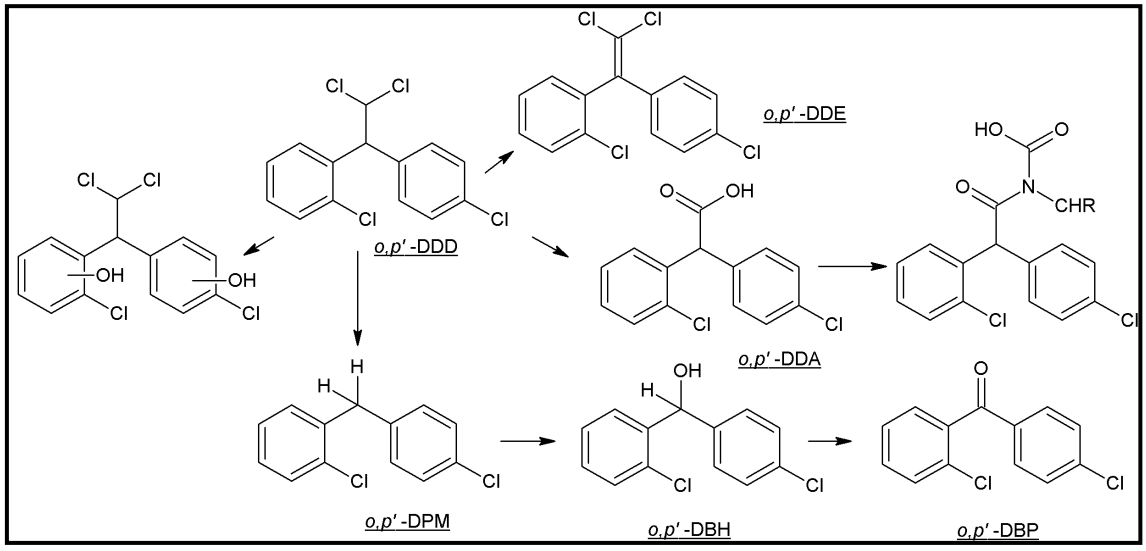


FIGURA 85- HIPÓTESE DE JENSEN et al SOBRE O METABOLISMO DO MITOTANO

FONTE: JENSEN ET AL., 1987

Em 1993, Schteingart et al publicaram um trabalho absolutamente conflitante com o de Jensen et al (1987), onde foram comparados os efeitos do promissor Mitometh aos efeitos do mitotano em cachorros. Apesar da falta de atividade adrenolítica, o mitometh manteve sua toxicidade causando necrose hepática e aumento de enzimas hepáticas. Enquanto mitotano suprimiu

fortemente o crescimento celular em células H295R, mitometh teve um efeito insignificante (SCHTEIGART et al, 1993*)*.

Com base nesses resultados, CAI et al (1995) propuseram um mecanismo de metabolização e ação farmacológica do mitotano semelhante ao mecanismo de ação do cloranfenicol (Figura 86), o qual é semelhante ao mitotano na cadeia alquílica $–CHCl_2$.

O mecanismo sugerido para o cloranfenicol é que a ligação C-H do carbono dihalogenado é oxidada e o metabólito hidroxilado é espontaneamente declorinado para produzir um derivado clorado oxamil. O metabólito reativo reage com a proteína microssomal e causa os efeitos citotóxicos (POHL; KRISHNA, 1978).

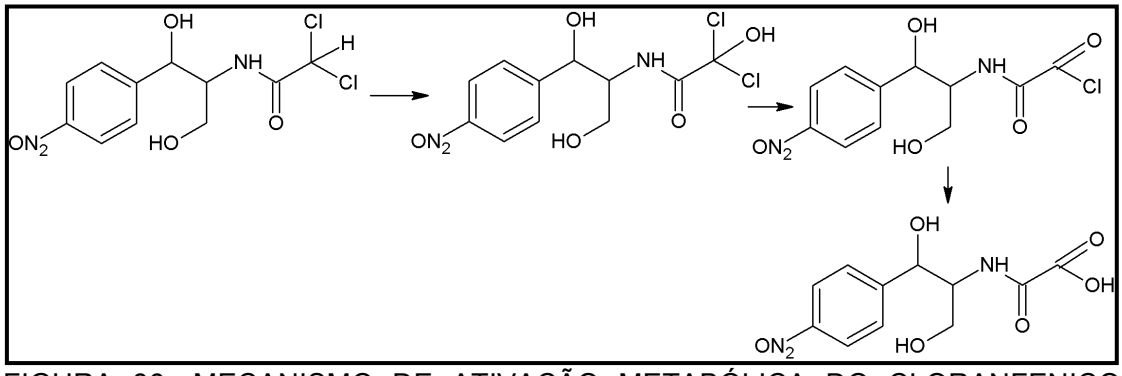


FIGURA 86- MECANISMO DE ATIVAÇÃO METABÓLICA DO CLORANFENICOL POR MICROSSOMAS DE FÍGADO DE RATO

FONTE: (POHL; KRISHNA, 1978).

De acordo com os autores, o mitotano sofreria duas principais vias de metabolização: a primeira seria por α-hidroxilação, pela qual formaria o α-OH-*o,p'*-DDD que, por desidratação, geraria o *o,p'*-DDE (Figura 87). A segunda via seria por β-hidroxilação, pela qual forma o intermediário β-OH-*o,p'*-DDD, que por desidrohalogenação, forma o haleto de acila e este intermediário reativo após promover a ação terapêutica (adrenocorticolítica), geraria o *o,p'*-DDA (CAI et al, 1995).

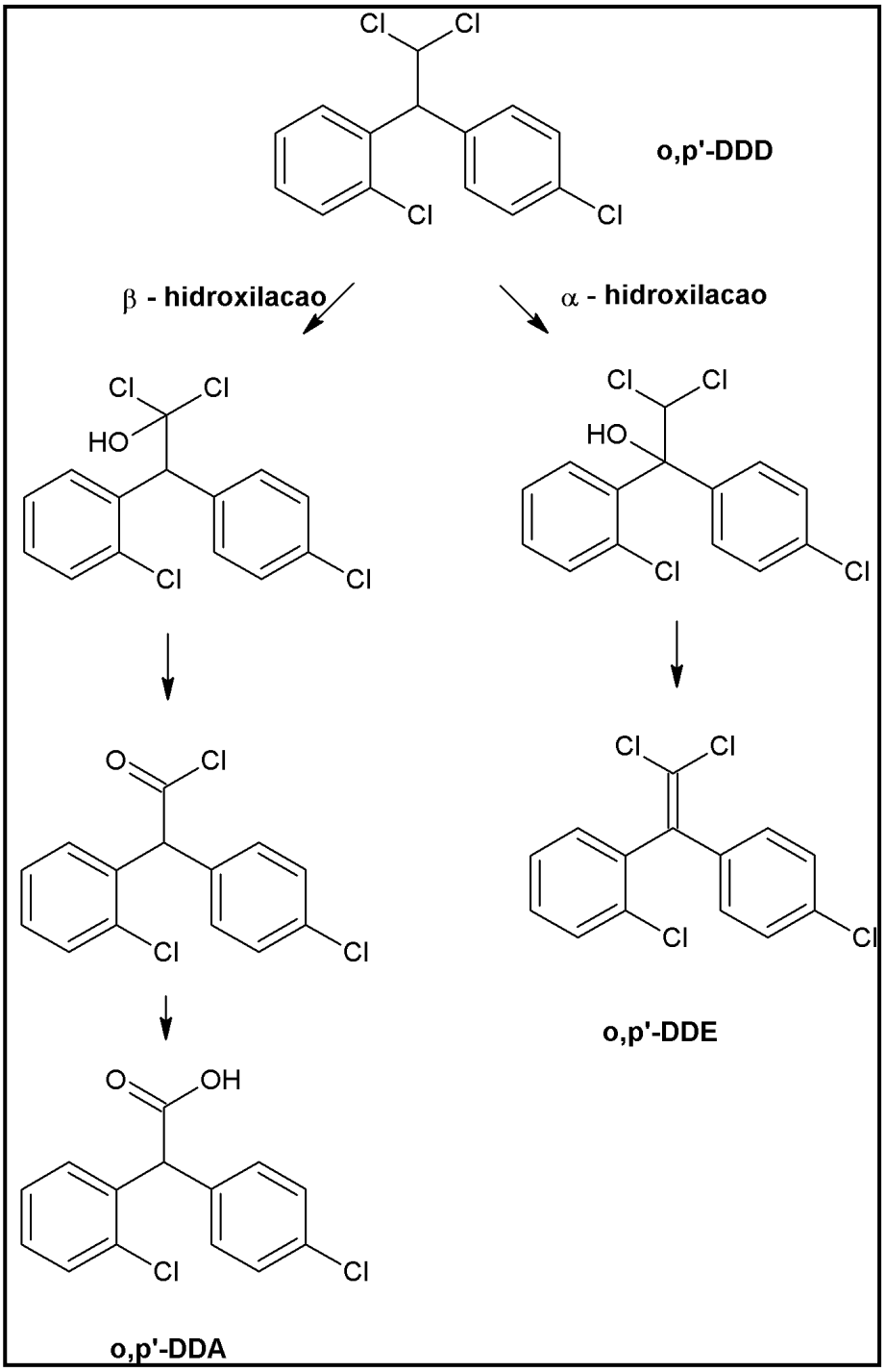


FIGURA 87- HIPÓTESE DE CAI SOBRE O METABOLISMO DO MITOTANO VIA α E β- HIDROXILAÇÃO

FONTE: CAI et al, 1995.

Considerando a hipótese de CAI et al (1995), o β-OH-*o,p'*-DDD é um produto que precederia a formação do *o,p'*-DDA. O haleto de acila não é esperado de ser encontrado em amostras biológicas, já que é uma substância altamente reativa.

Apesar desta última hipótese ser a mais aceita atualmente, estes estudos não demonstraram a formação e identificação de metabólitos urinários minoritários e tampouco sua rota de formação, que possivelmente poderiam estar envolvidos com alguma ação: terapêutica e/ou tóxica.

Reif et al. (1975) ao estudarem os metabólitos urinários do mitotano e proporem uma rota metabólica, descreveram não terem encontrado mitotano inalterado na urina e nem mesmo metabólitos com a cadeia alquílica intacta, tampouco metabólitos de oxidação intermediários do DDA. Os autores também encontraram metabólitos de conjugação com os aminoácidos glicina.

6 CONCLUSÃO

O carcinoma adrenocortical é considerado um tumor endócrino de alta malignidade. O medicamento mais amplamente empregado para o tratamento deste câncer é o quimioterápico mitotano que provoca severas reações adversas e efeitos colaterais. O baixo índice terapêutico e a elevada toxicidade justificam o estudo dos fatores que possam estar relacionadas com o mecanismo de ação. Dentre estes fatores, incluem-se os aspectos de quiralidade e metabolismo do fármaco. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar metabólitos do mitotano e aplicá-los como padrão na detecção em amostras biológicas humanas, produtos de biotransformação por fungos e produto de cultivo celular dos enantiômeros.

Os metabólitos do mitotano foram obtidos por síntese e caracterizados por métodos espectroscópicos de RMN e de massas apresentando rendimentos razoáveis. Para obtenção do primeiro metabólito, o *o,p'*-DDE, foi preciso sintetizar o *o,p'*-DDT. A síntese clássica do DDT, feita pela condensação do cloral com clorobenzeno produz uma mistura de isômeros de difícil separação, com predominância do isômero *p,p'*, A síntese feita neste trabalho foi específica para formação do isômero de interesse *o,p'*-DDT e até o momento não foi descrita na literatura.

Os metabólitos obtidos por síntese foram aplicados como padrão de comparação no intuito de identificar os metabólitos do mitotano em produtos de biotransformação por fungos, em cultivo celular e amostras de plasma e urina de pacientes. A biotransformação do DDT por fungos é facilmente encontrada na literatura por diferentes microrganismos. Os fungos selecionados neste trabalho, *Mycelia sterilia e Cladosporium sp*, não são conhecidos, até o momento, por biotransformar compostos organoclorados, no entanto produziram metabólitos que já foram obtidos por outras cepas.

No estudo em cultivo celular, pode-se concluir que, apesar de estudos prévios demonstrarem excesso enantiomérico do mitotano em plasma de pacientes, isso não pôde ser atribuído ao metabolismo diferencial de cada enantiômero pelo tumor, pois ambos os enantiômeros produziram os mesmos

metabólitos em cultivo celular. E ainda, a cloridrina, metabólito obtido por síntese que não é comercialmente disponível, foi encontrada em cultivo celular. Apesar desta substância ser sugerida como intermediária à formação do DDE, ainda não havia sido relatada na literatura como metabólito do mitotano em humanos.

A pesquisa de metabólitos em urina de pacientes demonstrou que existe uma série de outros metabólitos ainda não conhecidos, e que, por isso não foi possível elucidar suas estruturas. Estes metabólitos poderiam também estar envolvidos no mecanismo de ação farmacológica/tóxica do mitotano ou em diferentes vias metabólicas além de α e β hidroxilação, hidroxilação em anel aromático e glicoconjugação.

Uma molécula obtida neste trabalho, o dioxolano, cuja estrutura cristalina é inédita, apresentou ação citotóxica em linhagem H295R. O dioxolano é mais polar que o mitotano e por isso é possível que haja menor acúmulo em tecido adiposo, o que reduziria as altas doses utilizadas na prática médica, podendo resultar em diminuição da toxicidade.

Sugere-se, como perspectiva de estudos complementares, a avaliação da ação adrenocorticolítica do dioxolano em outras linhagens celulares e estudos *"in vivo"* (cães).

7 REFERÊNCIAS

AGGARWAL, V.K.; MEREU, A. Amidine-promoted addition of chloroform to carbonyl compounds. **Journal of Organic Chemistry**. V. 65, p. 7211-7212, 2000.

ALLOLIO, B.; FASSNACHT, M. Clinical review: Adrenocortical Carcinoma. Clinical Update. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 91, n. 6, 2027–2037, 2006. doi: 10.1210/jc.2005-2639

ANDERSEN, A.; ZALUSKA, K.; ANNA, A.; WARREN, D.J. Determination of mitotano (*o,p*' –DDD) and its metabolites *p,p*' –DDA and *o,p*' –DDE in plasma by high performance liquid chromatography. **Therapeutic Drug Monitoring**. v. 21, p. 355-363, 1999.

BARLASKAR, F. M.; HAMMER, G. D. The molecular genetics of adrenocortical carcinoma. **Rev. Endocr. Metab. Disord**. v. 8, p. 343-348, 2007.

BAUMANN, P.; ZULLINO, D.F.; EAP, C.B. Enantiomer's potential in psychopharmacology – a critical analysis with special emphasis on the antidepressant escitalopram. **European Neuro-Psychopharmacology**, v. 12, p. 433-444, 2002.

BARKER, P.S.; MORRISON, F.O.; WITHAKER, R.S. Conversion of ddt to ddd by proteus vulgaris, a bacterium isolated from the intestinal flora of mouse. **Nature**, v. 205, p. 621-622, 1997.

BERGENSTAL, D.; HERTZ, R.; LIPSETT, M.; MOY, R. Chemotherapy of adrenocortical cancer with *o,p*'-DDD. **Ann Int Med.** v. 53, p.672, 1960.

BLEIBERG M.J.; LARSON P.S. Studies on derivatives of, 2,2 bis-(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane (ddd, tde) with special reference to their effects on the adrenal cortex. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 121, p. 421-31,1957.

BOJARSKI, J.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; GHANEM, A. What's new in chromatographic enantioseparations. **Current Analytical Chemistry**, v. 1, p. 59-77, 2005.

BUSER, H.R. e MULLER, M.D. Isomer-selective and enantiomerselective determination of ddt and related-compounds using chiral high-resolution gas-chromatography mass-spectrometry and chiral high-performance liquid-chromatography. **Analytical Chemistry**. v. 67**,** p. 2691-2698, 1995.

BREUNER, C.W.; JENNINGS, D.H.; MOORE, M.C.; ORCHINIK, M. Pharmacological Adrenalectomy with Mitotane. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 27-34, 2000.

BROCKS, D.R. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity in pharmacokinetics . **Biopharm. Drug. Dispos**. v. 27, p. 387-406, 2006.

CAI, W.; BENITEZ, R.; COUNSELL, R.E.; DJANEGARA, T.; SCHTEINGART, D.E.; SINSHEIMER, J.E. e WOTRING, L.L. Bovine adrenal-cortex transformations of mitotane [1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane-*o,p*'-ddd] and its *p,p*'-isomers and m,p'-isomers. **Biochemical Pharmacology**. v. 49**,** p. 1483-1489, 1995a.

CAI, W.; COUNSELL, R.E.; DJANEGARA, T.; SCHTEINGART, D.E.; SINSHEIMER, J.E. e WOTRING, L.L. Metabolic-activation and binding of mitotane in adrenal-cortex homogenates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 84**,** p. 134-138, 1995b.

CANTILLANA, T., LINDSTRÖM, V., ERIKSSON, L., BRANDT, I., BERGMAN, A. Interindividual differences in o,p'-DDD enantiomer kinetics examined in Göttingen minipigs. **Chemosphere**. v. 76. p. 167-72, 2009.

CANTILLANA, T., ERIKSSON, L., (2S)-1,1-dichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)ethane. **Acta Cryst.** supplementary materials, 2009.

CHASSEAUD, L.F.; HAWKINS, D.R. Biotransformation of drugs. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology** DOI: 10.1081/E-EPT-100000364, p. 310-24, 2007.

CIFTCI, A.O.; SENOCAK, M.E.; TANYEL, F.C.; BÜYÜKPAMUKÇU, B. Adrenocortical tumors in children. **Journal of Pediatric Surgery**. v. 36, p. 549-554, 2001.

CHITSAN, L.; CHANG, T. C. Photosensitized reduction of ddt using visible light: the intermediates and pathways of dechlorination. **Chemosphere**, v. 66, p. 1003-1011, 2007.

COBEY F.A.; TALIAFERRO I.; HAAG H.B. Effect of DDD and some of its derivatives on plasma 17-oh-corticosteroids in the dog. **Science.** v.123, p.140-41, 1956.

CRAND, A.; BORSON-CHAZOT, F.; BRUE, T. Actualités dans la tumorigenèse surrénalienne. **Annales d'Endocrinologie**, v.70, p. S20-25, 2009.

DIAS, R.M.; SANTANA, C.C. Separação cromatográfica quiral do o,p'-diclorodifeniletano (mitotano) em fase estacionária quiral o,o'bis[4-terc-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida. Dissertação de mestrado. Unicamp, Campinas, SP, abril, 2007. 133p. Faculdade de Engenharia Química.

ECKENRODE, F. M. Microbiological transformation of quinidine. **Journal Of Natural Products**. v. 47**,** p. 882-884, 1984.

EMEA, European Medicines Agency. **Relatório público europeu de avaliação (epar) lysodren**, London, UK, 2007.

FABER, K. Biotransformations in organic chemistry - *A Textbook*, 5 ed., New York: Springer-Verlag, 2004.

FANG, H.; DONG, B.; YAN, H.; TANG, F.; YU, Y. Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**. v. 184, p. 281-89, 2010.

FANG, V.S. Cytotoxic activity of 1-(o-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (mitotane) and its analogs on feminizing adrenal neoplastic cells in culture. **Cancer Research**, v. 39, p. 139-145, 1979.

FRANCIA, S.; PIRRO, E.; ZAPPIA, F.; MARTINO, F.; SPRIO, A.E.; DAFFARA, F.; TERZOLO, M.; BERRUTI, A.; Di CARLO, F.; GHEZZO, F. A new simple HPLC method for measuring mitotane and its two principle metabolites Tests in animals and mitotano-treated patients. **Journal of Chromatography B**. v. 837, p. 69-75, 2006

GIBLADI, M. Stereoselective and isozyme-selective drug interaction. **Chirality**, v. 5, p. 407-413, 1993.

GINGELL, R.; BRUNK, G.; LEUSCHEN,T.; GOLD, B. Metabolism of s DDT metabolite via a chloroepoxide. **Chem. Biol. Interactions**. v. 35, p. 159-76, 1981.

GOLD, B., BRUNK, G. Metabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT), 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethane, and 1-chloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethene in the hamster. **Cancer Research**. v. 43. p. 2644-47, 1983.

GOLD, B., BRUNK, G. A mechanistic study of the metabolism of 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethane (DDD) to 2,2-bis (p-chlorophenyl) acetic acid. **Biochemical Pharmacology**. v. 33, p. 979-82, 1984.

GONZALEZ, R.J.; TAMM, E.P.; NG, C.; PHAN, A.T.; VASSILOPOULOU-SELLIN, R.; PERRIER, N.D.; EVANS, D.B.; LEE, J.E. Response to mitotane predicts outcome in patients with recorrent adrenal cortical carcinoma. **Surgery**. v. 142, p. 867-875, 2007.

GRUMMITT, O.; BUCK, A.; EGAN, R. Di-(*p*-chlorophenyl)acetic acid. **Organic Syntheses**. v. Coll. Vol. 3**,** p. 21-22, 2008.

HALLER, H.L.; BARTLETT, P.D.; DRAKE, N.L.; NEWMAN, M.S.; CRISTOL, S.J.; EAKER, C.M.; HAYES, R.A.; KILMER, G.W.; MAGERLEIN, B.; MUELLER, P.; SCHNEIDER, A.; WHEATLEY, W. The Chemical Composition of technical DDT. **Journal of Chemical Society**. v. 67, p. 1591-1601, 1945

HART, M.M.; REAGEN, R.L.; ADAMSON, R.H. The effect of isomers of DDD on the ACTH-induced steroid output, histology and ultrastructure of the dog adrenal cortex. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 24, p. 101-13, 1973.

HEILMANN, P.; WAGNER, P.; NAWROTH, P.P.; ZIEGLER, R. Therapy of carcinoma with lysodren (*o,p*'-DDD): Experience in therapeutical management by monitoring of *o,p*'-DDD blood levels. **Medizinische Klinik**. v. 96**,** p. 371-377, 2001.

HEBERER, T., DÜNNBIER, U. DDT metabolite bis(chlorophenyl)acetic acid: the neglected environmental contaminant. **Environ. Sci. Technol**. v.33, p. 2346-51, 1999.

HERMANSSON, V.; CANTILLANA, T.; HOVANDER, L.; BERGMAN, A.; LJUNGVALL, K.; MAGNUSSON, U.; TÖRNEKE, K.; BRANDT, I. Pharmacokinetics of the adrenocorticolytic compounds 3-methylsulphonyl-de and *o,p*'-ddd (mitotane) in minipigs. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 61, p.267-274, 2008.

HONG, J.; YOO, J. S.; JUNG, S.Y. ; KIM, K.J. Identification of photodegradation products of ddt in water. **Analytical Sciences** v. 13, p. 75-82, 1997.

INOI, T.; GERICKE, P. ; HORTON, W. J. ; 1,1-dichloro-2-(o-chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl)ethane and related compounds.v. 27, p. 4597-4600, 1962.

JAROLIM, L.; BREZA, J.; WUNDERLICH, H. Adrenal tumors. **Eur. Urol**. v. 43, p. 1-10, 2003.

JENSEN, B.; CALDWELL, M. W.; FRENCH, L.G.; BRIGGS, D. G. Toxicity, Ultrastructural Effects, and Metabolic Studies with 1 -(o-Chlorophenyl)-1 -(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane(o,p'-DDD) and Its Methyl Analog in the Guinea Pig and Rat. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v. 87, p. 1-9, 1987.

KALLMAN, B. J.; ANDREW, M.; Reductive dechlorination of ddt to ddd by yeast. **Science**, v. 141, p. 1050-1051, 1963.

KAMANAVALLI, C.M.; NINNEKAR, H.Z. Biodegradation of ddt by a pseudomonas species. **Current Microbiology**, v. 48, p. 10-13, 2004.

KAMINSKI, L.S.; ZHANG, Z.Y. Human p450 metabolism of warfarin. **Pharmacol. Ther**. v. 73(1), p. 67-74, 1997.

KASPERLIK-ZALUSKA, A., CICHOCKI, A. Clinical role of determination of plasma mitotane and its metabolites levels in patients with adrenal cancer:

Results of a long-term follow-up. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**. v. 5, p. 125-32, 2005.

KROISS, M.; QUINKLER, M.; LUTZ, W.K.; ALLOLIO, B.; FASSNACHT, M. Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma. **Clinical Endocrinology.** v. 75, p. 585–91, 2011.

KUROSAWA, K.; NISHINO, H.; YONEMURA,H. Reaction of α,β-unsaturated carboxylic acids with manganese (III) acetate in the presence of chloride ion. **The chemical society of Japan**. v. 59, p. 3153-9, 1986.

LACROIX, M.; HONTELA, A. The organochlorine *o,p*' –ddd disrupts the adrenal steroidogenic signaling pathway in rainbow trout (oncorhynchus mykiss). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 190, p. 197-205, 2003.

LEWIS, D.F.V. P450 structures and oxidative metabolism of xenobiotics. **Pharmacogenomics**, v. 4, p. 387-395, 2003.

LIOU, L. S.; KAY, R. Adrenocortical carcinoma in children- Review and Recent Innovations. **Pediatric urologic oncology** v. 27, n. 3, P.403-21, 2000.

LOANNIDES, C. Chiral effects in adrenocorticolytic action of *o,p'*-DDD (mitotane) in human adrenal cells. **Xenobiotica**. v. 40, n.3, p.177-83, 2010.

LU, H. Stereoselectivity in drug metabolism. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol**. v. 3 (2), p. 149-158, 2007.

MALUF, D. F.; OLIVEIRA, B.H.; LALLI, E. Therapy of adrenocortical cancer: present and future. **Am J Cancer Res** v. 1, n. 2, p. 222-32, 2011.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G.M.M.; KAMTER, R.D. Species differenes between mouse, rat, dog, monkey and human cyp-mediated drug metabolism, inhibition, and induction. **Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol**. v. 2(6), p. 875-894, 2006.

MAYEHEW, M.; BUI, P.; ROZZELL, D. Better ways to produce drug metabolites. **Process Development**, Bioocatalytics Inc, december, 2004.

MORISHITA, K.; OKUMURA, H.; ITO, N.; TAKAHASHI, N. Primary culture system of adrenocortical cells from dogs to evaluate direct effects of chemicals on steroidogenesis. **Toxicology**, v. 165, p. 171-178, 2001.

MOSHER, H. S. CANNON, M. R., CONROY, E. A., VAN STRIEN, R. E., SPALDING, D. P. Preparation of technical DDT. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 38, p. 916-23, 1946.

MURRAY, H.C.; PETERSON, D.H. Oxygenation of steroids by Mucorales fungi. Upjohn Company. 272944[US2,602,769]. 1952. US.

MURTHY, T.; CHANDRASEKHAR, S. Nucleophilic addition to α,α-dihalogenocarbonyl compounds: synthetic and mechanistic implications. **J. Chem. Research.** v. 1, p. 414-5, 1987.

NG, L.; LIBERTINO, J.M.; Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. **Journal of Urology**. v.169, p. 5-11, 2003.

OLIVEIRA, B.H.; BUENO, D.D. Biotransformação de esteróides. **Química Nova.** v. 19(3), p. 233-36, 1996.

PHAN, A.T. Adrenal cortical carcinoma - Review of current knowledge and treatment practices. **Hematology-Oncology Clinics Of North America**. v. 21**,** p. 489, 2007.

PIÑEIRO-SÁNCHEZ, M.L.; VAZ, A.D.N.; COUNSELL, R.E.; RUYAN, M.; SCHTEINGART, D.E.; SINSHEIMER, J.E. Synthesis of β-^{3}H-mitotane for use in a rapid assay for mitotane metabolism. **Journal of labelled compunds and radiopharmaceuticals.** v. XXXVI, n. 2, p-121-7, 1994.

POHL, L. KRISHNA, G. Study of the mechanism of metabolic activation of chloramphenicol by rat liver microsomes. **Biochemical Pharmacology.** v. 27, n. 3, p. 335-41, 1978.

POLLARD, D.J.; WOODLEY, J.M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends Biotechnol.** v. 25**,** p. 66-73, 2007.

PURNOMO, A.S.; KAMEI, I.; KONDO, R. Degradation of 1,1,1 –trichloro -2,2-bis (4-chlorophenyl)ethane (ddt) by brown-rot fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105 (6), p. 614-621, 2008.

RAINEY, W. E.; SANER, K. ; CHIMMER, B. P. Adrenocortical cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 228, p. 23-38, 2004.

REIF, V.D.; SINSHEIMER, J.E.; WARD, J.C. e SCHTEING, D.E. Aromatic hydroxylation and alkyl oxidation in metabolism of mitotane (*o,p*'-ddd) in humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 63**,** p. 1730-1736, 1974.

ROLL, D.B. e BELTRAME, P. Assignment of configuration of dehydrochlorination products of mitotane. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 60**,** p. 484, 1971.

SCHMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M. e WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**. v. 409**,** p. 258-268, 2001.

SCHTEINGART, D.E.; SINSHEIMER, J.E.; COUNSELL, R.E.; ABRAMS, G.D.; MCCLELLAN, N.; DJANEGARA, T.; HINES, J.; RUANGWISES, N.; BENITEZ, R.; WOTRING, L.L. Comparison of the adrenalytic activity of mitotano and a methylated homolog on normal adrenal cortex and adrenal cortical carcinoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology.** v. 3, p. 459- 66, 1993.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. Spectrometric identification of organic compounds. v.1, pg. 35, 5 ed. Ed. John Wiley & Sons, INC. Melo Park California, 1963.

SCHTEINGART, D.E. Adjuvant Mitotane Therapy of Adrenal Cancer -Use and Controversy. **The new england journal of medicine.** v. 356, n. 23, p. 2415-18, 2007.

SINSHEIMER, J.E. FREEMAN C.J. Mitotane (1-(o-Chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane) Metabolism in Perfusion Studies with Dog Adrenal Glands. **Drug Metabolism.** v. 15, p. 267-69, 1986.

SINSHEIMER, J. E., COUNSELL, R. E., CAI, W., GOPALASWAMY, R.; MAHALASKSHMI, P., PINERO-SANCHEZ, M. L., RUANGWISES, N., SCHTEINGART, D. E. Gas chromatographic-electron capture determination of 2,4-dichlorodiphenylacetic acid from in-vitro adrenal transformations of mitotane and its analogs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p.861-66, 1996.

SRISILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. **Biotechnology Advances**. v. 21**,** p. 3-39, 2003.

STAELS, B.; HUM , D.W.; MILLER, W. L. Regulation of steroidogenesis in ncl-h295 cells: a celular model of the human fetal adrenal. **Molecular Endocrinology**, v. 7 (3) p. 423-433, 1993.

STEN, T. Prominent but reverse stereoselectivity in propranolol glucuronidation by human udp-glucuronosyltranferases1a9 and 1a10. **Drug Metab. Dispos**. v. 34(9), p. 1488-1494, 2006.

SUBBA-RAO, R.V.; ALEXANDER, M. Bacterial and fungal cometabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) and its breakdown products. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 509-16, 1985.

TANAKA, K.; KUMANO, Y.; KANOMATA, N.; TAKEDA, M.; HARA, I.; FUJISAWA, M.; KAWABATA, G.; KAMIDONO, S.; Oncocytic adrenocortical carcinoma. **Urology**. V. 64, p. 376e5-376e6, 2004.

TERZOLO, M.; ANGELI, A.; FASSNACHT, M.; DAFFARA, F.; TAUCHMANOVA, L.; CONTON, P.A.; ROSSETTO, R.; BUCI, L.; SPERONE, P.; GROSSRUBATSCHER, E.; REIMONDO, G.; BOLLITO, E.; PAPOTTI, M.; SAEGER, W.; HAHNER, S.; KOSCHKER, A.; ARVAT, E.; AMBROSI, B.; LOLI, P.; LOMBARDI, G.; MANNELLI, M.; BRUZZI, P.; MANTERO, F.; ALLOLIO, B.; DOGLIOTTI, L.; BERRUTI, A. Adjuvant Mitotane Treatment for Adrenocortical Carcinoma. **The new england journal of medicine**. v. 356, p. 2372-80, 2007.

TERZOLO, M.; BERRUTI, A. Adjunctive treatment of adrenocortical carcinoma. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**. v.15, p. 221–26, 2008.

UKISU, Y. Complete dechlorination of ddt and its metabolitesin na alcohol mixture using naoh and pd/c catalyst. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 287-292, 2008.

XIAO, P.; MORI, T.; KAMEI, I.; KONDO, R. A novel metabolism pathway for degradation of DDT por White rot fungi, Phlebia lindtneri and Phlebia brevispora. **Biodegradation**, 2010, doi 10.1007/s10532-010-9443-z.

ZAKS, A. Industrial biocatalysis. **Curr. Op. Chem. Biol.** v. 5**,** p. 130-136, 2001.

ZANCANELLA, P. Mitotano: metabolismo enantioseletivo, encapsulação em lipossomas e avaliação in vitro e in vivo. (2008). (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

ZANCANELLA, P.; PIANOVSKI, M.A.D.; OLIVEIRA, B.H.; FERMAN, S.; PIOVEZAN, G.C.; LICHTVAN, L.L.; VOSS, S.Z.; STINGHEN, S.T.; CALLEFE, L.G.; PARISE, G.A.; SANTANA, M.H.A. e FIGUEIREDO, B.C. Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma - Mitotane monitoring and tumor regression. **Journal of Pediatric Hematology Oncology**. v. 28**,** p. 513-524, 2006.

ZEE-CHENG, K.; CHENG, C. C. Synthesis of compounds related to 2-(o-chloro-phenyl)-2-(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane. v.5, p. 1008-15, 1962.

WANDREY, C.; LIESE, A. e KIHUMBU, D. Industrial biocatalysis: Past, present, and future. **Organic Process Research & Development.** v. 4**,** p. 286-290, 2000.

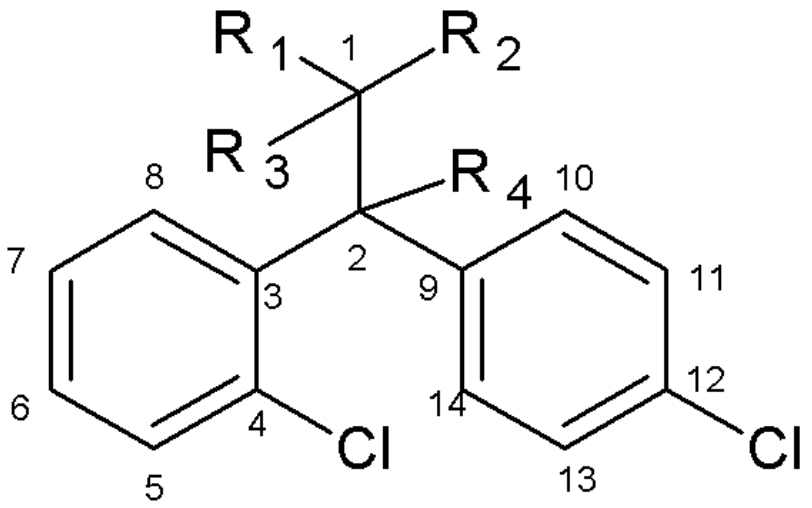
WENGERT, M., SANSEVERINO, A. M., MATTOS, M. C. S. Trichloroisocyanuric acid: an alternate green route for the transformation of alkenes into epoxides. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 13, p.700-3, 2002.

WOOD, M.A.; HAMMER, G.D. Adrenocortical stem and progenitor cells: unifying model of two proposed origins. **Mol Cell Endocrinol.** v. 10. p. 206-12, 2011.

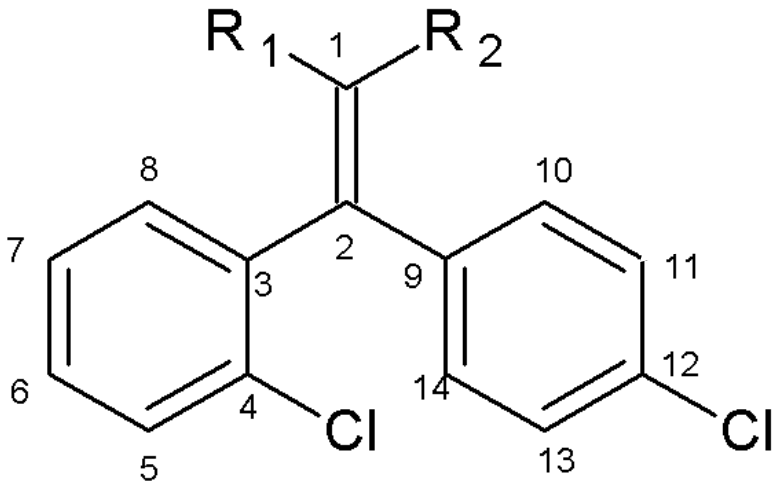
WOOTEN, M. C.; KING, D.K. Adrenal Cortical Carcinoma Epidemiology and Treatment with Mitotane and a Review of the Literature. **Cancer.** v. 72, n. 11, p. 3145-55, 1993.

YOU, G.; SAYLES, G.D.; KUPFERLE, M.J.; KIM, I.S.; BISHOP, P.L. Anaerobic DDT biotransformation: Enhancement by application of surfactenats and low oxidation reduction potential. **Chemosphere**. v.32, p. 2269-84, 1996.

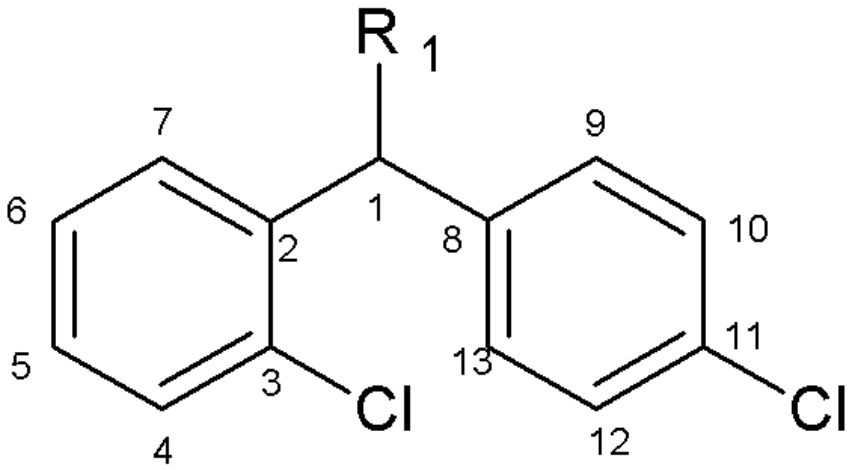
8 ANEXOS



R_1= Cl; R_2= -Cl; R_3= -Cl; R_4=H	o,p'-DDT
R_1= -Cl; R_2= -Cl; R_3= -H; R_4=H	o,p'-DDD (mitotano)
R_1= -Cl; R_2= -H; R_3= -H; R_4=H	o,p'-DDMS
R_1= =O; R_2= -OH; R_3= Ø; R_4=H	o,p'-DDA
R_1= -OH; R_2= -H; R_3= -H; R_4=H	o,p'-DDOH
R_1= -Cl; R_2= -Cl; R_3= -H; R_4= -OH	α- OH-o,p'- DDD
R_1= -H; R_2= =O; R_3= Ø; R_4= -OH	α- OH-o,p'- DDCHO



R_1= -Cl; R_2= -Cl	o,p'-DDE
R_1= -Cl; R_2= -H	o,p'-DDMU
R_1= -H; R_2= -H	o,p'-DDNU



R_1= -H	o,p'-DPM
R_1= =O	o,p'-DBP
R_1= -OH	o,p'-DBH

COORDENADAS ATÔMICAS E PARÂMETROS DE DESLOCAMENTO ATÔMICO ANISOTRÓPICO CORRESPONDENTE

	x/a	y/b	z/c	U(eq)
Cl1	0,77214(6)	0,38255(5)	0,01175(4)	0,06217(13)
Cl2	0,10734(6)	0,58648(5)	0,31682(5)	0,06334(13)
C6	0,51390(16)	0,19844(14)	0,17862(11)	0,0346(2)
C13	0,65594(16)	0,04056(14)	0,21569(11)	0,0335(2)
C15	0,86840(19)	0,80656(15)	0,37708(13)	0,0417(3)
C14	0,73344(18)	0,94781(15)	0,34448(12)	0,0379(2)
C7	0,57303(16)	0,28987(14)	0,23302(13)	0,0377(2)
C16	0,92668(18)	0,75761(15)	0,27971(14)	0,0414(3)
C2	0,31576(17)	0,19008(16)	0,21133(13)	0,0406(3)
C17	0,8485(2)	0,84428(17)	0,15211(14)	0,0479(3)
C18	0,7135(2)	0,98554(16)	0,12117(13)	0,0437(3)
C8	0,69189(19)	0,37655(15)	0,16361(16)	0,0458(3)
C9	0,7506(2)	0,4593(2)	0,2126(2)	0,0655(5)
C5	0,1532(2)	0,0332(2)	0,34243(16)	0,0560(4)
C12	0,5178(2)	0,28940(17)	0,35447(16)	0,0483(3)
C11	0,5776(3)	0,3703(2)	0,4049(2)	0,0630(4)
C4	0,1763(3)	0,0197(2)	0,21519(17)	0,0620(4)
C10	0,6927(3)	0,4557(2)	0,3333(2)	0,0729(5)
O1	0,30232(14)	0,08905(13)	0,34445(9)	0,0480(2)
O2	0,26110(15)	0,13305(14)	0,13264(10)	0,0536(3)

COMPRIMENTOS DE LIGAÇÃO (Å)

Cl1-C8	1,7388(16)	Cl2-C16	1,7402(13)
C6-C7	1,5146(17)	C6-C13	1,5189(16)
C6-C2	1,5278(17)	C6-H6	0,98
C13-C18	1,3885(18)	C13-C14	1,3926(16)
C15-C16	1,3794(19)	C15-C14	1,3843(19)
C15-H15	0,93	C14-H14	0,93
C7-C12	1,389(2)	C7-C8	1,3980(18)
C16-C17	1,380(2)	C2-O1	1,4067(16)
C2-O2	1,4131(17)	C2-H2	0,98
C17-C18	1,387(2)	C17-H17	0,93
C18-H18	0,93	C8-C9	1,390(2)
C9-C10	1,375(3)	C9-H9	0,93
C5-O1	1,4261(17)	C5-C4	1,491(2)
C5-H5A	0,97	C5-H5B	0,97
C12-C11	1,390(2)	C12-H12	0,93
C11-C10	1,373(3)	C11-H11	0,93
C4-O2	1,4181(19)	C4-H4A	0,97
C4-H4B	0,97	C10-H10	0,93

COMPRIMENTOS DE LIGAÇÃO (°)

C7-C6-C13	111,98(9)	C7-C6-C2	113,89(10)
C13-C6-C2	112,22(10)	C7-C6-H6	106,0
C13-C6-H6	106,0	C2-C6-H6	106,0
C18-C13-C14	118,17(12)	C18-C13-C6	120,66(11)
C14-C13-C6	121,16(11)	C16-C15-C14	119,10(12)
C16-C15-H15	120,5	C14-C15-H15	120,5
C15-C14-C13	121,18(12)	C15-C14-H14	119,4
C13-C14-H14	119,4	C12-C7-C8	116,50(12)
C12-C7-C6	122,60(11)	C8-C7-C6	120,88(12)
C15-C16-C17	121,23(12)	C15-C16-Cl2	119,47(10)
C17-C16-Cl2	119,26(11)	O1-C2-O2	106,64(11)
O1-C2-C6	112,75(10)	O2-C2-C6	108,83(11)
O1-C2-H2	109,5	O2-C2-H2	109,5
C6-C2-H2	109,5	C16-C17-C18	118,86(12)
C16-C17-H17	120,6	C18-C17-H17	120,6
C17-C18-C13	121,38(12)	C17-C18-H18	119,3
C13-C18-H18	119,3	C9-C8-C7	121,93(15)
C9-C8-Cl1	117,88(12)	C7-C8-Cl1	120,19(11)
C10-C9-C8	119,73(16)	C10-C9-H9	120,1
C8-C9-H9	120,1	O1-C5-C4	102,77(12)
O1-C5-H5A	111,2	C4-C5-H5A	111,2
O1-C5-H5B	111,2	C4-C5-H5B	111,2
H5A-C5-H5B	109,1	C7-C12-C11	121,95(15)
C7-C12-H12	119,0	C11-C12-H12	119,0
C10-C11-C12	119,98(18)	C10-C11-H11	120,0
C12-C11-H11	120,0	O2-C4-C5	104,37(13)
O2-C4-H4A	110,9	C5-C4-H4A	110,9
O2-C4-H4B	110,9	C5-C4-H4B	110,9
H4A-C4-H4B	108,9	C11-C10-C9	119,91(16)
C11-C10-H10	120,0	C9-C10-H10	120,0
C2-O1-C5	104,87(10)	C2-O2-C4	108,24(11)

ÂNGULOS DE TORSÃO (°)

C7-C6-C13-C18	-133,67(12)	C2-C6-C13-C18	96,78(13)
C7-C6-C13-C14	45,63(15)	C2-C6-C13-C14	-83,91(14)
C16-C15-C14-C13	0,08(19)	C18-C13-C14-C15	1,94(18)
C6-C13-C14-C15	-177,38(11)	C13-C6-C7-C12	-92,97(14)
C2-C6-C7-C12	35,70(17)	C13-C6-C7-C8	85,22(14)
C2-C6-C7-C8	-146,12(12)	C14-C15-C16-C17	-2,2(2)
C14-C15-C16-Cl2	175,65(10)	C7-C6-C2-O1	-74,72(14)
C13-C6-C2-O1	53,83(15)	C7-C6-C2-O2	167,18(10)
C13-C6-C2-O2	-64,28(13)	C15-C16-C17-C18	2,2(2)
Cl2-C16-C17-C18	-175,63(11)	C16-C17-C18-C13	-0,1(2)
C14-C13-C18-C17	-1,9(2)	C6-C13-C18-C17	177,41(12)
C12-C7-C8-C9	-0,6(2)	C6-C7-C8-C9	-178,89(13)
C12-C7-C8-Cl1	179,03(10)	C6-C7-C8-Cl1	0,74(17)
C7-C8-C9-C10	0,6(3)	Cl1-C8-C9-C10	-179,00(14)
C8-C7-C12-C11	-0,2(2)	C6-C7-C12-C11	178,07(13)
C7-C12-C11-C10	0,9(3)	O1-C5-C4-O2	-28,32(18)
C12-C11-C10-C9	-0,9(3)	C8-C9-C10-C11	0,1(3)
O2-C2-O1-C5	-31,23(15)	C6-C2-O1-C5	-150,62(12)
C4-C5-O1-C2	36,44(17)	O1-C2-O2-C4	12,74(16)
C6-C2-O2-C4	134,64(13)	C5-C4-O2-C2	9,89(18)

PARÂMETROS DE DESLOCAMENTO ATÔMICO ANISOTRÓPICO (Å2)

O fator exponencial do parâmetro de deslocamento atômico anisotrópico segue a fórmula: $-2\pi^2[h^2 a^{*2} U_{11} + ... + 2 h k a^* b^* U_{12}]$

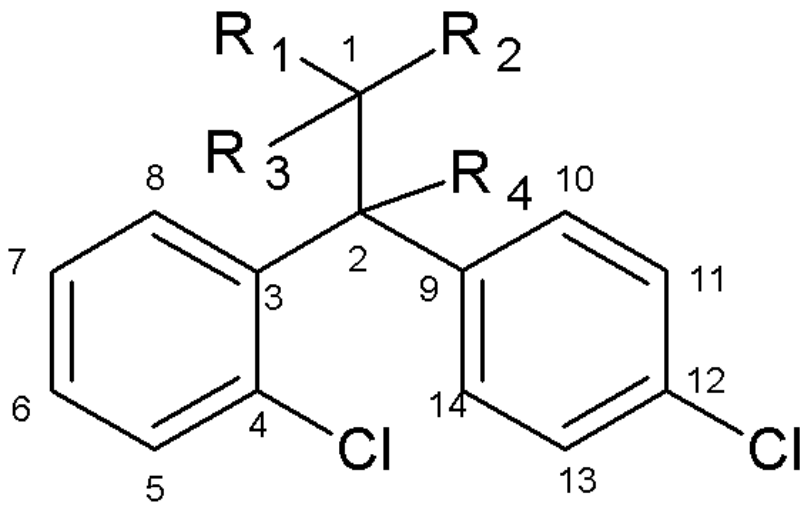
U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
0,0564(2)	0,0582(2)	0,0640(2)	-0,01678(18)	0,01797(18)	-0,02759(18)
0,0595(2)	0,0481(2)	0,0721(3)	-0,02775(19)	-0,00404(19)	0,00034(16)
0,0336(5)	0,0369(6)	0,0318(5)	-0,0123(4)	0,0005(4)	-0,0132(4)
0,0329(5)	0,0370(6)	0,0337(5)	-0,0151(4)	0,0016(4)	-0,0155(4)
0,0460(7)	0,0399(6)	0,0344(6)	-0,0109(5)	-0,0027(5)	-0,0138(5)
0,0439(6)	0,0405(6)	0,0315(5)	-0,0165(5)	0,0027(4)	-0,0151(5)
0,0319(5)	0,0330(5)	0,0463(6)	-0,0161(5)	-0,0025(5)	-0,0083(4)
0,0401(6)	0,0364(6)	0,0484(7)	-0,0188(5)	0,0004(5)	-0,0119(5)
0,0348(6)	0,0478(7)	0,0385(6)	-0,0157(5)	-0,0002(4)	-0,0163(5)
0,0540(8)	0,0516(8)	0,0451(7)	-0,0297(6)	-0,0003(6)	-0,0119(6)
0,0487(7)	0,0488(7)	0,0348(6)	-0,0205(5)	-0,0042(5)	-0,0119(6)
0,0371(6)	0,0369(6)	0,0601(8)	-0,0177(6)	0,0005(5)	-0,0121(5)
0,0532(9)	0,0539(9)	0,1019(14)	-0,0379(9)	0,0039(9)	-0,0269(7)
0,0488(8)	0,0723(10)	0,0500(8)	-0,0195(7)	0,0054(6)	-0,0347(7)
0,0481(7)	0,0489(7)	0,0559(8)	-0,0295(7)	0,0048(6)	-0,0162(6)
0,0651(10)	0,0654(10)	0,0756(11)	-0,0483(9)	-0,0005(8)	-0,0147(8)
0,0702(10)	0,0756(11)	0,0547(9)	-0,0260(8)	0,0033(7)	-0,0449(9)
0,0665(11)	0,0683(11)	0,1120(16)	-0,0592(12)	-0,0017(10)	-0,0252(9)
0,0450(5)	0,0713(7)	0,0346(4)	-0,0203(4)	0,0057(4)	-0,0322(5)
0,0545(6)	0,0796(7)	0,0372(5)	-0,0209(5)	-0,0004(4)	-0,0400(6)

PARÂMETROS DE DESLOCAMENTO ATÔMICO E COORDENADAS ATÔMICAS DO HIDROGÊNIO (Å2)

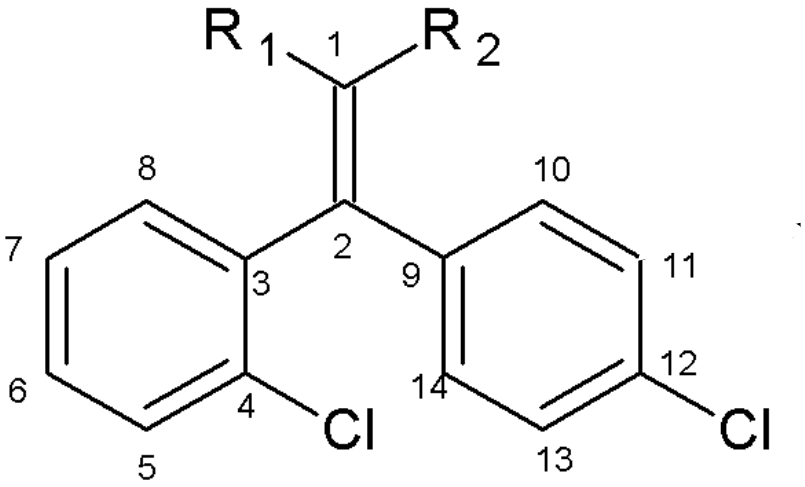
	x/a	**y/b**	**z/c**	**U(eq)**
H6	0,5131	0,2544	0,0818	0,041
H15	0,9191	-0,2545	0,4634	0,05
H14	0,6938	-0,0186	0,4098	0,046
H2	0,2303	0,2932	0,1918	0,049
H17	0,8857	-0,1914	0,0880	0,058
H18	0,6605	0,0446	0,0353	0,052
H9	0,8287	0,5168	0,1639	0,079
H5A	0,0330	0,1052	0,3428	0,067
H5B	0,1653	-0,0658	0,4177	0,067
H12	0,4384	0,2333	0,4035	0,058
H11	0,5397	0,3666	0,4872	0,076
H4A	0,2555	-0,0822	0,2289	0,074
H4B	0,0563	0,0397	0,1765	0,074
H10	0,7314	0,5110	0,3664	0,088

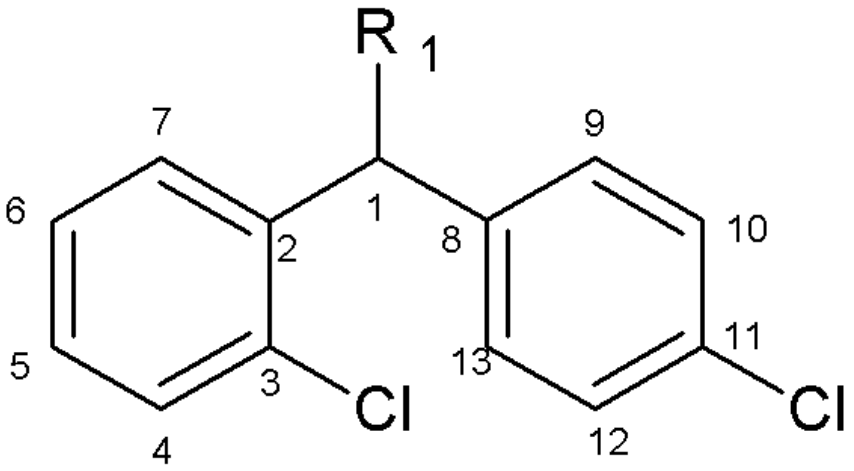
COLETA DE DADOS E REFINAMENTO ESTRUTURAL PARA

Theta range for data	
Index ranges	-10<=h<=10, -14<=k<=14, -16<=l<=16
Reflections collected	24953
Independent reflections	4556 [R(int) = 0.0223]
Coverage of independent	99,6%
Absorption correction	multi-scan
Max. and min.	0,8830 and 0,7832
Structure solution	direct methods
Structure solution	SHELXS-97 (Sheldrick, 2008)
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Refinement program	SHELXL-97 (Sheldrick, 2008)
Function minimized	$\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2$
Data / restraints /	4556 / 0 / 181
Goodness-of-fit on F^2	1,045
Final R indices	3654 data; I>2σ(I)
all data	R1 = 0,0402, wR2 = 0,1093
	R1 = 0,0509, wR2 = 0,1173
Weighting scheme	$w=1/[\sigma^2(F_o^2)+(0,0556P)^2+0,1712P]$ where $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$
Largest diff. peak and	0,370 and -0,285 $eÅ^{-3}$
R.M.S. deviation from	0,042 $eÅ^{-3}$



R_1= Cl; R_2= -Cl; R_3= -Cl; R_4=H	o,p'-DDT
R_1= -Cl; R_2= -Cl; R_3= -H; R_4=H	o,p'-DDD (mitotano)
R_1= -Cl; R_2= -H; R_3= -H; R_4=H	o,p'-DDMS
R_1= =O; R_2= -OH; R_3= Ø; R_4=H	o,p'-DDA
R_1= -OH; R_2= -H; R_3= -H; R_4=H	o,p'-DDOH
R_1= -Cl; R_2= -Cl; R_3= -H; R_4= -OH	α- OH-o,p'- DDD
R_1= -H; R_2= =O; R_3= Ø; R_4= -OH	α- OH-o,p'- DDCHO





R_1= -Cl; R_2= -Cl	o,p'-DDE	R_1= -H	o,p'-DPM
R_1= -Cl; R_2= -H	o,p'-DDMU	R_1= =O	o,p'-DBP
R_1= -H; R_2= -H	o,p'-DDNU	R_1= -OH	o,p'-DBH

PARÂMETROS DE DESLOCAMENTO ATÔMICO ANISOTRÓPICO (Å2)

O fator exponencial do parâmetro de deslocamento atômico anisotrópico segue a fórmula: $-2\pi^2[h^2 a^{*2} U_{11} + ... + 2 h k a^* b^* U_{12}]$

	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
Cl1	0,0564(2)	0,0582(2)	0,0640(2)	-0,01678(18)	0,01797(18)	-0,02759(18)
Cl2	0,0595(2)	0,0481(2)	0,0721(3)	-0,02775(19)	-0,00404(19)	0,00034(16)
C6	0,0336(5)	0,0369(6)	0,0318(5)	-0,0123(4)	0,0005(4)	-0,0132(4)
C13	0,0329(5)	0,0370(6)	0,0337(5)	-0,0151(4)	0,0016(4)	-0,0155(4)
C15	0,0460(7)	0,0399(6)	0,0344(6)	-0,0109(5)	-0,0027(5)	-0,0138(5)
C14	0,0439(6)	0,0405(6)	0,0315(5)	-0,0165(5)	0,0027(4)	-0,0151(5)
C7	0,0319(5)	0,0330(5)	0,0463(6)	-0,0161(5)	-0,0025(5)	-0,0083(4)
C16	0,0401(6)	0,0364(6)	0,0484(7)	-0,0188(5)	0,0004(5)	-0,0119(5)
C2	0,0348(6)	0,0478(7)	0,0385(6)	-0,0157(5)	-0,0002(4)	-0,0163(5)
C17	0,0540(8)	0,0516(8)	0,0451(7)	-0,0297(6)	-0,0003(6)	-0,0119(6)
C18	0,0487(7)	0,0488(7)	0,0348(6)	-0,0205(5)	-0,0042(5)	-0,0119(6)
C8	0,0371(6)	0,0369(6)	0,0601(8)	-0,0177(6)	0,0005(5)	-0,0121(5)
C9	0,0532(9)	0,0539(9)	0,1019(14)	-0,0379(9)	0,0039(9)	-0,0269(7)
C5	0,0488(8)	0,0723(10)	0,0500(8)	-0,0195(7)	0,0054(6)	-0,0347(7)
C12	0,0481(7)	0,0489(7)	0,0559(8)	-0,0295(7)	0,0048(6)	-0,0162(6)
C11	0,0651(10)	0,0654(10)	0,0756(11)	-0,0483(9)	-0,0005(8)	-0,0147(8)
C4	0,0702(10)	0,0756(11)	0,0547(9)	-0,0260(8)	0,0033(7)	-0,0449(9)
C10	0,0665(11)	0,0683(11)	0,1120(16)	-0,0592(12)	-0,0017(10)	-0,0252(9)
O1	0,0450(5)	0,0713(7)	0,0346(4)	-0,0203(4)	0,0057(4)	-0,0322(5)
O2	0,0545(6)	0,0796(7)	0,0372(5)	-0,0209(5)	-0,0004(4)	-0,0400(6)