

PRODUÇÃO “*IN VITRO*” VIA BIOCONVERSÃO DE PROVÁVEIS METABÓLITOS HUMANOS DO LASSBio 873, UM POTENCIAL ANALGÉSICO E HIPNÓTICO NÃO BENZODIAZEPÍNICO

CARNEIRO, Emmanuel de Oliveira¹; **DE OLIVEIRA**, Valéria².

Palavras-chave: Metabolismo, Bioconversão, LASSBio 873.

1. INTRODUÇÃO

Novas entidades químicas são continuamente sintetizadas e são consideradas novos candidatos a fármacos quando apresentam uma potencial atividade terapêutica. No entanto, a aprovação para o uso em humanos como fármacos depende de extensivos estudos que comprovem sua eficácia e segurança. A elucidação do metabolismo destes compostos constitui um importante e necessário passo nesta avaliação, uma vez que o espectro de atividades dos metabólitos formados pode ser bastante amplo. Microrganismos simples, como actinomicetos ou fungos filamentosos, podem mimetizar a maioria das reações de Fase I e algumas de Fase II observadas em mamíferos, representando uma alternativa para a produção *in vitro* em alta escala de certos metabólitos. (AZERAD, 1999). Estes métodos apresentam as vantagens da seletividade das reações enzimáticas, da grande quantidade de metabólitos geralmente produzida e da possibilidade de obtenção de novas moléculas com diferentes atividades biológicas. O LASSBio 873 é um novo candidato a fármaco originalmente desenhado para ser um modulador seletivo dos receptores GABA. Os ensaios biológicos do LASSBio 873 foram realizados *in vivo* e demonstraram sua habilidade em promover sedação e seu potente efeito antinociceptivo central. No entanto, quando se modificava a via de administração de i.p. para i.v., os animais passavam a apresentar convulsões. Isto poderia sugerir um metabolismo e ação diferenciada dos metabólitos formados na biofase (MENEGATTI *et al*, 2006). Esta foi então uma boa oportunidade de produzir os prováveis metabólitos humanos do LASSBio 873 por bioconversão para elucidação estrutural e para estudos farmacológicos e toxicológicos que podem contribuir para a avaliação de sua ação convulsivante. Os metabólitos formados poderão servir como substâncias de referência, e ainda podem apresentar uma melhor solubilidade ou menor toxicidade que o composto de partida, possibilitando uma otimização deste candidato a fármaco.

2. METODOLOGIA

2.1 – Análise do substrato LASSBio 873 por CLAE

As condições cromatográficas utilizadas foram: Cromatógrafo Gilson, injetor Rheodyne com loop fixo de 20 µl, coluna Lichrospher 100 RP 18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5µm), fase móvel metanol/tampão 65:35 em sistema isocrático, fluxo de 0,5 ml/min e detecção a 260 nm.

2.2 – Triagem (*Screening*)

Foi realizada uma triagem com cinco diferentes cepas de fungos filamentosos para avaliar a capacidade destas de metabolizar o substrato. As cepas utilizadas foram *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Mortierella isabelina* NRRL 1757, *Mucor plumbeus* ATCC 4740 e *Rhizopus arrhizus*

ATCC 11145. Para os testes de *screening*, sub-culturas de cada uma das cepas foram obtidas com repique em meio de cultura sólido ágar batata estéril e incubação por 7 dias em câmara germinativa B.O.D. à 25°C. Os esporos formados foram semeados em um meio de cultura líquido PDSM (Potato Dextrose Soy Medium). À biomassa obtida em 60-65 horas de incubação no Incubador Rotativo Tecnal à 27°C e 200 rpm foi adicionada 10 mg do substrato, dissolvido em 1 mL de etanol. O monitoramento das cinéticas de bioconversão foi realizado com tomadas de alíquotas do sobrenadante em 24, 48, 72 e 96 horas após a adição do substrato e análise por CLAE. As condições cromatográficas usadas foram as mesmas já citadas anteriormente.

2.3 – Incubação de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e produção dos metabólitos em escala semi-preparativa

A incubação ocorreu nas mesmas condições descritas na triagem, exceto pelo fato de que foram usados 10 Erlenmeyers, todos com a cepa escolhida, e cada um com uma concentração final de 0,5 g LASSBio 873/L. Com a interrupção da incubação em 96 horas após a adição do substrato, o micélio foi separado do meio por filtração à vácuo. O micélio foi então extraído com acetona, obtendo-se assim a fração cetônica. O sobrenadante de incubação foi supersaturado com cloreto de sódio e foi novamente filtrado sob vácuo numa camada de celite. Após, procedeu-se a extração da fração aquosa resultante com acetato de etila, cuja água residual foi eliminada com adição de sulfato de magnésio anidro. O acetato de etila foi rotaevaporado, levando a obtenção da fração orgânica.

2.4 – Purificação e Caracterização dos metabólitos produzidos

A purificação dos metabólitos presentes nas frações obtidas foi efetuada separadamente por flash cromatografia em coluna de vidro (26,5 x 2 cm), utilizando sílica gel como fase estacionária e diclorometano-metanol 95:5 como eluente. Esta etapa foi monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), com placas de sílica gel ALUGRAM® Macherey-Nagel, diclorometano-metanol 95:5 como fase móvel e a luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 como reveladores. A caracterização de um dos compostos obtidos foi realizada por Espectrometria de Massas, com análise de varredura (scan) realizada em Espectrômetro de Massas Varian Quadrupolo com ESI source (fonte elétron-spray) no modo positivo e argônio como gás de colisão. Os metabólitos purificados, cuja quantidade foi suficiente, foram enviados para análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) para elucidação de suas estruturas químicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Análise do substrato LASSBio 873 por CLAE

A análise do substrato por CLAE resultou em cromatogramas nos quais foi observado um único pico no tempo de retenção 4,97 minutos, identificado como sendo o LASSBio 873.

3.2 – Triagem (*Screening*)

Os cromatogramas obtidos demonstraram a formação de metabólitos mais polares que o LASSBio 873 por todas as cepas testadas, uma vez que apareceram em tempos de retenção menores que este no sistema cromatográfico com fase reversa. A resolução cromatográfica mostrou-se satisfatória para o objetivo proposto. As análises mostraram que, dentre os metabólitos formados, os metabólitos II e IV foram produzidos por todos os fungos em quantidades moderadas. Os demais metabólitos foram detectados em pequenas quantidades, na maioria das vezes. *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi selecionada para incubação em escala

semi-preparativa. Este fungo formou predominantemente os metabólitos I e IV de 48-96 horas. A possibilidade de extração destes derivados com bons rendimentos motivou sua escolha. Além disso, membros do gênero *Cunninghamella* são considerados na literatura como portadores de alta capacidade metabólica e são muito utilizados em experimentos de biotransformação (AZERAD, 1999).

3.3 – Identificação e Caracterização dos metabólitos produzidos

Foram detectados por CLAE três diferentes metabólitos na fração orgânica e um na fração cetônica. O espectro de massas deste último sugere a formação do derivado ácido carboxílico do LASSBio 873 pelo metabolismo oxidativo do grupamento 1-metil. Considerando M^+ como a massa do LASSBio 873 igual a 399,4, infere-se que o íon molecular m/z 429 ($M^+ + \text{COOH} - \text{CH}_3$).

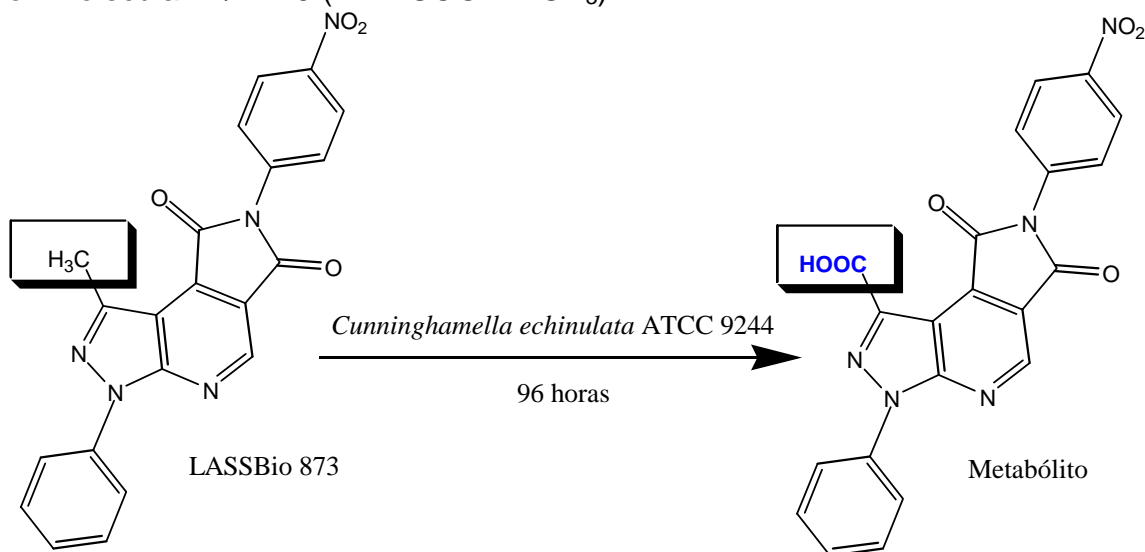


Fig. 1: Formação do metabólito carboxilado do LASSBio 873 por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que todas as cepas de fungos filamentosos testadas foram capazes de produzir metabólitos mais polares a partir do substrato LASSBio 873 e que *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 produziu pelo menos 4 metabólitos na incubação em escala semi-preparativa, distribuídos nas frações orgânica e cetônica, sendo proposta a estrutura química de um deles.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZERAD, R. Microbial Models for Drug Metabolism. In: SCHEPER, Th. *Advances in Biochemical Engineering*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. p. 169-218.
MENEGATTI, R.; SILVA, G. M.S.; ZAPATA-SUDO, G.; RAIMUNDO, J.M.; SUDO, R.T.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of new neuroactive pyrazolo[3, 4-b]pyridine derivatives with in vivo hypnotic and analgesic profile. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 3, p. 632-640, 2006.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹ Bolsista de iniciação científica. Faculdade de Farmácia - LaBioCon - Laboratório de Bioconversão, emmanuel.carneiro@gmail.com

² Orientador/ Faculdade de Farmácia/UFG, valeria@farmacia.ufg.br