

BIOCONVERSÃO DO DIAZEPAM POR BACTÉRIAS E FUNGOS FILAMENTOSOS.

DE PAULA, Núbia Custódio¹; **DE OLIVEIRA**, Valéria².

Palavras-chave: Biotecnologia, bioconversão, diazepam.

1. INTRODUÇÃO

A evolução do processo de descoberta de fármacos tem recebido a contribuição de inúmeras ferramentas como por exemplo a química combinatória e os métodos robotizados para a avaliação de ligantes a alvos macromoleculares. A modificação estrutural de fármacos conhecidos e a abordagem fisiológica são modernos processos de planejamento estrutural de novos fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2005). Os processos biotecnológicos fundamentados na utilização do arsenal enzimático microbiano apresentam grande aplicação na indústria farmacêutica. A biotransformação de substratos orgânicos pela utilização de enzimas microbianas apresenta grande potencial comercial devido a sua estabilidade, enantioseletividade e especificidade ao substrato (CARDENAS *et al.*, 2001). Diferentes técnicas de biocatálise podem ser utilizadas, através do uso de enzimas ou microrganismos inteiros livres ou imobilizadas. Modelos microbianos podem representar uma alternativa ao uso de animais nos estudos de metabolismo em mamíferos. Apresentando as vantagens do baixo custo, redução da utilização de animais de experimentação e maior quantidade de metabólitos produzidos (AZERAD, 1999;). Os benzodiazepínicos desde sua descoberta tornaram-se os fármacos mais prescritos para o tratamento da insônia, ansiedade, convulsão e como relaxantes musculares. Estes agentes ansiolíticos apresentam o núcleo 5-fenil-1,4-benzodiazepina-2-ona. O diazepam possui três principais metabólitos: N-desmetildiazepam, oxazepam e temazepam, que são conjugados e excretados principalmente como um glicuronídeo na urina. Nos ensaios utilizados para avaliação da eficácia terapêutica de fármacos tanto na etapa de equivalência farmacêutica quanto de bioequivalência, a determinação de substâncias relacionadas e metabólitos são solicitadas permitindo a detecção de substâncias tóxicas, produtos de síntese indesejáveis e impurezas possivelmente presentes na formulação. A identificação e quantificação destes fármacos e seus metabólitos apresenta inúmeras aplicações clínicas, toxicológicas e forenses. Dados da literatura demonstram a possibilidade de obtenção de N-desmetilação, hidroxilação em C-3 e hidroxilação aromática em C-4' promovida por fungos filamentosos utilizando o diazepam como substrato (GRIFFITS; BEST; JEZEQUEL, 1991). A produção destes compostos através de métodos biotecnológicos, como a biossíntese microbiana é uma alternativa promissora futuras aplicações.

2. METODOLOGIA

2.1 – Triagem (*Screening*)

Realizou-se triagem para escolha das cepas capazes de metabolizar o diazepam com a produção de maior variedade e/ou quantidade de produtos. *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, *Streptomyces rimosus* NRRL 2234 foram as escolhidas. Realizou-se repiques de culturas estocadas utilizando solução de glicerol a 25% para obtenção de sub-culturas destes microrganismos em ágar batata inclinado e crescimento à 25

°C por 7 dias em câmara climática BOD Fanem 345 Micronal. Após este período erlenmeyers de 250 mL, boca larga, contendo 100mL de meio líquido PDSM (Potato Dextrose Soy Médium) cada, foram inoculadas com 2 gotas da suspensão de esporos e mantidos sob agitação 200 rpm a 27 ± 2 °C por 7 dias em shaker Tecnal modelo TE-420. Foi realizado um controle negativo com ausência de microrganismo e adição do substrato nas mesmas condições. Após 65 horas foram adicionadas à biomassa 50mg do substrato diazepam dissolvido em volume mínimo de etanol a 96 %, mantendo-se a agitação de 200 rpm e 27°C por 168 horas. Alíquotas do meio reacional foram retiradas de forma asséptica a cada 24 horas (24, 48, 72, 96 e 168 horas) utilizando-se pipetas de Pasteur e transferidas para erpendorfs. As amostras coletadas foram centrifugadas em microcentrifuga Fanem modelo 243, o sobrenadante congelado para posterior análise por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). O monitoramento da cinética de bioconversão foi realizado em todas as alíquotas empregando as condições cromatográficas descritas em 2.2.

2.2 – Monitoramento por CLAE das bioconversões

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 (solvente A) e mistura de metanol/tampão (fosfato de potássio monobásico 0,02M) 65:35 (solvente B), fluxo 0,8mL/min, detecção a 230nm, como especificado abaixo:

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0 a 6	0 a 100	100 a 0
6 a 12	100	0
12 a 15	100 a 0	0 a 100

2.3 – Incubação de *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 e produção dos metabólitos em escala semi-preparativa

A incubação ocorreu nas mesmas condições descritas na triagem, pela adição de 2 gotas do inóculo da cepa de *Aspergillus ochraceus* utilizados 10 Erlenmeyers, com uma concentração final de 0,5 g/L de diazepam. Com a interrupção da incubação em 96 horas após a adição do substrato, o micélio foi separado do meio por filtração a 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. Realizou-se a extração da fração aquosa resultante com acetato de etila, dessecado pela adição de sulfato de magnésio anidro. O acetato de etila foi rotaevaporado, obtendo-se a fração orgânica.

2.4 – Purificação dos metabólitos produzidos na escala semi-preparativa

A purificação dos metabólitos presentes nas frações obtidas foi efetuada separadamente por flash cromatografia em coluna de vidro (28 x 2 cm), utilizando sílica gel como fase estacionária e eluente acetato de etila/hexano 50:50. Esta etapa foi monitorada por CCD (cromatografia em camada delgada), com placas de sílica gel ALUGRAM® Macherey-Nagel, acetato de etila/hexano 50:50 como fase móvel e cristais de iodo e luz ultravioleta em 254 e 365nm como reveladores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Triagem (*Screening*)

Todas as cepas testadas foram capazes de metabolizar o diazepam. Foram detectados por CLAE 17 diferentes prováveis metabólitos na análise das amostras do *screening*, sendo que 13 apresentaram-se mais polares que o substrato. Não foi observada a metabolização completa do substrato por nenhuma das cepas testadas. O cromatograma do sobrenadante de incubação de bioconversão do diazepam realizada pelo *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 em 96 horas e a cinética reacional estão representados nas figuras 01 e 02.

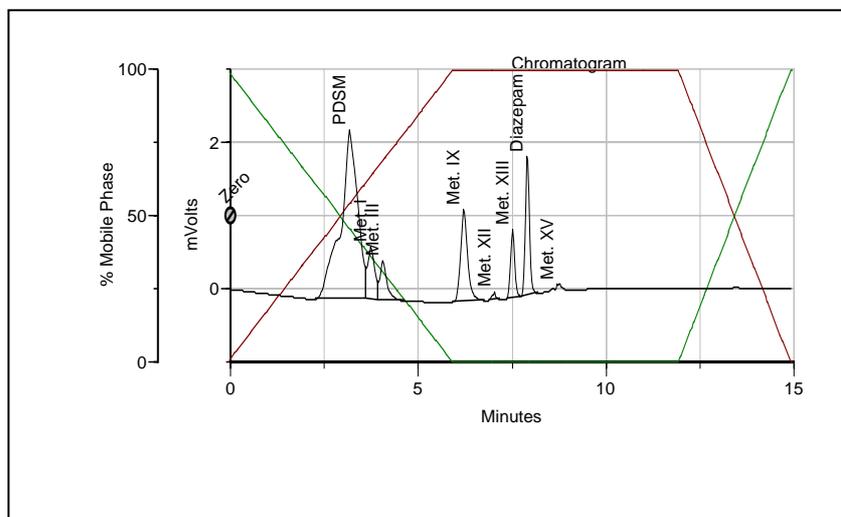


Figura 01: Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do diazepam com *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 no tempo de 96 horas. Coluna Lichrospher 100 RP 18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5µm), fase móvel metanol (solvente A) e mistura de metanol/tampão (fosfato de potássio monobásico 0,02M) 65:35 (solvente B), fluxo 0,8mL/min, detecção a 230nm.

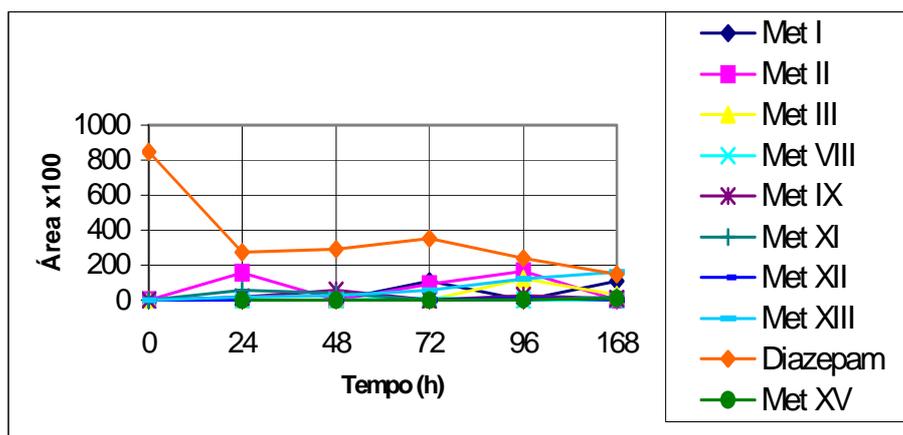


Figura 02: Cinética de bioconversão do sobrenadante de incubação do diazepam com *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 no período de 96 horas.

3.2 – Monitoramento dos metabólitos produzidos durante triagem

Alguns dos metabólitos foram produzidos simultaneamente por mais de uma das cepas testadas. Em 96 horas de incubação pelo *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009,

foram produzidos o metabólito XIII majoritariamente e o metabólito IX exclusivamente se comparado às outras cepas. Os metabólitos XII e I tiveram uma maior produção com incubação de *Cunninghamella elegans* e *Streptomyces rimosus* respectivamente (figura 03).

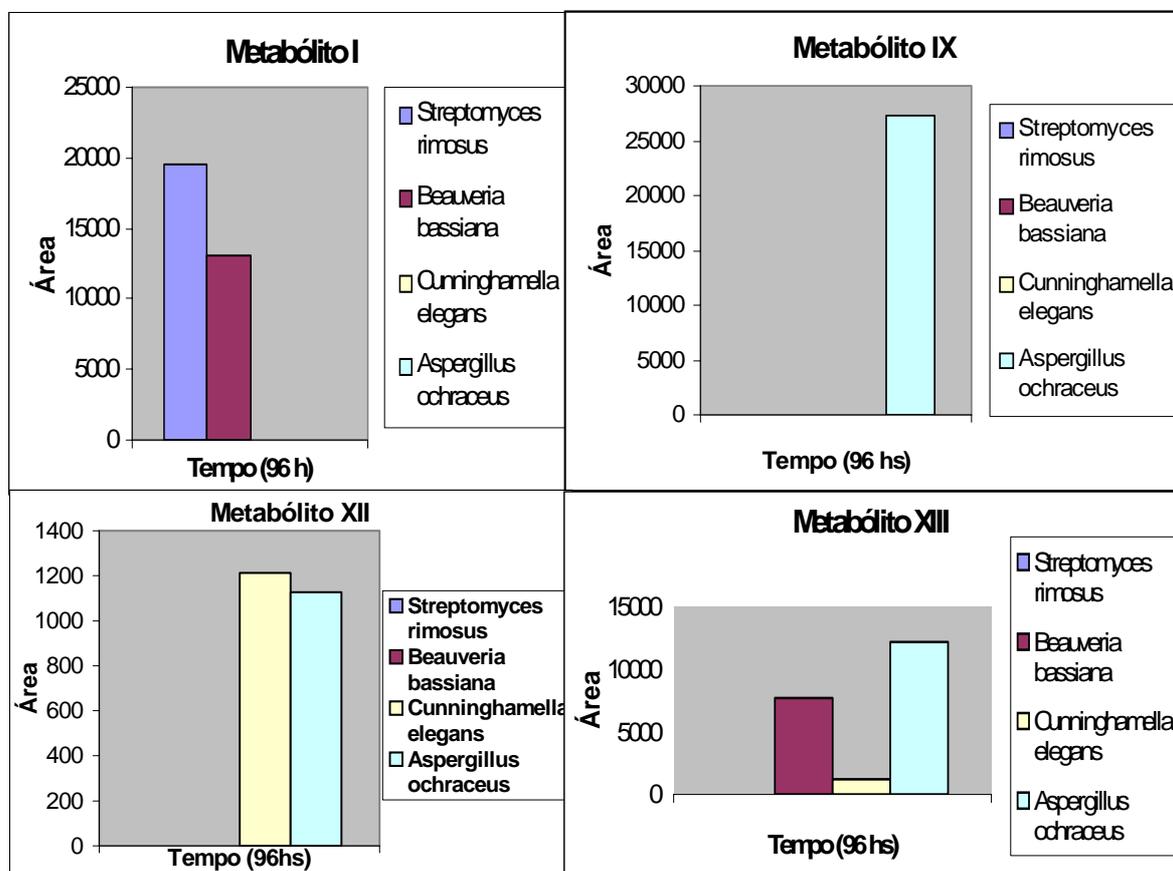


Figura 3: Quantidade de metabólitos (área do cromatograma referente ao pico obtido por CLAE) formados em 96 horas de incubação obtidos da análise do sobrenadante de incubação.

3.3 – Escala semi-preparativa com *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009

Análise por CLAE do sobrenadante de incubação do *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 mostrou a presença de 9 metabólitos, sendo que 7 foram majoritários em comparação com os metabólitos formados pelas demais cepas.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que todos os microrganismos testados até o momento foram capazes de produzir metabólitos mais polares a partir do substrato diazepam. *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 apresenta-se como a cepa mais promissora para futuros experimentos em escala semi-preparativa

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. (Biotransformation)*, ed. K. Faber, T. Scheper, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, v.63, p.169-218, 1999.

BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: Proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). *Quim. Nova*, Rio de Janeiro, v.28, S56-S63, 2005.

CARDENAS, F. et al. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis, B: Enzymatic*. v.14, p.111-123, 2001.

GRIFFITHS, D.A.; BEST, D.J.; JEZEQUEL, S.G. The screening of selected microorganisms for use as models of mammalian drug metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer-Verlag, v.35 p.373-381, 1991.

FONTE DE FINANCIAMENTO –

¹ Mestranda em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, nubiaccp@brturbo.com.br

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