

Biotransformação “in vitro” de análogos sintéticos do 4-nerolidilcatecol (4NRC)

Kelly Carolina Frauzino Araújo¹, Valéria de Oliveira²

Faculdade de Farmácia - UFG, CEP: 74605-220, Brasil

kelly_frauzino@hotmail.com; valeria@farmacia.ufg.br

Palavras-chave: Biotransformação, 4-nerolidilcatecol, *Cunninghamella echinulata*

revisado pelo orientador
Identificação dos autores:
¹Orientanda
²Orientadora

Introdução

Reações de biotransformação ou bioconversão referem-se ao metabolismo de substâncias estranhas ou xenobióticos, realizadas por seres vivos. O metabolismo dos mamíferos ocorre no fígado e pode ser dividido em duas fases: Fase 1, que engloba reações de oxidação, redução e hidrólise; e Fase 2, que envolve reações de conjugação do fármaco com moléculas endógenas. Normalmente, as duas vias resultam na formação de metabólitos que são mais hidrossolúveis e desse modo serão mais facilmente excretados. (ABOURASHED, 1999, AZERAD, 1999)

O uso de fungos filamentosos tais como *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 como modelos “in vitro” para a realização de reações de oxidação, redução e glicosilação, entre outras, tem se mostrado útil na bioconversão de uma grande variedade de compostos orgânicos. (ALEXANDRE, 2004, CIRILO, 2005)

O 4-nerolidilcatecol (4-NRC) (Fig 1) é o metabólito secundário majoritário extraído de raízes e folhas da *Pothomorphe peltata* e *Pothomorphe umbellata* tradicionalmente usada para tratamento de desordens hepáticas no Brasil. Estudos farmacológicos demonstraram intensa atividade antioxidante, antimalárica, anti-HIV e antiinflamatória. (REZENDE, 2004; ROPKE, 2005) Tal composto, contudo, é extremamente lábil em condições laboratoriais e soluções alcalinas devido à presença de hidroxilas reativas no anel catecol. (PINTO, 2009)

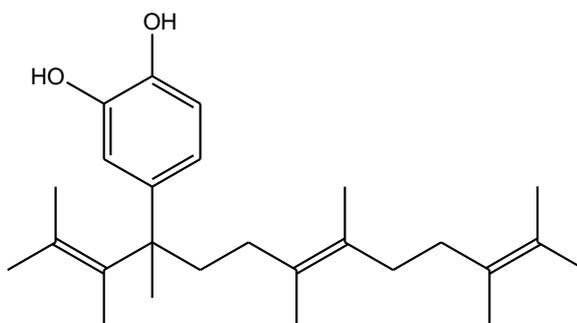


Figura 1: 4-nerolidilcatecol

O planejamento e a síntese de novos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios a partir do nerolidilcatecol para foi descrita em Martins (2009) , obtendo-se análogos mais estáveis e mais ativos (Figura 2 e 3).

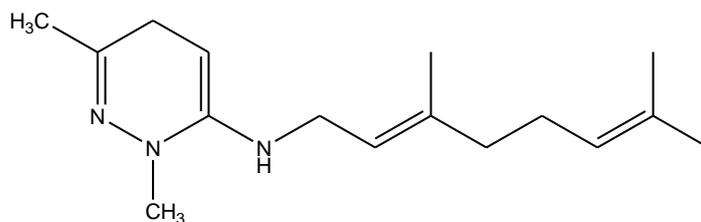


Figura 2: LQFM 002

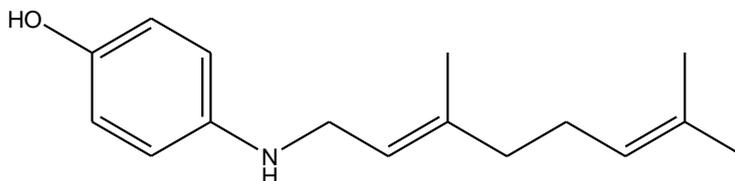


Figura 3: LQFM 015

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de novos derivados funcionalizados de análogos sintéticos do (4-NRC) sintetizados no laboratório de Química Farmacêutica Medicinal, denominados LQFM 002 e LQFM 015 e obtenção dos metabólitos desses análogos.

Metodologia

As cepas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foram repicadas em tubos vedados contendo meio de cultura sólido ágar batata inclinado e mantidos por 7 dias a 27°C em câmara germinativa BOD para crescimento da cultura. Em seguida foi adicionada ao tubo uma solução de glicerol a 25%, a suspensão de esporos resultante foi inoculada em erlemmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura líquido PDSM (Potato dextrose soy médium- 5 g de peptona bacteriológica, 20 g de dextrose, 5 g de lecitina de soja, 5 g de KH_2PO_4 , 5 g de NaCl e 3 g de extrato de levedura para 1000 mL de água destilada) preparado no mesmo dia e esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm.

Os Erlemmeyers contendo o meio PDSM e as cepas foram mantidos em incubadora rotativa Tecnal a 27°C e 200 rpm por 65 horas. Em seguida os análogos do 4-NRC (LQFM 002 e LQFM 015) foram adicionados às culturas solubilizados em dimetilformamida obtendo-se uma concentração final de 0,25 g/L e retornaram os erlmeyers à incubadora onde foram mantidos por 96 horas nas mesmas condições.

Para monitoramento da cinética da biotransformação alíquotas foram retiradas de um erlemmeyer com o meio PDSM, substrato e o fungo e de outro controle sem o fungo a cada 24 horas e centrifugadas em Centrifuga FANEM modelo 243, o sobrenadante foi analisado em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) - placas de sílica gel ALUGRAM® SIL G/UV Macherey-Nagel.

Após as 96 horas de incubação a extração foi realizada através de filtração e separação das frações aquosa, acetato de etila e cetônica utilizando solventes. Estas foram rotavaporadas e analisadas em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), com o intuito de observar a formação de possíveis metabólitos.

Resultados e discussão

Foi utilizada a espécie *Cunninghamella* no trabalho devido ao fato de já haver sido utilizada anteriormente para biotransformar o 4-NRC, além de esta cepa ser capaz de metabolizar uma grande quantidade de substratos usando mecanismos que envolvem tanto as reações de fase I (oxidativas) quanto as de fase II (conjugativas) e realizar biotransformações regio- e estereoseletivas, semelhante às que ocorrem no sistema enzimático de mamíferos (ASHA,2009).

A análise dos sobrenadantes de incubação através de CCD indicou a formação de 2 possíveis metabólitos para o LQFM 015 e o mesmo para o LQFM 002. Após a extração dos micélios e da fração líquida uma nova cromatografia foi realizada, indicando a presença de outros possíveis metabólitos cujo fator de retenção (Rf) é apresentado na Tabela 1 e 2.

Tabela 1: Rf calculado para possíveis metabólitos do LQFM 002, Fase móvel: diclorometano: metanol (80:20)

LQFM 002	Met. I	Met. II*	Met. III	Met. IV
0,92	0,83	0,71	0,53	0,28

*Presente somente na fração acetato de etila

Tabela 2: Rf calculado para possíveis metabólitos do LQFM 015, Fase móvel: diclorometano: metanol (80:20)

LQFM 015	Met. I*	Met. II	Met. III**	Met. IV**
0,95	0,85	0,64	0,40	0,18

*Presente somente na fração acetato de etila

** Presente somente na fração acetona.

As frações acetato de etila e acetona de cada molécula reunidas e rotoevaporadas resultaram em 766 mg de extrato bruto para o LQFM 002 e 319 mg para o LQFM 015.

A purificação dos metabólitos não foi possível através de coluna cromatográfica, posteriormente pode-se utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência em coluna preparativa para a tentativa de purificação e posterior caracterização dos metabólitos.

Conclusão

A cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi capaz de bioconverter os análogos LQFM 002 E LQFM 015. A cromatografia em camada delgada das frações acetato de etila e acetona provenientes da extração indicaram a presença de quatro possíveis metabólitos para cada molécula. A cromatografia em coluna não foi um método eficiente para a purificação dos metabólitos, sendo necessária a utilização de um método alternativo, como a cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna preparativa ou alteração das condições cromatográficas.

Referências

- 1- ABOURASHED, E. A., Clark, A. M., Hufford, C. D., Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotics: An Updated Review, *Current Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 359-374, 1999.
- 2- AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In *Adv. Biochem. Engin. / Biotechnol. (Biotransformations)*, ed. K. Faber, T. Scheper, pp. 169-218. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 1999
- 3- ALEXANDRE, V., Ladril, S., Maurs, M., Azerad, R. Microbial models for drug metabolism. Part 5 Microbial preparation of human hydroxylated metabolites of ibesartan. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, v. 29, p. 173-179, 2004.
- 4- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. *Biotechnology Advances*, v 27, p. 16-29, 2009
- 5- CIRILO, Hérica Núbia Cardoso; NETTO, Heleno José Costa Bezerra; FRAGA, Carlos Alberto Manssour; BARREIRO, Eliezer Jesus; LIÃO, Luciano Morais; DE OLIVEIRA, Valéria. Bioconversão de 2-(1,3-benzodioxol-5-iloxi)-*n*- [(1e,z)-fenilmetileno]-acetoidrazona (Lassbio 939), um potencial agente antiinflamatório sintetizado a partir do safrol. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento*, v. 2, p. 48-51, 2005.
- 6- MARTINS, F.I. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios desenhados a partir do nerolidilcatecol. Goiânia, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás
- 7- PINTO, A.C.S.; SILVA, L.F.R.; CAVALCANTI, B.C.; et al. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*; v. 44; p. 2731–2735; 2009.
- 8- REZENDE, K.R.; BARROS, S. B. M.; Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) in rat plasma samples by HPLC-UV. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*; v. 40, 2004.

9-ROPKE CD, SAWADA TC, DA SILVA VV, MICHALANY NS, de MORAES BARROS SB. Photoprotective effect of Pothomorphe umbellata root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. Clin Exp Dermatol. v. 30, n.3, p.272-6, 2005