

PRODUÇÃO POR BIOCONVERSÃO DE DERIVADOS FUNCIONALIZADOS DO CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACO ANTIASMÁTICO LASSBio-596

Juliana Camila Lopes CAVAION, Valéria de OLIVEIRA

Laboratório de Bioconversão, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, julianacavaion@yahoo.com.br

Palavras-chave: metabolismo, fungos filamentosos, S-oxidação

Introdução

Em um processo de desenvolvimento de um novo fármaco o estudo do metabolismo é uma ferramenta interessante para avaliar o perfil farmacológico, farmacocinético e de segurança dos metabólitos gerados (AZERAD, 1999; FURA et.al, 2004; JAYAMANNE et al., 2010).

A utilização de microrganismos como modelo de metabolização foi introduzido em meados da década de 1970 (SMITH, ROSAZZA, 1974; ASHA, VIDYAVATHI, 2009) e seu uso baseia-se na similaridade dos sistemas complexos para destoxificação das substâncias químicas estranhas. Um grande número de estudos tem demonstrado que os fungos filamentosos, particularmente *Cunninghamella echinulata*, possuem um sistema enzimático citocromo P450 análogo ao dos mamíferos (MOODY et al., 2002; ZHANG et al., 2006).

O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro constitui um laboratório de pesquisa multidisciplinar na área da Química Medicinal e tem como objetivo principal contribuir para a descoberta de novos fármacos. Em pesquisas do LASSBio na busca por novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos, com a aplicação da abordagem fisiológica como estratégia de planejamento racional, permitiu-se identificar a citocina fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e as enzimas fosfodiesterases (PDEs) 4 e 5 como alvos promissores para o desenho de novos protótipos antiasmáticos simbióticos. Os protótipos selecionados foram a talidomida (como protótipo modulador das ações do TNF α), o sildenafil (como inibidor seletivo de PDE-5) e a arilsulfonamida (como inibidor seletivo de PDE-4). O LASSBio-596 foi

obtido através da hibridação molecular da talidomida, arilsulfonamida e sildenafil (LIMA, 2001; BARREIRO *et al.*, 2002; LIMA, DE LIMA 2009). (Figura 1)

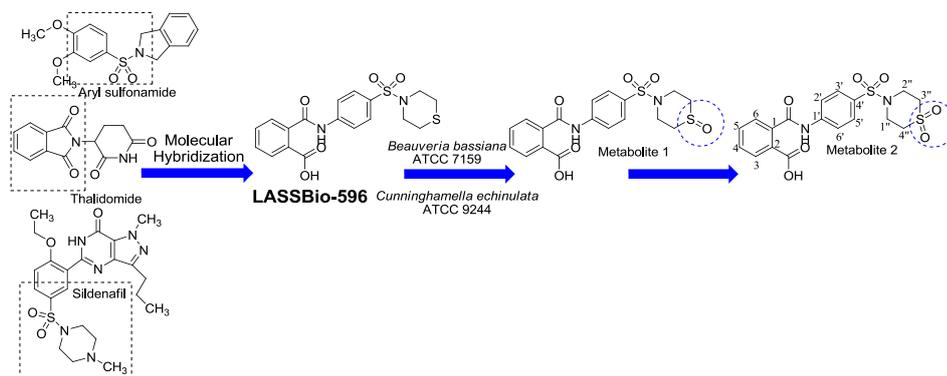


Figura 1 – Concepção estrutural do LASSBio-596 e metabólitos

Os métodos computacionais para prever o metabolismo são úteis ferramentas na descoberta de fármacos. As técnicas *in silico* podem prever o sítio mais metabolicamente lábil na estrutura do candidato a fármaco (SUN, SCOTT 2010).

Material e Métodos

A substância foi sintetizada no LASSBio (Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas). O substrato é o (ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil] benzóico) denominado LASSBio-596 (C₁₈H₁₈N₂O₅S₂).

Biotransformação, extração e purificação

O estudo do metabolismo *in vitro* do LASSBio-596 foi realizado utilizando os fungos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159. Os fungos foram obtidos da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). As cepas foram mantidas no ágar batata e armazenadas a 4 °C. O meio líquido PDSM (Potato Dextrose Sucrose Medium) contém (por litro) glicose (20 g), peptona (5 g), extrato de levedura (3 g), lecitina de soja (5 g), K₂HPO₄ (5 g) e cloreto de sódio (5 g). Esterilizou-se na autoclave a 121 °C e 1,5 atm por 15 min. Os erlenmeyers contendo 100 mL do meio líquido PDSM foram inoculados com 0,5 mL de uma suspensão de esporos em glicerol a 25 % de *C. echinulata* ATCC 9244 e *B. bassiana* ATCC 7159 obtidas de sete dias de crescimento no ágar batata. Os erlenmeyers foram orbitalmente agitados (200 rpm) a 27 °C ± 2 °C por 65 h.

LASSBio-596 foi então adicionado como uma solução em *N,N*-dimetilformamida e solução em metanol em uma concentração final de 25 mg/100 mL. O frasco de controle consiste de um meio estéril com o LASSBio-596. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 27 °C ± 2 °C por 96 h. Alíquotas (1,0 mL) do sobrenadante foram coletadas em 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Ao final do processo, o meio sob incubação foi extraído com acetato de etila para obtenção da fração que foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa utilizando metanol como eluente.

Resultados e Discussão

As poses de ligação do LASSBio-596 no sítio ativo do CYP2C9 foram analisadas utilizando o software MOE-Dock, que permite a flexibilidade do receptor. A energia de ligação da melhor pose obtida do docking foi -5.72 kcal/mol. A figura 2 ilustra a pose mais energeticamente favorecida do docking para o LASSBio-596. O átomo de enxofre do anel tiomorfolina está numa proximidade de 4,2 Å do ferro do heme, o que sugere que o metabolismo possa ocorrer por sulfoxidação. As reações de sulfoxidação correspondem a *S*-oxidação de sulfetos para sulfóxidos, que podem ainda ser oxidados a sulfonas.

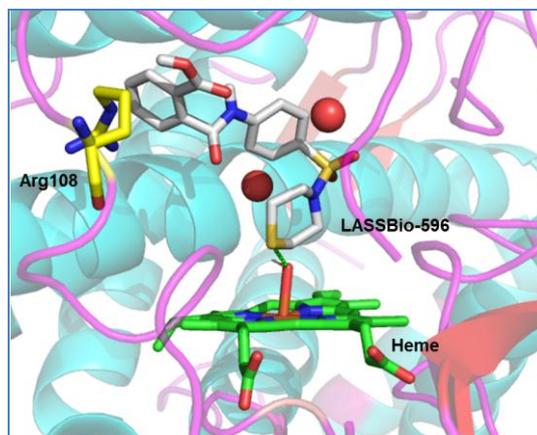


Figura 2 - LASSBio-596 no sítio ativo do CYP2C9

Após o processo de purificação, o metabólito 2 (mostrado na figura 1) foi obtido como um pó amarelo, rendimento de 5,8 %. A estrutura do metabólito 2 foi elucidada por ¹H RMN e foi consistente com a estrutura esperada. Dados experimentais: ¹H RMN (500 MHz, MeOD): δ 7,49 (2H, d, J = 8,88 Hz, H-3' e H-5'), δ 7,1 (2H, d, J = 8,88 Hz, H-2' e H-6'), δ 6,75-6,68 (4H, m, H-3, H-4, H-5 e H-6), δ 2,95 (8H, m, H-1'', H-2'', H-3'' e H-4''). A massa do composto foi confirmada por ESI-

EM/EM como 439,377 para $[M+H]^+ + 16(O) + 16(O)$. A figura 3 mostra o pico do íon molecular para o metabólito sulfona $[M+H]^+$, m/z 439,377, resultando em quatro fragmentos principais em m/z 423,377, 407,108, 259,350 e 151,097. A partir desses dados do espectro, o composto foi caracterizado como metabólito sulfona do LASSBio-596.

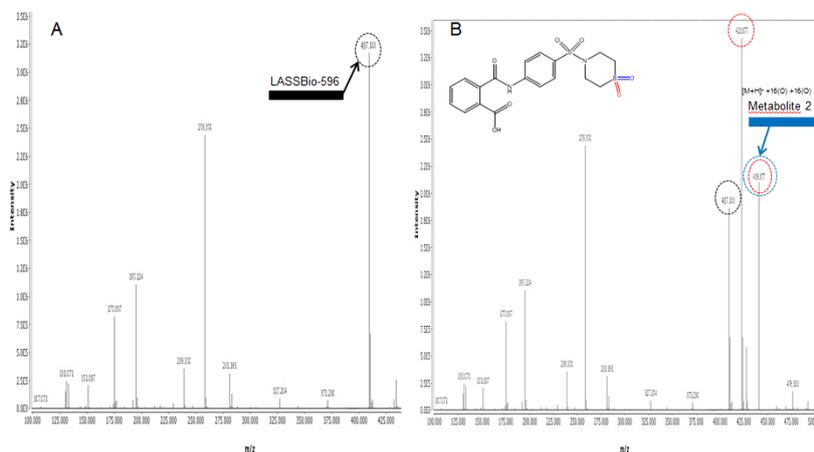


Figura 3 – Espectro de massas do LASSBio-596 (A) e do metabólito 2 (B)

A formação de sulfóxidos e/ou sulfonas ocorre na biotransformação de fármacos conhecidos, alguns exemplos são inibidores da bomba de prótons como omeprazol e esomeprazol, o anti-helmíntico albendazol, o anti-inflamatório não-esteroidal sulindaco e antipsicóticos fenotiazínicos, incluindo promazina, clorpromazina e tioridazina. Em alguns casos, o metabólito sulfona é mais ativo que a molécula de partida, ou tem atividade diferente, reafirmando a importância do estudo do metabolismo para um novo fármaco.

Conclusões

Os resultados da análise do docking com CYP2C9 foram consistentes com os dados experimentais, em que LASSBio-596 adotou uma orientação a favor da sulfoxidação seguida pela sulfonação. O metabólito sulfona do protótipo de fármaco antiasmático LASSBio-596 foi caracterizado utilizando os fungos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159, o qual será posteriormente avaliado nos perfis farmacológico e toxicológico.

Agradecimentos

CAPES, CNPq e INCT-INOFAR pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 16–29, 2009.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In **Advances Biochemical Engineering/Biotechnology (Biotransformations)**, ed. K. Faber, T. Scheper, p. 169-218. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.

BARREIRO, E. J.; ROCCO, P. R. M.; ZIN, W. A.; LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; KOATZ, V. L. G. Uso do Composto LASSBio-596 e Congêneres, e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos, no Tratamento da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Pedido de privilégio de invenção do INPI **PI 0208767-7**, Depósito - 08/11/2002.

FURA, A.; SHU, Y. Z.; ZHU, M.; HANSON, R. L.; ROONGTA, V.; HUMPHREYS, W. G. Discovering Drugs through Biological Transformation: Role of Pharmacologically Active Metabolites in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 18, 2004.

JAYAMANNE, M.; GRANELLI, I.; TJERNBERG, A.; EDLUND, P. O. Development of a two-dimensional liquid chromatography system for isolation of drug metabolites. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 649–657, 2010.

LIMA, L. M. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios e antiasmáticos**. 2001. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

LIMA, L. M.; DE LIMA, N. M. Contribuição do LASSBio® no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 35-48, 2009.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; FU, P. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 11, p. 1274–1279, 2002.

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 161, n. 2, p. 551-558, 1974.

ZHANG, D.; ZHANG, H.; ARANIBAR, N.; HANSON, R.; HUANG, Y.; CHENG, P. T.; WU, S.; BONACORSI, S.; ZHU, M.; SWAMINATHAN, A.; HUMPHREYS, W. G. Structural elucidation of human oxidative metabolites of muraglitazar: use of microbial bioreactors in the biosynthesis of metabolite standards. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 2, p. 267–280, 2006.

SUN H, SCOTT D.O. Structure-based drug metabolism predictions for drug design. **Chem Biol Drug Des**, v. 75, p. 3–17, 2010.