



Preparação de metabólitos fase I e II do derivado N-fenilpiperazínico (LASSBio 581 via bioconversão por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757

PAZINI, Francine¹; DE OLIVEIRA, Valéria²; MENEGATTI, Ricardo³; DE PAULA, André Figueira³; FRAGA, Carlos Alberto Manssur³; BARREIRO, Eliezer J.⁴

Palavras-chave: Bioconversão; LASSBio 581; hidroxilação, glicosilação.

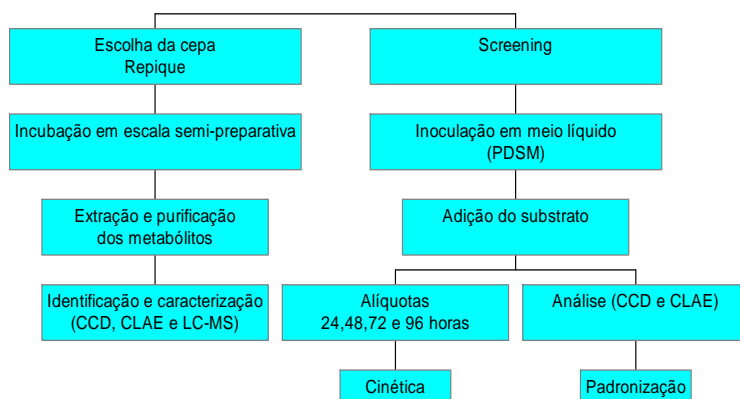
1. INTRODUÇÃO

A elucidação do metabolismo de fármacos constitui um importante passo na avaliação da eficácia e segurança de novos compostos a serem introduzidos na terapêutica (Azerad, 1999). Estudos metabólicos são realizados, tradicionalmente, em modelos animais, perfusão em órgãos e culturas de células normais ou malignas. Modelos microbianos (Smith, Rosazza, 1983; Sariaslani, 1991; Abourashed, Clark, Hufford, 1999) podem consistir em uma alternativa ou um complemento aos estudos em sistemas animais, já que imitam o metabolismo de mamíferos e fornecem informações sobre o destino metabólico de um fármaco¹. Diante disto, reações de hidroxilação e glicosilação por via microbiológica permitem a síntese de prováveis metabólitos animais de fase I e II, em quantidades suficientes para elucidação estrutural e realização de testes farmacológicos e toxicológicos. O LASSBio 581 é um derivado heterocíclico N-fenilpiperazínico, sintetizado por hibridização molecular da clozapina, um antipsicótico atípico, e do L-741 (Menegatti et al, 2003). Este derivado N-fenilpiperazínico é um ligante seletivo do receptor dopaminérgico D₂, apresentando atividade agonista modulada pela presença do átomo de cloro no anel aromático, e atividade hipotérmica determinada em modelo experimental com apomorfina (Menegatti et al, 2003; Neves et al, 2003). Para preparação de metabólitos hidroxilados e glicosilados a partir do substrato LASSBio 581, dois fungos filamentosos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 foram selecionados por apresentarem a capacidade de produzir tais produtos funcionalizados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foi realizado um processo de seleção (*screening*), para selecionar as cepas que fossem capaz de metabolizar o substrato LASSBio 581 produzindo maior quantidade ou maior variedade de produtos. No processo de triagem, fungos filamentosos foram repicados em ágar batata e incubados a 27°C por 7 dias. Após repique, as culturas de fungos com crescimento de 7 dias foram inoculadas em meio

líquido PDSM (que contém por litro de água destilada, 5g de peptona, 20g de dextrose, 5g de lecitina de soja, 5g de KH_2PO_4 , 5g de NaCl e 3g de extrato de levedura) e incubadas com agitação de 200 rpm a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após 65 horas foi adicionado 50mg do substrato LASSBio 581 a cada um dos erlenmeyers contendo 100mL de meio PDSM, solubilizado em mistura de dimetilformamida/etanol 1:1. O monitoramento da cinética de reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (fase estacionária: cromatofolhas de alumínio TCL 20x20cm Sílica gel 60 F₂₅₄, fase móvel: acetato de etila/metanol 95:05, revelador: iodo ressublimado) e cromatografia líquida de alta eficiência (fase estacionária: coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250x4,6mm x 0,5 μ), fases móveis: metanol e metanol/tampão 65:35, sistema gradiente, 248nm) à cada 24 horas, durante 96 horas. Duas cepas, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 foram selecionadas, e incubações em escala semi-preparativa (sob as mesmas condições do *screening*, alterando apenas o tempo de incubação, 72, 96, 168 ou 190 horas) foram realizadas para obtenção de maiores quantidades dos produtos formados. Os metabólitos produzidos foram identificados (CCD e CLAE nas condições já especificadas) e quantificados após o final da incubação. O micélio fúngico foi filtrado, e os possíveis produtos hidroxilados e glicosilados foram extraídos com acetato de etila. Os produtos de interesse contidos na fração orgânica foram separados e purificados por cromatografia de adsorção em coluna. Os produtos contidos no interior das células fúngicas foram extraídos com acetona por agitação mecânica. Caracterização dos diferentes compostos encontrados foi realizada por cromatografia em camada delgada (diferentes valores de R_fs), cromatografia líquida de alta eficiência (diferentes tempos de retenção), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE-MS) e ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H).



Fluxograma 1: Representação esquemática da metodologia empregada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto hidroxilado (3) e o produto glicosilado (1) foram formados através da incubação do LASSBio 581 com *Mortierella isabelina* NRRL 1757 e tempo de reação de 96 horas. Para obtenção dos metabólitos 2 (hidroxilado) e 4 (glicosilado) a cepa utilizada foi *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e tempos de incubação de 72, 96, 168 ou 190 horas.

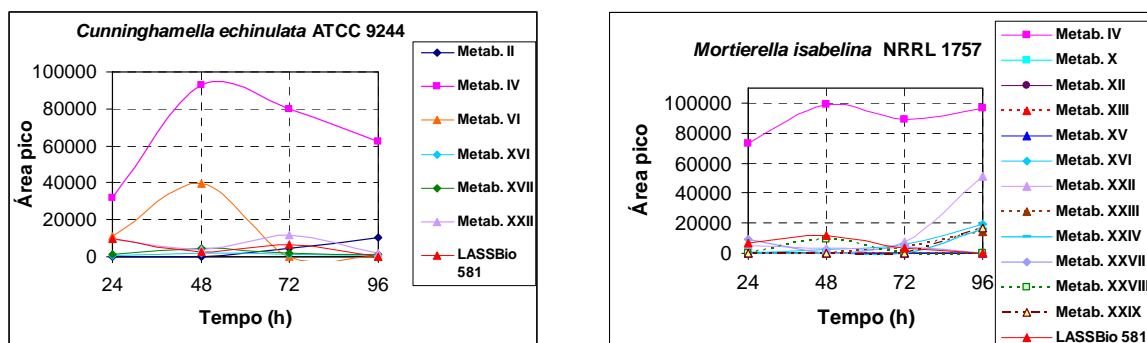


Figura 1: Cinéticas de biotransformação do substrato LASSBio 581 por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757.

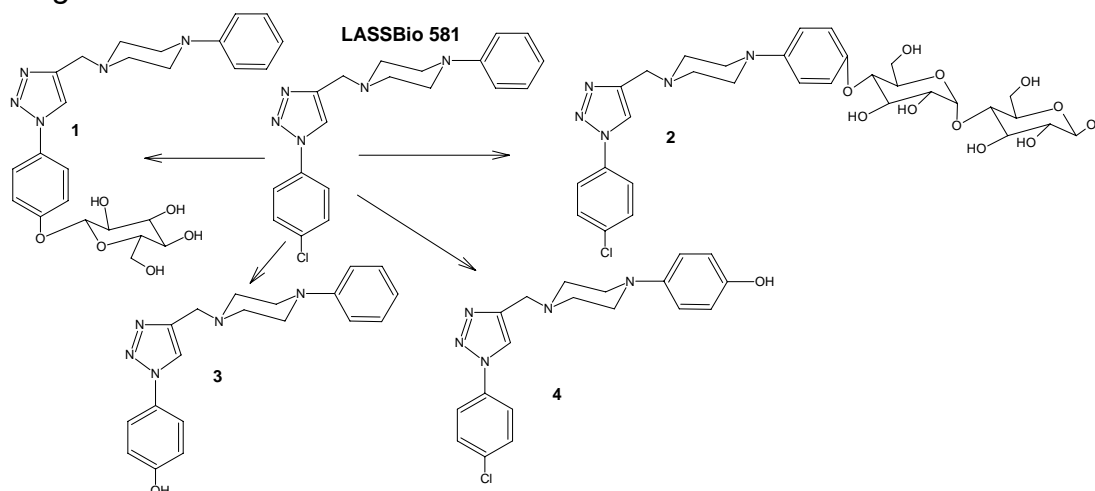


Figura 2: Estruturas químicas dos metabólitos formados nos diferentes tempos de reação, caracterizados por CCD, CLAE, CLAE-MS e RMN ¹H.

4. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que a obtenção de produtos funcionalizados do LASSBio 581 via bioconversão é uma alternativa promissora para preparação de novos derivados. Além disso os fungos filamentosos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 mostraram-se eficazes na produção de compostos Fase I e II do metabolismo, já que apresentam sistemas enzimáticos similares aos mamíferos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

SMITH, R. V., ROSAZZA, J. P., Microbial models of mammalian metabolism, *J.Nat.Prod.*, 46, 79-91, 1983.

SARIASLANI, F. S., Microbial cytochromes P-450 and xenobiotic metabolism, *Adv.Appl.Microbiol.*, 36, 133-178, 1991.

ABOURASHED, E. A., CLARK, A. M., HUFFORD, C. D., Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotics: An Updated Review, *Current Medicinal Chemistry*, 6, 359-374, 1999.

MENEGATTI, R. C., A.C.; FERREIRA, V. F.; PEREIRA, E. F. R.; EL NABAWI, A.; ELDEFRAWI, A. T.; ALBUQUERQUE, E. X.; NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J., Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D2 receptor ligands, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11, 2003.

NEVES, G.; FENNER, R.; HECKLER, A. P.; VIANA, A. F.; TASSO, L.; MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; DALLA-COSTA, T.; RATES, S. M. K., Dopaminergic profile of new heterocyclic N-phenylpiperazine derivates, *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, 36, 2003

¹Aluna de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFRJ, e professora substituta – UFG franpazini@bol.com.br

²Co-orientadora – Faculdade de Farmácia – UFG – Laboratório de Bioconversão - UFG

³Colaboradores – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas – UFRJ

⁴Orientador – UFRJ – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas