



AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE METABOLIZADORA DE ENZIMAS CYP1A2

Marília Aparecida Silva¹ (IC)*, Caroline Rego Rodrigues² (PQ).

1. Faculdade de Enfermagem. Bolsista VIC/UEG. Campus Ceres, Universidade Estadual de Goiás.
Mariliaa.silva@hotmail.com.
2. Docente, Universidade Estadual de Goiás, Ceres-GO.

É possível prever possíveis interações medicamentosas entre novas drogas e os medicamentos existentes no mercado. Para isso é necessário avaliar se os candidatos a fármacos apresentam a capacidade de inibir enzimas responsáveis pela biotransformação de outros medicamentos. O objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade metabolizadora de enzimas CYP1A2 obtidas da Sigma® para que possam ser posteriormente usadas para o teste de inibição do protótipo de fármaco antitumoral LQFM018. Foram incubados por 10 minutos a 37 °C: 100µL de solução de fenacetina 10µg/mL e 100µL de tampão fosfato de potássio monobásico pH7,5. Foram acrescentados 100µL da solução contendo enzimas+NADPH (Sigma®). Foram acrescentados 300µL de metanol gelado e a solução foi centrifugada a 13.000g por 10min. A quantidade de fenacetina foi determinada conforme método analítico: Fase móvel isocrática metanol:água (50:50 v/v), fluxo de 1,0mL/min, volume de injeção de 20µL e comprimento de onda de 245nm (padrão interno: salicilamida 5µg/mL). O sinal analítico fornecido pela detecção da fenacetina no meio reacional (na presença das enzimas) foi menor em relação ao sinal obtido para a solução de fenacetina na ausência das enzimas. Isso demonstra que as enzimas metabolizaram o substrato. A quantidade de fenacetina antes do contato com as enzimas foi aproximadamente 20% maior que após a metabolização.

Palavras-chave: Fenacetina. HPLC-PDA. NADPH. Interação medicamentosa. Biotransformação.

Introdução

No ano de 2011, foi desenvolvida uma linha de pesquisa no Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG) com o intuito de obter compostos com o





mesmo mecanismo de ação dos nutlins na qual, através da simplificação molecular, conseguiu-se elaborar o desenho, a síntese e a avaliação do perfil antineoplásico de novos candidatos a protótipos de fármacos, obtidos a partir do protótipo nutlin-3 (CARVALHO, 2011).

O LQFM18, ainda está sendo estudado, mas já demonstrou resultados preliminares positivos quanto à citotoxicidade em células malignas (dados ainda não publicados). Estes resultados iniciais, revelaram a ação antineoplásica do protótipo LQFM018. Além disso, os estudos cinéticos em ratos e camundongos já realizados pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico Farmacológicas (NEPET) da UFG, revelaram que esta molécula é bem absorvida por via oral, apresenta baixa biodisponibilidade, apresenta cinética linear e pode apresentar interação medicamentosa com a subfamília enzimática CYP3A. A partir dessas informações, entende-se que é necessário continuar estes estudos no sentido de analisar também a possível interferência do LQFM018 no metabolismo de outras drogas, como as metabolizadas pela subfamília CYP1A2. A literatura relata que a furafilina é uma substância que demonstra capacidade em inibir as enzimas CYP1A2 (OLIVEIRA, 2015). Portanto, pode ser utilizada como controle positivo de inibição em testes de metabolização de fenacetina por CYP1A2. Este protocolo pode ser útil para testar várias drogas e prever se elas poderão apresentar interação medicamentosa com fármacos metabolizados por esta subfamília.

O objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade metabolizadora de enzimas CYP1A2 obtidas da Sigma® para que possam ser posteriormente usadas para o teste de inibição do protótipo de fármaco antitumoral LQFM018.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no NEPET-UFG (Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG).

O protótipo LQFM18 foi gentilmente fornecido pelo professor Dr. Ricardo Menegatti - Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Universidade Federal de Goiás – LQFM. Os materiais de consumo grau cromatográfico e as enzimas

CYP1A2 Sigma® foram gentilmente cedidas pelo professor Luiz Carlos da Cunha (UEG), assim como o padrão de fenacetina e os equipamentos gerais (centrífuga, balança, shaker, cromatógrafo).

Inicialmente foram incubados por 10 minutos a 37 °C: 100 µL de solução de fenacetina 10 µg/mL e 100 µL de tampão fosfato de potássio monobásico pH 7,5. Foram acrescentados 100 µL da solução contendo enzimas na concentração de 20 µg/mL + NADPH (Sigma®) e o meio reacional foi mantido em agitação por 120 min a 37 °C (mesa agitadora com temperatura). Após o tempo determinado, foram acrescentados 300 µL de metanol gelado para parar a reação. A solução foi centrifugada a 13.000 g por 10 min.

O sobrenadante foi filtrado em membrana Millex® e acondicionado em vial para injeção em HPLC. Utilizando o método cromatográfico descrito abaixo, a quantidade de fenacetina foi determinada antes e depois da adição de enzimas. O método analítico foi: Fase móvel isocrática composta por metanol e água ultrapura (50:50 v/v), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 245 nm (padrão interno: salicilamida 5 µg/mL) (OLIVEIRA, 2015).

Resultados e Discussão

O método analítico demonstrou ser adequado para a quantificação do analito em questão. Parâmetros de validação do método estão demonstrados na Tabela 1:

Tabela 1. Parâmetros de validação do método de quantificação de fenacetina por HPLC-PDA.

Parâmetros de validação baseados na RDC 27/2012 (BRASIL, 2012)	
Linearidade	Linear na faixa de 0,2 a 2,5 µg/mL $r^2 > 0,99$
Efeito Matriz	Não há interferência da matriz biológica presente no meio no comprimento de onda de 245 nm
Limite de quantificação	250 ng/mL
Limite de detecção	100 ng/mL



O sinal analítico fornecido pela detecção da fenacetina no meio reacional (na presença das enzimas) foi menor em relação ao sinal obtido para a solução de fenacetina na ausência das enzimas. Isso demonstra que as enzimas metabolizaram o substrato.

A partir do resultado obtido, pode-se afirmar que as enzimas utilizadas apresentam capacidade metabolizadora e estão ativas; a quantidade de fenacetina antes do contato com as enzimas foi aproximadamente 20% maior que após a metabolização.

Considerações Finais

Dessa forma, pode-se indicar este protocolo como adequado para os testes de atividade metabolizadora das enzimas CYP1A2 e este será ainda útil na determinação da capacidade de inibição de protótipos de fármacos a serem testados.

Agradecimentos

Agradecemos à colaboração do Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha que possibilitou que os testes fossem desenvolvidos no NEPET – Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas e forneceu o material necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

Referências

BUSKÜHL, H. *Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxica de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de Vermonia scorpiodes (LAM)* PERS. 2007. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº 27 de 17 de Maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. 2012.



CARVALHO, F. S. Avaliação farmacológica e toxicológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais. Goiânia, 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, 95p.

LI, W.; XIN, H.; SU, M.; XIONG, L. Inhibitory effects of Schisandrin A and Schisandrin B on CYP3A activity. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. v. 32, p. 1-7, 2010.

OLIVEIRA, S. R. Avaliação in vitro da inibição metabólica de enzimas do citocromo P450 por derivados de plantas medicinais. 2015. Tese (Pós-graduação em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

PAGNO, T. Estudos da atividade antineoplásica da fração diclorometano (DCM) da planta *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. Em modelo animal. 2004. Monografia (Graduação em Farmácia). Universidade Vale do Itajaí, Itajaí, 2004.

VASSILEV, L. T.; VU, B. T.; GRAVES, B.; CARNAVAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E. A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. v. 303, n. 5659, p. 844-848, 2004.