

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO FÁRMACO MYONOVIN

DRIELLY C. BRAITE¹, SARAH M.G. ELOI², FRANK BURCZYNSKI³, JUDY ANDERSON³, SIBELE BORSUK¹

¹Universidade Federal de Pelotas – driellybraite@gmail.com / sibeleborsuk@gmail.com

²Universidade de Brasília – sarahmontieloi@gmail.com

³University of Manitoba – frank.burczynski@umanitoba.ca / Judith.Anderson@umanitoba.ca

1. INTRODUÇÃO

A reparação do músculo esquelético é necessária quando o tecido muscular sofre lesões, que são caracterizadas pelo processo de inflamação e degeneração do sítio danificado (KARALAKI *et al.*, 2009) Em resposta à doença ou lesão, as células miogênicas quiescentes, chamadas de células satélites, são ativadas, multiplicadas, diferenciadas e se fundem para formar fibras multinucleadas musculares que iniciam o processo de regeneração com outras células-tronco não-musculares (ANDERSON, 2000).

Os trabalhos anteriores mostraram que MyoNovin é capaz de iniciar a miogênese através da ativação das células satélites do músculo esquelético pela doação de óxido nítrico para as células-alvo. MyoNovin (1,2-di-O-nitro-3-(*o*-metoxifenoxi) – propanediol) é um composto sintetizado a partir do relaxante muscular guaifenesina (3-(*o*-metoxifenoxi)-1,2 – propanediol) (LEITER *et al.*, 2010). Este fármaco foi primeiramente sintetizado em 2009 por Anderson, Wang e Burczynski na University of Manitoba, Winnipeg/MB – Canadá (WANG *et al.*, 2009).

Desta forma, foi realizada a síntese, purificação e caracterização pela técnica de cromatografia de alta eficiência (HPLC) e teste de liberação transdérmica a partir do método de difusão em células de Franz.

Por atuar como um doador de óxido nítrico, este fármaco apresenta papel na proliferação de células musculares, e potencial para o crescimento do músculo esquelético e regeneração muscular em idosos (ANDERSON, 2006). Portanto, esta pesquisa visa promover a função normal muscular de tecidos lesionados, e possivelmente, tratar doenças neuromusculares. Assim, o objetivo do trabalho foi o desenvolvimento e avaliação da liberação transdérmica do fármaco MyoNovin a partir do método de difusão em célula de Franz.

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese de MyoNovin

A síntese de MyoNovin foi realizada em duas etapas. A primeira reação envolveu a mistura de guaiacol (C₇H₈O₂), brometo de alila (C₃H₅Br) e carbonato de potássio (K₂CO₃). Tais reagentes estavam sob equivalência de 1 (para guaiacol), 1,2 (brometo de alila) e 1,5 (carbonato de potássio).

O produto intermediário desta reação foi concentrado por destilador a vácuo e foi caracterizado como composto oleoso. Com a finalidade de testar a pureza e avaliar todos os componentes da mistura, o método de TLC (cromatografia de camada delgada) foi usado com um sistema de solventes incluindo 90% de hexano e 10% de acetato de etilo.

Na segunda reação, ao produto intermediário foram adicionados iodo (I₂) e nitrato de prata (AgNO₃) (WOZNIAK *et al.*, 2009). A equivalência dos reagentes foi de 1,0 (para o produto intermediário), 1,0 (iodo) e 4,0 (nitrato de prata). O produto

final também foi concentrado por destilado a vácuo e as reações foram monitoradas pela técnica de TLC (WANG *et al.*, 2009).

2.2 Cromatografia em coluna e Cromatografia de alta eficiência (HPLC)

Com o objetivo de determinar o tempo de eluição de MyoNovin, foi utilizada a técnica de cromatografia em coluna com sílica gel, e posterior, cromatografia de alta eficiência (HPLC).

Várias amostras foram coletadas em eppendorf a partir da técnica de separação cromatografia em coluna com sílica gel (AGUILAR, 2004). Com a finalidade de determinar o tempo de eluição e analisar o produto final as amostras foram lidas por HPLC.

Dois solventes diferentes foram testados em várias concentrações, injeções e fluxos totais para definir a melhor fase móvel: acetonitrila ou metanol. Ambos foram diluídos em água.

2.3 Liberação transdérmica

Célula de difusão de Franz é um método que analisa a interação entre a pele, drogas e formulações utilizando membranas naturais ou sintetizadas. O sistema de liberação transdérmica é constituído por dois componentes de vidro separados por uma fina membrana (NG *et al.*, 2010). No presente trabalho as membranas artificiais foram usadas para testar a permeabilidade de MyoNovin.

A liberação transdérmica do fármaco MyoNovin foi avaliada a partir do método de difusão em célula de Franz. Para essa avaliação, duas soluções foram realizadas, uma utilizando PBS (salina tamponada com fosfato) com albumina (ALB PBS + 1%), e outra, sem a proteína albumina (apenas PBS). Os dois sistemas foram testados e analisados por HPLC em solvente acetonitrila e óleo de canola 1% foi utilizado como veículo para o fármaco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cromatografia de alta eficiência (HPLC)

As análises de HPLC foram realizadas para identificar o tempo de eluição de MyoNovin e detectar outros picos em relação a outras substâncias. Os solventes metanol (METH) e acetonitrila (ACN) foram testados em diferentes concentrações, injeções, e fluxos totais. Ácido fórmico também foi comparado nos diferentes solventes.

As tabelas abaixo mostram o tempo que o pico de MyoNovin aparece para cada caso:

Tabela 1: Picos de MyoNovin com diferentes solventes e sem ácido fórmico.

ACN – Concentração: 1mg/mL de MyoNovin. Injeção: 1µL. Sem ácido fórmico			
Fluxo	ACN60%	ACN80%	ACN100%
0.7mL/min	4.5minutos		
0.8mL/min	8.5minutos	4minutos	2.5minutos
0.9mL/min			2.5minutos
1.0mL/min	3minutos		
1.2mL/min	3minutos		2minutos

Tabela 2: Picos de MyoNovin com diferentes solvestes e 0.1% de ácido fórmico.

ACN – Concentração: 1mg/mL de MyoNovin. Injeção: 10µL. 0.1% ácido fórmico			
Fluxo	ACN 60%	ACN 80%	ACN 100%
0.7mL/min			3minutos
0.8mL/min	5minutos	3minutos	2.5minutos
1.0mL/min		2.5minutos	2minutos
1.2mL/min			1.5minutos
METH – Concentração: 1mg/mL de MyoNovin. Injeção: 10µL. 0.1% ácido fórmico			
Fluxo	METH60%	METH80%	METH100%
0.8mL/min	8.5minutos	3minutos	2.5minutos
1.0mL/min	6.5minutos	3minutos	
1.2mL/min	5.5minutos	2minutos	
1.4mL/min	4.5minutos	2minutos	

Comparando o fluxo total entre metanol e acetonitrila, o último mostrou os melhores resultados, já que o tempo de eluição de MyoNovin foi menor para o solvente acetonitrila. Depois disso, MyoNovin foi analisado com e sem ácido fórmico em diferentes concentrações e injeções para o solvente acetonitrila. E foi possível observar que quanto maior a concentração menor será o tempo de eluição, de modo que o pico MyoNovin será mostrado de forma mais rápida. Assim, a pureza e a caracterização de MyoNovin foram confirmadas a partir da técnica de HPLC e o solvente acetonitrila 60% mostrou ser uma boa opção para a fase móvel para analisar o fármaco MyoNovin.

3.2 Liberação transdérmica

Considerando MyoNovin como um fármaco lipofílico, era esperado uma ligação entre MyoNovin e albumina durante o ensaio transdérmico. No entanto, analisando todas as amostras de sistemas com e sem albumina pela técnica de HPLC, foi notado que MyoNovin não foi observado no mesmo tempo de eluição que tinha sido verificado durante a caracterização do fármaco. Portanto, pode-se dizer que as amostras testadas em fluxo transdérmico não apresentaram ligação com a albumina.

4. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada foi eficiente para produzir e caracterizar o fármaco. O solvente acetonitrila 60% em água mostrou ser uma opção de eluente para analisar o fármaco MyoNovin. O uso de óleo de canola como veículo para MyoNovin não foi favorável para estudar a permeabilidade em fluxo transdérmico. Mais estudos transdérmicos são necessários antes da validação do uso tópico de MyoNovin.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M. HPLC of peptides and proteins, methods and protocols. Volume 251. Totowa, Estados Unidos, Humana Press, 2004.

ANDERSON, J.E. A role for nitric oxide in muscle repair: Nitric Oxide-mediated activation on muscle satellite cells. *Molecular Biology of the Cell*, Bethesda, Estados Unidos, Vol. 11, 1859-1874, 2000.

ANDERSON, J.E. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *The Journal of experimental biology*, Londres, Inglaterra, Vol. 209, 2276-92, 2006.

KARALAKI, M.; FILI, S.; PHILIPPOU, A.; KOUTSILIERIS, M. Muscle Regeneration: Cellular and Molecular Events. *International of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research. In vivo*, Atenas, Grécia. Vol. 23: 779-796, 2009.

LEITER, J.R.S.; ANDERSON, J.E. Satellite cells are increasingly refractory to activation by nitric oxide and stretch in aged mouse-muscle culture. *The International of Biochemistry & Cell Biology*, Amsterdam, Holanda, (42) 132-136, 2010.

NG, S.F., ROUSE, J.J., SANDERSON, F.D. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for *In Vitro* Permeation Studies, *Glasgow*, Reino Unido, 11(3): 1432–1441, 2010.

University of Manitoba – UofM. ANDERSON, J.E. Bringing Research to LIFE. *The Bulletin*, May 21, 2009. Acessado em Disponível em: 25/07/2014. Online. Disponível em: https://umanitoba.ca/research/ors/media/Pages_from_May_21_2009_Bulletin.pdf

WANG, G.; BURCZYNSKI, F.J.; HASINOFF, B.B.; ZHANG, K.; LU, Q.; ANDERSON, J.E. Development of a Nitric Oxide-Releasing Analogue of the Muscle Relaxant Guaifenesin for Skeletal Muscle Satellite Cell Myogenesis. *Molecular Pharmaceutics*, Washington, Estados Unidos, Vol. 6 (3), pp 895–904, 2009.

WOZNIAK, A.C.; ANDERSON, J.E. The dynamics of the nitric oxide release-transient from stretched muscle cells. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Amsterdam, Holanda, (41) 625-631, 2009.