

Kelly C. F. Araújo Cordeiro<sup>a</sup>

Diogo F. Nogueira<sup>a</sup>

Diego B. da Silva e Sousa<sup>a</sup>

Maisa Borges Costa<sup>b</sup>

Valéria de Oliveira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Goiás  
(UFG), Faculdade de Farmácia.

<sup>b</sup>Universidade Estadual de Goiás

\*Autor para correspondência:  
Laboratório de Bioconversão,  
Faculdade de Farmácia –  
Universidade Federal de Goiás,  
Praça Universitária, Qd. 62, Goiânia,  
Goiás, Brasil. 74.605-220. E-mail:  
valeria@farmacia.ufg.br Telefone:  
+55(62)3209-6432.



Congresso de Ciências  
Farmacêuticas do Brasil Central



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-  
GRADUAÇÃO

Endereço: BR-153 – Quadra Área  
75.132-903 – Anápolis –  
revista.prp@ueg.br

Coordenação:  
GERÊNCIA DE PESQUISA  
Coordenação de Projetos e Publicações

Publicação: 19 de setembro de 2013

Modalidade: Pós-Graduação

# APLICAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE PADRÕES DE REFERÊNCIA DE METABÓLITOS DE CLONAZEPAM

*Application of biotechnology in clonazepam metabolites reference standards production*

## RESUMO

**Introdução e objetivos:** O clonazepam é um agente antiepiléptico bastante útil na terapêutica. O principal metabólito descrito é um produto de redução do grupamento nitro. Métodos para determinação do clonazepam e seus metabólitos no plasma apresentam várias aplicações clínicas, toxicológicas e forenses e requer padrões de referência. Baseando-se no uso de enzimas fúngicas, o modelo microbiano do metabolismo animal pode ser uma alternativa para obtenção de miligramas de metabólitos com menor custo e maior eficiência se comparado aos modelos animais. O objetivo deste trabalho foi produzir metabólitos do clonazepam para depois utilizá-los como padrão de referência. **Metodologia:** Uma solução em acetona de clonazepam 50 mg·mL<sup>-1</sup> foi incubada, em meio líquido PDSM em shaker a 27±2 °C e 200 rpm, por 144 horas, com fungos filamentosos (*Beauveria Bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella elegans* ATCC 9244, *Chaetomium indicum* LCP 984200) cultivados por 65 horas. Os derivados produzidos foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD), purificados por coluna cromatográfica (CC) e identificados por GC-MS. **Resultados e discussões:** Todas as cepas utilizadas foram capazes de biotransformar clonazepam. Após a purificação 03 metabólitos foram isolados, sendo um deles identificado como o metabólito encontrado em humanos: 7-acetamido-clonazepam. **Conclusões:** Os resultados demonstram o grande potencial da metodologia para a preparação de compostos de referência de metabólitos do clonazepam. **Agradecimentos:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

**Palavras-Chave:** Clonazepam; metabólitos; padrões de referência; fungos filamentosos.

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Clonazepam is an antiepileptic agent useful in therapy. The major metabolite is described as a product of reduction of nitro group. Methods for determination of clonazepam and its metabolites in plasma have several clinical applications, toxicological and forensic and require reference standards. Relying on the use of fungal enzymes, microbial model of animal metabolism may be an alternative for production of metabolites with lower cost and higher efficiency, when compared to animal models. The aim of this work was to produce metabolites of clonazepam for use as standard reference. **Methodology:** An acetone solution of 50 mg·mL<sup>-1</sup> of clonazepam was incubated in PDSM liquid medium in a Shaker at 27 ± 2 °C and 200 rpm, for 144 hours with filamentous fungi (*Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella elegans* ATCC 9244 and *Chaetomium indicum* LCP 984 200) cultured for 65 hours. The derivatives produced were monitored by thin layer chromatography (TLC), purified by column chromatography (CC) and identified by GC-MS. **Results and discussion:** All strains used were capable of biotransform clonazepam. After purification 03 metabolites were isolated, one was identified as the metabolite found in humans, 7-acetamido-clonazepam. **Conclusions:** The results demonstrate the great potential of this methodology for the preparation of reference metabolites compounds. **Acknowledgments:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

**Keywords:** Clonazepam; metabolites; reference standards; filamentous fungi