



ESTUDO DA INTERCONVERSÃO ENANTIOMÉRICA E DA INTERAÇÃO DE 3-HIDROXI-1,4-BENZODIAZEPÍNICOS QUIRAIS COM O RECEPTOR GABA_A EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

Débora M. Barbosa, Nakaly Natiely Oliveira, Daví A. C. Ferreira.

Instituto de Química -IQ, Universidade De Brasília -UnB, 70904-970, Brasília-DF, Brasil

med.ddebora@gmail.com

Palavras-Chave: Benzodiazepínicos; Enantiomerização ; Racemização.

Introdução

Historicamente, os benzodiazepínicos ganharam destaque com a introdução clínica do clordiazepóxido (librium), em 1960, seguida pelo diazepam, em 1963. Esses fármacos representaram um avanço na psicofarmacologia por oferecerem tratamento eficaz para ansiedade, insônia e outras condições associadas à hiperatividade do sistema nervoso central, com maior margem de segurança quando comparados aos barbitúricos, que apresentavam um risco associado à depressão respiratória ¹. Com o avanço da química medicinal, entretanto, tornou-se evidente que a atividade de um medicamento não depende apenas de sua fórmula molecular, mas também da disposição tridimensional de seus átomos. Como receptores, transportadores e enzimas são estruturas quirais, os enantiômeros de um mesmo fármaco podem apresentar diferenças de reconhecimento molecular, atividade farmacológica, metabolismo e eliminação. Por isso, o estudo da quiralidade tornou-se relevante para o desenvolvimento e a avaliação da eficácia e da segurança dos medicamentos ^{2,3,4}.

Os 3-Hidroxi-1,4-benzodiazepínicos, que incluem o oxazepam (OxaZPM), lorazepam (LorZPM) e temazepam (TemZPM), constituem uma subclasse de fármacos psicotrópico, do qual a característica estrutural é a presença de um grupo hidroxila (-OH) com centro estereogênico no carbono 3 do anel benzodiazepínico^{5,6}, com a possibilidade de ocorrência nas configuração R ou S.

Desse modo, a comercialização, convencionalmente, desses medicamentos é feita como mistura racêmica, nas quais esses dois enantiômeros estão presentes. Não obstante,



mesmo com estruturas químicas idênticas, a grande maioria dos isômeros quirais se distingue pela sua atividade biológica, alterando a eficiência terapêutica, efeitos colaterais e o metabolismo corporal ^{7,3}. Em especial, o caso dos 3-hidroxi-1,4-benzodiazepínicos adquire maior complexidade devido à instabilidade do centro estereogênico C3 em meio aquoso⁸.

Estudos experimentais e computacionais demonstraram que esses compostos podem sofrer interconversão R/S, sendo o tautomerismo cadeia–anel o mecanismo mais compatível com as barreiras energéticas e com o comportamento observado em diferentes valores de pH. Apesar disso, predominam estudos realizados em soluções, sistemas cromatográficos e modelos computacionais ⁵. Estudos experimentais indicam instabilidade estereoquímica, em plasma humano, para o LorZPM; no entanto, os resultados apresentam caráter preliminar e pouco quantitativo ⁹. Dessa forma, qualquer avaliação cinética ou farmacológica constitui caráter especulativo.

A ação farmacológica das benzodiazepinas ocorre, principalmente, por meio da modulação alostérica positiva dos receptores GABA(A), potencializando a neurotransmissão inibitória mediada pelo ácido γ -aminobutírico ¹⁰. Sendo assim, as atividades farmacológicas e farmacocinéticas dos enantiômeros dos 3-hidroxi-1,4-benzodiazepínicos frente o GABA(A) devem ser distintas ². A exemplo, evidências experimentais indicam que, para o LorZPM, o enantiômero S apresenta atividade de 100-200 vezes maior em comparação ao enantiômero R ^{11,12,9}.

Convencionalmente, os 3-hidroxi-1,4-benzodiazepínicos são comercializados como misturas racêmicas. Diante disso, a possibilidade de interconversão de enantiômeros se constitui em um problema a ser elucidado. Experimentalmente, essas barreiras já apresentam estudos associados. A determinação das barreiras energéticas de enantiomerização por técnicas como eletroforese capilar dinâmica e cromatografia com fluido supercrítico consolidou a compreensão desses compostos como fármacos propensos à racemização ⁸.

Todavia, a interconversão enantiomérica dessas espécies em pH fisiológico e temperatura corpórea não é claramente considerada na literatura, principalmente no que se refere à dosagem ministrada a pacientes, considerando a sua interconversão no organismo. Embora os aspectos farmacológicos gerais e os efeitos adversos dos benzodiazepínicos



estejam amplamente descritos, a estabilidade enantiomérica *in vivo* ainda permanece inexplorada. Outrossim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a cinética e a termoquímica do processo de racemização dos 3-hidroxi-1,4-benzodiazepínicos.

Material e Metodologia

A estrutura cristalina do receptor GABA_A em complexo com um inibidor flumazenil (PDB: 6D6U)¹³ foi obtida do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB)¹⁴.

A molécula do flumazenil foi removida da estrutura cristalina. Para o desenvolvimento deste trabalho, foram aplicadas técnicas baseadas no Docking Molecular. O software aplicado para tal estudo foi o Autodock Vina¹⁵.

Hidrogênios polares e cargas de Kollman foram adicionados à proteína e um arquivo *.pdbqt foi gerado usando o software AutoDockTools 1.5.7¹⁶. As estruturas moleculares dos ligantes (Lorazepam e Temazepam) foram obtidas no banco de dados DrugBank¹⁷. Para verificar a forma de manifestação destes fármacos em pH fisiológico (pH=7.4), foi utilizado o programa Marvin Sketch¹⁸.

Todas as estruturas moleculares do ligante foram previamente otimizadas usando Gaussian 09¹⁹ package, através do modelo GFN-xTB^{20,21}.

O mecanismo aquoso de racemização foi explorado através de técnicas baseadas na Dinâmica Molecular de Born-Openheimer (BOMD)^{22,23}. As simulações de BOMD foram desempenhadas usando um intervalo de 120 fs, divididos em 240 passos de 0.5 fs cada. As forças foram calculadas usando o método Semiempírico via módulo QuickStep²⁴, implementado no pacote CP2K²⁴, utilizando o modelo PM6^{25,26}. As simulações BOMD foram realizadas no ensemble NVT a 309.15 K usando a família de termostatos do tipo Nosè-Hoover²⁷⁻²⁹, com temperatura constante no intervalo de simulação.

As estruturas moleculares de cada ligante foi convertida em *.pdbqt através do software AutoDockTools 1.5.7¹⁶. O caráter lipofílico dos fármacos foi obtido através do software ALOGPS 2.1³⁰. Todo o estudo de docking molecular foi desenvolvido através do software Autodock Vina 1.1.2¹⁵ e as análises dos resultados, bem como as imagens, através do software Discovery Studio Visualizer³¹.

Resultados e Discussão

Para calcular o efeito da reacemização sobre a inibição do receptor GABAA, projetamos simulações de docking com grid definido por uma zona esférica de raio $r = 13 \text{ \AA}$, cuja coordenada cartesiana do centro esférico é definida por $x = 120.160591 \text{ \AA}$, $y = 167.821409 \text{ \AA}$ e $z = 153.597318 \text{ \AA}$. O grid GABA_A cobrindo apenas a zona vermelha, como mostrado na Figura 1.

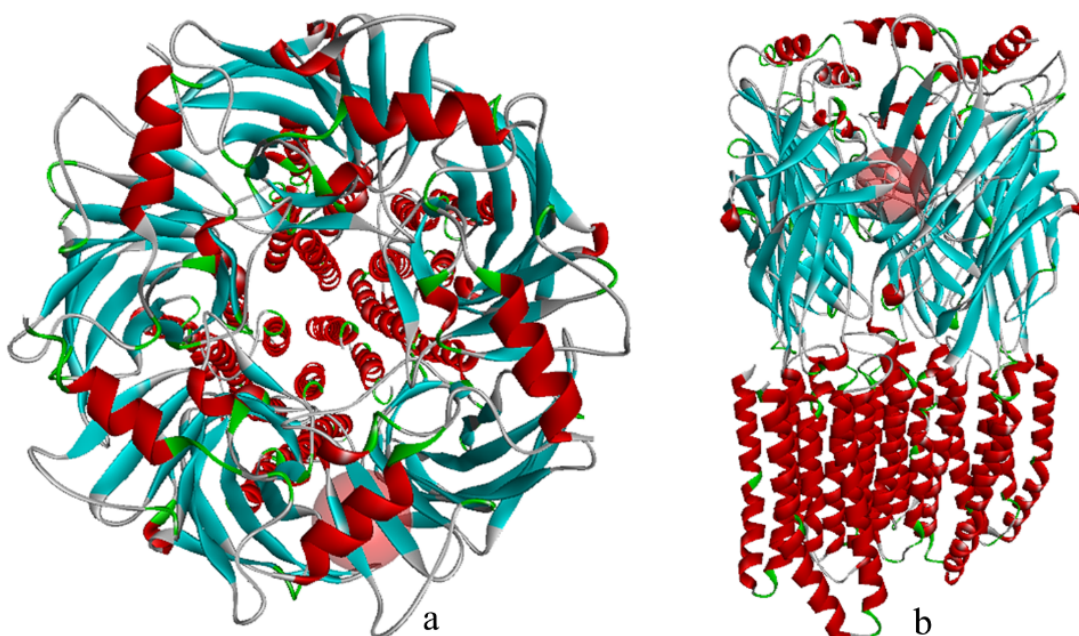


Figura 1 Vista superior (a) e frontal (b) da proteína GABA_A, com seu grid em destaque.

Os fármacos explorados foram previamente investigados e tiveram suas respectivas formas identificadas em pH=7.4. As formas com maiores populações relativas (**Figura 2**) foram usadas como ligantes no estudo de docking.

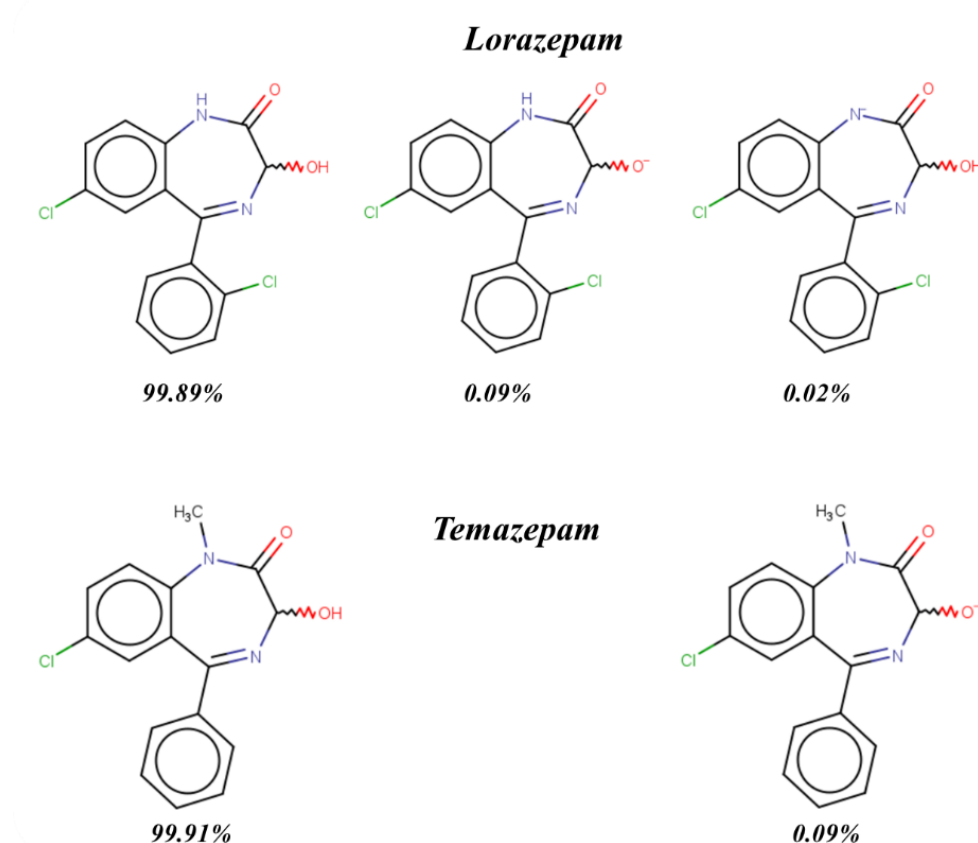


Figura 2 formas mais prováveis do lorazepam e temazepam em pH=7.4. As formas mais prováveis são as formas neutras (que coincidem com as formas moleculares originais dos fármacos.)

Primeiramente, empregamos o docking molecular envolvendo GABAA como sistema receptor. Todas as afinidades de ligação envolvidas na formação do complexo GABAA-fármaco estão sumarizadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 Propriedades físico-químicas/bioatividades teóricas para os fármacos explorados neste estudo, envolvendo a inibição do GABA_A: afinidade (kcal.mol⁻¹), constante de ligação (ou complexação, K_B), IC₅₀ (M), logaritmo do coeficiente de partição (logP) e logaritmo do coeficiente de solubilidade em água (logS).

Fármaco	Afinidade	K_B	IC₅₀	logP	logS
(R)-LoraZPM	-9.50	5,04x10 ⁶	1,98x10 ⁻⁷	2.39	-3.60
(S)-LoraZPM	-9.80	8.21x10 ⁶	1.22x10 ⁻⁷		
(R)-TemaZPM	-9.50	5.04x10 ⁶	1.98x10 ⁻⁷	2.16	-3.80
(S)-TemaZPM	-8.80	1.62x10 ⁶	6.18x10 ⁻⁷		

Como pode ser verificado, os enantiômeros R e S o LoraZPM apresentam energias de complexação similares. Este mesmo fato pode ser verificado para o TemaZPM.

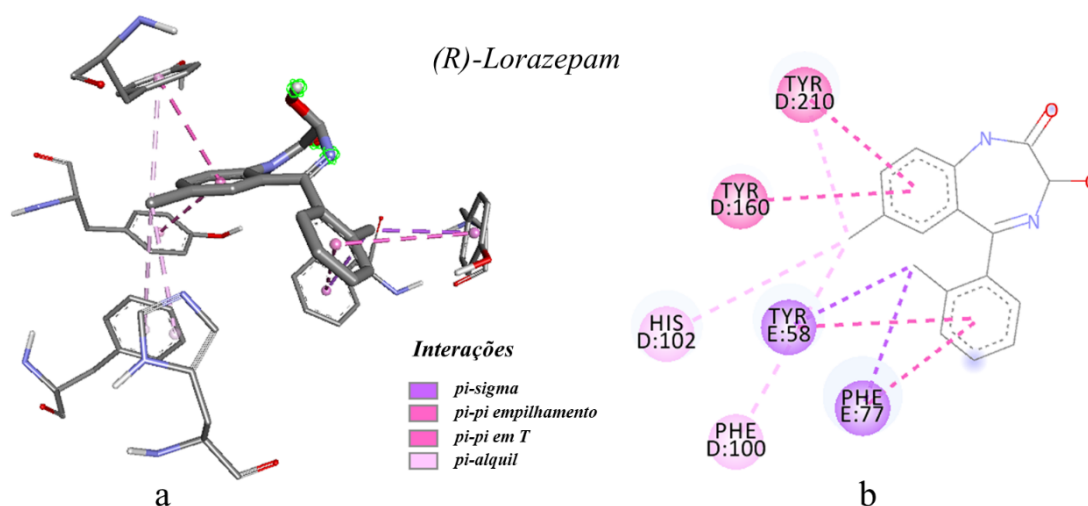


Figura 3 Pose para a estrutura mais estável (obtida por docking) do *(R)*-LoraZPM (**a** em 3D e **b** em 2D), no sítio ativo da proteína GABA_A, em interação com resíduos.

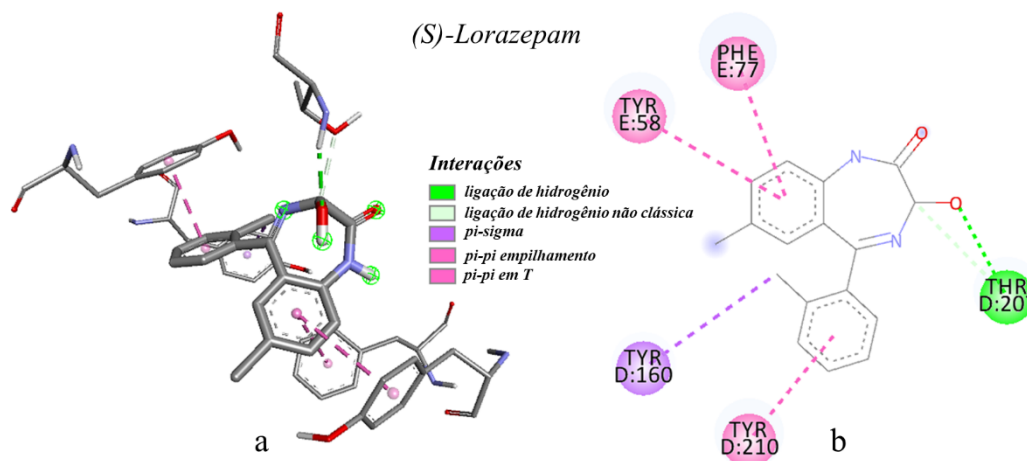


Figura 4 Pose para a estrutura mais estável (obtida por docking) do *(S)*-LoraZPM (**a** em 3D e **b** em 2D), no sítio ativo da proteína GABA_A, em interação com resíduos.

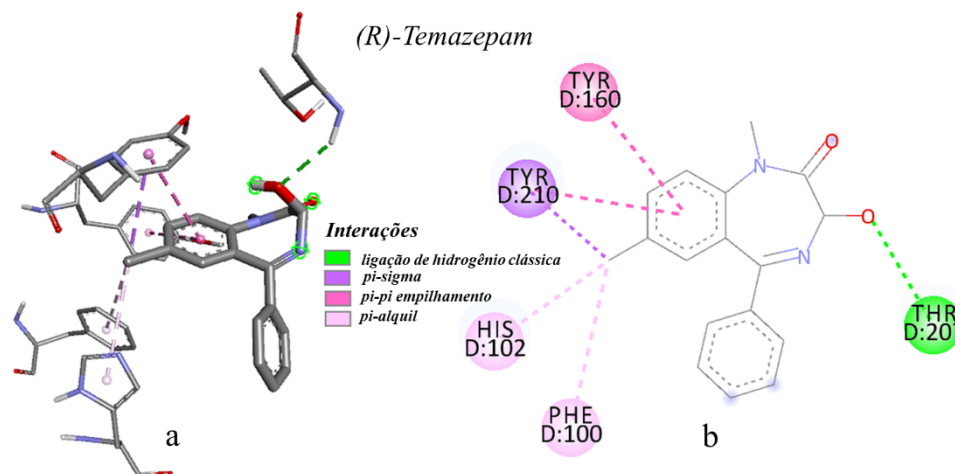


Figura 5 Pose para a estrutura mais estável (obtida por docking) do *(R)*-TemaZPM (**a** em 3D e **b** em 2D), no sítio ativo da proteína GABA_A, em interação com resíduos.

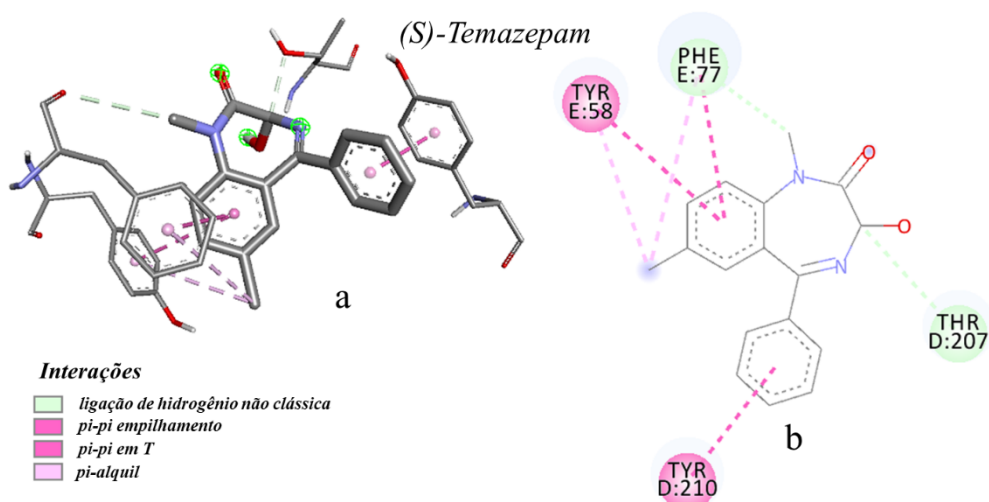


Figura 6 Pose para a estrutura mais estável (obtida por docking) do *(S)*-TemaZPM (**a** em 3D e **b** em 2D), no sítio ativo da proteína GABA_A, em interação com resíduos.

Analisando as interações detectadas, podemos sugerir que parte do sítio ativo do GABA_A compreende os resíduos de aminoácidos Tyr(E)58, Phe(E)77, Phe(D)100, His(D)102, Tyr(D)160, Thr(D)207 e Tyr(D)210; dos quais apenas o resíduo Tyr(D)210 é comum a todas as interações aqui expostas.

Para os enantiômeros do LoraZPM, é possível verificar os resíduos em comum são Tyr(E)58, Phe(E)77, Tyr(D)160 e Tyr(D)210; e apesar de apresentar um menor número de interações em comparação ao seu enantiômero, a presença da ligação de hidrogênio

envolvendo o resíduo Thr(D)207 e o grupo C*-OH garante maior constante de complexação para o (S)-LoraZPM.

Constatação semelhante pode ser feita para o TemaZPM, cuja presença da ligação de hidrogênio envolvendo o resíduo Thr(D)207 e o grupo C*-OH favorece a complexação GABA_A-(R)-TemaZPM, em comparação ao seu enantiômero (S)-TemaZPM.

Para verificar a possibilidade de ocorrência de racemização dos fármacos in vivo, realizamos cálculos de BOMD para um sistema contendo vinte e uma moléculas: uma molécula de lorazepam, dezenove moléculas de água e uma molécula de hidrônio. A evolução temporal do sistema pode ser visualizada na Figura 7.

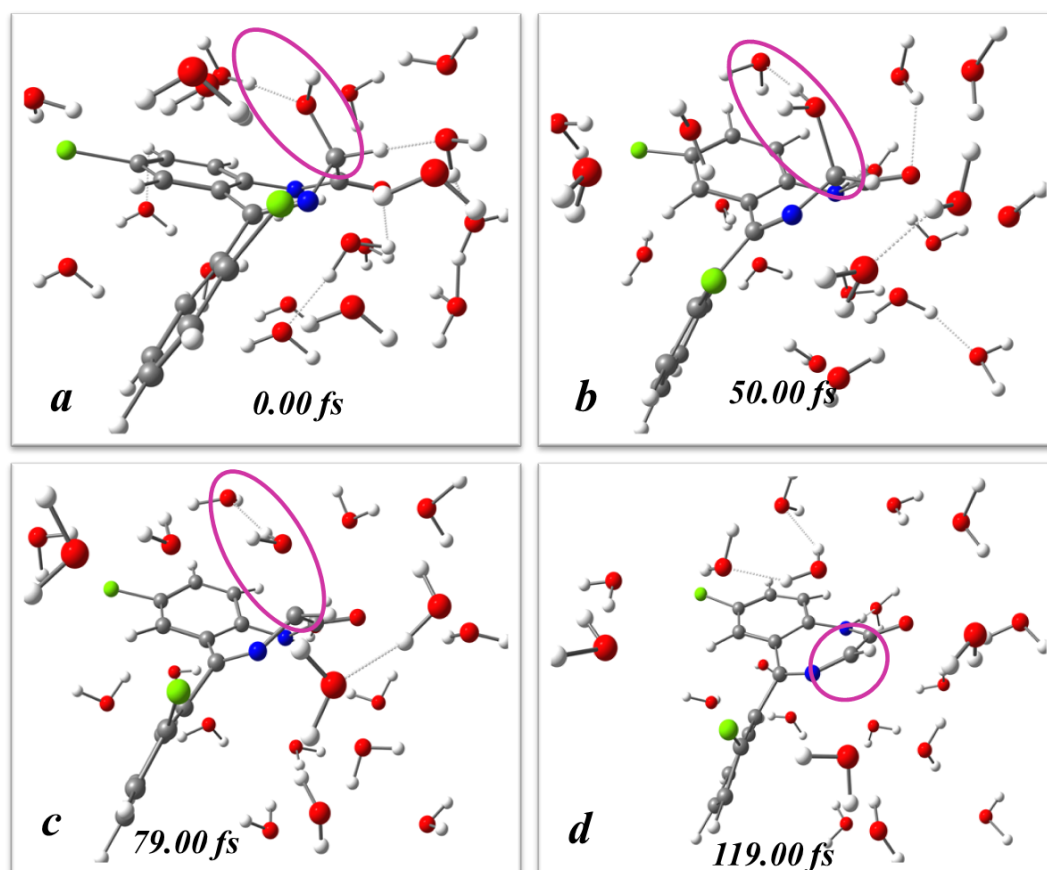


Figura 7 Evolução temporal da hidrólise do (R)-LoraZPM.

Com o avanço do tempo, é observada a protonação do grupo hidróxi ligado ao átomo de carbono assimétrico do (R)-LoraZPM. Como pode ser verificado na Figura 7a, o sistema molecular (R)-LoraZPM evolui estruturalmente à medida que estabelece ligação de hidrogênio com o fragmento C*-OH (Figura 7b); em seguida, este mesmo grupo é hidrolisado



(Figura 7c) e dá origem a um carbocátion (Figura 7d). A geração deste carbocátion é uma característica de uma reação de mecanismo S_N1 , cuja estereoquímica (para sistemas quirais) conduz à geração de racemato.

Conclusões

Nossa pesquisa revelou, através de dinâmica quântica, que há possibilidade de rápida racemização de benzodiazepinas em ambiente biológico. Ao mesmo tempo, foi verificado que as atividades dos enantiômeros são similares. Dessa forma, ambas as formas R e S podem interagir satisfatoriamente com a proteína GABA_A.

As semelhanças entre as atividades das espécies, majoritariamente, se devem à presença da ligação de hidrogênio envolvendo o resíduo Thr(D)207 e o grupo C*-OH para todas as espécies aqui investigadas.

REFERÊNCIAS

1. WICK, J. Y. **The History of Benzodiazepines**. Consult. Pharm., v. 28, n. 9, p. 538–548, 2013. DOI: 10.4140/TCP.n.2013.538.
2. EASSON, L. H.; STEDMAN, E. **Studies on the Relationship Between Chemical Constitution and Physiological Action: Molecular Dissymmetry and Physiological Activity**. Biochem. J., v. 27, n. 4, p. 1257–1266, 1933. DOI: 10.1042/bj0271257.
3. NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. **Chiral Drugs: An Overview**. Int. J. Biomed. Sci., v. 2, n. 2, p. 85–100, 2006.
4. CROM, W. R. **Effect of Chirality on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**. Am. J. Hosp. Pharm., v. 49, n. 9, Suppl. 1, p. S9–S14, 1992. DOI: 10.1093/ajhp/49.9_Suppl_1.S9.
5. HOK, L.; BOŽIČEVIĆ, L.; SREMEC, H.; ŠAKIĆ, D.; VRČEK, V. **Racemization of Oxazepam and Chiral 1,4-Benzodiazepines: DFT Study of the Reaction Mechanism in Aqueous Solution**. Org. Biomol. Chem., v. 17, p. 1471–1479, 2019.
6. PHAM-HUY, C.; VILLAIN-PAUTET, G.; HUA, H.; CHIKHI-CHORFI, N.; GALONS, H.; THEVENIN, M.; CLAUDE, J.-R.; WARNET, J.-M. **Separation of Oxazepam, Lorazepam, and Temazepam Enantiomers by HPLC on a Derivatized Cyclodextrin-Bonded Phase: Application to the Determination of Oxazepam in Plasma**. J. Biochem. Biophys. Methods, v. 54, n. 1–3, p. 287–299, 2002.
7. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION — FDA. **Development of New Stereoisomeric Drugs**. Center for Drug Evaluation and Research, 1992.



8. SCHOETZ, G.; TRAPP, O.; SCHURIG, V. **Dynamic Micellar Electrokinetic Chromatography: Determination of the Enantiomerization Barriers of Oxazepam, Temazepam, and Lorazepam.** Anal. Chem., v. 72, n. 13, p. 2758–2764, 2000.
9. PAPINI, O.; BERTUCCI, C.; PEREIRA DA CUNHA, S.; GUINAIM DOS SANTOS, N. A.; LANCHOTE, V. L. **Quantitative Assay of Lorazepam and Its Metabolite Glucuronide by Reverse-Phase Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry in Human Plasma and Urine Samples.** J. Pharm. Biomed. Anal., v. 40, n. 2, p. 389–396, 2006. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.07.033.
10. NOGUEIRA, C. E. R.; BARBOSA, D. M.; OLIVEIRA, V. M. **Breve panorama do uso dos benzodiazepínicos.** In: RAMALHO, E. (Ed.). Pesquisas em Temas de Ciências Médicas. v. 4, p. 23–32, 2025. DOI: 10.46898/rfb.7a6fc900-d42d-4dad-86a7-93326dad2d63.
11. WADDINGTON, J. L.; OWEN, F. **Stereospecific Benzodiazepine Receptor Binding by the Enantiomers of Oxazepam Sodium Hemisuccinate.** Neuropharmacology, v. 17, n. 3, p. 215–216, 1978. DOI: 10.1016/0028-3908(78)90103-X.
12. FELL, A. F.; NOCTOR, T. A.; MAMA, J. E.; CLARK, B. J. **Computer-Aided Optimisation of Drug Enantiomer Separation in Chiral High-Performance Liquid Chromatography.** Journal of Chromatography, v. 434, n. 2, p. 377–384, 1988. DOI: 10.1016/S0378-4347(88)80004-5.
13. ZHU, S.; NOVIELLO, C. M.; TENG, J.; WALSH, R. M.; KIM, J. J.; HIBBS, R. E. **Structure of a Human Synaptic GABAA Receptor.** Nature, v. 559, p. 67–72, 2018.
14. RCSB PROTEIN DATA BANK. **Protein Data Bank.** Acesso em: 27 jun. 2020.
15. TROTT, O.; OLSON, A. J. **AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading.** J. Comput. Chem., v. 31, p. 455–461, 2010.
16. MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. **AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility.** J. Comput. Chem., v. 30, p. 2785–2791, 2009.
17. DRUGBANK. **DrugBank Database.** Acesso em: 27 jun. 2020.
18. CHEMAXON. MarvinSketch, ChemAxon.
19. FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09.** Wallingford: Gaussian, Inc., 2009.
20. BANNWARTH, C.; EHLERT, S.; GRIMME, S. **GFN2-xTB—An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions.** J. Chem. Theory Comput., v. 15, p. 1652–1671, 2019.
21. BANNWARTH, C.; CALDEWEYHER, E.; EHLERT, S.; HANSEN, A.; PRACHT, P.; SEIBERT, J.; SPICHER, S.; GRIMME, S. **Extended Tight-Binding Quantum Chemistry Methods.** WIREs Comput. Mol. Sci., v. 11, e1493, 2021.



22. HELGAKER, T.; UGGERUD, E.; JENSEN, H. J. A. **Integration of the Classical Equations of Motion on Ab Initio Molecular Potential Energy Surfaces Using Gradients and Hessians: Application to Translational Energy Release upon Fragmentation.** *Chem. Phys. Lett.*, v. 173, p. 145–150, 1990.
23. UGGERUD, E.; HELGAKER, T. **Dynamics of the Reaction $\text{CH}_2\text{O} + \text{H} \rightarrow \text{CHO}^+ + \text{H}_2$: Translational Energy Release from Ab Initio Trajectory Calculations.** *J. Am. Chem. Soc.*, v. 114, p. 4265–4268, 1992.
24. VANDEVONDELE, J.; KRACK, M.; MOHAMED, F.; PARRINELLO, M.; CHASSAING, T.; HUTTER, J. **Quickstep: Fast and Accurate Density Functional Calculations Using a Mixed Gaussian and Plane Waves Approach.** *Comput. Phys. Commun.*, v. 167, p. 103–128, 2005.
25. STEWART, J. J. P. **Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements.** *J. Mol. Model.*, v. 13, p. 1173–1213, 2007.
26. STEWART, J. J. P. **Optimization of Parameters for Semiempirical Methods VI: More Modifications to the NDDO Approximations and Re-Optimization of Parameters.** *J. Mol. Model.*, v. 19, p. 1–32, 2013.
27. EVANS, D. J.; HOLIAN, B. L. **The Nosé–Hoover Thermostat.** *J. Chem. Phys.*, v. 83, p. 4069–4074, 1985.
28. NOSÉ, S. **A Unified Formulation of the Constant Temperature Molecular Dynamics Methods.** *J. Chem. Phys.*, v. 81, p. 511–519, 1984.
29. HOOVER, W. G. **Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions.** *Phys. Rev. A*, v. 31, p. 1695–1697, 1985.
30. TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. **Virtual Computational Chemistry Laboratory—Design and Description.** *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, v. 19, p. 453–463, 2005.
31. DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA. **BIOVIA Discovery Studio Visualizer.** San Diego: Dassault Systèmes BIOVIA Corp., 2020.