Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da
Hidroxizina e obtenção do metabólito quiral e ativo Cetirizina**

Simone Silveira Fortes

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da hidroxizina e obtenção do metabólito quiral e ativo cetirizina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientado: Simone Silveira Fortes

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO - SP
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Fortes, Simone Silveira

Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da hidroxizina e obtenção do metabólito quiral e ativo cetirizina. Ribeirão Preto, 2013.
102 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: De Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes.

1. Análise Estereosseletiva. 2. Biotransformação. 3. Cetirizina. 4. DLLME. 5. Hidroxizina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fortes, Simone Silveira

Título: Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da hidroxizina e obtenção do metabólito quiral e ativo cetirizina

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

:

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus
pais, Aristides e Maria
Corina, e ao meu namorado
Felipe por todo amor, carinho,
paciência e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Dr. Anderson R. M. de Oliveira, pelo privilégio em ser sua orientada, pelos ensinamentos e convívio com uma das pessoas mais justas e competentes que tive o prazer de conhecer. Desejo muita saúde, paz e alegria para ti e tua família. Muito obrigada!

Aos colegas do laboratório LABMETS pelo auxílio e amizade;

Aos meus familiares, ao meu cunhado Thiago e minhas irmãs Vanessa e Andressa;

Aos meus amigos, em especial Cida, Fátima e José Carlos, pelo carinho e compreensão;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido;

A todos aqueles que de alguma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito Obrigada!

RESUMO

FORTES, S. S. **Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da hidroxizina e obtenção do metabólito quiral e ativo cetirizina**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Modelos microbiológicos tem sido usado na biotransformação de fármacos para a obtenção de metabólitos. Fungos de diversos gêneros têm sido amplamente utilizados para mimetizar o metabolismo hepático de mamíferos. O uso de fungos é vantajoso uma vez que apresentam um crescimento rápido e de fácil formação do sistema multienzimático. Além disso, hoje, a biotransformação é considerada como uma tecnologia econômica e competitiva, na busca de novas rotas de produção farmacêutica e de compostos agrotóxicos. Em muitos casos a transformação biológica é enantiosseletiva, permitindo a produção de enantiômeros puros a partir de misturas racêmicas. Devido à ausência de um método de extração com baixo consumo de solventes orgânicos para a determinação enantiosseletiva da hidroxizina (HZ) e cetirizina (CTZ), foi desenvolvido um método que combina a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e eletroforese capilar (CE) para estudar a biotransformação enantiosseletiva da HZ pelos fungos *Penicillium crustosum*, *Mucor rouxii*, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 10028, *Nigrospora sphaerica* e *Fusarium oxysporum*. Um método por CE foi desenvolvido para a análise enantiosseletiva da hidroxizina e cetirizina em meio de cultura Czapek. As análises por CE foram realizadas utilizando um capilar de sílica fundida não revestida, 50 mmol L⁻¹ de borato de sódio como solução tampão de análise (pH 9,0) contendo 0,8% p/v de ciclodextrina-β-sulfatada como seletor quiral. A tensão aplicada e temperatura foram de +6 kV e 15 °C, respectivamente. O detector UV foi ajustado no comprimento de onda 214 nm. As condições da DLLME envolvidas foram: clorofórmio (300 µL) como solvente extrator, etanol (400 µL) como solvente dispersante. Após a formação da solução turva, as amostras foram submetidas a agitação por vórtex durante 30 segundos a 2000 rpm e centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm. As recuperações foram na faixa de 87,4 – 91,7%. O método se mostrou linear na faixa de concentração 250 – 12500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da HZ (r > 0.998) e de 125 – 6250 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da CTZ (r > 0.998). Os limites de quantificação foram 125 e 250 ng mL⁻¹ para CTZ e HZ, respectivamente. Dentre os seis fungos estudados, três foram capazes de converter a HZ em CTZ enantiosseletivamente, especialmente o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028 que converteu 19% de (E1)-HZ em (S)-CTZ com excesso enantiomérico de 65%.

Palavras-chave: Análise Estereosseletiva, Biotransformação, Cetirizina, DLLME, Hidroxizina

ABSTRACT

FORTES, S. S. **Evaluation of fungi in the stereoselective biotransformation of hydroxyzine and obtention of the active and chiral metabolite cetirizine.** 2013. 103 f. Thesis (Master). Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Microbial models have been used in biotransformation studies of many drugs aiming their metabolite production. Fungi of various genera have been extensively used to mimic the mammals' hepatic metabolism. The use of fungi is advantageous because they present fast growth and easy formation of the multienzymatic system. Moreover, the biotransformation is, nowadays, considered an economically and competitive technology, in the search of new production routes for fine chemical, pharmaceutical and agrochemical compounds. In many cases, the biological transformation is enantioselective, allowing the production of pure enantiomers from racemic mixtures. In light of the above considerations and due to the absence of a low consuming organic solvent extraction method for the enantioselective determination of hydroxyzine (HZ) and cetirizine (CTZ), it was developed a method combining dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and capillary electrophoresis (CE) to study the enantioselective biotransformation of HZ through the fungi *Penicillium crustosum*, *Mucor rouxii*, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 10028, *Nigrospora sphaerica* e *Fusarium oxysporum*. A CE method was developed for the enantioselective analysis of hydroxyzine (HZ) and cetirizine (CTZ) in Czapek liquid culture medium. The CE analyses were performed using an uncoated fused-silica capillary and 50 mmol/L sodium borate buffer (pH 9.0) containing 0.8% (w/v) sulfated- β -cyclodextrin. The applied voltage and temperature used were +6 kV and 15 °C, respectively. The UV detector was set at 214 nm. The DLLME conditions involved: chloroform (300 μ L) as extraction solvent and ethanol (400 μ L) as dispersive solvent. After the formation of the cloudy solution, the samples were subjected to vortex agitation during 30 s at 2000 rpm and centrifugation for 5 min at 3000 rpm. The recoveries were in the range of 87.4 – 91.7%. The method was linear over the concentration range of 250 – 12500 ng/mL for each enantiomer of HZ ($r > 0.998$) and of 125 – 6250 ng/mL for each enantiomer of CTZ ($r > 0.998$). The quantification limits were 125 and 250 ng/mL for CTZ and HZ, respectively. Among the six studied fungi three were able to convert HZ to CTZ enantioselectively, especially the fungus *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B that converted 19% of (E1)-HZ to (S)-CTZ with an enantiomeric excess of 65%.

Keywords: Biotransformation, Cetirizine, DLLME, Enantioseparation, Hydroxyzine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de eletroforese capilar.....	3
Figura 2: Esquema mostrando o fluxo eletrosmótico.....	6
Figura 3: Perfil do fluxo eletrosmótico (A) e hidrodinâmico (B). (Adaptado de WEINBERGER, 2000a).....	6
Figura 4: Estruturas da α -CD, β -CD e γ -CD.....	9
Figura 5: Etapas do processo da DLLME. (A) Uma mistura apropriada do solvente dispersor e do solvente extrator é injetada rapidamente, com auxílio de uma seringa, na solução aquosa que se encontra em um tubo cônico de 10 mL. (B) Após leve agitação, uma solução turva ou ponto nuvem como também é chamado (solução aquosa/ solvente extrator/ solvente dispersor) com microgotas é formada. Este ponto nuvem proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator proporcionando assim, a rápida transição do analito da fase aquosa para a fase orgânica. O estado de equilíbrio na DLLME é alcançado rapidamente, resultando num tempo de extração muito curto, o que é uma vantagem notável da DLLME comparado com outras técnicas de microextração (REZAEI et al., 2006). (C) Após centrifugação, ocorre a sedimentação das microgotas formando uma fase sedimentada, (D) que é retirada com o auxílio de uma seringa e é efetuada a quantificação dos analitos pela técnica mais apropriada (REZAEI et al., 2010).....	12
Figura 6: Frequência de artigos publicados no período entre 2010 e 2012, para as principais técnicas de microextração por solventes. (DLLME) microextração líquido-líquido dispersivo, (HFME) microextração com fibra oca, (SDME/HS-SDME) microextração em gota suspensa, (LLME/LLLME) microextração líquido-líquido / microextração líquido-líquido-líquido. (Adaptado de KOCUROVÁ et al., 2012).....	15
Figura 7: estrutura da hidroxizina. (*)centro quiral.....	17
Figura 8: Estrutura química da levocetirizina (<i>R</i>)-CTZ e dextrocetirizina (<i>S</i>)-CTZ	17
Figura 9: Sequência de justificativas na escolha entre o racemato (cetirizina) e seu eutômero (levocetirizina) Adaptado de TILLEMENT et al., 2003).....	18
Figura 10. Fungos estudados em meio de crescimento BDA e meio líquido Czapek.....	37

Figura 11. Estrutura química e valores de pK_a s referentes a (1) hidroxizina e (2) cetirizina.....	40
Figura 12. Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva da HZ (1 e 2) e CTZ (3 e 4) em diferentes pH da solução tampão borato de sódio 50 mmol L ⁻¹ . Condição de análise: solução tampão borato de sódio 50 mmol L ⁻¹ em vários pHs contendo 0,5% (p/v) de β -CD sulfatada. Tensão aplicada de +6 kV e temperatura de 20 °C.....	42
Figura 13. Influência da concentração do eletrólito (mmol L ⁻¹) na resolução. Demais condições de análise: solução tampão borato de sódio pH 9, tensão de +10 kV, 0,5% (p/v) de β -CD sulfatada, temperatura de análise de 20 °C. A concentração de cada enantiômero da hidroxizina e cetirizina na amostra analisada foi 5000 ng mL ⁻¹	44
Figura 14. Influência da concentração de β -CD sulfatada na resolução. Demais condições de análise: solução tampão borato de sódio 50 mmol L ⁻¹ pH 9, tensão +10 kV, temperatura de análise de 20 °C. A concentração de cada enantiômero da hidroxizina e cetirizina na amostra analisada foi 5000 ng mL ⁻¹	45
Figura 15: Influência da temperatura de análise na resolução. Demais condições de análise: tampão borato de sódio 50 mmol L ⁻¹ pH 9, tensão +10 kV e 0,8% (p/v) de β -CD sulfatada A concentração de cada enantiômero da hidroxizina e cetirizina na amostra analisada foi 5000 ng mL ⁻¹	46
Figura 16. Eletroferograma representativo da análise da HZ e CTZ empregando o método otimizado. Concentração dos analitos: 5000 ng mL ⁻¹ de risperidona (padrão interno) e 7500 ng mL ⁻¹ de cada um dos enantiômero da HZ e CTZ. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 22 cm efetivo x 75 μ m d.i., injeção hidrodinâmica, tampão tetraborato de sódio 50 mmol L ⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β -CD sulfatada, tensão de +6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1) risperidona, (2) (1)-HZ, (3) (2)-HZ, (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ.....	49
Figura 17. Seleção do solvente extrator na extração dos enantiômeros da HZ e CTZ em meio de cultura liquido Czapek. Condições de extração: volume do solvente extrator, 200 μ L; volume da amostra, 1 mL; volume do solvente dispersor (acetona), 500 μ L; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm.....	52
Figura 18. Seleção do solvente dispersor na extração dos enantiômeros da HZ e CTZ em meio de cultura liquido Czapek. Condições de extração: volume do solvente dispersor, 500 μ L; volume da amostra, 1 mL; volume do solvente extrator (clorofórmio), 200 μ L; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm.....	53

Figura 19. Avaliação do volume do solvente extrator na extração dos enantiômeros da HZ e CTZ em meio de cultura Czapek . Extração eficiente representada pela área dos picos. Condições de extração: solvente extrator, clorofórmio; volume da amostra, 1 mL; volume do solvente dispersor (etanol), 400 µL; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm..... **54**

Figura 20. Avaliação do volume do solvente extrator na extração dos enantiômeros da HZ e CTZ em meio de cultura Czapek. Condições de extração: solvente dispersor, etanol; volume da amostra, 1 mL; volume do solvente extrator (clorofórmio) 300 µL; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm..... **55**

Figura 21. Eficiência da extração no método da DLLME usando ponto nuvem (PN), ponto nuvem + vórtex (PN + VX), ponto nuvem + ultrassom (PN + US) e ponto nuvem + vórtex + ultrassom (PN + VX + US). Condições de extração: volume de amostra 1 mL, volume de solvente extrator (clorofórmio), 300 µL; volume de solvente dispersor (etanol), 400 µL; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm. Tempo de extração assistida: Vórtex durante 30 s e Ultrassom durante 5 min..... **56**

Figura 22. Eletroferogramas representativo dos enantiômeros da HZ a CTZ em meio de cultura Czapek após extração DLLME. (A) Meio de cultura Czapek fortificado com (1) padrão interno, (2) E1-HZ e (3) E2-HZ (7500 ng mL⁻¹), (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ (2500 ng mL⁻¹). (B) Meio de cultura Czapek sem adição dos analitos. Condições de análise: Tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C..... **62**

Figura 23. Eletroferogramas representativos das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos *Penicillium crustosum* (VR4), *Cunninghamella elegans* ATCC 8688 e *Cunninghamella elegans* ATCC 10028. Condições de análise: Tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C..... **63**

Figura 24. (A) Eletroferograma representativo da amostra de hidroxizina incubada com o fungo *Penicillium crustosum* (VR4) após 360 horas de incubação. (B) Meio de cultura Czapek contendo o fungo *Penicillium crustosum* sem adição da hidroxizina. Condições de análise: solução tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1) padrão interno, (2) E1-HZ, (3) E2-HZ, (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ..... **65**

Figura 25. (A) Eletroferograma representativo da amostra de hidroxizina incubada com o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894 após 360 horas de incubação. (B) Meio de cultura Czapek contendo o fungo *Mucor rouxii* sem adição da hidroxizina. As condições eletroforéticas foram: solução tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1) padrão interno, (2) E1-HZ, (3) E2-HZ, (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ..... 66

Figura 26. Gráfico de formação dos enantiômeros da cetirizina e decaimento da hidroxizina no estudo de biotransformação pelo fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894. As barras expressam o desvio padrão das replicatas (n = 3). (●) E1-HZ, (■) E2-HZ, (○) (S)-CTZ e (□) (R)-CTZ..... 67

Figura 27. (A) Eletroferograma representativo da amostra de hidroxizina incubada com o fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A após 360 horas de incubação. (B) Meio de cultura Czapek contendo o fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A sem adição da hidroxizina. Condições de análise: solução tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1) padrão interno, (2) E1-HZ, (3) E2-HZ, (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ..... 68

Figura 28. Perfil de formação dos enantiômeros da cetirizina e decaimento da hidroxizina pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A. As barras expressam o desvio padrão das replicatas (n = 3). (●) E1-HZ, (■) E2-HZ, (○) (S)-CTZ e (□) (R)-CTZ..... 69

Figura 29. (A) Eletroferograma representativo da amostra de hidroxizina incubada com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028 após 360 horas de incubação. (B) Meio de cultura Czapek contendo o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028 sem adição da hidroxizina. Condições de análise: solução tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1) padrão interno, (2) E1-HZ, (3) E2-HZ, (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ..... 70

Figura 30. Perfil de formação dos enantiômeros da cetirizina e decaimento da hidroxizina pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028. As barras expressam o desvio padrão das replicatas (n = 3). (●) E1-HZ, (■) E2-HZ, (○) (S)-CTZ e (□) (R)-CTZ..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos do emprego de fungos endofíticos em biotransformações esterosseletivas.....	22
Tabela 2. Composição do meio BDA.....	35
Tabela 3. Composição do meio pré-fermentativo malte.....	36
Tabela 4. Composição do meio fermentativo Czapek.....	36
Tabela 5: Influência da tensão aplicada (kV).....	48
Tabela 6. Condições eletroforéticas otimizadas para análise da HZ e CTZ.....	49
Tabela 7. Condições para o procedimento de preparação das amostras.....	57
Tabela 8. Linearidade do método para análise dos analitos em meio de cultura líquido Czapek e em pool de fungos.....	58
Tabela 9. Recuperação do método de DLLME para análise dos enantiômeros da hidroxizina e cetirizina.....	59
Tabela 10. Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva de hidroxizina e cetirizina.....	59
Tabela 11. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da hidroxizina em meio Czapek.....	60
Tabela 12. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da cetirizina em meio Czapek.....	61
Tabela 13. Estabilidade dos enantiômeros da hidroxizina e cetirizina nos ciclos congelamento/descongelamento e bancada por 12 h em meio de cultura Czapek.....	64
Tabela 14. Métodos de separação enantiomérica da HZ e CTZ.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BDA	Batata dextrose Ágar
CDs	Ciclodextrinas
CE	Eletroforese capilar
CG	Cromatografia gasosa
CM- β -CD	Carboximetil- β -CD
CV%	Coeficiente de variação percentual
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
E%	Erro relativo
EOF	Fluxo eletrosmótico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HP- β -CD	2-Hidroxipropil- β -CD
LLE	Extração líquido-líquido
p/v	Peso/volume
P.I.	Padrão interno
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rs	Resolução
S- β -CD	β -CD sulfatada
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
INTRODUÇÃO	1
1.1. Técnica de análise enantiosseletiva.....	2
1.1.1. Eletroforese Capilar (CE).....	2
1.1.2. Mobilidade eletroforética (μ_e)	4
1.1.3. Fluxo eletrosmótico (μ_{eo}).....	4
1.1.4. Modo de separação e aplicação em CE	7
1.1.5. Análise enantiosseletiva por CE	7
1.1.6. Aplicação de CE em análise farmacêutica.....	10
1.2. Técnica de Preparação de amostra: microextração líquido líquido dispersiva (DLLME).....	11
1.2.1. Princípios da DLLME	11
1.2.2. Parâmetros que afetam a eficiência da extração na DLLME	12
1.2.2.1. Seleção e volume do solvente extrator e dispersor	13
1.2.2.2. Tempo de extração	14
1.2.2.3. Adição de sal e pH.....	14
1.2.3. Vantagens e Desvantagens da DLLME	15
1.3. Fármaco selecionado.....	16
1.4. Estudo de biotransformação com fungos.....	19
OBJETIVOS.....	23
2. Objetivos Gerais.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Procedimento para separação dos analitos empregando eletroforese capilar.....	26
3.1.1. Materiais	26
3.1.1.1 Equipamentos.....	26
3.1.1.2. Reagentes e Solventes.....	26
3.1.1.3. Seletores quirais	27
3.1.1.4. Capilar	27
3.1.2. Métodos	28

3.1.2.1. Condicionamento do capilar	28
3.1.2.2. Avaliação dos seletores quirais empregados em CE.....	28
3.2. Otimização do procedimento de preparo da amostra empregando a DLLME	29
3.2.1. Avaliação do tipo e volume de solvente extrator e dispersor	29
3.2.2. Efeito do tempo de extração	30
3.2.3. Efeito do tempo de centrifugação	30
3.3. Validação do método para a análise da hidroxizina e cetirizina em meio de cultura Czapek	30
3.3.1. Soluções-padrão empregadas na validação do método	30
3.3.2. Parâmetros avaliados na validação do método	31
3.3.3. Linearidade	31
3.3.4. Limite de quantificação (LQ)	31
3.3.5. Precisão e Exatidão	32
3.3.6. Recuperação	32
3.3.7. Seletividade	32
3.3.8. Estabilidade	33
3.3.8.1. Ciclo de congelamento e descongelamento	33
3.3.8.2. Bancada por 12 horas.....	33
3.3.8.3. Condições de Biotransformação	33
3.3.8.4. Autoinjeter por 12 horas.....	34
3.4. Estudo de biotransformação da hidroxizina empregando fungos	34
3.4.1. Materiais	34
3.4.1.1. Reagentes	34
3.4.1.2. Equipamentos	35
3.4.1.3. Meios de cultura.....	35
3.4.1.4. Fungos empregados no estudo de biotransformação.....	36
3.4.2. Métodos	38
3.4.2.1. Procedimento de biotransformação	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Análise enantiosseletiva da hidroxizina e cetirizina por CE	40
4.1.1. Otimização da separação quiral.....	40
4.1.2. Influência do pH da solução na separação dos analitos	41
4.1.3. Influência da composição da solução de eletrólitos	43
4.1.4. Influência do tipo e concentração da ciclodextrina	44
4.1.5. Influência da temperatura do capilar	45
4.1.6. Dimensão do capilar	47
4.1.7. Influência da tensão aplicada	47

4.1.8. Otimização da detectabilidade do método	48
4.1.9. Condições eletroforéticas otimizadas	48
4.1.10. Determinação da ordem de migração	50
4.2. Desenvolvimento do procedimento de DLLME	50
4.2.1. Efeito do tipo de solvente extrator e dispersor	51
4.2.2. Efeito do volume do solvente extrator e dispersor	53
4.2.3. Efeito do tempo de extração	55
4.2.4. Parâmetros da centrifugação	56
4.2.5. Condições da extração otimizadas	57
4.3. Validação da metodologia para análise enantiosseletiva da HZ e CTZ em meio de cultura líquido	57
4.3.1. Linearidade	57
4.3.2. Recuperação	58
4.3.3. Limite de quantificação	59
4.3.4. Precisão e Exatidão	60
4.3.5. Seletividade	61
4.3.6. Estabilidade	63
4.4. Estudos de biotransformação enantiosseletiva da hidroxizina por fungos	64
4.4.1. <i>Penicillium crustosum</i> (VR4)	65
4.4.2. <i>Mucor rouxii</i> NRRL 1894	66
4.4.3. <i>Cunninghamella echinulata</i> var. <i>elegans</i> ATCC 8688A	67
4.4.4. <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 10028	69
CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	74

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Técnica de análise enantiosseletiva

1.1.1. Eletroforese Capilar (CE)

A descoberta de medicamentos é um processo interativo e de múltiplos estágios. Cada etapa do processo produz uma grande quantidade de amostras que, exigem rapidez nos dados analíticos com maior teor de informação. Neste contexto, técnicas de separação tornaram-se cada vez mais importantes, pois várias decisões são tomadas em cada etapa do processo, com base em resultados gerados por, uma ou várias, técnicas de separação (ESPADA; MOLINA-MARTIN, 2013). A eletroforese capilar (CE) é uma técnica analítica poderosa, veloz, eficaz, versátil e com exclusivo mecanismo de separação, que permite a separação e detecção de espécies iônicas com base nas suas diferentes velocidades de migração sob a influência de um campo elétrico aplicado (SUNTORN SUK, 2010). A CE tem muitas vantagens em comparação a outros métodos cromatográficos, tais como elevada eficiência de separação, curto tempo de análise, baixo custo, boa seletividade bem como, baixo consumo de amostra e solventes. Além disso, a separação simultânea de fármacos ácidos e básicos em CE é simples e eficiente (TABANI; FAKHARI; SHAHSAVANI, 2013; BAHGA; SANTIAGO, 2013). Assim, CE combinado com técnicas de microextrações podem proporcionar resultados ainda mais satisfatórios, livre de solventes orgânicos e sensíveis para determinação simultânea destes fármacos em amostras biológicas (KOHLENER et al, 2013).

A CE é descrita como uma técnica de alta eficiência nas separações de espécies carregadas em um tubo capilar estreito (25 -100 μm) preenchido com uma solução de eletrólitos. O uso de tubos com dimensões capilares minimiza as limitações relativas ao efeito Joule (calor causado pela passagem de corrente elétrica), pois a geometria do capilar favorece a dissipação do calor. Os componentes principais da CE são: uma fonte de alimentação de alta tensão, um capilar que passa através do centro óptico de um sistema de detecção ligado a um dispositivo de aquisição de dados, um sistema de introdução da amostra, e um

amostrador automático (ALTRIA, 1996; ESPADA; MOLINA-MARTIN, 2013). Um esquema típico de uma configuração do instrumento é apresentado na **Figura 1**.

Figura 1: Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de eletroforese capilar.

Primeiramente o capilar de sílica fundida é preenchido com a solução de eletrólitos. Em seguida, uma solução de amostra, na ordem de nanolitros, é introduzida em uma das extremidades do capilar (geralmente o ânodo). As extremidades dos capilares são em seguida mergulhadas em reservatórios contendo eletrodos de alta tensão e a solução de eletrólitos para completar o contato elétrico. Um eletrodo está ligado a um cabo condutor de alta tensão, enquanto que o outro (situado na extremidade do detector do capilar) está ligado a um cabo terra. Os eletrodos são compostos de um material inerte, como a platina. A aplicação de uma tensão através do capilar (por exemplo, 10 – 30 kV) causa movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos resultantes do movimento das espécies carregadas ao longo do capilar em direção ao eletrodo apropriado (NATISHAN, 2005; TAVARES, 1997). O gráfico gerado em CE é chamado de eletroferograma.

1.1.2. Mobilidade eletroforética (μ_e)

O movimento eletroforético ou mobilidade eletroforética é inerente à espécie iônica. Portanto, cátions migram em direção ao cátodo (eletrodo negativo) e os ânions migram em direção ao ânodo (eletrodo positivo). A mobilidade eletroforética depende da carga do soluto, do seu tamanho, ou seja, a relação carga/massa, e da viscosidade do meio (Equação 1). Assim, um íon pequeno se moverá mais rápido que um íon maior com a mesma carga (ALTRIA, 1996).

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi \eta r} \quad (1)$$

Onde: q = carga do íon

η = viscosidade da solução

r = raio do íon

A velocidade eletroforética de um íon sob a influência de uma tensão aplicada é determinada pela Equação 2.

$$V = \mu_e \times E \quad (2)$$

Onde: V = velocidade do íon

μ_e = mobilidade eletroforética

E = tensão aplicada (volts cm^{-1})

1.1.3. Fluxo eletrosmótico (μ_{eo})

Aplicação de tensão através de um capilar preenchido com a solução de eletrólitos provoca um fluxo da solução ao longo do capilar. Este fluxo eficaz bombeia íons do soluto ao longo do capilar. Este efeito ocorre em razão da ionização dos grupos silanóis ácidos (SiOH) presentes na parede interna do capilar quando em contato com a solução de eletrólitos. Em pH elevado, os grupos silanóis

se dissociam (SiO^-) e resultam numa superfície interna carregada negativamente. Para manter a neutralidade, uma camada de cátions provenientes da solução de eletrólitos migra para a parede do capilar formando uma camada fixa. Contudo, somente essa primeira camada não é suficiente para neutralizar os silanóis residuais. Dessa forma, uma segunda camada de cátions migra em direção a parede, formando uma camada difusa. Quando uma tensão é aplicada, estes cátions presentes na camada difusa migram para o cátodo. Os cátions solvatados pelas moléculas de água se movem em direção ao cátodo, provocando um fluxo de solução ao longo do capilar, considerado como uma "bomba elétrica". Esse movimento cria um fluxo uniforme da solução inteira na direção do cátodo, chamado de fluxo eletrosmótico (*Electroosmotic Flow*, EOF). A magnitude do fluxo eletrosmótico pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade, segundo as Equações 3 e 4 e está associada com a viscosidade do meio, a constante dielétrica da solução de eletrólitos e o potencial zeta da parede do capilar (ALTRIA, 1996; WEINBERGER, 2000a; WANG, 2007).

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \xi}{\eta} \quad (3)$$

$$V_{eo} = \mu_{eof} \times E \quad (4)$$

onde: V_{eo} = velocidade do EOF;

ε = constante dielétrica;

ξ = potencial zeta;

η = viscosidade;

E = potencial aplicado;

μ_{eof} = mobilidade do EOF

O potencial zeta (ξ) é essencialmente determinado pela carga da superfície na parede do capilar (a carga é dependente do pH). Quando uma diferença de potencial (ddp) é aplicada, estes íons e suas moléculas solvatadas com água migram em direção ao cátodo. A magnitude do fluxo eletrosmótico é altamente dependente do pH da solução de eletrólitos, uma vez que o potencial zeta é fortemente regulada pela ionização dos silanóis ácidos. Em pH abaixo de 4, o EOF é pouco significativo devido a pequena ionização. Acima de pH 9, as silanóis estão

completamente ionizado e EOF é intenso. A presença do EOF permite a separação e detecção de cátions e ânions dentro de uma única análise. Em pH acima de 7,0 o EOF é suficientemente forte, conseguindo assim, arrastar ânions para o cátodo independente da carga dos mesmos. (ALTRIA, 1996; WEINBERGER, 2000a). Uma característica única do EOF no capilar é o perfil plano do fluxo (**Figura 2**).

Figura 2: Esquema mostrando o fluxo eletrosmótico.

Em HPLC, o uso de bombas produz um perfil laminar do fluxo, o que pode ocasionar o alargamento das bandas. Em CE, a velocidade uniforme dos solutos através do capilar causa menor dispersão da amostra e por isso o fluxo apresenta um perfil plano (**Figura 3**), otimizando a eficiência do método (WEINBERGER, 2000a).

Figura 3: Perfil do fluxo eletrosmótico (A) e hidrodinâmico (B). (Adaptado de WEINBERGER, 2000a).

1.1.4. Modo de separação e aplicação em CE

Técnicas de eletromigração são muitas vezes consideradas métodos ideais para separações enantioméricas, devido à sua elevada seletividade de separação e flexibilidade (SCRIBA, 2011). O modo mais simples de CE é a eletroforese capilar de zona (CZE), em que uma solução de eletrólitos preenche um tubo capilar e os analitos são separados com base em suas razões massa-carga. A eletroforese capilar não-aquosa (NACE) é uma metodologia complementar a CZE e emprega solventes orgânicos em vez de água na solução tampão de análise. Isto aumenta a solubilidade de analitos hidrofóbicos e permite o ajuste da seletividade do método. A eletroforese capilar de afinidade (ACE) é uma técnica eletroforética de separação em capilares na qual substâncias capazes de interagir especificamente (muitas vezes bio-especificamente) com os analitos são adicionadas ao eletrólito de análise. A cromatografia eletrocinética é uma técnica de separação baseada na combinação de eletroforese e interações dos analitos com aditivos (por ex., tensoativos), de modo a formar uma fase dispersa que se mova com velocidade diferente do analito. De maneira a promover a separação, os analitos ou a fase dispersa devem possuir carga. Dessa maneira, a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) é um caso especial da cromatografia eletrocinética, em que a fase dispersa no capilar é micelar. Já a cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC) também é um caso especial da cromatografia eletrocinética, no qual uma microemulsão é empregada como fase dispersa. A focalização isoelétrica capilar (CIEF) é uma técnica eletroforética para separação de analitos anfóteros de acordo com seu ponto isoelétrico, através da aplicação de um campo elétrico ao longo de um gradiente de pH gerado no capilar (DA SILVA et al., 2007; AMIN et al., 2012; SUNTORNUSUK, 2010).

1.1.5. Análise enantiosseletiva por CE

Muitos compostos farmacêuticos possuem um ou mais centros quirais responsáveis pela atividade óptica do fármaco. Por essa razão, o desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos é necessário não somente para estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, mas também para estudos toxicológicos

(EECKHAUT; MICHOTE, 2006). Uma das vantagens da CE é a aplicabilidade na separação de uma grande variedade de compostos utilizando o mesmo instrumento, muitas vezes o mesmo capilar, mudando somente a composição da solução de eletrólitos. Para análise de compostos quirais pode ser adicionados aditivos (seletores quirais) à solução de eletrólitos. As CDs, os derivados de éteres coroa, proteínas, oligossacarídeos lineares, sais biliares e alguns antibióticos macrocíclicos são alguns dos seletos quirais usados em CE (TAVARES, 1997; ALI; KUMERER; ENEIN, 2006). Separações enantioméricas em CE baseiam-se no reconhecimento estereosseletivo dos enantiômeros pelo seletor quiral, formando complexos diastereoisoméricos transitórios que possuem mobilidades diferentes, os quais chegarão em diferentes tempos no detector, proporcionando dessa forma a separação dos enantiômeros. A diferença nas mobilidades dos analitos livres e complexados é um pré-requisito para a separação e, diferença nas constantes de ligação dos enantiômeros ao seletor quiral é geralmente necessário para a separação enantiomérica (AMIN et al., 2012; GÜBITZ; SCHMID, 2008).

Devido ao grande êxito obtido nas separações enantioméricas, as ciclodextrinas (CDs) são os seletos quirais mais utilizados em separação enantiosseletiva por eletroforese capilar. O uso das CD possui vantagem como, transparência no UV, bem como, o fato de muitos derivados serem comercialmente disponíveis e poderem ser utilizados em eletrólitos aquosos ou não aquosos (SCRIBA, 2011). A principal vantagem do uso das ciclodextrinas são os inúmeros complexos de inclusão que essas podem formar com vários tipos de compostos. Vários estudos têm sido realizados no intuito de entender as estruturas do complexo analito-seletor e explicar fenômenos migratórios observados em CE. Estes estudos normalmente combinam experimentos da técnica de CE juntamente com técnicas espectroscópicas e/ou modelagem molecular (JÁC; SCRIBA, 2013). Uma das características mais importantes no complexo de inclusão são as operações simultâneas de diversas interações fracas entre analito-CD, que foram comprovadas por extensos estudos sobre o reconhecimento molecular por ciclodextrinas (GHOSH et al., 2013). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos preparados através da degradação enzimática do amido. Elas apresentam a forma de um cone truncado com uma cavidade hidrofóbica e extremidade hidrofílica devido à presença de grupos hidroxilas. Os principais tipos desses compostos são α -CD, β -CD e γ -CD (**Figura 4**). Essas CDs são consideradas ciclodextrinas nativas, sendo que a

diferença entre elas reside no número de unidades de glicose. A α -CD é composta de seis unidades, a β -CD é composta de sete unidades e a γ -CD é composta de oito unidades de glicose. O mecanismo de reconhecimento quiral é baseado na inclusão de uma parte hidrofóbica do analito na cavidade apolar da CD. Além disso, as interações hidrofílicas dos grupos polares do analito e os grupos hidroxila da superfície externa da CD também auxiliam no mecanismo de separação quiral (GÜBITZ; SCHMID, 2010). As forças que atuam entre as ciclodextrinas e as moléculas hóspedes incluem principalmente as interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligação de hidrogênio e efeitos eletrostáticos, através dos quais os enantiômeros e CDs formam complexos de inclusão com diferentes constantes de estabilidade (Lu; Chen, 2011).

Figura 4: Estruturas da α -CD, β -CD e γ -CD.

Apesar das três ciclodextrinas nativas apresentarem a mesma profundidade, elas possuem algumas propriedades físicas diferentes: largura da cavidade, solubilidade e massa molecular. Modificações químicas nas CDs nativas levaram a uma melhoria significativa em suas propriedades físico-químicas e habilidades de reconhecimento quiral. A primeira classe de CDs são as CDs neutras, tais como, heptakis (2,3,6-tris-*O*-metil- β -CD), (2,6-tris-*O*-metil- β -CD) e hidroxipropil- β -CD. As CDs modificadas surgiram a partir da tentativa de alterar ou melhorar suas estruturas

a fim de obter complexos de inclusão adequados a vários setores, como industrial, alimentício e farmacêutico, e assim um grande número de CDs modificadas tem sido sintetizada. As estratégias mais eficientes de separação por CE foram alcançadas com CDs carregadas, especialmente com as CDs sulfatadas, devido à ocorrência de interações iônicas adicionais que contribuem para o reconhecimento quiral. As CDs carregadas também aumentam a diferença de mobilidade entre o analito livre e o analito complexado, o qual permite uma ótima resolução em concentrações baixas de CD (MATTHIJS et al., 2004; SCRIBA, 2008; VENTURINI, 2008; CHANKVETADZE, 2009).

1.1.6. Aplicação de CE em análise farmacêutica

A CE é uma técnica poderosa e sua utilidade está crescendo na indústria farmacêutica. A separação enantiomérica de fármacos por CE relatadas na literatura podem ser divididas em três categorias principais: (1) separações enantioméricas de compostos racêmicos, a fim de estudar a capacidade de separação com seletos quirais ou em estudos de mecanismos de separação, (2) aplicações farmacêuticas, tais como separação de misturas racêmicas de enantiômeros para o desenvolvimento de ensaios e determinação de pureza enantiomérica, bem como análise e desenvolvimento de produtos farmacêuticos, e (3) separação enantiomérica de fármacos e seus respectivos metabólitos em meios biológicos a fim de realizar estudos farmacocinéticos (SCRIBA, 2011). O potencial da CE para análise farmacêutica foi bem explorada desde a década de 90. Muitas destas aplicações iniciais foram dedicadas para a análise de misturas bem caracterizadas, a maioria delas ocorrendo em fases posteriores ao processo de descoberta do fármaco e desenvolvimento. A CE é usada em análise de rotina, especialmente em análise de proteínas de soro e marcadores de doenças em muitos hospitais e clínicas. Na indústria farmacêutica, a CE tem sido usado para suportar todas as etapas de síntese química para a seleção de compostos, para o desenvolvimento de fármacos e controle de qualidade. Neste contexto, as várias aplicações incluem: perfil físico-químico, triagem de pK_a , triagem de Log P, triagem da atividade de enzima, descoberta quiral, metabolômica, dentre outras aplicações. (SEKHON, 2011; ESPADA; MOLINA-MARTIN, 2013; SUNTORN SUK, 2010).

1.2. Técnica de Preparação de amostra: microextração líquido líquido dispersiva (DLLME)

Essencialmente, cada método analítico inclui algum tipo de pré-tratamento de amostra com a finalidade de extrair e/ou pré-concentrar os analitos presentes na matriz de forma compatível com o sistema de detecção. Frequentemente, esta etapa de extração do analito da matriz consome a maior parte do trabalho analítico. A microextração é definida como uma técnica onde o volume da fase extratora é muito menor em relação ao volume da amostra, e a eficiência da extração é determinada pela partição dos analitos entre a matriz da amostra e a fase extratora (LORD; PAWLISZYN, 2000). Ao longo das duas últimas décadas, muitas técnicas de preparo de amostra ambientalmente sustentável têm sido propostas, com o objetivo de reduzir o uso de solventes orgânicos tóxicos ou substituindo-os por alternativas ambientalmente menos agressivas. Técnicas de microextração em que apenas uma pequena quantidade de solvente orgânico é utilizada possuem várias vantagens, incluindo o volume reduzido da amostra, tempo de análise e custo de operação. Usualmente, na eletroforese capilar não são necessários solventes orgânicos para análise. A combinação da CE e uma técnica de microextração é uma ferramenta analítica muito atrativa sendo considerada ambientalmente sustentável (KOHLENER; SCHAPPLER; RUDAZ, 2013). Atualmente um dos objetivos mais importantes da química analítica são a miniaturização e simplificação de todo o processo analítico para acelerar a fase de tratamento da amostra. Entre as diversas técnicas miniaturizadas desenvolvidas, uma das microtécnicas que vem atraindo com uma atenção especial, é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) introduzida por REZAEI e colaboradores em 2006 (HERRERA et al., 2010).

1.2.1. Princípios da DLLME

O princípio básico da técnica DLLME é a dispersão de um solvente extrator (imiscível em água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator (REZAEI et al., 2006). A DLLME é considerada uma miniaturização da LLE usando volumes de solvente extrator em escala de microlitros, o qual é baseado no processo de distribuição de equilíbrio dos

analitos de interesse entre solução de amostra e solvente extrator. O coeficiente de distribuição (K) é definido como a razão entre a concentração do analito na solução aquosa e solvente extrator. Esta técnica é aplicável para analitos com alta ou moderada propriedade lipofílica ($K > 500$). Quanto aos analitos ácidos ou alcalinos, o coeficiente de distribuição pode ser aumentado através do controle do valor do pH da solução da amostra, fazendo com que estes analitos se encontrem no estado não ionizado (ZANG et al., 2009). As etapas da DLLME estão ilustradas na **Figura 5**.

Figura 5: Etapas do processo da DLLME. (A) Uma mistura apropriada do solvente dispersor e do solvente extrator é injetada rapidamente, com auxílio de uma seringa, na solução aquosa que se encontra em um tubo cônico. (B) Após leve agitação, uma solução turva ou ponto nuvem como também é chamado (solução aquosa/ solvente extrator/ solvente dispersor) com microgotas é formada. Este ponto nuvem proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator proporcionando assim, a rápida transição do analito da fase aquosa para a fase orgânica. O estado de equilíbrio na DLLME é alcançado rapidamente, resultando em um tempo de extração muito curto, o que é uma vantagem notável da DLLME comparado com outras técnicas de microextração (REZAEI et al., 2006). (C) Após centrifugação, ocorre a sedimentação das microgotas formando uma fase sedimentada, (D) que é retirada com o auxílio de uma seringa e é efetuada a quantificação dos analitos pela técnica mais apropriada (REZAEI et al., 2010).

1.2.2. Parâmetros que afetam a eficiência da extração na DLLME

O processo de extração por DLLME é influenciado por alguns parâmetros, entre os quais volume e tipo de solvente extrator e de solvente dispersor, tempo de extração, força iônica e pH.

1.2.2.1. Seleção e volume do solvente extrator e dispersor

A seleção de um solvente extrator apropriado é um dos parâmetros mais importantes no processo de DLLME. Este solvente deve satisfazer duas condições: a primeira é ter a densidade do solvente extrator maior que a densidade da solução aquosa, para que possa possibilitar a separação da fase orgânica da fase aquosa após a centrifugação; e a segunda condição é a capacidade de extração do solvente extrator pelo analito de interesse e baixa solubilidade do solvente extrator em água. Os solventes usualmente selecionados como extratores, devido a sua alta densidade, são: clorofórmio, tetracloreto de carbono, diclorometano, clorobenzeno e dicloroetano ((REZAE et al., 2010; ANDRUCH et al., 2012; RODRÍGUEZ; BLANCO; CAMPAÑA, 2012). O volume do solvente extrator é selecionado em função do menor volume que possa obter um alto fator de enriquecimento (razão entre a concentração do analito na fase sedimentada e a concentração do analito inicial na amostra), e menor quantidade de solventes tóxicos (REZAE et al., 2010).

O solvente dispersor deve ser solúvel no solvente extrator e solúvel na solução aquosa, para permitir que o solvente extrator se disperse na fase aquosa e forme várias pequenas gotículas (ponto nuvem) aumentando assim, a área de contato entre as fases extratora e aquosa. Comparado com outros métodos, o aumento da área de contato entre as fases e velocidade de transferência de massa, aumenta, não somente, significativamente a eficiência, mas também resolve o problema de tempo gasto no preparo de amostra. Devido a baixa toxicidade e baixo custo, acetona, metanol, etanol e acetonitrila geralmente têm sido utilizados como solventes dispersores. Embora seja mais dispendioso e nocivo comparado a outros solventes dispersores, o tetraidrofurano (THF) pode constituir volumes líquidos maiores, proporcionando uma extração conveniente onde ocorre a redução de volume de solventes tóxicos como solventes extratores clorados (SARAFRAZ-YAZDI, 2010; KOHLER, 2013). O volume do solvente dispersor afetará diretamente a formação do ponto nuvem, o grau de dispersão do solvente extrator na solução aquosa e consequentemente na eficiência da extração (REZAE et al., 2010).

1.2.2.2. Tempo de extração

Na DLLME o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor e a centrifugação. Segundo REZAEE et al., 2006 o tempo de extração tem pouco efeito sobre a eficiência da extração. Este fato é explicado devido à área superficial entre as fases orgânica e aquosa serem infinitamente grande, atingindo assim, o estado de equilíbrio da transição do analito para outra fase quase instantaneamente. A DLLME assistida por vórtex e/ou ultrassom é uma etapa que vem sendo adicionada com sucesso no tempo de extração para se obter um aumento na eficiência da extração dos analitos (DARIAS et al., 2010; SHI; LEE, 2010).

1.2.2.3. Adição de sal e pH

Quando em uma matriz contém componentes lipofílicos, a natureza hidrofóbica dos solventes convencionais de extração da DLLME não é capaz de discriminar entre os analitos e as interferências, o que compromete a eficácia e a seletividade do processo. Alternativamente, a distribuição de equilíbrio do analitos entre a água e solvente extrator, poderia melhorar a seletividade da DLLME. Fatores, tais como o pH e força iônica, desempenham um papel crucial na eficiência da extração líquido-líquido (ZGOŁA-GRZÉSKOWIAKA; KACZOREKB, 2011). As solubilidades do analito de interesse e o solvente extrator na fase aquosa são diminuídas com o aumento da força iônica, o que é favorável para se obter altas recuperações. Contudo, com a diminuição da solubilidade do solvente extrator na fase aquosa, a fase sedimentada é aumentada, resultando em um decréscimo da concentração do analito e fator de enriquecimento (ZANG et al., 2009). Para compostos ionizáveis, a eficiência da DLLME poderia ser modulada por ajustes no pH da fase aquosa. Dessa maneira, a forma ionizada é solúvel em água dificultando sua passagem para a fase extratora, enquanto que a forma não ionizada é facilmente transferida para o solvente extrator. Dessa forma, o valor de pH é escolhido de forma a tornar o analito menos solúvel na fase aquosa (CAMPONE; PICCINELLI; RASTRELLI, 2012) .

1.2.3. Vantagens e Desvantagens da DLLME

A DLLME, como outras técnicas de microextrações, rapidamente chamou atenção de pesquisadores e tornou-se muito conhecida entre os químicos analíticos como evidenciado na **Figura 6**. Nessa figura pode ser observado o grande número de publicações em artigos e revisões envolvendo a DLLME (KOCUROVÁ et al., 2012).

Figura 6: Frequência de artigos publicados no período entre 2010 e 2012, para as principais técnicas de microextração por solventes. (DLLME) microextração líquido-líquido dispersivo, (HFME) microextração com fibra oca, (SDME/HS-SDME) microextração em gota suspensa, (LLME/LLLME) microextração líquido-líquido / microextração líquido-líquido-líquido. (Adaptado de KOCUROVÁ et al., 2012).

Em parte, isto ocorre por ser uma das mais recentes técnicas de microextração por solvente e, em parte, devido ao desenvolvimento de adequados líquidos iônicos para utilização na técnica (KOKOSA, 2012). As vantagens da DLLME em relação aos métodos convencionais de extração com solvente são a simplicidade de operação, baixo custo, rapidez, baixo consumo de solventes orgânicos, altas recuperações e fatores de enriquecimento juntamente com a compatibilidade com os métodos analíticos como CG (FARAJZADEH et al., 2009; LEONG; HUANG, 2009), HPLC (TIAN.; CHEN; BAI, 2012) e CE (MENG et al., 2011). No entanto, ao contrário de quase todos os outros métodos de microextração, a DLLME tem vantagens adicionais, como por exemplo, sua extração ser quase instantânea e possibilidade de alcançar recuperações do analito próximas a 100% (KOKOSA, 2012). Apesar das vantagens indubitáveis da DLLME, este método

também apresenta desvantagens, como por exemplo: a toxicidade dos solventes orgânicos utilizados, pois esta técnica é útil para analitos apolares que geralmente requerem solventes halogenados; a DLLME não é uma técnica seletiva, e os extratos das matrizes complexas podem não ser compatíveis com o processo da DLLME devido à interação dos componentes da matriz com o solvente extrator; outra desvantagem é a etapa da centrifugação necessária, de modo que o processo não pode ser totalmente automatizado (CAMPONE; PICCINELLI; RASTRELLI, 2012). Recentemente algumas soluções interessantes para estas desvantagens foram publicados para aumentar a aplicabilidade da DLLME. Existem métodos que utilizam dispositivos especiais que permite a utilização de solventes de baixa densidade (FARAJZADEH et al., 2009; HASHEMI et al., 2009), procedimentos baseados na solidificação de uma gota orgânica flutuante (LEONG; HUANG, 2008; CHANG et al., 2011). Outra solução foi proposta por CHEN et al., 2010 que fez o uso de um solvente para separação da solução turva sem a necessidade de centrifugação, denominada ST-DLLME (*Solvent Terminated*), procedimentos baseados no ajuste da densidade da mistura dos solventes (BALOGH et al., 2011) e procedimentos baseados na automatização da DLLME por análise de injeção sequencial (ANTHEMIDIS; LOANNOU, 2011).

1.3. Fármaco selecionado

A hidroxizina (HZ; **Figura 7**) é um fármaco anti-histamínico de longa duração e alta afinidade para os receptores H₁ da histamina. O bloqueio sobre estes receptores inibe a interação da histamina e suas consequentes ações sistêmicas. A HZ tem um centro quiral e pode existir nas formas enantioméricas (*R*) ou (*S*). O metabolismo do fármaco, mediado pelo citocromo P450-2D6, resulta em um metabólito principal e carboxilado (45%), com o nome de cetirizina (HAJIMOMENIAN et al., 2003; TEKES et al., 2011; JAVANBAKHTA, 2008).

Figura 7: estrutura química da hidroxizina. (*) centro quiral.

Cetirizina (CTZ), pertence à classe das piperazinas de segunda geração de anti-histamínicos. Devido à sua estrutura, a cetirizina insignificamente penetra no sistema nervoso central e tem menos efeitos anticolinérgicos, como por exemplo, boca seca, em comparação com outros anti-histamínicos. Este fármaco é empregado no tratamento de urticária sazonal, perene e rinite alérgica. A cetirizina também apresenta um centro quiral, apresentando dois enantiômeros. Esse medicamento é comercializado na forma de racemato (**Figura 8**) de (*R*)-CTZ (levocetirizina) e (*S*)-CTZ (dextrocetirizina) (GOLIGHTLY; GREOS, 2005; NICOLAS et al, 1999; KOWALSKI; PLENIS, 2007).

Figura 8: Estrutura química da levocetirizina (*R*)-CTZ e dextrocetirizina (*S*)-CTZ.

No entanto, a levocetirizina é o enantiômero mais ativo, com uma afinidade duas vezes maior para o receptor H1 comparado com o racemato (GILLARD et al., 2002). Em ensaios de ligação com receptores H1 humano, a levocetirizina demonstrou uma afinidade 2 vezes mais elevada, em comparação com a cetirizina, e uma afinidade aproximadamente 30 vezes mais elevada do que dextrocetirizina. Devido à flexibilidade conformacional e a formação de uma ligação intermolecular

iônica, a carga positiva e negativa, em parte, neutralizam-se, tornando a molécula mais lipofílica. A diferença de afinidades entre os dois enantiômeros é a principal causa de diferentes taxas de interação do receptor H1. Dessa forma, a levocetirizina apresenta uma meia vida muito mais longa do que a dextrocetirizina, devido seu maior grau de ligação a esse receptor. Assim, a atividade antagonista H1 da cetirizina é devido principalmente a levocetirizina, o que é considerado como sendo o enantiômero mais ativo (isto é, o eutômero), enquanto a dextrocetirizina é o enantiômero menos ativo (distômero) (Tillement et al, 2003). A decisão em comercializar a levocetirizina em vez do racemato baseia-se em critérios científicos e comerciais o qual foi demonstrado resumidamente por Tillement e colaboradores (2003) (**Figura 9**). Atualmente a levocetirizina já é comercializada na forma enantiômero puro.

Figura 9: Sequência de justificativas na escolha entre o racemato (cetirizina) e seu eutômero (levocetirizina) Adaptado de TILLEMENT et al., 2003.

Poucos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para determinação enantiosseletiva da HZ e CTZ em matriz biológica e análise por CE. A determinação enantiosseletiva do CTZ em matrizes biológicas foi realizada em plasma de ratos utilizando HPLC com detecção por UV (CHOI et al., 2000), em plasma, cérebro e sangue de roedor com detecção por espectrometria de massas (GUPTA et al., 2006; GUPTA et al., 2005). A determinação quiral da CTZ foi realizada também em plasma humano por CE, utilizando β -CD sulfatada como seletor quiral (CHOU et al., 2008). A análise simultânea enantiosseletiva da HZ e CTZ utilizando CE e maltodextrina como seletor quiral tem sido relatada (NOJAVAN; FAKHARI, 2011). Em suma, todos estes métodos são descritos na literatura com base no uso do processo de extração convencional, isto é, a extração líquido-líquido.

1.4. Estudo de biotransformação com fungos

Transformações microbianas de compostos orgânicos frequentemente têm aplicações práticas na síntese de medicamentos. A síntese de muitos compostos de difícil obtenção, por métodos químicos, pode ser realizada por tecnologia microbiana, assim há muitas vezes uma necessidade para a síntese de produtos farmacêuticos na biotransformação (PARSHIKOV; NETRUSOV; SUTHERLAND, 2012). Micro-organismos, especialmente fungos, tem sido considerado uma fonte importante de metabólitos ativos com atividade anti-bacteriana, anti-micótica e anti-viral (CHANDRA, 2012).

Cada medicamento antes de ser introduzido no mercado deve ser submetido a diversos procedimentos. O estudo do metabolismo dessas substâncias e sua toxicidade fazem parte destes procedimentos. Antes que o candidato a fármaco atinja ensaios clínicos e seja administrada em humanos, existe a fase de triagem pré-clínica. Esta fase nos dá informações sobre absorção, distribuição, metabolismo, excreção (PEKALA; KUBOWICZ; ŁAŻEWSKA, 2012).

Modelos microbiológicos podem constituir uma alternativa ou, pelo menos, um complemento para o uso de sistemas de origem animal, desde que possam mimetizar o metabolismo dos mamíferos e proporcionar todas as informações pertinentes sobre o destino metabólico do substrato em análise. (VENISETTY; CIDD, 2003; LOZADA et al., 2008;). Este modelo tem a vantagem de reduzir a

procura de animais, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento do fármaco. Além disso, oferece uma série de vantagens sobre o uso de animais em estudos de metabolismo, como: (1) ser simples e fácil, podendo ser preparado com baixo custo; (2) possibilidade do rastreio de um grande número de cepas; (3) muitas vezes, a concentração de metabólitos formados é alta, facilitando dessa forma a detecção, isolamento e identificação estrutural; (4) úteis nos casos em que regio- e estereoespecificidade é necessária; (7) a manutenção de culturas de micro-organismos é mais simples e mais barato do que de culturas de células ou de tecidos ou animais de laboratório; (8) facilidade de manipulação (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

A capacidade oxidativa e redutiva dos fungos, já são conhecidas há muito tempo e são utilizadas em reações preparativas. Modelos microbianos têm sido utilizados em estudos de biotransformação enantiosseletiva de muitos fármacos (BARTH et al., 2010; CARRÃO et al., 2011; BORGES et al., 2009; JESUS et al., 2011)). O uso de fungos é vantajoso uma vez que apresentam um crescimento rápido e de fácil formação do sistema multienzimático. Além disso, a biotransformação é, hoje, considerada por químicos orgânicos sintéticos como uma tecnologia econômica e competitiva, na busca de novas rotas de produção de produtos químicos, farmacêuticos e de compostos agroquímicos. Em muitos casos, a transformação biológica é enantiosseletiva, permitindo a produção de enantiômeros puros a partir de uma mistura racêmica (BORGES et al., 2007). O método descrito por Jesus et al. (2011) foi aplicado no estudo de biotransformação da risperidona utilizando o fungo filamentoso *Mucor rouxii*, este estudo mostrou que o fungo filamentoso foi capaz de metabolizar a risperidona enantiosseletivamente em seu metabólito ativo (-)-9-hidroxisperidona.

O fungo do gênero *Cunninghamella* contém espécies de importância para a micologia médica e em processos biotecnológicos. *Cunninghamella bertholletiae*, *C. elegans* e *C. echinulata* são as espécies mais comuns (KEUM; LEE; KIM, 2009; AMADIO; MURPHY, 2011). *Cunninghamella* tem propriedades específicas que fazem deste fungo ser muito útil em estudos de metabolismo de fármacos. Esta propriedade é a capacidade de metabolizar uma grande variedade de fármacos de maneira semelhante ao sistema de enzimático dos mamíferos e são úteis especialmente para as biotransformações de fármacos devido a regio- e estereoespecificidade de suas enzimas. Foi demonstrado que fungos do gênero

Cunninghamella tem enzimas que são sinônimos para os envolvidos na desintoxicação de xenobióticos em mamíferos. Além disso, há muitas evidências que esses fungos podem prever o destino de fármacos no organismo dos mamíferos (PRIOR et al., 2010; PEKALA; KUBOWICZ; ŁAŻEWSKA, 2012). Dessa maneira, os fungos do gênero *Cunninghamella* têm sido extensivamente utilizados para mimetizar o metabolismo hepático dos mamíferos. IBRAIM e EL-FERALY (1996) utilizaram os fungos *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans* e *Cunninghamella blakesleeana* na biotransformação do diclofenaco observaram a biotransformação do fármaco em dois metabólitos. A biotransformação da doxepina pelo fungo *Cunninghamella elegans* gerou doze metabólitos dos quais seis idênticos aos formados em mamíferos, demonstrando com esses resultados a aplicabilidade microbiológica empregando fungos (MOODY et al., 1999). Por sua vez, ZHANG et al., 2006, estudaram a biotransformação *Cunninghamella blakesleeana* e observaram a transformação da indometacina em três metabólitos, da mesma forma como acontece na biotransformação em mamíferos. FREITAG et al. (1997) demonstraram que o fungo *Cunninghamella echinulata* foi capaz de converter estereosseletivamente a mistura racêmica de mexiletina em hidroximetilmexiletina e p-hidroximexiletina. BOCATO et al. (2012) demonstrou que o fungo *Cunninghamella echinulata* foi capaz de biotransformar a risperidona no metabólito ativo (+)-9-hidroxisperidona, resultando em 100% de excesso enantiomérico e que o fungo *Cunninghamella elegans* foi também capaz de biotransformar estereosseletivamente a risperidona nos enantiômeros (+)- e (-)-9- hidroxisperidona em diferentes taxas.

Outros tipos de fungos, mais recentemente utilizado em procedimentos de biotransformação são os endofíticos. Estes microrganismos são encontrados em um momento particular, associados aos tecidos da planta hospedeira, tipicamente sem causar sintomas aparente de doença (TAN; ZOU, 2001). Fungos endofíticos fornecem uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos com estrutura única, incluindo alcaloides, benzopirranonas, flavonoides, ácidos fenólicos, quinonas, esteroides, e outros. Tais metabólitos bioativos encontram uma ampla aplicação como agroquímicos, antibióticos, antiparasitários, imunossupressores, antioxidantes e agentes anticancerígenos. A descoberta de novos metabólitos antimicrobianos de endófitos é uma alternativa importante para superar os níveis crescentes de resistência a fármacos por plantas e patógenos humanos. Considerando que apenas uma pequena quantidade de endófitos têm sido estudados, recentemente, vários

grupos de pesquisa têm sido motivados para avaliar e elucidar potencial destes micro-organismos aplicados em processos biotecnológicos focando na produção de compostos bioativos (MOLINA et al., 2012; SURYANARAYANAN, 2009).

Alguns exemplos de seu uso são apresentados na Tabela 1, como por exemplo, Carrão et al. (2011) descreveu um método aplicado para a determinação do albendazol sufóxido após o estudo de biotransformação empregando o fungo *Penicillium crustosum* (VR4). Este método mostrou que o fungo endofítico foi capaz de metabolizar o albendazol em (-)- albendazol sufóxido com um excesso enantiomérico de 50% após 96 horas de incubação.

Tabela 1. Exemplos do emprego de fungos endofíticos em biotransformações estereosseletivas (Adaptado de BARTH; T., 2012).

Fármaco	Fungo	Planta	Metabólito ^a	Referência
Ibuprofeno	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(+)-(S)-2-hidroxi-ibuprofeno	BORGES et al., 2011
	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	(+)-(S)-2-hidroxi-ibuprofeno	
Albendazol	<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(-)-albendazol sulfóxido	CARRÃO et al., 2011
Albendazol	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	(+)-albendazol sulfóxido	HILÁRIO et al., 2012
	<i>Pestalotiopsis foedans</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(+)-albendazol sulfóxido	
	<i>Papulaspora immersa</i>	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	(+)-albendazol sulfóxido	

^a Produto de biotransformação majoritário

OBJETIVOS

2. Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho é desenvolver uma nova metodologia analítica e estudar a biotransformação enantiosseletiva do fármaco hidroxizina em seu metabólito ativo cetirizina empregando fungos no processo. Para alcançar estes objetivos foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- a) Desenvolvimento de um método analítico para determinação enantiosseletiva da hidroxizina e cetirizina por eletroforese capilar (CE);
- b) Desenvolvimento de uma técnica de preparação de amostra miniaturizada para extração da hidroxizina e cetirizina de meio de cultura;
- c) Validação do método analítico para a determinação dos analitos em meio de cultura;
- d) Aplicação do método validado no estudo de biotransformação enantiosseletiva da hidroxizina empregando fungos no processo.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Procedimento para separação dos analitos empregando eletroforese capilar

3.1.1. Materiais

3.1.1.1 Equipamentos

As análises foram realizadas em um sistema de eletroforese capilar (CE) da marca Beckman Coulter Instruments, modelo P/ACE MDQ (Fullerton, CA, USA), equipado com amostrador automático com controle de temperatura, analisador e um detector por absorção no UV-VIS com arranjo de diodos. O equipamento foi controlado pelo *software* 32 Karat®, que também foi usado na aquisição e tratamento dos dados.

Os constituintes das soluções tampão foram pesados em balança analítica Ohaus, modelo Adventurer (Pine Brook, NJ, EUA). O peagômetro utilizado nas aferições de pH das soluções tampão foi da marca Thermo, Orion 420 A+ (Waltham, MA, EUA). Para degaseificação e dissolução dos solutos das soluções empregadas na análise eletroforética foi empregado um aparelho de ultrassom da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, SP, Brasil). Foi utilizado também um agitador Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil) na extração e homogeneização das amostras. Um sistema de purificação de água, Milli-Q plus da Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções aquosas.

3.1.1.2. Reagentes e Solventes

Os reagentes usados na preparação da solução de eletrólitos, no condicionamento dos capilares e nos procedimentos de extração foram: borato de sódio decaidratado obtido da J.T.Baker (Phillipsburg, New Jersey, EUA), hidróxido

de sódio obtido da Nuclear (Diadema, SP, Brasil), fosfato dissódico diidratado adquirido da Merck (Darmstadt, Germany) todos grau P.A.

A água utilizada na preparação da solução de eletrólito e no procedimento de lavagem dos capilares foi purificada pelo sistema Milli-Q Plus da Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA). As soluções usadas como eletrólito e nos ciclos de lavagem foram filtradas através de um filtro Millex-HA com poros de 0,45 μm , obtido da Millipore (Bedford, MA, USA).

As substâncias de referências *rac*-dicloridrato de hidroxizina (HZ), *rac*-dicloridrato de cetirizina (CTZ) e dicloridrato de levocetirizina foram obtidos da Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA). Risperidona, empregada como padrão interno, foi obtido da Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá). As soluções-padrão de HZ e CTZ utilizadas no trabalho foram preparadas na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de uma solução estoque preparada também em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} . A solução-padrão de risperidona foi preparada também em metanol na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 $^{\circ}\text{C}$ e protegidas da luz.

3.1.1.3. Seletores quirais

Foram avaliados três seletores quirais para a separação dos enantiômeros da hidroxizina e seu metabólito cetirizina objetivando obter uma resolução adequada no menor tempo de análise possível. As três CDs usadas foram:

- ✓ 2-Hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD), obtida da Aldrich (Saint Louis, MO, EUA);
- ✓ Carboximetil- β -CD (CM- β -CD), obtida da Fluka (Buch, Suíça);
- ✓ β -CD-sulfatada sódica (S- β -CD), Fluka (Buch, Suíça).

3.1.1.4. Capilar

Para as separações enantioméricas da HZ e CTZ, foi utilizado um capilar de sílica fundida revestida externamente por uma camada de poli-imida. O capilar empregado no desenvolvimento e otimização do método apresenta 75 μm de diâmetro interno 30,2 cm de comprimento total e 20 cm de comprimento efetivo. A

janela óptica de detecção ($\approx 0,5$ cm de comprimento) foi construída pela remoção do revestimento de poli-imida a 8 cm de uma das extremidades do capilar, através da aplicação de calor. Após aplicação de calor, a poli-imida foi removida com o auxílio de um algodão embebido em acetona.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Condicionamento do capilar

Antes do primeiro uso, os capilares novos foram condicionados por lavagem com solução de NaOH 1 mol L^{-1} durante 10 min, seguido de 10 min com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e finalizando com água ultrapura durante 10 min. No início de cada dia, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 10 min, seguido de uma etapa de lavagem com água ultrapura por 10 min.

Entre cada análise o capilar era condicionado por 2 min com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 2 min com água ultrapura e 2 min com o eletrólito de análise. Ao final das análises, o capilar era lavado com uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 10 min, seguido por uma etapa de lavagem com água ultrapura durante 10 min. Durante o armazenamento, as extremidades do capilar permaneceram imersas em água ultrapura.

3.1.2.2. Avaliação dos seletos quirais empregados em CE

A resolução dos analitos por eletroforese capilar foi avaliada empregando alíquotas de $50 \text{ }\mu\text{L}$ das soluções-padrão de hidroxizina e cetirizina na concentração de $200 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Após evaporação do solvente sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em $120 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e analisados por CE. Nesta etapa foram otimizadas várias condições e parâmetros do método, sendo esses: tipo de seletor quiral, concentração da solução de eletrólito de análise, pH de análise, pré-condicionamento do capilar, temperatura de análise, modo de injeção (tempo e pressão) e tensão aplicada.

3.2. Otimização do procedimento de preparo da amostra empregando a DLLME

Para otimização da DLLME, as análises foram realizadas fortificando-se 1 mL de meio de cultura líquido Czapek com 50 μL das soluções-padrão de HZ e CTZ na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em paralelo, 1 mL de meio de cultura líquido isendo dos fármacos também era processado sob as mesmas condições e análise, para verificar a presença de interferentes da matriz.

Os solventes (grau HPLC) empregados nos procedimentos da DLLME foram: acetonitrila, metanol e etanol obtidos da JT Baker (Phillipsburg, New Jersey, EUA), diclorometano e clorofórmio obtidos da Sigma (St. Louis, Missouri, USA), 1,1-dicloroetano adquirido da Fluka (Buchs, Switzerland) e tetracloreto de carbono obtido da Merck (Darmstadt, Germany). A acetona foi adquirida da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA).

Em todos os experimentos executados no desenvolvimento e otimização do procedimento de extração, o meio de cultura foi alcalinizado com solução tampão fosfato dibásico 0,25 mol L^{-1} (pH ajustado a 7,5 com uma solução de NaOH 1 mol L^{-1}), para manter os analitos na sua forma não dissociada, viabilizando a extração pelo solvente orgânico. Os dados obtidos foram plotados no programa GraphPrism versão 5.0, relacionando a área dos picos *versus* o parâmetro avaliado. Toda a otimização do processo foi realizada em quintuplicata.

3.2.1. Avaliação do tipo e volume de solvente extrator e dispersor

Para a escolha do solvente extrator foram realizados ensaios utilizando clorofórmio, diclorometano, dicloroetano e tetracloreto de carbono. Neste experimento, 200 μL de cada solvente extrator e um volume de 500 μL de acetona (solvente dispersor usado nesta etapa) foram avaliados. Para selecionar o volume do solvente extrator foram realizadas extrações com volumes de 100 a 500 μL , mantendo fixo o volume de 400 μL do solvente dispersor (etanol).

Para a seleção do solvente dispersor foram utilizados acetona, metanol, etanol e acetonitrila. Neste experimento foram utilizados 500 μL de cada solvente dispersor, mantendo constante o volume 200 μL de solvente extrator otimizado (clorofórmio). Para a escolha do volume do solvente dispersor os volumes variaram

entre 300 a 700 μL , fixando o volume de 300 μL de solvente extrator (clorofórmio). Todas as extrações foram submetidas ao mesmo procedimento de DLLME.

3.2.2. Efeito do tempo de extração

O tempo de extração é um dos parâmetros mais importantes em processos de extração. Na DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor, antes de iniciar a centrifugação (REZAEI *et al.*, 2006). Neste intervalo foi acrescentado, após a formação do ponto nuvem, uma agitação vigorosa da amostra por vórtex durante 30 segundos a 2000 rpm. Nesta etapa, os analitos foram extraídos em finas partículas de clorofórmio em poucos segundos.

3.2.3. Efeito do tempo de centrifugação

Na centrifugação, as microgotas do extrator dispersas na solução são sedimentadas no fundo do tubo cônico. Foi investigado a influência do tempo de centrifugação na recuperação dos analitos variando o tempo entre 5 e 15 minutos, com uma rotação fixa de 3000 rpm e temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}$.

3.3. Validação do método para a análise da hidroxizina e cetirizina em meio de cultura líquido Czapek

3.3.1. Soluções-padrão empregadas na validação do método

As soluções-padrão de *rac*-hidroxizina utilizadas na validação do método eletroforético foram preparadas em metanol, nas concentrações de 10, 40, 80, 120, 300, 400 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e soluções-padrão da *rac*-cetirizina nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Risperidona, usada como padrão interno, foi preparada na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 $^{\circ}\text{C}$ e protegidas da ação da luz.

3.3.2. Parâmetros avaliados na validação do método

O método foi validado conforme recomendações de guias oficiais (EMEA, 2011; ANVISA, 2012) pela avaliação dos seguintes parâmetros: recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, seletividade e estabilidade.

3.3.3. Linearidade

Uma vez que a otimização da DLLME foi realizada em meio de cultura líquido Czapek e, após a biotransformação por fungos, o meio de cultura pode apresentar características diferentes, devido à formação de metabólitos secundários, a linearidade foi realizada em duas matrizes diferentes. Portanto, a linearidade foi realizada em meio de cultura líquido Czapek e em uma associação de fungos (pool de fungos), que foi preparado na ausência dos analitos. A linearidade do método foi realizada em triplicata e os resultados foram ponderados empregando o peso $1/x^2$. Foram construídas duas curvas analíticas obtidas pela fortificação de 1 mL de meio de cultura líquido Czapek e de 1 mL de pool de fungos na concentração de 250-12500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da HZ e 125-6250 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da CTZ. A linearidade foi determinada avaliando coeficiente de correlação (r), a falta de ajuste e pela análise estatística de variância. O programa estatístico MINITAB Release versão 14.1 (State College, PA, EUA) foi utilizado para os cálculos estatísticos. Além disso, a inclinação (*slope*) das diferentes curvas analíticas, preparadas em meio de cultura Czapek e pool de fungos foram analisadas e comparadas.

3.3.4. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração de enantiômeros que pode ser determinada com exatidão, representada pelo erro relativo, e precisão, representada pelo desvio padrão relativo, inferiores a 20%, como recomendado pelo EMEA em seu "Guia de validação de métodos bioanalíticos". O LQ do método foi determinado fortificando 1 mL de meio de cultura

liquido Czapek ($n = 5$) com 250 e 125 ng mL⁻¹ de HZ e CTZ, respectivamente, e analisadas com base em uma curva analítica preparada simultaneamente.

3.3.5. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas através da avaliação da precisão e exatidão intraensaio e interensaio. Para isso foram empregadas amostras de meio de cultura Czapek fortificadas com os enantiômeros da CTZ nas concentrações de 125, 250, 1250 e 5000 ng mL⁻¹ e HZ nas concentrações de 250, 1000, 3000 e 10000 ng mL⁻¹ de cada enantiômero. Os resultados obtidos foram expressos como coeficiente de variação percentual (CV%) para a determinação da precisão e como erro relativo (E%) para a determinação da exatidão do método. O procedimento intraensaio foi realizado em um mesmo dia, em quintuplicata para cada concentração. Já, o procedimento interensaio, foi realizado em três dias consecutivos, também em quintuplicata para cada concentração.

3.3.6. Recuperação

Na determinação da recuperação absoluta do procedimento de extração, alíquotas de 1 mL de meio de cultura liquido Czapek foram fortificadas com cetirizina nas concentrações de 250, 1250 e 5000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero ($n = 3$) e 1000, 3000 e 10000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da hidroxizina ($n = 3$) e submetidas ao procedimento de DLLME. As áreas destas amostras foram comparadas com áreas obtidas por injeção direta de soluções-padrão, contendo a mesma quantidade de cada composto dissolvido em água. A recuperação foi expressa como porcentagem (%) da quantidade extraída.

3.3.7. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise de meio de cultura liquido Czapek estéril e meio de cultura liquido Czapek estéril incubado com os fungos estudados.

3.3.8. Estabilidade

3.3.8.1. Ciclo de congelamento e descongelamento

Para determinar a estabilidade das amostras sob ciclos de congelamento/descongelamento, três alíquotas ($n = 3$) de amostras preparadas em meio de cultura líquido Czapek nas concentrações de 250 ng mL⁻¹ (baixa) e 5000 ng mL⁻¹ (alta) de cada enantiômero da cetirizina e 250 (baixa) e 10000 ng mL⁻¹ (alta) de cada enantiômero da hidroxizina foram armazenadas a temperatura de -20 °C por 24 h e descongeladas após este período a temperatura ambiente. No momento em que estas amostras encontraram-se completamente descongeladas, as mesmas foram recongeladas a temperatura de -20 °C por 12h. Este ciclo de congelamento/descongelamento foi repetido por mais duas vezes e ao final do terceiro ciclo as amostras foram analisadas. As amostras submetidas a este procedimento foram quantificadas empregando uma curva analítica recém-preparada. Foram consideradas estáveis às amostras que apresentaram E% e CV% inferiores a 15%.

3.3.8.2. Bancada por 12 horas

Na determinação da estabilidade a temperatura ambiente por período de 12 h, três alíquotas ($n = 3$) de amostras preparadas em meio de cultura líquido Czapek nas concentrações baixa e alta descritas no item 3.3.8.1 foram mantidas a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por 12 h. Após este período, as amostras foram analisadas. As amostras submetidas a este procedimento foram quantificadas empregando uma curva analítica recém-preparada. Foram consideradas estáveis às amostras que apresentaram E% e CV% inferiores a 15%.

3.3.8.3. Condições de Biotransformação

Na determinação da estabilidade nas condições de biotransformação, uma alíquota de 5 mg de HZ dissolvido em água estéril foi adicionado ao frasco

empregado no procedimento de biotransformação contendo 100 mL de meio de cultura líquido Czapek ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero). Paralelamente foi determinada também a estabilidade da cetirizina, adicionando 1 mg em 100 mL de meio de cultura líquido Czapek ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero). Após essas amostras foram submetidos a mesma condição empregadas no procedimento de biotransformação (ver item 3.3.2.3). Durante o período de biotransformação (15 dias), alíquotas de 1 mL ($n = 3$) destas amostras foram coletadas no primeiro (dia 0) e último dia (dia 15) e posteriormente foram analisadas. As amostras submetidas a este procedimento foram quantificadas empregando uma curva analítica recém preparada. Foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram E% e CV% inferiores a 15%.

3.3.8.4. Autoinjeter por 12 horas

Para avaliar a estabilidade das amostras processadas e mantidas por 12 horas no autoinjeter, três alíquotas ($n = 3$) foram preparadas em meio de cultura líquido Czapek nas concentrações descritas no item 3.3.8.1. Estas amostras foram extraídas e acondicionadas nos recipientes do autoinjeter a temperatura ambiente. Após 12 horas essas amostras foram analisadas. As amostras submetidas a este procedimento foram quantificadas empregando uma curva analítica recém-preparada. Foram consideradas estáveis às amostras que apresentaram E% e CV% inferiores a 15%.

3.4. Estudo de biotransformação da hidroxizina empregando fungos

3.4.1. Materiais

3.4.1.1. Reagentes

O meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), assim como os componentes do meio malte (extrato de malte e triptona de soja) foram adquiridos da Acumedia

(Lansing, MI, EUA); a dextrose foi obtida da Dinamica (Diadema, SP, Brasil) e o extrato de levedura da Fluka (Buch, Suíça).

Os reagentes (grau P.A) utilizados no preparo do meio fermentativo Czapek foram sacarose e nitrato de sódio obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), fosfato de potássio dibásico obtido da Henrifarma (São Paulo, SP, Brasil), sulfato de magnésio heptaidratado, cloreto de potássio e sulfato de ferro (II) heptaidratado obtidos da Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.4.1.2. Equipamentos

A esterilização dos materiais e meios de cultura foi realizada em autoclave vertical Phoenix modelo AV 75 (Araraquara, SP, Brasil). A manipulação dos fungos foi conduzida em cabine de fluxo laminar vertical Pachane (Piracicaba, SP, Brasil) modelo 310. O cultivo dos fungos foi realizado em estufa de incubação bacteriológica modelo SL 101, marca Solab® (Piracicaba, SP, Brasil). O procedimento de pré-cultivo e biotransformação foi realizado em mesa agitadora (tipo “shaker”) com controle de temperatura da marca CIENTEC®, modelo CT-712RN (Piracicaba, SP, Brasil).

3.4.1.3. Meios de cultura

A composição dos meios de cultura de crescimento, pré-fermentativo e fermentativo são apresentadas nas tabelas a seguir:

Tabela 2. Composição do meio BDA.

Componente	g L ⁻¹
BDA	39
Água destilada	q.s.p.

Tabela 3. Composição do meio pré-fermentativo malte.

Composição	g L ⁻¹
Extrato de malte	10,0
Dextrose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Triptona de soja	5,0
Água destilada	q.s.p.

Tabela 4. Composição do meio fermentativo Czapek.

Composição	%
Sacarose	3,0
NaNO ₃	0,2
K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,05
KCl	0,05
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,001
Água destilada	q.s.p.

O pH foi ajustado para 5,0 com solução HCl 1 mol L⁻¹.

3.4.1.4. Fungos empregados no estudo de biotransformação

Os fungos utilizados nos experimentos de biotransformação foram *Mucor rouxii* NRRL 1894 obtido como uma cortesia do Dr. C.W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, ARS, USDA, Peoria, IL, USA) e pertencente a coleção de culturas de fungos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os fungos *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B foram adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA).

Os fungos endofíticos *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason (SS67) e *Fusarium oxysporum* (SS50) foram previamente isolados como endofíticos da planta *Smallanthus sonchifolius* (Gallo et al., 2009) enquanto o fungo *Penicillium crustosum*

(VR4) foi isolado da planta *Viguiera robusta*. Os fungos endofíticos e *Cunninghamella* são mantidos em discos de meio BDA, com 0,5 cm de diâmetro, imersos em solução estéril de glicerol 80% e armazenados a temperatura de -20 °C. Os fungos endofíticos estão estocados no "Laboratório de Química de Microorganismos-FCFRP/USP, Brasil. A **Figura 10** apresenta os fungos estudados nesse projeto.

Figura 10. Fungos estudados em meio de crescimento BDA e meio líquido Czapek

3.4.2. Métodos

3.4.2.1. Procedimento de biotransformação

Primeiramente foi realizada a transferência de três discos de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA contendo o micélio do fungo, com auxílio de alça de platina, para placas de petri com 9,0 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio BDA (Tabela 1). As placas inoculadas foram mantidas em estufa bacteriológica por um período de 7 dias, a temperatura de 30 °C, possibilitando o crescimento dos micro-organismos. O procedimento de biotransformação foi realizado em duas etapas (BORGES et al., 2007; BORGES et al., 2008). Na primeira etapa, chamada de pré-cultivo, três discos de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA contendo o fungo foram removidos das placas de Petri com auxílio de um *transfer tube* e assepticamente inoculados em tubos Falcon® de 50 mL contendo 20 mL de meio pré-fermentativo malte (Tabela 2). Os tubos Falcon® foram inocubados por 5 dias (120 h) a temperatura de 30 °C em incubadora com agitação orbital, a 125 rpm. Na segunda etapa, chamada de biotransformação, a massa micelial resultante e 5 mg de HZ (dissolvida em 1 mL de água) foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapek (Tabela 3). A mistura foi incubada por 15 dias a 30 °C, com agitação de 125 rpm. Alíquotas de 4 mL foram assepticamente coletadas, a cada 48 horas, e 1 mL foi submetido ao procedimento de DLLME e analisadas por CE.

Adicionalmente, foram realizados controles com meio de cultura líquido Czapek e meio de cultura líquido Czapek inoculados com os fungos utilizados no trabalho.

Os resultados de formação dos enantiômeros da cetirizina quando observado enantiosseletividade foram expressos como excesso enantiomérico (*ee*), determinado através da equação $ee = (A-B/A+B) \times 100$ (ALTRIA, 1996), onde A representa a concentração do enantiômero majoritário e B representa a concentração do enantiômero minoritário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise enantiosseletiva da hidroxizina e cetirizina por CE

4.1.1. Otimização da separação quiral

Para se obter a separação enantiomérica, foram consideradas as propriedades físico-químicas da hidroxizina e cetirizina como podemos observar na **Figura 11**. A hidroxizina é um composto básico que possui em sua estrutura duas funções ionizáveis, ou seja, um grupo fortemente básico e um grupo fracamente básico com valores de pK_a s 7,13 e 2,13. A HZ pode ser considerada um dicátion em $pH < 2,13$, um cátion com valores de pH entre 2,13-7,13 e um composto neutro em $pH > 7,13$. A cetirizina é um composto zwitteriônico que possui em sua estrutura um grupo fortemente ácido, um grupo fortemente básico e outro grupo fracamente básico com valores de pK_a s 2,93; 8,0 e 2,19 respectivamente. Teoricamente, a CTZ pode ser considerada como um dicátion quando $pH < 2,19$, como um cátion com valores de pH entre 2,19-2,93, como um composto zwitteriônico em pH entre 2,93-8,0 e também pode ser considerado como um ânion em $pH > 8,0$ (NOJAVAN; FAKHARI, 2011).

Figura 11. Estrutura química e valores de pK_a s referentes a (1) hidroxizina e (2) cetirizina.

Como é possível observar, a CTZ pode se apresentar de diferentes formas, e a porcentagem de cada forma será afetada dependendo do valor do pH . Em CE, o pH da solução tampão desempenha um papel importante na separação enantiomérica dos analitos básicos ou ácidos pois determina o grau de ionização de cada analito individual e o estado iônico da parede do capilar. Além do pH da

solução tampão, outros parâmetros eletroforéticos podem ser investigados durante a otimização da separação enantiomérica dos analitos, tais como: tipo e concentração do seletor quiral, temperatura de análise, comprimento do capilar e tensão aplicada no sistema. As condições iniciais para a otimização da enantioseparação da HZ e CTZ foram baseadas no trabalho de CHOU et al., 2008 utilizando a solução alcalina tetraborato de sódio e β -CD sulfatada como seletor quiral.

4.1.2. Influência do pH da solução na separação dos analitos

A escolha do pH da solução tampão de análise, é um dos fatores determinantes para o sucesso de uma separação por CE. O fluxo eletrosmótico (EOF) é muito sensível a variações de pH, portanto, seu controle através do pH da solução de tampão de análise, possibilita melhorar a performance das separações pela modificação das mobilidades aparentes dos analitos (RIZZI, 2001). Dessa forma, a fim de avaliar a influência do pH da solução tampão de análise sobre a migração e a separação dos enantiômeros, a solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹, contendo β -CD sulfatada (0,5% *p/v*) foi ajustada para os pHs 8, 9, 10, 11 e 12, garantindo assim, a completa ionização da parede do capilar e aumento do fluxo eletrosmótico. A importância de garantir um alto fluxo eletrosmótico na separação enantiomérica da HZ e CTZ é facilitar a migração da cetirizina até o local de detecção (polaridade normal), pois em pHs altos a CTZ comporta-se como um ânion.

Na faixa de pH 8-12, a hidroxizina está em sua forma molecular neutra, cetirizina e β -CD sulfatada apresentam cargas negativas. Nesta situação, o fluxo eletrosmótico é o responsável pelo movimento dos analitos em direção ao cátodo (polo negativo). Na **Figura 12** podem ser observados os eletroferogramas obtidos em cada pH empregado. As demais condições eletroforéticas empregadas foram mantidas constantes. Não foram observadas separações dos enantiômeros quando usadas soluções com valores de pH superiores a 11, provavelmente por ter influenciado no mecanismo de reconhecimento quiral. Além disso, uma menor resolução foi observado em pH 10. A melhor resolução, com tempo de migração adequado, foi obtido em pH 9,0; em seguida, este foi o pH selecionado para futuros experimentos.

Na **Figura 12** em pH 9,0, é observado o efeito de eletrodispersão no pico de número 1 da hidroxizina. Esse fenômeno pode ser atribuído à diferença entre a condutividade do analito e dos íons do eletrólito de corrida (EECKHAUT; MICHOTTE, 2006). Neste caso, a condutividade na zona da amostra é menor que a condutividade no eletrólito de análise pois os íons mais distantes do centro da banda da amostra são submetidos a um campo elétrico menor que os íons que se encontram no centro da banda, possuindo assim mobilidades diferentes do mesmo analito.

Figura 12. Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva da HZ (1 e 2) e CTZ (3 e 4) em diferentes pH da solução tampão borato de sódio 50 mmol L⁻¹. Condição de análise: solução tampão borato de sódio 50 mmol L⁻¹ em vários pHs contendo 0,5% (p/v) de β -CD sulfatada. Tensão aplicada de +6 kV e temperatura de 20 °C.

4.1.3. Influência da composição da solução de eletrólitos

A natureza do eletrólito empregado como solução tampão não foi avaliada, visto que o tetraborato de sódio, dentre os sais comumente empregados em CE, é o que apresenta efeito tamponante (pK_a 9,14) na região do pH 9,0 empregado. A finalidade da solução tampão é manter o valor do pH constante pois a mobilidade dos analitos e o fluxo eletrosmótico são sensíveis a variação de pH (WEINBERGER, 2000a). A concentração da solução tampão de análise determina a força iônica do eletrólito que pode influenciar na resolução e tempo de migração da HZ e CTZ. A influência da concentração da solução tampão borato de sódio (pH 9,0) foi verificada em quatro diferentes concentrações: 5, 25, 50 e 100 mmol L⁻¹. As demais condições eletroforéticas foram mantidas constantes. O aumento da concentração do tampão de análise influencia o EOF, tempo de migração e resolução (CHOU et al., 2008). Observando a **Figura 13**, pode ser observado que o aumento da concentração do eletrólito de análise aumentou a resolução entre os enantiômeros e também aumentou a corrente gerada que variou de 23 μA para a concentração de 5 mmol L⁻¹ a 130 μA para a concentração de 100 mmol L⁻¹. A condição de ótima resolução, com níveis aceitáveis de corrente (75 μA) e baixos tempo de migração foi a solução tampão na concentração de 50 mmol L⁻¹. Dessa forma, esta concentração foi selecionada para os ensaios adicionais.

Figura 13. Influência da concentração do eletrólito (mmol L⁻¹) na resolução. Demais condições de análise: solução tampão borato de sódio pH 9, tensão de +10 kV, 0,5% (p/v) de β -CD sulfatada, temperatura de análise de 20 °C. A concentração de cada enantiômero da hidroxizina e cetirizina na amostra analisada foi 5000 ng mL⁻¹.

4.1.4. Influência do tipo e concentração de ciclodextrina

A migração dos enantiômeros da HZ e CTZ em direção ao cátodo, em pH elevado, não dependem somente de suas mobilidades eletroforéticas, pois os solutos não estão carregados positivamente; contudo em pH 9 o EOF é alto, o qual arrasta os solutos em direção ao cátodo. Somente esse fator não seria suficiente para determinar diferentes tempos de migração para os enantiômeros; contudo devido o emprego seletos quirais na separação, as diferentes constantes de estabilidade dos complexos formados entre cada enantiômero e o seletor quiral permitem a separação (CHANKVETADZE, 2009). A formação dos complexos de inclusão entre os enantiômeros e a CD é fortemente influenciada não somente pela interação hidrofóbica na cavidade, mas também, pela interação entre os grupos substituintes na extremidade do anel e substituintes do centro estereogênico dos enantiômeros (GUBITZ; SCHMID, 2008).

Para a avaliação do seletor quiral, foram avaliadas ciclodextrinas ionizáveis/ionizadas (CM- β -CD e β -CD sulfatada) e ciclodextrina neutra (HP- β -CD). A β -CD sulfatada foi previamente relatada para obter resolução enantiosseletiva dos enantiômeros da hidroxizina e cetirizina (CHOU et al., 2008; DENG et al., 2012), e

nesse projeto, foi a única, das ciclodextrinas avaliadas, capaz de promover a separação quiral dos analitos. O efeito da concentração da β -CD sulfatada na enantioseparação foi investigado usando 50 mmol L^{-1} de solução tetraborato de sódio (pH 9,0) como tampão de análise, ao longo do intervalo de concentração de 0,5-1,0% (p/v) com uma tensão aplicada de +10 kV (**Figura 14**).

O aumento da concentração de CD no eletrólito aumenta a probabilidade de interações, entretanto, uma condição de equilíbrio existe para cada separação quiral, e concentrações acima desta condição podem reduzir a resolução (ALTRIA, 1996a). Em maior concentração da β -CD sulfatada foi observado uma redução da resolução entre os enantiômeros da hidroxizina e o efeito oposto foi verificado na resolução entre os enantiômeros da cetirizina. A concentração ótima da β -CD sulfatada que permitiu a melhor resolução para todos os analitos foi de 0,8% (p/v). Nestas condições foi observado valores de resolução de 1,2 e 1,4 para os enantiômeros da HZ e CTZ, respectivamente.

Figura 14. Influência da concentração de β -CD sulfatada na resolução dos analitos. Demais condições de análise: solução tampão borato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9, tensão +10 kV, temperatura de análise de 20°C . A concentração de cada enantiômero da hidroxizina e cetirizina na amostra analisada foi 5000 ng mL^{-1} .

4.1.5. Influência da temperatura do capilar

O controle da temperatura do capilar é extremamente importante para a reprodutibilidade na determinação dos analitos, pois quando a corrente passa ao

longo de um capilar, parte da energia elétrica é convertida em calor pelo efeito joule (NOJAVAN; FAKHARI, 2011). Variações na temperatura de análise alteram a viscosidade da solução do tampão de corrida, EOF, tempo de migração e consequentemente a resolução dos analitos. Além disso, a temperatura pode afetar na cinética de transferência de massa entre o complexo analito-CD (SERVAIS, 2010).

Foram feitas análises da mesma amostra nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C. Os resultados obtidos, ilustrados pela **Figura 15**, indicaram uma diminuição nos valores de resolução com o aumento da temperatura; também foi verificado que os tempos de migração dos enantiômeros da HZ e CTZ diminuíram. A diminuição do tempo de análise esta relacionado com a baixa viscosidade da solução tampão conforme a temperatura é aumentada (EECKHAUT, 2006). A temperatura de análise que apresentou os melhores e mais adequados valores de resolução foi de 15 °C. Nesta temperatura as resoluções foram 1,9 e 1,7 para os enantiômeros da HZ e CTZ, respectivamente.

Figura 15: Influência da temperatura de análise na resolução. Demais condições de análise: tampão borato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 9, tensão +10 kV e 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada. A concentração de cada enantiômero da hidroxizina e cetirizina na amostra analisada foi 5000 ng mL⁻¹.

4.1.6. Dimensão do capilar

Devido a fatores geométricos (relação entre a área superficial interna e volume), o capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule) e lhe confere alta resistência que permite o estabelecimento de campos elétricos elevados, resultando em separações de alta eficiência e com tempos curtos de análises (TAVARES, 1997). O uso de capilares menores pode reduzir significativamente o tempo de análise, porém, a resolução pode ser prejudicada, visto que há uma menor distância a ser percorrida pela amostra. Por esta razão, na tentativa de diminuir o tempo de análise, as dimensões dos capilares também foram testadas. Nesta etapa, o capilar de 40 cm de comprimento total que estava sendo usado na otimização do método foi trocado por um capilar mais curto, de 30 cm de comprimento possuindo o mesmo diâmetro interno (75 μm) e mantendo as mesmas condições de análise utilizadas no capilar de 40 cm. Com esta troca de capilar, foi observado uma redução no tempo total de análise de 14 min para 9 min, juntamente com um aumento significativo da corrente gerada (130 μA). Devido a esta alta corrente, a tensão aplicada no capilar foi otimizada no capilar de 30 cm para tentar minimizar a corrente e manter uma resolução aceitável dos enantiômeros da HZ e CTZ.

4.1.7. Influência da tensão aplicada

Em geral, o efeito da tensão na enantioseparação inclui vários aspectos: eficiência da eletroforese, aquecimento Joule, e a velocidade do EOF e analito, que afetam o tempo de interação entre o seletor quiral e analito (NOJAVAN; FAKHARI, 2011). O efeito da tensão aplicada foi avaliado em uma faixa de 6-10 kV usando 50 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio pH 9 com 0,8% (*p/v*) de β -CD sulfatada na temperatura constante de 15 °C (**Tabela 5**). Constatou-se que tempo de migração dos enantiômeros diminuiu com o aumento da tensão aplicada. Isto pode ser atribuído ao aumento na velocidade eletroforética dos analitos e EOF. A tensão aplicada de +6 kV apresentou uma corrente adequada (75 μA) e melhores resoluções, 2,8 e 1,7 para a HZ e CTZ respectivamente, portanto este valor de tensão foi selecionada para os experimentos subsequentes.

Tabela 5: Influência da tensão aplicada (kV) (polaridade normal).

Tensão (kV)	Corrente (μ A)	Resolução		Tempo de migração (min)	
		(E1)/(E2)HZ	(E1)/(E2)CTZ	T _{m1}	T _{m2}
6	75	2,8	1,7	6,9	8,1
8	105	1,7	1,6	5,0	5,8
10	130	1,3	1,4	3,8	4,4

T_{m1} se refere ao tempo de migração do enantiômero (E1)-HZ e T_{m2} se refere ao (S)-CTZ.

4.1.8. Otimização da detectabilidade do método

Uma das principais desvantagens da CE é a menor detectabilidade da técnica. Isso ocorre devido o baixo volume de amostra injetado (≈ 20 nL) e o diminuto caminho óptico de detecção que pode variar de acordo com o diâmetro interno do capilar utilizado. Dessa forma, o aumento da quantidade injetada assim como o aumento do diâmetro interno do capilar pode melhorar a detectabilidade em CE (WEINBERGER, 2000b).

Para avaliar a quantidade mais adequada de amostra introduzida no capilar, foram variadas a pressão e o tempo aplicado durante a injeção hidrodinâmica de uma mesma amostra. Foram realizadas combinações de 0,3 psi com duração de 5, 8, 10 e 13 seg, e combinações de 0,5 psi durante 5, 8, 10, 13 seg. O procedimento de injeção adotado consistiu da injeção hidrodinâmica da amostra diluída em água ultrapura durante 5 seg a 0,3 psi, pois apresentou as melhores resoluções de 2,7 e 2,1 para os enantiômeros da HZ e CTZ, respectivamente.

4.1.9. Condições eletroforéticas otimizadas

Após o estudo dos principais parâmetros que influenciam a separação eletroforética enantiosseletiva, chegou-se à condição otimizada de análise (**Tabela 6**), a qual proporcionou a melhor separação e menor tempo de análise (**Figura 16**).

Tabela 6. Condições eletroforéticas otimizadas para análise da HZ e CTZ.

Parâmetro	Condição otimizada
Solução Tampão	Tetraborato de sódio 50 mmol L ⁻¹ , pH 9,0
Seletor quiral	β-CD sulfatada 0,8% (p/v)
Polaridade	Normal
Injeção	5 seg a 0,3 psi
Temperatura do capilar	15 °C
Tensão	+6 Kv
Deteção	UV: 214 nm
Comprimento do capilar (total / efetivo)	30 cm / 22 cm

Figura 16. Eletroferograma representativo da análise da HZ e CTZ empregando o método otimizado. Concentração dos analitos: 5000 ng mL⁻¹ de risperidona (padrão interno) e 7500 ng mL⁻¹ de cada um dos enantiômeros da HZ e CTZ. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 22 cm efetivo x 75 μm d.i., injeção hidrodinâmica, tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de +6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1) risperidona, (2) (1)-HZ, (3) (2)-HZ, (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ.

Nessa condição otimizada, além da resolução dos enantiômeros da hidroxizina e cetirizina foi também possível obter a resolução do padrão interno (P.I.) risperidona, em um tempo de análise (9 min) inferior ao apresentado por Novajan et al. (2011), que relataram um método para a determinação enantiosseletiva para HZ e CTZ por CE realizados num tempo de migração de 33 min, utilizando maltodextrina como seletor quiral e 75 mmol L⁻¹ de solução fosfato de sódio (pH 2,0) como eletrólito de análise.

A eletrólise da solução de eletrólitos pode alterar seu pH e, consequentemente, alterar o EOF, afetando os tempos de migração, seletividade e a reprodutibilidade das separações (WEINBERGER, 2000b). Empregando a condição estabelecida da análise, a reprodutibilidade dos tempos de migração foi avaliada por injeção de 10 amostras consecutivas utilizando a mesma solução de tampão de análise. Os melhores valores de DPR no tempo de migração foram obtidas na sétima injeção com 1,6% para os enantiômeros da HZ e 2,5% para os enantiômeros da CTZ. Estes resultados podem ser explicados pelo efeito de depleção de tampão que conduz à perda de resolução (JESUS et al., 2011). Para garantir a repetibilidade das análises, o reservatório da solução tampão foi substituído após sete análises consecutivas. Do mesmo modo, os reservatórios de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e água ultrapura também foram substituídos para evitar mudanças no condicionamento do capilar.

4.1.10. Determinação da ordem de migração

A ordem de migração dos enantiômeros da CTZ foi estabelecida com a injeção da solução de dicloridrato de levocetirizina, que é o R-enantiômero do racemato da CTZ, no método desenvolvido nesse trabalho. Esta análise confirmou que o segundo enantiômero a migrar é o (*R*)-CTZ e, consequentemente, o primeiro é o enantiômero (*S*)-CTZ. A ordem de migração dos enantiômeros da HZ não foi estabelecida. Assim, o primeiro enantiômero a migrar foi nomeado como (E1)-HZ e como segundo enantiômero a migrar foi (E2)-HZ.

4.2. Desenvolvimento do procedimento de DLLME

A DLLME foi desenvolvida em 2006 por Rezaee et al. Esse método é baseado no sistema ternário de solventes e é uma miniaturização da extração líquido-líquido (LLE). O princípio básico da técnica é a dispersão de um solvente extrator (imiscível com água e polaridade compatível ao do analito) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator (XIAO-HUAN et al., 2009). A hidroxizina e cetirizina são substâncias com Logs de P

de 2,3 e 1,6, respectivamente. Estes valores foram obtidos do programa de computador *Scifinder scholar* da ACD/Labs versão 2007 (Toronto, ON, Canadá). Dessa maneira, buscou-se avaliar solventes de polaridade semelhantes no desenvolvimento do método por DLLME.

A eficiência da extração dos analitos por DLLME é influenciada por vários fatores, como o tipo e volume do solvente extrator e dispersor, tempo de extração, tempo e velocidade de centrifugação. Outros parâmetros frequentemente otimizados são a quantidade de sal adicionado devido o efeito salting-out, e o pH da amostra (HERRERA et al., 2010). Contudo, estes dois últimos parâmetros citados não foram avaliados devido ao conhecimento prévio sobre o pH de neutralidade de ambos analitos (ver item 4.1.1.), bem como, a adição de sal não foi necessária devido a alta quantidade de eletrólitos presentes na matriz meio de cultura.

4.2.1. Efeito do tipo de solvente extrator e dispersor

A escolha de um solvente extrator apropriado é um dos parâmetros mais importantes para a otimização da DLLME (MENG, 2011). Os solventes orgânicos usados como solventes extratores na DLLME requerem algumas características como, por exemplo, possuir densidade maior que a água. Esta propriedade permite, por meio de centrifugação, a separação do solvente extrator e fase aquosa (matriz). A extração dos analitos da HZ e CTZ em meio de cultura líquido Czapek foi investigada utilizando-se clorofórmio, tetracloreto de carbono, diclorometano e dicloroetano como solvente extrator. Nestes experimentos, 200 µL de cada solvente extrator e um volume fixo de 500 µL de acetona (solvente dispersor usado nesta etapa) foram avaliados. O solvente tetracloreto de carbono não apresentou afinidade para extração de qualquer analito (resultados não apresentados). De acordo com a **Figura 17**, as respostas das áreas dos picos dos enantiômeros da HZ foram mais elevadas utilizando diclorometano, porém, as maiores respostas de área dos enantiômeros da CTZ, o metabólito ativo da HZ, foram obtidas com clorofórmio e por esta razão este solvente foi selecionado para os experimentos seguintes.

Figura 17. Seleção do solvente extrator na extração dos enantiômeros da HZ e CTZ em meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: volume do solvente extrator, 200 µL; volume da amostra, 1 mL; volume do solvente dispersor (acetona), 500 µL; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm.

A solubilidade do solvente dispersor entre o solvente extrator e a fase aquosa (matriz) é a condição essencial para sua seleção. Esta condição permite a formação de pequenas gotículas de solvente extrator na fase aquosa. Assim, a área superficial de contato entre solvente extrator e matriz é aumentada, facilitando a passagem do analito de uma fase para outra (WEN et al., 2011). Portanto, acetona, acetonitrila, metanol e etanol foram avaliados como solvente dispersor. Os experimentos foram realizados utilizando 500 µL de cada solvente dispersor contendo 200 µL de solvente extrator otimizado (CHCl_3). De acordo com a **Figura 18**, as respostas das áreas dos picos dos enantiômeros da HZ foram superiores utilizando acetonitrila, enquanto que para os enantiômeros da CTZ as respostas das áreas dos picos foram semelhantes entre metanol e etanol. Finalmente, o etanol foi o solvente dispersor selecionado devido a sua menor toxicidade em relação ao metanol.

Figura 18. Seleção do solvente dispersor na extração dos enantiômeros da HZ e CTZ em meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: volume do solvente dispersor, 500 µL; volume da amostra, 1 mL; volume do solvente extrator (clorofórmio), 200 µL; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm.

4.2.2. Efeito do volume do solvente extrator e dispersor

Para avaliar o efeito do volume do solvente extrator na extração dos analitos, um volume constante (400 µL) de etanol contendo diferentes volumes de CHCl_3 (100 a 500 µL) foram submetidas ao mesmo procedimento de DLLME. De acordo com a **Figura 19**, através do aumento do volume de clorofórmio, a recuperação da extração dos analitos é ligeiramente constante a partir do volume de 300 µL, o que indica extração quantitativa e coeficiente de partição elevado dos analitos nesta condição (REZAEE et al., 2006). Com base nestes resultados, o volume de 300 µL de CHCl_3 foi escolhido para experimentos posteriores.

Figura 19. Avaliação do volume do solvente extrator na extração dos enantiômeros da HZ e CTZ em meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: solvente extrator, clorofórmio; volume da amostra, 1 mL; volume do solvente dispersor (etanol), 400 μL; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm.

O volume do solvente dispersor afeta a formação do ponto nuvem. Para avaliar este efeito, o volume do solvente dispersor foi avaliado na faixa de 300 a 700 μL (**Figura 20**), mantendo constante o volume de 300 μL de solvente extrator (CHCl₃). Com baixos volumes de etanol, foi observado baixos valores de recuperação, provavelmente este resultado está relacionado a formação do ponto nuvem. Com maiores volumes de etanol foi observado uma diminuição da eficiência de extração devido ao aumento da solubilidade do analito na fase aquosa (WEN et al., 2011). A melhor recuperação do analito foi obtida com 400 μL de etanol, portanto, este foi o volume selecionado para os próximos experimentos.

Figura 20. Avaliação do volume do solvente extrator na extração dos enantiômeros da HZ e CTZ em meio de cultura Czapek. Condições de extração: solvente dispersor, etanol; volume da amostra, 1 mL; volume do solvente extrator (clorofórmio) 300 µL; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm.

4.2.3. Efeito do tempo de extração

O tempo de extração é definido como intervalo entre a injeção da mistura dos solventes dispersor e extrator na matriz e a centrifugação da amostra (REZAEI et al., 2006). De acordo com diversos estudos (MENG et al., 2011; YE et al., 2012), o tempo de extração afeta, em pequena extensão, a eficiência da extração na DLLME. Isso ocorre devido a área de superfície entre o solvente extrator e a fase aquosa (amostra) ser infinitamente grande. Desse modo, a transferência do analito a partir da fase aquosa para a fase extratora é rápida (alguns segundos) (REZAEI et al., 2006). Tem sido descrito na literatura que a utilização de ultrassom (US) e vórtex (VX) melhoram a eficiência da extração na DLLME (DLLME assistida) (CARRO et al., 2012; DARIAS et al., 2010). A DLLME assistida foi avaliada por comparação entre o uso da DLLME assistida com ultrassom durante 5 min, DLLME assistida com vórtex durante 30 seg e a combinação das duas formas de extração da DLLME assistida. Na **Figura 21** pode-se observar que a combinação da formação do ponto nuvem com agitação no vórtex por 30 seg é mais eficiente que a utilização de ultrassom para a extração da HZ e CTZ. Isto deve ter ocorrido devido os efeitos mecânicos e térmicos do ultrassom, pois estes efeitos podem resultar na perda do

solvente extrator pela sua volatilização (CARRO et al., 2012). Por sua vez, a agitação rápida pelo vórtex permite a formação de gotas finas do clorofórmio, que podem ser benéficas para a dispersão eficaz destas gotículas no interior da solução aquosa (DARIAS et al., 2010; SHI; LEE, 2010). Como resultado, o aumento de transferência de massa e eficiência de extração pode ser alcançado.

Figura 21. Eficiência da extração no método da DLLME usando ponto nuvem (PN), ponto nuvem + vórtex (PN + VX), ponto nuvem + ultrassom (PN + US) e ponto nuvem + vórtex + ultrassom (PN + VX + US). Condições de extração: volume de amostra 1 mL, volume de solvente extrator (clorofórmio), 300 μ L; volume de solvente dispersor (etanol), 400 μ L; pH 7,5 e 5 min de centrifugação a 3000 rpm. Tempo de extração assistida: vórtex durante 30 s e ultrassom durante 5 min.

4.2.4. Parâmetros da centrifugação

Após a agitação pelo vórtex, a solução turva deve ser submetida a centrifugação, a fim de garantir a completa separação das fases orgânica e aquosa. O parâmetro avaliado foi a centrifugação no intervalo de tempo de 5 a 15 min, com rotação fixa de 3000 rpm e temperatura a 10 °C. Após a avaliação do tempo, 5 min foi escolhido para os experimentos, pois nenhuma recuperação significativa foi observada para tempos mais longos de centrifugação.

4.2.5. Condições da extração otimizadas

O ajuste na composição da amostra aquosa é um parâmetro importante na extração uma vez que a transferência de massa é largamente afetada pelo coeficiente de difusão dos compostos entre a amostra aquosa e o solvente extrator (LORD; PAWLISZYN, 2000). O pH da amostra foi mantido em 7,5 com a adição da solução tampão fosfato de sódio, pois tanto a hidroxizina como a cetirizina se encontram na forma não ionizada na faixa de pH entre 7 e 8. As recuperações dos analitos após o procedimento da extração resultaram em, aproximadamente, 90%. As condições otimizadas de preparação das amostras estão ilustradas na **Tabela 7**.

Tabela 7. Condições para o procedimento de preparação das amostras.

Parâmetro	Condição otimizada
Solvente extrator (volume)	Clorofórmio (300 µL)
Solvente dispersante (volume)	Etanol (400 µL)
Tempo de agitação	30 seg vórtex
Solução alcalina (volume)	1 mL
Velocidade, tempo e temperatura de Centrifugação	3000 rpm, 5 min, 10 °C

4.3. Validação da metodologia para análise enantiosseletiva da HZ e CTZ em meio de cultura líquido

4.3.1. Linearidade

A linearidade do método foi realizada pela regressão linear, realizada através da representação gráfica da razão área dos picos dos analitos e padrão interno *versus* a concentração do analito. O método apresentou-se linear (peso $1/x^2$), para ambas as curvas analíticas (**Tabela 8**), no intervalo de concentrações de 125-6200 ng mL⁻¹ para cada um dos enantiômeros da CTZ e no intervalo de concentração de 250-12500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da HZ com coeficiente de correlação maior do que 0,998 e erro relativo para cada ponto da curva analítica inferior a 15%. Além disso, as curvas analíticas construídas foram submetidas a análise estatística empregando a ANOVA e a validade das curvas foi demonstrada. A análise da inclinação (*slope*) das curvas analíticas foi realizada para avaliar a influência de

diferentes tipos de matrizes no processo de preparação de amostras, DLLME. Dessa forma curvas analíticas foram preparadas em duas diferentes matrizes, uma em meio de cultura líquido Czapek e outra em um pool de fungos. Como pode ser observado na **Tabela 8**, as curvas analíticas apresentaram valores de coeficiente angulares semelhantes o que indica que as diferentes matrizes sofreram a mesma influência no processo de extração por DLLME (Bocato et al., 2012).

Tabela 8. Linearidade do método para análise dos analitos em meio de cultura líquido Czapek e em pool de fungos.

Analitos	Tipo de matriz	Concentração (ng mL ⁻¹)	Equação linear ^a	r ^b	Razão dos slopes	ANOVA lack-of-fit	
						F-valor	p-valor
(1)-HZ	Pool de fungos	250-12500	y= 0,000157x+0,0042	0,998	0,93	1,17	0,371
(1)-HZ	Meio Czapek	250-12500	y= 0,000169x+0,0101	0,998		0,77	0,585
(2)-HZ	Pool de fungos	250-12500	y= 0,000154x+0,0013	0,999	0,90	1,32	0,312
(2)-HZ	Meio Czapek	250-12500	y= 0,000171x+0,0124	0,998		1,39	0,288
(S)-CTZ	Pool de fungos	125-6200	y= 0,000243x+0,0035	0,999	1,00	2,86	0,055
(S)-CTZ	Meio Czapek	125-6200	y= 0,000242x+0,0024	0,998		2,66	0,068
(R)-CTZ	Pool de fungos	125-6200	y= 0,000243x+0,0030	0,997	1,05	1,78	0,181
(R)-CTZ	Meio Czapek	125-6200	y= 0,000232x+0,0045	0,998		1,90	0,159

^a Cinco replicatas ($n = 5$) para cada concentração.

^b coeficiente de correlação

4.3.2. Recuperação

As recuperações médias para (E1)-HZ, (E2)-HZ, (S)-CTZ, (R)-CTZ foram, respectivamente, 90%, 92%, 87% e 87%, com um desvio padrão relativo inferior a 7% (**Tabela 9**).

Tabela 9. Recuperação do método de DLLME para análise dos enantiômeros da hidroxizina e cetirizina.

Concentração ^a (ng mL ⁻¹),	(E1)-HZ		(E1)-HZ		(S)-CTZ		(R)-CTZ	
	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b
CB	95,0	4,5	93,1	2,2	88,6	4,4	87,6	9,0
CM	81,6	1,6	85,3	1,2	90,9	3,2	93,9	4,0
CA	93,5	3,8	96,7	2,8	82,6	5,3	81,0	5,4

^aAs concentrações da hidroxizina avaliadas na recuperação foram 1000, 3000 e 10000 ng mL⁻¹ e as concentrações dos enantiômeros da cetirizina foram 250, 1250 e 5000 ng mL⁻¹. (CB) concentração baixa, (CM) concentração média, (CA) concentração alta.

4.3.3. Limite de quantificação

Os limites de quantificação do método foram de 250 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da hidroxizina e 125 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da cetirizina. Os valores de precisão (representado pelo CV,%) e exatidão (representado pelo E,%) foram inferiores a 20% (EMEA, 2012) e são apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva de hidroxizina e cetirizina.

Analitos	Concentração nominal	Concentração analisada (ng mL ⁻¹) ^a	E (%) ^b	CV (%) ^c
(E1)-HZ	250,0	231,7	-7,3	11,0
(E1)-HZ	250,0	241,4	-3,4	10,1
(S)-CTZ	125,0	137,2	9,7	6,8
(R)-CTZ	125,0	136,7	9,4	7,3

^a Limite de quantificação, $n = 5$; ^b E, erro relativo do limite de quantificação; ^c CV (%), coeficiente de variação percentual do limite de quantificação.

4.3.4. Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão intra- e interensaio foram utilizadas alíquotas de meio de cultura líquido Czapek fortificadas com concentrações baixa, média e alta de cada um dos enantiômeros.

A **Tabela 11** apresenta os valores de precisão (DPR,%) e exatidão (ER,%) intra- e interensaio dos enantiômeros da hidroxizina e a **Tabela 12** apresenta os para análise dos enantiômeros da cetirizina. Os resultados de precisão e exatidão para os enantiômeros da hidroxizina foram inferiores a 8,4% e 9,2%, respectivamente. Por sua vez, os resultados de precisão e exatidão para os enantiômeros da cetirizina foram de 6,2% e 9,4%, respectivamente.

Tabela 11. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da hidroxizina em meio Czapek.

Analitos	Concentração teórica (ng mL ⁻¹)	Intraensaio (n = 5) ^a			Interensaio (n = 3) ^b		
		Concentração (ng mL ⁻¹)	DPR ^c (%)	ER ^d (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	DPR ^c (%)	ER ^d (%)
(1)-HZ	250,0	255,6	1,7	4,8	245,5	4,6	-6,8
	1000,0	1092,2	2,7	9,2	1043,8	7,1	-4,6
	3000,0	3144,8	1,7	4,8	3231,6	2,3	9,2
	10000,0	9847,6	3,7	-1,5	9724,1	6,1	2,4
(2)-HZ	250,0	258,2	6,0	3,2	248,3	4,7	0,5
	1000,0	996,7	4,8	-0,3	1008,9	8,4	-6,9
	3000,0	3101,6	1,2	3,3	3163,5	2,2	8,0
	10000,0	9759,3	2,3	-2,4	9292,1	4,4	-8,4

^a número de determinações; ^b número de dias; ^c porcentagem de desvio padrão relativo; ^d porcentagem de erro relativo.

Tabela 12. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da cetirizina em meio de cultura líquido Czapek.

Analitos	Concentração teórica (ng mL ⁻¹)	Intraensaio (<i>n</i> = 5) ^a			Interensaio (<i>n</i> = 3) ^b		
		Concentração (ng mL ⁻¹)	DPR ^c (%)	ER ^d (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	DPR ^c (%)	ER ^d (%)
(S)-CTZ	125,0	120,5	4,3	-3,5	125,9	7,7	9,6
	250, 0	249,4	4,6	-0,2	255,0	4,7	7,5
	1250,0	1200,3	3,4	-3,9	1211,5	6,7	-9,1
	5000,0	4940,6	1,6	-1,1	5065,4	6,4	8,6
(R)-CTZ	125,0	127,1	4,7	1,7	129,8	4,6	9,4
	250, 0	233,3	4,7	-6,6	238,0	6,2	-9,5
	1250,0	1215,5	3,5	-2,7	1215,1	5,0	-7,7
	5000,0	4904,8	2,1	-1,9	5031,7	8,8	10,5

n = número de determinações: cinco (intraensaio) e três (interensaio); ^aExpresso como desvio padrão relativo, DPR (%); ^bExpresso como erro relativo, E%.

4.3.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da análise de amostras extraídas de meio de cultura Czapek sem adição dos analitos, amostras de meio de cultura Czapek fortificadas com os enantiômeros da hidroxizina e cetirizina e amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos empregados nos estudos de biotransformação. Os eletroferogramas referentes à análise do meio de cultura fortificado com os enantiômeros da hidroxizina e cetirizina e meio de cultura sem a presença dos analitos são apresentados nas **Figuras 22(A) e 22(B)**, respectivamente.

Figura 22. Eletroferogramas representativo dos enantiômeros da HZ a CTZ em meio de cultura Czapek após extração DLLME. (A) Meio de cultura Czapek fortificado com (1) padrão interno, (2) E1-HZ e (3) E2-HZ (7500 ng mL^{-1}), (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ (2500 ng mL^{-1}). (B) Meio de cultura Czapek sem adição dos analitos. Condições de análise: Tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β -CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15°C .

Na avaliação da seletividade, os fungos estudados não produziram qualquer metabólito secundário próximo ao tempo de migração dos enantiômeros da CTZ e HZ (**Figura 23**), e o meio de cultura líquido Czapek não apresentou nenhum pico interferente (**Figura 22B**).

Figura 23. Eletroferogramas representativos das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos *Penicillium crustosum* (VR4), *Cunninghamella elegans* ATCC 8688 e *Cunninghamella elegans* ATCC 10028. Condições de análise: Tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C.

4.3.6. Estabilidade

A estabilidade dos enantiômeros da hidroxizina e cetirizina foi avaliada durante ciclos congelamento e descongelamento, em temperatura ambiente (bancada) por 12 horas, nas condições de biotransformação e nas condições de armazenamento das soluções-padrão. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas como pode ser observado na **Tabela 13**. Nas condições de biotransformação também não foi observado degradação superior a 15%, avaliado através do E%, em relação a curva analítica preparada simultaneamente (dados não apresentados)

Tabela 13. Estabilidade dos enantiômeros da hidroxizina e cetirizina nos ciclos congelamento/descongelamento e bancada por 12 h em meio de cultura líquido Czapek.

Estabilidade	(1)-HZ		(2)-HZ		(S)-CTZ		(R)-CTZ	
Ciclos congelamento e descongelamento								
Concentração (ng mL ⁻¹)	243,2	8914,0	236,0	9073,4	225,2	4386,8	232,7	4471,2
Precisão (DPR) ^{a)}	1,3	6,9	0,9	5,7	3,7	5,6	1,8	6,7
Exatidão (ER, %) ^{b)}	-2,7	-10,8	-5,5	-9,2	-9,8	-12,2	-6,8	-10,5
Bancada por 12 h								
Concentração (ng mL ⁻¹)	242,2	8714,3	233,1	8706,2	238,8	4719,7	234,5	4603,5
Precisão (DPR) ^{a)}	1,0	7,9	2,7	7,5	3,0	5,5	2,0	2,7
Exatidão (ER, %) ^{b)}	-3,1	-12,8	-6,7	-12,9	-4,4	-5,6	-6,1	-7,9
Autoinjeter por 12 h								
Concentração (ng mL ⁻¹)	242,2	8714,3	233,1	8706,2	238,8	4719,7	234,5	4603,5
Precisão (DPR) ^{a)}	1,0	7,9	2,7	7,5	3,0	5,5	2,0	2,7
Exatidão (ER, %) ^{b)}	-3,1	-12,8	-6,7	-12,9	-4,4	-5,6	-6,1	-7,9

n = número de determinações; ^a Expresso como coeficiente de variação percentual, CV; ^b Expresso como erro relativo, E.

4.4. Estudos de biotransformação enantiosseletiva da hidroxizina por fungos

A biotransformação da HZ foi avaliada frente empregando seis fungos sob as mesmas condições incubação. A biotransformação da HZ em seu metabólito ativo, CTZ envolve uma reação de carboxilação. As reações de biotransformação dos fungos *Penicillium crustosum*, *Mucor rouxii*, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 10028, *Nigrospora sphaerica* e *Fusarium oxysporum* foram acompanhadas diariamente, durante 15 dias (360 horas). Alíquotas de amostras foram coletadas a cada 48 horas até o décimo dia, e finalmente, no décimo quinto dia. As amostras foram coletadas, extraídas e analisadas pelo método validado. Após análise, foram construídos gráficos (concentração *versus* tempo de incubação) de biotransformação dos fungos selecionados.

Dentre os seis fungos avaliados, o fungo SS50 e SS67 não biotransformaram a HZ nas condições avaliadas, pois picos referentes aos enantiômeros da cetirizina não foram observados. Porém, os demais quatro fungos (VR4, 10028, 8688 e *Mucor Rouxii*) biotransformaram a hidroxizina em cetirizina através da reação de oxidação do grupo hidroxila.

4.4.1. *Penicillium crustosum* (VR4)

Na **Figura 24**, podem ser observados os resultados da biotransformação da hidroxizina em cetirizina pelo fungo *Penicillium crustosum* (VR4). Foi observado a presença dos enantiômeros da cetirizina somente após 360 horas de incubação. A concentração dos enantiômeros da cetirizina encontrada no meio de cultura foram 7137 ng mL⁻¹ (≈37% de biotransformação) para (S)-CTZ e 6874 ng mL⁻¹ (≈35% de biotransformação) para (R)-CTZ com um excesso enantiomérico de 2% para (S)-CTZ.

Figura 24. (A) Eletroferograma representativo da amostra de hidroxizina incubada com o fungo *Penicillium crustosum* (VR4) após 360 horas de incubação. (B) Meio de cultura líquido Czapek contendo o fungo *Penicillium crustosum* sem adição da hidroxizina. Condições de análise: solução tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1) padrão interno, (2) E1-HZ, (3) E2-HZ, (4) (S)-CTZ e (5) (R)-CTZ.

4.4.2. *Mucor rouxii* NRRL 1894

O fungo *Mucor rouxii* apresentou habilidade em carboxilar enantiosseletivamente o grupo hidroxila da hidroxizina e, sendo assim, foi observado a formação predominantemente do enantiômero (S)-CTZ (**Figura 25**). A **Figura 26** apresenta os resultados da biotransformação da HZ pelo fungo *Mucor rouxii*. Após 360 horas de incubação, as concentrações máximas de (S)-CTZ observadas no meio de cultura foram 1957 ng mL^{-1} ($\approx 7\%$ de biotransformação) e 495 ng mL^{-1} ($\approx 2\%$ de biotransformação) para (R)-CTZ. Estas concentrações representam um excesso enantiomérico de 60% de (S)-CTZ.

Figura 25. (A) Eletroferograma representativo da amostra de hidroxizina incubada com o fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894 após 360 horas de incubação. (B) Meio de cultura Czapek contendo o fungo *Mucor rouxii* sem adição da hidroxizina. As condições eletroforéticas foram: solução tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β -CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15°C . (1)-padrão interno, (2)-E1-HZ, (3)-E2-HZ, (4)-(S)-CTZ e (5)-(R)-CTZ.

Figura 26. Gráfico de formação dos enantiômeros da cetirizina e decaimento da hidroxizina no estudo de biotransformação pelo fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894. As barras expressam o desvio padrão das replicatas ($n = 3$). (●) E1-HZ, (■) E2-HZ, (○) (S)-CTZ and (□) (R)-CTZ.

4.4.3. *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A

Fungos do gênero *Cunninghamella* foram selecionados para o procedimento de biotransformação, pois apresentam habilidade de efetuar reações de carboxilação. Esta habilidade foi descrita por Zhang et al., 2006 com o medicamento celecoxib e SRISAILAM et al., 2010, descreveu a biotransformação do antidiabético, muraglitazar.

O fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A apresentou maior formação do enantiômero (S)-CTZ (**Figura 27**). Na biotransformação por este fungo, foi detectado com 96 horas de incubação somente o enantiômero (S)-CTZ no meio de cultura. Porém, após 144 horas o enantiômero (R)-CTZ também foi detectado. Na **Figura 28** é apresentado um eletroferograma de uma amostra após 144 horas de incubação.

Figura 27. (A) Eletroferograma representativo da amostra de hidroxizina incubada com o fungo *Cunninghamhamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A após 360 horas de incubação. (B) Meio de cultura líquido Czapek contendo o fungo *Cunninghamhamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A sem adição da hidroxizina. Condições de análise: solução tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β-CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1)-padrão interno, (3)-(S)-CTZ e (4)-(R)-CTZ.

Como é possível observar na **Figura 28**, a formação do (S)-CTZ inicia-se após 96 horas de incubação. A máxima concentração do enantiômero (S)-CTZ no meio de cultura foi de 12279 ng mL⁻¹ (≈57% de biotransformação) enquanto que para o enantiômero (R)-CTZ a máxima concentração foi 6277 ng mL⁻¹ (≈26% de biotransformação) em 360 horas. Esta concentração representa um excesso enantiomérico de 32% com predominância de formação do enantiômero (S)-CTZ.

Figura 28. Perfil de formação dos enantiômeros da cetirizina e decaimento da hidroxizina pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A. As barras expressam o desvio padrão das replicatas ($n = 3$). (●) E1-HZ, (■) E2-HZ, (○) (S)-CTZ e (□) (R)-CTZ.

4.4.4. *Cunninghamella elegans* ATCC 10028

A biotransformação da HZ pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028 resultou na formação predominante do enantiômero (S)-CTZ (**Figura 29**). A formação dos enantiômeros da CTZ foi primeiramente observada após 96 horas de incubação. A concentração máxima dos enantiômeros da CTZ no meio de cultura Czapek foi 2693 ng mL^{-1} ($\approx 19\%$ de biotransformação) para o enantiômero (S)-CTZ e 579 ng mL^{-1} ($\approx 4\%$ de biotransformação) para o enantiômero (R)-CTZ em 360 horas de incubação. Esta concentração máxima corresponde a um excesso enantiomérico de 65% para o enantiômero (S)-CTZ (**Figura 30**).

Figura 29. (A) Eletroferograma representativo da amostra de hidroxizina incubada com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028 após 360 horas de incubação. (B) Meio de cultura liquido Czapek contendo o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028 sem adição da hidroxizina. Condições de análise: solução tampão de análise tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) contendo 0,8% (p/v) de β -CD sulfatada, tensão de + 6 kV, detecção UV em 214, temperatura de análise de 15 °C. (1)-padrão interno, (2)-E1-HZ, (3)-E2-HZ, (4)-(*S*)-CTZ e (5)-(*R*)-CTZ.

Figura 30. Perfil de formação dos enantiômeros da cetirizina e decaimento da hidroxizina pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028. As barras expressam o desvio padrão das replicatas ($n = 3$). (●) E1-HZ, (■) E2-HZ, (○) (*S*)-CTZ e (□) (*R*)-CTZ.

O estudo da biotransformação pelos fungos com aplicação do método DLLME-CE demonstrou ser bem sucedida para determinação enantiosseletiva da hidroxizina e cetirizina em meio de cultura liquido Czapek. Até o presente momento,

este método foi o primeiro na literatura a relatar a extração simultânea dos enantiômeros da HZ e CTZ utilizando a DLLME e aplicada com êxito no estudo da biotransformação da HZ por fungos. Em comparação com outros métodos descritos na literatura (**Tabela 14**), este método apresenta vantagens como: tempo curto de análise (9 min) para a determinação simultânea dos enantiômeros da HZ e CTZ e procedimento de extração simples e rápida (DENG et al., 2012; CHOU et al., 2008 e EECKHAUT; MICHOTE, 2006; NOJAVANS et al., 2011).

Tabela 14. Métodos de separação enantiomérica da HZ e CTZ.

Fármaco	Matriz	Método	T _m ^a (min)	Seletor Quiral	pH de análise	Preparo de Amostra	Referência
CTZ	comprimido	CE	8	β-CD-sulfatada	8,2	diluição	Deng et al., 2012
CTZ	plasma	CE	7	β-CD-sulfatada	8,7	LLE	Chou et al., 2008
CTZ	comprimido	CE	9	Heptakis (2,3 ciacetil-6-sulfato)	2,5	diluição	Eeckhaut; Michote, 2006
CTZ e HZ	plasma	CE	33	maltodextrina	2,0	LLE	Nojavan; Fakhari, 2011
CTZ e HZ	meio de cultura	CE	9	β-CD-sulfatada	9,0	DLLME	Presente trabalho

^a Tempo de Migração Final do último enantiômero. LLE: extração líquido-líquido. DLLME: extração líquido-líquido dispersiva

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho a técnica CE foi empregada na determinação enantiosseletiva da hidroxizina e seu metabólito ativo cetirizina em meio de cultura líquido. O método desenvolvido apresentou suficiente resolução e tempo de análise relativamente curto, para a determinação dos analitos estudados. A CE mostrou-se uma técnica muito atrativa, devido ao baixo custo decorrente e por não necessitar do uso de solventes orgânicos.

Como técnica de preparo de amostra foi empregado a microtécnica DLLME. Essa técnica demonstrou diversas vantagens na extração da HZ e CTZ do meio de cultura, tais como: simplicidade de operação, rapidez, custo baixo e altos valores recuperação. Além disso, o tempo médio de preparo de 32 amostras foi de aproximadamente 45 min Assim a técnica DLLME-CE demonstrou ser eficiente para o estudo proposto. Pela primeira vez a DLLME foi empregada para a extração simultânea da hidroxizina e cetirizina com aplicação em estudo de biotransformação empregando fungos. Este método apresenta vantagens em relação a outros já existentes, como: tempo de análise mais curto em relação ao procedimento descrito por NOJAVAN et al.; procedimento de extração mais simples e com um menor consumo de solvente, em comparação com a o método descrito por CHOI et al., 2000; GUPTA et al., 2005a; GUPTA et al., 2005b, BELTAGI; ABDALLAH; GHONEIM, 2008. Além disso, no procedimento de preparo de amostra, destaca-se a melhoria significativa da recuperação através da inclusão da etapa do uso do “vórtex” DLLME-assistida, em comparação com o uso de apenas a formação do ponto nuvem.

Entre as espécies de fungos avaliadas, 4 apresentaram biotransformação estereosseletiva com destaque para o fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A que biotransformou 57% da (E1)-HZ em (S)-CTZ e 26% da (E2)-HZ em (R)-CTZ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALI, I.; KUMERER, K.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Mechanistic Principles in Chiral Separations Using Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 63, p. 295-307, 2006.

ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa: Humana Press Inc., 1996. 349 p.

AMADIO, J.; MURPHY, C.D. Production of human metabolites of the anti-cancer drug flutamide via biotransformation in *Cunninghamella* species. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, p. 321–326, 2011.

AMIN, N.C.; BLANCHIN, M.D.; AKÉ, M.; FABRE, H. Capillary electrophoresis methods for the analysis of antimalarials. Part I. Chiral separation methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1264, p. 1– 12, 2012.

ANDRUCH, V.; ACEBAL, C.C.; ŠKRLÍKOVÁ, J.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P.; BALOGH, I.S.; BILLES, F.; KOCÚROVÁ, L. Automated on-line dispersive liquid–liquid microextraction based on a sequential injection system. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 100, p.77–82, 2012.

ANTHEMIDIS, A.N.; IOANNOU, K.I.G. Sequential injection dispersive liquid–liquid microextraction based on fatty alcohols and poly(etheretherketone)-turnings for metal determination by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, Amsterdam, v. 84, p. 1215– 1220, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm. Acesso em 10 de maio 2012.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella*– A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, p. 16–29, 2009.

BALOGH, I.S.; BILLES, F.; KOCÚROVÁ, L. Automated on-line dispersive liquid–liquid microextraction based on a sequential injection system. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 100, p.77–82, 2012.

BAHGA, S.S.; SANTIAGO, J.G. Coupling isotachopheresis and capillary electrophoresis: a review and comparison of methods. **Analyst**, Cambs, v. 138, p.735-754, 2013.

BALOGH, I.S.; RUSNÁKOVÁ, L.; ŠKRLÍKOVÁ, J.; KOCÚROVÁ, L.; TOROK, M.; ANDRUCH, V. A spectrophotometric method for manganese determination in water samples based on ion pair formation and dispersive liquid–liquid microextraction, **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Oxon, v. 92, p. 1059-1071, 2011.

BARTH, T.; PUPO, M. T.; BORGES, K. B.; OKANO, L. T.; BONATO, P. S. Stereoselective determination of midodrine and desglymidodrine in culture medium: Application to a biotransformation study employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, Malden, v. 31, p. 1521–1528, 2010.

BELTAGI, A.M.; ABDALLAH, O.M.; GHONEIM, M.M. Development of a voltametric produre for assay of the antihistamine drug hydroxyzine at a glassy carbon electrode: Quantification and pharmacokinetics studies. **Talanta**, Amsterdam, v. 74, p. 851-859, 2008.

BOCATO, M.Z. SIMÕES, R.A.; CALIXTO, L.A.; GAITANI, C.M.; PUPO, M.T.; OLIVEIRA, A.R.M. Solid phase microextraction and LC–MS/MS for the determination of paliperidone after stereoselective fungal biotransformation of risperidone. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 742, p. 80-89, 2012.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRÓN, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v.20, p. 385–397, 2009a.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 77, p. 669-674, 2007.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 46, n. 5, p. 945-952, 2008.

BORGES, W.S.; BORGES, K.B.; BONATO, P.S.; SAID, S.; PUPO, M.T. Endophytic fungi: Natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, Sharjah, v. 13, p. 1137-1163, 2009b.

BRESSOLE, F.; AUDRAN, M.; PHAM, T.N.; VALLON, J.J. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. **Journal of Chromatography B**, [S.l.], v. 686, p. 303-336, 1996.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A.L.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. pH-controlled dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals. **Analytica Chimica Acta**, Amsterda, v. 754, p. 61– 66, 2012.

CARRÃO, D.B; BORGES, K.B.; BARTH, T.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S.; OLIVEIRA, A.R.M. Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis**, Malden, v. 32, p. 2746–2756, 2011.

CARRO, A.M.; FERNÁNDEZ, S.; RACAMONDE, I.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, D.; GONZÁLEZ, P.; LORENZO, R.A. Dispersive liquid–liquid microextraction coupled with programmed temperature vaporization-large volume injection-gas chromatography–tandem mass spectrometry for multiclass pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1253, p. 134– 143, 2012.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 95, p. 47–59, 2012.
CHANG C.H.; WIE, S.Y.; HUANG, S.D. Improved solvent collection system for a dispersive liquid–liquid microextraction of organochlorine pesticides from water using low-density organic solvent. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 34, p. 837–843, 2011.

CHANKVETADZE, B. Separation of enantiomers with charged chiral selectors in CE. **Electrophoresis**, Malden, v. 30, p. 211-221, 2009.

CHEN, H.; CHEN, R.; LI, S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 1244–1248, 2010.

CHOI, S. O.; LEE, S. H.; KONG, H. S.; KIM, E. J.; CHOO, H. Y. Stereoselective determination of cetirizine and studies on pharmacokinetics in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, Malden, v. 744, p. 201 – 206, 2000. CHOU, Y.W.; HUANG, W.S.; KO, C.C.; CHEN, S.W. Enantioseparation of cetirizine by sulfated- β -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 31, p. 845-852, 2008.

DARIAS, J.L.; HERNÁNDEZ, M.G.; PINO, V.; AFONSO A.M. Dispersive liquid–liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, p. 1611-1618, 2010.

DA SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, 740-744, 2007.

DENG, X.; DE COCK, B.; VERVOORT, R.; PAMPERIN, D.; ADAMS, E.; SCHEPDAEL, A.V. Development of a validated capillary electrophoresis method for enantiomeric purity control and quality control of levocetirizine in a pharmaceutical formulation. **Chirality**, Malden, v. 24, 276-282, 2012.

ESPADA, A.; MOLINA-MARTIN, M. Capillary electrophoresis and small molecule drug discovery: a perfect match? **Drug Discovery Today**, Oxon, v. 17, p. 396-404, 2012.

EECKHAUT, A.V.; MICHOTE, Y. Chiral separation of by capillary electrophoresis: Recent developments and applications. **Electrophoresis**, Malden, v. 27, p. 2880-2895, 2006.

FARAJZADEH, M.A.; SEYEDI, S.E.; SHALAMZARI, M.S.; BAMOROWAT, M. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. **Journal of Separation Science**. Weinheim, v. 32, p. 3191–3200, 2009.

FREITAG, D.G.; FOSTER, R.T.; COUTTS, R.T.; PICKARD, M.A.; PASUTTP, F.M. Stereoselective metabolism of rac-mixileline by the fungus *cunninghamella echinulata* yields the major human metabolites hydroxymethylmexileline and p-hidroxmexileline, **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 25, p. 685-692, 1997.

GALLO, M.B.C.; CHAGAS, F.O.; ALMEIDA, M.O.; MACEDO, C.C.; CAVALCANTI, B.C.; BARROS, F.W.A.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; BASTOS, J.K.; PUPO, M.T. Endophytic fungi found in association with *Smalanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, v. 49, p. 142-151, 2009.

GHOSH, S.; FANG T.H.; UDDIN M.S.; HIDAJAT, K. Enantioselective separation of chiral aromatic amino acids with surface functionalized magnetic nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Malden, v. 105, p. 267– 277, 2013.

GOLIGHTLY, L.K.; GREOS, L.S. Second-generation antihistamines. Actions and efficacy in the management of allergic disorders. **Drugs**, Auckland, v. 65, p. 341-384, 2005.

GÜBITZ G., SCHMID, M. G. Cyclodextrin-Mediated Chiral Separations. In: VAN EECKHAUT, A.; MICHOTTE, Y. **Chiral Separations by Capillary Electrophoresis**. CRC Press. cap. 3, p. 47-86, 2010.

GÜBITZ G., SCHMID, M. G. Chiral separation by capillary electromigration techniques. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1204, p. 140-156, 2008.

Guideline on bioanalytical method validation, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.

GUPTA, A.; CHATELAIN, P.; MASSINGHAM, R.; JONSSON, E. N.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Brain Distribution of cetirizine enantiomers: comparison of three different tissue-to-plasma partition coefficients: K_p , $K_{p,u}$, and $K_{p,uu}$. **DRUG METABOLISM AND DISPOSITION**, Bethesda, v. 34, p. 318 – 323, 2006.

GUPTA, A.; JANSSON, B.; CHATELAIN, P.; MASSINGHAM, R.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Quantitative determination of cetirizine enantiomers in guinea pig plasma brain tissue and microdialysis samples using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY**, [S.l.], v. 19, p. 1749–1757, 2005.

HAJI-MOMENIAN, S.; RIEGER, J.M.; MACDONALD, T.L.; BROWN, M.L. Comparative molecular field analysis and QSAR on substrates binding to cytochrome P450 2D6. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 11, p. 5545-5554, 2003.

HASHEMI, P.; BEYRANVAND, S.; MANSUR, R.S.; GHIASVAND, A.R. Development of a simple device for dispersive liquid–liquid microextraction with lighter than water organic solvents: isolation and enrichment of glycyrrhizic acid from licorice, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 655, p. 60–65, 2009.

HERRERA, A.V.H.; RAMOS, M.A.; BORGES, J.H.; DELGADO, M.A.R. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 29, No. 7, 2010.

HILÁRIO, V.C.; CARRÃO, D.B.; BARTH, T.; BORGES, K.B.; FURTADO, N.A.J.C.; PUPO, M.T.; DE OLIVEIRA, A.R.M. Assessment of the stereoselective fungal

biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 61, p. 100-107, 2012.

IBRAHIM, A.R.S.; EI-FERALY, F.S. Microbial transformation of diclofenac. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Amsterdam, v. 4, p. 165-169, 1996.

JAC, P.; SCRIBA, G.K.E. Recent advances in electrodriven enantioseparations. **Journal of Separation Science**., Weinheim, v. 36, p. 52-74, 2013.

JAVANBAKHTA, M.; FARDB, S.E.; MOHAMMADIC,A.; ABDOUSSA, M.; GANJALIE, M.R.; NOROUZIE, P.; SAFARALIEE, L. Molecularly imprinted polymer based potentiometric sensor for the determination of hydroxyzine in tablets and biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 612, p. 65-74, 2008.

JESUS, L.I.; ALBUQUERQUE, N.C.P.; BORGES, K.B.; SIMÕES, R.A.; CALIXTO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; GAITANI, C.M.; PUPO, M.T.; OLIVEIRA, A.R.M. Enantioselective fungal biotransformation of risperidone in liquid culture medium by capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction. **Electrophoresis**, Malden, v. 32, p. 2765-2775, 2011.

KEUM, Y.S.; LEE, Y.H.; KIM, J.H. Metabolism of methoxychlor by *Cunninghamella elegans* ATCC36112. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 7931–7937, 2009.

KOCÚROVÁ L.; BALOGH, I.S.; ŠANDREJOVÁ, J.; KOCÚROVÁ, V.A.L. Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 102, p. 11–17, 2012.

KOHLER, I.; SCHAPPLER, J.; SIERRO, T.; RUDAZ, S. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam,v. 73, p. 82– 89, 2013.

KOKOSA, J.M. Advances in solvent microextraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, [S.l], 2012.

KOWALSKI, P.; PLENIS, A. Comparison of HPLC and CE methods for the determination of cetirizine dihydrochloride in human plasma samples. **Biomedical Chromatography**, Malden, v. 21, p. 903–911, 2007.

LEONG, M.I.; HUANG S.D. Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection, **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1211, p. 8–12, 2008.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, p. 17-63, 2000.

LOZADA, A.O; SURAPANENI, S.; GARY L. SKILES, SG.L.; SUBRAMANIAN, R. Biosynthesis of Drug Metabolites Using Microbes in Hollow Fiber Cartridge Reactors: Case Study of Diclofenac Metabolism by *Actinoplanes* Species. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 36, p. 234–240, 2008.

LU, H.; CHEN, G. Recent advances of enantioseparations in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Analytical Methods**, Cambs, v. 3, p. 488-508, 2011.

MATTHIJS, N.; HEMELRYCK, S.V.; MAFTOUH, M.; MASSART, D.L.; HEYDEN, Y.V. Electrophoretic separation strategy for chiral pharmaceuticals using highly-sulfated and neutral cyclodextrins based dual selector systems. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 525, p. 247-263, 2004.

MENG, L.; WANG, B.; LUO, F.; SHEN, G.; WANG, Z.; GUO, M. Application of dispersive liquid–liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples. **Forensic Science International**, Clare, v.209, p. 42-47, 2011.

MOLINA, G.; PIMENTEL, M.R.; THAYSE C. P. BERTUCCI, T.C.P.; PASTORE, G.M. Application of fungal endophytes in biotechnological processes. **Chemical Engineering Transactions**, [S.I.], v. 27,p. 289-294, 2012.

MOODY, J.D.; FREEMAN, J.P.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 27, p. 1157–1164, 1999.

MOODY, J.D.; FREEMAN, J.P.; Fu, P.P.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 30, p. 1274–1279, 2002.

NATISHAN, T.K. Recent Progress in the Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Philadelphia, v. 28, p. 1115–1160, 2005.

NICOLAS, J.M.; WHOMSLEY, R.; COLLART, P.; ROBA, J. In vitro inhibition of human liver drug metabolizing enzymes by second generation antihistamines. **Chemical Biological Interactions**, [S.l.], v. 123, p. 63–79, 1999.

NOJAVAN, S.; FAKHARI, A.R. Chiral separation and quantitation of cetirizine and hydroxyzine by maltodextrin-mediated CE in human plasma: Effect of zwitterionic property of cetirizine on enantioseparation. **Electrophoresis**, Malden, v. 32, p. 764–771, 2011.

PARSHIKOV, I.A.; NETRUSOV, A.I.; SUTHERLAND, J.B. Microbial transformation of azaarenes and potential uses in pharmaceutical synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 95, p. 871–889, 2012.

PEKALA, E.; KUBOWICZ, P.; ŁAŻEWSKA, D. Cunninghamella as a Microbiological Model for Metabolism of Histamine H3 Receptor Antagonist 1-[3-(4-tert-Butylphenoxy)propyl]piperidine. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.168, p. 1584–1593, 2012.

PRIOR, J.E.; SHOKATI, T.; CHRISTIANS, U.; GILL, R.T. Identification and characterization of a bacterial cytochrome P450 for the metabolism of diclofenac. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 85, p. 625–663, 2010.

REZAEI, M.; ASSADDI, Y.; HOSSEINI, M.R.M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v. 1119, p. 1–9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 2342–2357, 2010.

RIZZI, A. Fundamental aspects of chiral separation by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Malden, v. 22, p. 3079–3106, 2001.

RODRÍGUEZ, D.A.; BLANCO, C.C.; CAMPAÑA, A.M.G. Dispersive liquid-liquid microextraction prior to field-amplified sample injection for the sensitive analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, phencyclidine and lysergic acid diethylamide

by capillary electrophoresis in human urine. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1267, p. 189–197, 2012.

SARAFRAZ-YAZDI, A; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 29, No. 1, 2010.

SCRIBA, G.K.E. Chiral electromigration techniques in pharmaceutical and biomedical analysis. **Bioanal Rev**, [S.l.], v. 3, p. 95–114, 2011.

SEKHON, B.S. An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**, [S.l.], v. 2, p. 2-36, 2011.

SERVAIS, A.C.; CROMMEN, J.; FILLET, M. Factors influencing cyclodextrin-mediated chiral separations. In: VAN EECKHAUT, A.; MICHOTTE, Y. (Ed.). **Chiral separations capillary electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. Capítulo. 4, p. 87-107.

SHI, Z.G.; LEE, K. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with Dispersive μ -Solid-Phase Extraction for the Fast Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Water Samples. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 1540-1545, 2010.

SUNTORNUSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 398, p. 29–52, 2010.

SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, [S.l.], v. 23, p. 9-19, 2009.

TABANI, H.; FAKHARI, A.R.; SHAHSAVANI, A. Simultaneous determination of acidic and basic drugs using dual hollow fibre electromembrane extraction combined with CE. **Electrophoresis**, Malden, v. 34, p. 269-276, 2013.

TAN, R.X.; ZOU, W.X.; Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, Cambs, v. 18, p. 448-459, 2001.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, p.493-511, 1997.

TEKES, K.; KALÁSZ, H.; HASAN, M.Y.; ADEGHATE, E.; DARVAS, F.; RAM, N.; ADEM, A. Aliphatic and Aromatic Oxidations, Epoxidation and S-Oxidation of Prodrugs that Yield Active Drug Metabolites. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 18, p. 4885-4900, 2011.

TIAN, J.; CHEN, X.; BAI, X. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction based on organic solvent and ionic liquid combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of emodin and its metabolites in urine samples. *Journal of Separation Science*, Weinheim, v. 35, 145–152, 2012.

TILLEMENT, J.P.; TESTA, B.; BRÉE, F. Compared pharmacological characteristics in humans of racemic cetirizine and levocetirizine, two histamine H1-receptor antagonists. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 66, p. 1123-1126, 2003.

VENISETTY R.K.; CIDDI V. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Oxford, v. 4, p. 123–140, 2003.

VENTURINI, C.G.; NICOLINI, J. MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e aplicação recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 360-368, 2008.

WANG, W.; ZHOU, F.; ZHAO, L.; ZHANG, J.R.; ZHU, J.J. Measurement of electroosmotic flow in capillary and microchip electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1170, p. 1–8, 2007.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis: Basic concept. In:_____. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2. Ed. San Diego: Academic Press, 2000a. Capítulo 2, p. 25-71.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis: Basic concept. In:_____. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2. Ed. San Diego: Academic Press, 2000b. Capítulo 8, p. 321-364.

WEN, X.; YANG, Q.; YAN, Z. DENG, Q. Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–vis spectrophotometry. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 97, p. 249-254, 2011.

XIAO-HUAN, Z.; QIU-HUA, W.; MEI-YUE, Z., GUO-HONG, X.; ZHI, W. Developments of Dispersive Liquid-Liquid microextraction technique. **Chinese Journal Analutical Chemistry**, Beijing, v. 37, p. 161-168, 2009.

YE, C.L.; LIU, Q.L.; WANG, Z.K.; FAN, J. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of three triazole derivatives in environmental water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Oxon, v. 20, p. 1176-1186, 2012.

ZGOLA-GRZESKOWIAK, A.; GRZESKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v. 30, p. 1382-1399, 2011.

ZHANG, S.; LI, C.; SONG, S.; FENG, T.; WANG, C.; WANG, Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography for trace analysis of six carbamate pesticides in apples. **Analytical Methods**, Cambs, v. 2, p. 54-62, 2010.

ZHANG P.; LIN L.H.; HUANG H.H.; XU H.Y, ZHONG D.F. Biotransformation of indomethacin by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 27, p. 1097–102, 2006.