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 e complexos de salen na obtenção do metabólito quirál e ativo terbutalina

Lídia Renata Zanão

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
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Avaliação de fungos e complexos de salen na obtenção do metabólito quirál e ativo terbutalina

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**

Orientada: Lídia Renata Zanão

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes Oliveira

VERSÃO CORRIGIDA

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zanão, Lídia Renata
Avaliação de fungos e complexos de salen na obtenção do metabólito quiral e ativo terbutalina. Ribeirão Preto, 2013.
101 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.
Orientador: De Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes.

1. Análise Enantiosseletiva. 2. Biotransformação. 3. Bambuterol. 4. Terbutalina. 5. DLLME.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Zanão, Lídia Renata

Título: Avaliação de fungos e complexos de salen na obtenção do metabólito quiral e ativo terbutalina

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 e à
minha família, que me deram amor,
apoio e incentivo, sempre acreditando e
confiando na minha capacidade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde física e mental e por permitir que eu consiga alcançar meus objetivos.

Aos meus pais e toda a família por todo o amor, carinho e compreensão. Obrigada pelo auxílio psicológico e financeiro, por todas as orações e velinhas acesas que fizeram com que eu me sentisse cada vez mais confiante e segura.

Ao Prof. Anderson, por ter me aceitado como aluna e me recebido de braços abertos em seu laboratório sem me conhecer direito. Por ser meu espelho e exemplo a ser seguido, tanto na forma de trabalhar como na amizade e companheirismo que oferece aos alunos. Muito obrigada pela paciência e incentivo e por acreditar em mim quando nem eu mais acreditava.

A Bruna, irmã de coração desde os tempos de graduação, pelo ombro amigo sincero, pelo incentivo a todo o momento e pelos tempos de estudo na biblioteca pra ingressar na pós-graduação. Seu amor pela pesquisa é contagiante e encorajador. Com suas palavras sábias e seu abraço reconfortante sempre me guiava pro rumo certo nos momentos de dúvida.

A Layci, pessoinha especial que conheci há pouco tempo, mas já ganhou cadeira cativa na minha vida, pela amizade sincera, pelos momentos de festa e alegria e os de tristeza e desespero que compartilhamos e pela companhia fiel durante os estudos na madrugada. Aprendemos e crescemos muito juntas.

Ao Naidel, outro irmãozinho que a universidade me presenteou, pelos momentos filosóficos na cantina, na biblioteca e no laboratório e principalmente, por me ajudar com a Química Teórica, sempre arrumando um tempinho e muita disposição pra realizar os cálculos e me explicar e ensinar cada etapa pacientemente.

A todos os amigos do LABMETS, alunos e funcionários, os que estão presentes e aqueles que já passaram por aqui. Cada um de vocês, a sua

maneira, contribuiu bastante para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por proporcionarem um ambiente tão gostoso de trabalhar. Um agradecimento especial a aluna de iniciação científica Máisa e ao pós-doutorando Lucas Sky, que contribuíram bastante nos estudos de catálise assimétrica.

Ao Prof. Beto e a todos de seu laboratório, que me receberam tão bem durante o tempo que utilizei o equipamento de espectrometria de massas. Pelos momentos divertidos e de descontração nesse ambiente acolhedor. Agradecimento especial a aluna de doutorado Ana Paula, grande amiga que sempre me ajudou e me socorreu, me ensinando com paciência e dedicação.

A Profa. Pierina e aos alunos e funcionários do CROEC, por me receberem e permitirem que eu realizasse lá grande parte do projeto. Agradecimento especial aos alunos Rodrigo, Thiago e Milena, por todos os ensinamentos.

As Profas. Niede e Mônica por cederem os fungos e a Profa. Marilda por ceder os reagentes utilizados nos estudos de catálise assimétrica.

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

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

(Mãe Teresa de Calcutá)

RESUMO

ZANÃO, L. R. **Avaliação de fungos e complexos de salen na obtenção do metabólito quiral e ativo terbutalina**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Enantiômeros podem interagir de maneira diferenciada no organismo, ocasionando efeitos farmacológicos variados. Dessa forma, metodologias para a obtenção de fármacos enantiomericamente puros são importantes para a indústria farmacêutica. Modelos sintéticos empregando reagentes quirais, como complexos de salen e modelos biológicos utilizando fungos estão sendo muito estudados neste contexto. O uso de fungos apresenta como principais vantagens o crescimento rápido, baixo custo e fácil operação, além da produção de metabólitos em grande quantidade. Complexos de salen são eficientes e estáveis, possuindo ampla aplicabilidade e possibilidade de produzir reações enantiosseletivas. O objetivo deste trabalho foi avaliar fungos e complexo de salen como alternativas na produção enantiosseletiva de terbutalina, o metabólito quiral e ativo de seu pró-fármaco, o bambuterol. A separação enantiosseletiva dos analitos foi realizada empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis (LC/UV). A validação da metodologia analítica e os estudos de biotransformação foram executados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). A resolução do bambuterol e da terbutalina por LC/UV foi realizada utilizando como fase estacionária a coluna Chirobiotic T e como fase móvel acetonitrila:metanol (80:20, v/v) + 0,3% de ácido fórmico e 0,1% de trietilamina, numa vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e por LC-MS utilizando a mesma fase estacionária e a fase móvel composta por 96% de metanol em água + 0,2% de ácido acético e 0,1% de acetato de amônio na vazão de 1 mL min^{-1} . A extração dos analitos em meio de cultura líquido (Czapek, 2 mL) foi feita empregando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), nas condições: solvente dispersor, isopropanol (600 μL); solvente extrator, diclorometano (50 μL); reagente par iônico, di(2-etil-hexil)fosfato (100 μL); e solução tampão fosfato de sódio (2 mL, pH 7,6). A recuperação do bambuterol foi de 92% e a da terbutalina foi estimada em 55%. O método foi validado para a análise do bambuterol no meio de cultura e se mostrou linear na faixa de concentração 500 – 17500 ng mL^{-1} para cada enantiômero ($r > 0.998$). O limite de quantificação foi igual a 500 ng mL^{-1} . Dentre os fungos avaliados neste trabalho, nenhum foi capaz de realizar a biotransformação do bambuterol em terbutalina nas condições empregadas. Nos estudos feitos utilizando catálise assimétrica também não foi possível observar esse metabólito. Dada a complexidade do metabolismo do bambuterol (reações de hidrólise e/ou oxidação) e da formação de vários intermediários anterior a etapa de formação da terbutalina, as condições avaliadas nesse estudo não foi capaz de produzir o metabólito ativo do bambuterol, terbutalina.

Palavras-chave: Análise Enantiosseletiva, Biotransformação, Bambuterol, Terbutalina, DLLME.

ABSTRACT

ZANÃO, L. R. **Evaluation of fungi and salen complexes in the obtention of the chiral and active metabolite terbutaline**. 2013. 101 f. Thesis (Master). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Enantiomers may interact differently in the organism causing pharmacological sundry effects. For these reason, enantiomeric pure drugs are very important for the pharmaceutical industries. Synthetic models employing chiral reagents, like salen complexes, and biological models using fungi are been very studied in this context. Fungi present as main advantage the fast growing up, low costs and easily application, moreover, their metabolites are produced in huge quantities. Salen complexes are efficient and stable. They have a wide application and the possibility of production of high enantiomeric excess. The aim of this work was to evaluate fungi and salen complex as alternatives to the enantioselective production of terbutaline, the chiral and active metabolite of your prodrug, bambuterol. The analytes' enantioselective separation was done employing high performance liquid chromatography with UV-Vis detector (LC/UV). The method validation and the studies of biotransformation were done using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). The resolution of bambuterol and terbutaline by LC/UV was accomplished using the Chirobiotic T column and acetonitrile: methanol (80:20, v/v) + 0.3% formic acid and 0.1% triethylamine as mobile phase at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹ and by LC-MS employing the same column and the mobile phase was composed by 96% of methanol in water + 0,2% acetic acid and 0,1% ammonium acetate at a flow rate of 0.1 mL min⁻¹. The analytes' extraction of the culture medium (Czapek, 2 mL) was done using the dispersive liquid liquid microextraction (DLLME), in the following conditions: dispersive solvent, isopropanol (600 µL); extractor solvent, dichloromethane (50 µL); ionic-pair reagent; di(2-ethylhexyl)phosphate (100 µL); and sodium phosphate buffer (2 mL, pH 7.6). The recoveries were 92% for the bambuterol and estimated in 55% for terbutaline. The method was validated for the analysis of bambuterol in the culture medium and was linear over the concentration range of 500 – 17500 ng mL⁻¹ for each enantiomer ($r > 0.998$). The quantification limit was 500 ng mL⁻¹. Among the evaluated fungi, none was able to do the biotransformation process of bambuterol at terbutaline in the employed conditions and so do the studies employing asymmetric catalyses. Because the complexity of bambuterol's metabolism for producing terbutaline (hydrolysis and/or oxidation reactions) and the formation of several intermediates before the terbutaline's formation step, the evaluated conditions in this study were not able to produce the chiral active metabolite, terbutaline.

Keywords: Enantioseparation, Biotransformation, Bambuterol, Terbutaline, DLLME.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do metabolismo do bambuterol. Os asteriscos indicam os centros quirais. As setas pontilhadas representam o mecanismo de hidrólise e as setas sólidas, a via oxidativa (Adaptado de Rosenborg, 2001) **8**
- Figura 2.** Esquema dos componentes de um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Adaptado de GATES et al., 2006).....**12**
- Figura 3.** Esquema do mecanismo de ionização por eletronebulização (ESI) (Adaptado de HO et al., 2003)**14**
- Figura 4.** Etapas da DLLME. Primeiramente, um volume de solução da amostra é colocado em um tubo de ensaio de vidro com fundo cônico (A) e injeta-se rapidamente o solvente dispersor junto com o solvente extrator com o auxílio de uma seringa ou pipeta. Em seguida, a mistura é suavemente agitada e uma solução turva é formada no tubo de ensaio B (ponto nuvem). Posteriormente, centrifuga-se o tubo de ensaio e as partículas da fase de extração são depositadas no fundo deste tubo, solubilizadas no solvente extrator (C). Um pequeno volume desta fase inferior é então coletado utilizando uma microsseringa (D) e analisado no sistema cromatográfico (Adaptado de ZANG et al., 2009).....**18**
- Figura 5.** Aplicações da DLLME nas mais diversas técnicas atuais de análise química (Adaptado de KOKOSA, 2013).....**19**
- Figura 6.** Catalisador de *Jacobsen*.**25**
- Figura 7.** Incubação dos fungos em meio Czapek com bambuterol no “shaker” durante o processo de biotransformação.**37**
- Figura 8.** Separação enantiomérica do bambuterol e da terbutalina utilizando FEQ Chirobiotic T[®] e fase móvel composta por acetonitrila e metanol 80:20 (v/v) + 0,3% ácido fórmico e 0,1% trietilamina a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. Detecção a 275 nm. Temperatura de análise 23 (±2)°C. 1 e 2 Enantiômeros do bambuterol, 3 e 4 enantiômeros da terbutalina.**45**
- Figura 9.** Otimização do solvente dispersor utilizando 500 µL de cada e dicloroetano como solvente extrator (100 µL). Temperatura de extração: 23(±2)°C. Volume de matriz: 2 mL. Concentração de DEHP 0,1 mol L⁻¹. Concentração dos analitos no meio de cultura: 1,25 µg mL⁻¹.**46**

Figura 10. Otimização do solvente extrator utilizando 100 μL de cada e isopropanol como solvente dispersor (500 μL). Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Volume de matriz: 2 mL. Concentração de DEHP 0,1 mol L^{-1} . Concentração dos analitos no meio de cultura: 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$47

Figura 11. Otimização do volume de solvente dispersor. Solvente extrator: diclorometano. Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Volume de matriz: 2 mL. Concentração de DEHP 0,1 mol L^{-1} . Concentração dos analitos no meio de cultura: 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$48

Figura 12. Otimização do volume de solvente extrator. Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Solvente dispersor: isopropanol 600 μL . Volume de matriz: 2 mL. Concentração de DEHP 0,1 mol L^{-1} . Concentração dos analitos no meio de cultura: 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$48

Figura 13. Otimização dos volumes de meio de cultura Czapek e tampão fosfato 0,25 mol L^{-1} , pH 7,6. Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Solvente dispersor: isopropanol 600 μL . Solvente extrator: diclorometano 50 μL . Concentração de DEHP 0,1 mol L^{-1} . Concentração dos analitos no meio de cultura: 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$49

Figura 14. Cromatogramas da separação do bambuterol, salbutamol e terbutalina obtidos pela análise em LC-MS. O cromatograma A é o obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 226$ (terbutalina); C é a extração da razão $m/z = 368$ (bambuterol) e D é a extração da razão $m/z = 240$ (salbutamol). *O cromatograma referente a análise do salbutamol apresenta dois picos porque esse analito é quiral.....51

Figura 15. Sobreposição das análises feitas por HPLC com detector UV-Vis da amostra biotransformada do décimo dia para o fungo endofítico VR12. Em azul, amostra biotransformada. Em rosa e preto, controles. Nota-se que o pico supostamente referente ao enantiômero 2 da terbutalina (3) aparece apenas na amostra submetida à biotransformação. 1 e 2 são respectivamente os enantiômeros 1 e 2 do bambuterol.....53

Figura 16. (A) Cromatograma da análise do décimo dia de biotransformação do fungo endofítico VR12 por LC-MS. Nota-se a presença de um composto em tempo de retenção similar ao da terbutalina (ver Figura 14). Entretanto, observando o espectro de massas (B) é possível verificar que a substância formada não se trata da terbutalina, que possui razão m/z igual a 226.53

Figura 17. Cromatogramas representativos da avaliação do parâmetro seletividade na validação analítica. (A) Meio de cultura Czapek sem adição de analito. (B) Meio de cultura Czapek fortificado com (1) padrão interno, (2) E1-Bambuterol (6250 ng mL^{-1}) e (3) E2-Bambuterol (6250 ng mL^{-1}).57

Figura 18. Espectro de massas relativo ao pico que apareceu sem correlação aos analitos no cromatograma da extração por DLLME do bambuterol e salbutamol em meio de cultura representado na Figura 17.B..
.....57

Figura 19. Controle da reação sem a presença de catalisador, utilizando bambuterol como substrato e PhIO como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.
.....61

Figura 20. Controle da reação sem a presença de catalisador, utilizando bambuterol como substrato e m-CPBA como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.61

Figura 21. A-Cromatograma da corrente iônica total do controle da reação sem o catalisador, utilizando bambuterol como substrato e m-CPBA como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. Nestas condições, o bambuterol foi consumido e apareceu um pico em tempo de retenção similar ao da terbutalina (ver Figura 14). Entretanto, observando o espectro de massas desta figura (B), é possível verificar que a substância formada não se trata da terbutalina, que possui razão m/z igual a 226 e não corresponde ao m-CPBA, que possui razão m/z igual a 173.....62

Figura 22. Controle da reação sem a presença de catalisador, utilizando bambuterol como substrato e H₂O₂ como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.....63

Figura 23. Controle da reação sem a presença de catalisador, utilizando bambuterol como substrato e t-BuOOH como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.
.....63

Figura 24. Controle da reação sem a presença de oxidante, utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador e bambuterol como substrato na proporção de 1:20 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.64

Figura 25. Controle da reação sem a presença de oxidante, utilizando (S,S)-Jacobsen como catalisador e bambuterol como substrato na proporção de 1:20 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.64

Figura 26. Reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e *m*-CPBA como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.68

Figura 27. Reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e PhIO como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.69

Figura 28. Reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e *t*-BuOOH como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.67

Figura 29. Reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e H₂O₂ como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma da Figura 29.A é obtido pela corrente iônica total, o da Figura 29.B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol. Como o pico correspondente ao tempo de retenção dos enantiômeros do bambuterol apresenta compostos coeluídos, foi feita uma extração da razão m/z igual a 226, para verificar se havia terbutalina produzida e eluída em tempo de retenção muito próximo ao bambuterol e como pode ser visto na Figura 29.C, não houve formação deste metabólito.68

Figura 30. Cromatograma da corrente iônica total da reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e H₂O₂ como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. Nota-se a presença de um composto com pico em tempo de retenção similar ao da terbutalina (ver Figura 14). Entretanto, observando o espectro de massas, é possível verificar que a substância formada não se trata da terbutalina, que possui razão m/z igual a 226.69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos (Adaptado de BARTH, T., 2012).....	4
Tabela 2. Exemplos de fases estacionárias quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos.....	6
Tabela 3. Condições finais para a DLLME na análise de bambuterol e terbutalina em meio de cultura.	50
Tabela 4. Linearidade do método para análise de bambuterol em meio de cultura Czapek.....	54
Tabela 5. Recuperação do método para análise dos enantiômeros do bambuterol.	55
Tabela 6. Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva de bambuterol.....	55
Tabela 7. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros do bambuterol em meio Czapek.....	56
Tabela 8. Estabilidade dos enantiômeros de bambuterol nos ciclos de congelamento/descongelamento, bancada por 12h e autoinjeter por 12 h em meio de cultura líquido Czapek.....	58
Tabela 9. Estabilidade do bambuterol em meio Czapek durante o processo de biotransformação.....	59
Tabela 10. Estudo do efeito da matriz na ionização dos analitos em meio de cultura líquido.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
APPI	Fotoionização à pressão atmosférica
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BuChE	Butirilcolinesterase
CPE	Extração no ponto nuvem
CG	Cromatografia gasosa
CYP	Citocromo
CV%	Coeficiente de variação percentual
DEA	Dietilamina
DCM	Diclorometano
DEHP	Di(2-etil-hexil)fosfato
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
DMF	Dimetilformamida
E%	Erro relativo
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI	Ionização por eletronebulização
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEQ	Fase estacionária quiral
FM	Fator matriz
HLLE	Extração líquido-líquido homogênea
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ID-MS	Inserção direta no espectrômetro de massas
K	Coeficiente de distribuição
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
LLE	Extração líquido-líquido
log P	Coeficiente de partição
m/v	Massa/Volume
<i>m</i> -CPBA	Ácido metacloroperbenzóico
MS	Espectrometria de Massas

PDA	Batata dextrose ágar
PhIO	Iodosilbenzeno
P.I.	Padrão interno
pKa	- log da constante de acidez
Q	Quadrupolo
QqQ	Triplo quadrupolo
Q-ToF	Quadrupolo sequencial com tempo de voo
Rs	Resolução
salen	Saliciladeídoetilenodiamina
<i>t</i> -BuOOH	<i>Terc</i> -butil-hidroperóxido
TEA	Trietilamina
t_R	Tempo de retenção
ToF	Tempo de voo
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta e visível
v/m	Volume/Massa
v/v	Volume/Volume
W_b	Largura da base do pico cromatográfico

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Fármacos Quirais	2
1.2. Análise Enantiosseletiva por HPLC.....	3
1.2.1. Fases Estacionárias Quirais Baseadas em Polissacarídeos	4
1.2.2. Fases Estacionárias Quirais Baseadas em Antibióticos Macrocíclicos	5
1.2.3. Modo de eluição Polar Orgânico em Cromatografia Quiral	6
1.3. Fármaco Selecionado Para os Estudos	7
1.3.1 Análise Enantiosseletiva do Bambuterol e da Terbutalina	9
1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) .	10
1.4.1. Modos de Ionização em LC-MS	12
1.4.2. Analisadores de massa	14
1.5. Preparo de Amostras.....	15
1.5.1. Microextração Líquido –Líquido Dispersiva.....	17
1.5.1.1. Princípios da DLLME	17
1.5.1.2. Parâmetros que Afetam a Eficiência da Extração em DLLME	19
1.6. Estudos de Biotransformação	21
1.6.1 Emprego de Modelos Microbiológicos em Processos de Biotransformação.....	21
1. 6.1.1 Biotransformação Estereosseletiva Mediada por Fungos.....	22
1.7. Catálise Oxidativa de Fármacos.....	23
1.7.1 Catálise Assimétrica Empregando Complexos de Salen	24
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Materiais.....	29
3.1.1. Equipamentos e Acessórios	29
3.1.2. Reagentes e Solventes.....	30
3.1.3. Fases Estacionárias e Coluna de Guarda	31
3.2. Métodos.....	31
3.2.1. Preparo da Fase Móvel	31
3.2.2. Preparo da Solução Tampão.....	32
3.2.3. Otimização da Separação Enantiosseletiva do Bambuterol e da Terbutalina e detecção por UV-Vis	32
3.2.4 Otimização da Separação Enantiosseletiva e Detecção por LC-MS.....	33

3.2.5 Procedimentos para DLLME	34
3.3. Validação da Metodologia Analítica para Análise do Bambuterol em meio de Cultura Líquido Czapek	39
3.3.1. Linearidade	38
3.3.2. Limite de quantificação (LQ)	39
3.3.3. Precisão e Exatidão	39
3.3.4. Recuperação	39
3.3.5. Seletividade	40
3.3.6. Estabilidade	40
3.3.6.1. Ciclos de congelamento e descongelamento	40
3.3.6.2. Bancada por 12 horas	40
3.3.6.3. Condições de Biotransformação	41
3.3.6.4. Autoinjeter por 12 horas	41
3.3.7. Efeito da Matriz na Ionização dos Analitos	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Otimização da Separação Enantiosseletiva do Bambuterol e da Terbutalina	44
4.2. Otimização da microextração líquido- líquido dispersiva (DLLME)	45
4.3. Adequação do método para análises por LC-MS	50
4.4. Estudos de Biotransformação com Fungos	51
4.5. Validação da Metodologia Analítica para Análise Enantiosseletiva do Bambuterol	54
4.5.1. Linearidade	54
4.5.2. Recuperação	54
4.5.3. Limite de Quantificação	55
4.5.4. Precisão e Exatidão	55
4.5.5. Seletividade	56
4.5.6. Estabilidade	58
4.5.7. Efeito da Matriz na Supressão da Ionização	59
4.6. Estudos Preliminares de Catálise Assimétrica	60
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fármacos Quirais

A estereoquímica foi inicialmente estudada e compreendida durante o século XIX, onde a capacidade de alguns compostos desviarem a luz plano polarizada, a assimetria molecular destes compostos e a configuração tetraédrica do átomo de carbono foram descobertas, respectivamente, por Jean-Baptist Biot, Louis Pasteur e van'Hoff. (HYNECK et al., 1990). Um carbono (ou nitrogênio, ou enxofre) ligado a quatro diferentes grupos substituintes, tem um centro assimétrico e, portanto, são moléculas quirais; esses grupos podem ocupar duas disposições espaciais distintas, e estas são, entre si, imagens especulares não-superponíveis, nem por rotação ou por translação. Essas duas formas representam uma classe de estereoisômeros, chamada de enantiômeros. A mistura equimolar desses isômeros numa solução denomina-se mistura racêmica.

Os fármacos quirais são geralmente comercializados na forma de racematos, pois as indústrias químicas e farmacêuticas enfrentam dificuldades na produção de medicamentos que os contém na forma enantiomericamente pura; seja na síntese ou na purificação, além do elevado custo acoplado a estes processos (WALDECK, 1993; ORLANDO et al., 2007). Porém, a maioria das moléculas presentes na estrutura dos organismos vivos são quirais e, portanto, macromoléculas como enzimas e receptores podem apresentar seletividade e distinção entre enantiômeros (MISLANOVÁ; HUTTA, 2003). Devido à estereosseletividade apresentada pelos receptores biológicos, as interações fármaco-receptor podem levar a diferenças farmacocinéticas (absorção, distribuição, eliminação, e principalmente, o metabolismo) e farmacodinâmicas (interação com os sítios-alvo da ação) (HYNECK et al., 1990; ORLANDO et al., 2007). Sendo assim, na maioria dos casos, apenas um enantiômero do fármaco quiral pode estar relacionado com o efeito desejado, e o outro pode até causar efeitos colaterais graves (BONATO et al., 2005).

Devido ao reconhecimento da importância de estudos enantiosseletivos de fármacos quirais, houve algumas mudanças na legislação referente ao desenvolvimento de fármacos (SILVA-JUNIOR et al., 2006; SMITH, 2009). Nos EUA, o FDA (*Food and Drug Administration*) tem apresentado exigências cada

vez mais rigorosas quanto à concessão de novas patentes de fármacos quirais, exigindo em documento, a descrição completa sobre os perfis farmacológico e farmacocinético de cada enantiômero, bem como de suas combinações (SILVA-JUNIOR et al., 2006). Neste aspecto, o desenvolvimento de técnicas de análise com possibilidade de identificação, separação e quantificação de enantiômeros está se tornando cada vez mais importante em química analítica, especialmente no desenvolvimento de novos medicamentos e no entendimento das propriedades farmacocinéticas destes compostos quirais (BONATO et al, 2005).

1.2. Análise Enantiosseletiva por HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é considerada uma técnica robusta, de facilidade operacional e versátil, possibilitando a determinação e quantificação de diversos fármacos e metabólitos. Os métodos de análise enantiosseletiva por HPLC podem ser classificados em diretos ou indiretos. Nos métodos diretos, emprega-se uma fase estacionária quiral (FEQ) ou uma fase móvel quiral. Nesse caso, a separação dos enantiômeros ocorre devido à formação de diastereoisômeros temporários na fase estacionária ou móvel, os quais terão tempos de retenção diferentes. Nos métodos indiretos, os analitos são derivatizados com o emprego de um reagente quiral e enantiomericamente puro. Posteriormente, os diastereoisômeros formados são resolvidos em fases estacionárias não-quirais (HAGINAKA, 2002; MISLANOVÁ; HUTTA, 2003; OLIVEIRA et al., 2005). Grande parte das resoluções quirais por HPLC utilizam a metodologia direta empregando FEQs. Atualmente, as FEQs mais empregadas na resolução de enantiômeros são as baseadas em polissacarídeos e em antibióticos macrocíclicos (ILISZ et al.; 2012). Os seletores quirais empregados na confecção dessas fases estacionárias são incorporados ou imobilizados na superfície de um suporte (geralmente sílica gel), atuando como discriminadores quirais *in situ* durante o processo (LOURENÇO et al., 2010).

1.2.1. Fases Estacionárias Quirais Baseadas em Polissacarídeos

Apesar dos polissacarídeos encontrados na natureza (*in natura*) serem capazes de reconhecimento quiral, as reações de derivatização aumentam sua estabilidade mecânica e sua habilidade de reconhecimento quiral (YASHIMA, 2001). Essas FEQs são muito versáteis e dependendo do material utilizado, podem ser feitas análises nos modos de eluição normal, reverso e polar orgânico, desde que haja um pré-condicionamento adequado da coluna (CASS et. al, 2000; QIU et. al, 2011). Desta forma, as FEQs baseadas em polissacarídeos tornaram-se umas das mais usadas na separação enantiomérica (WARD, 2006).

O mecanismo de interação entre os enantiômeros e estas fases estacionárias depende do polissacarídeo empregado, que pode ser amilose ou celulose, e das interações intermoleculares entre o analito e o seletor quiral (ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações π - π) (LAMMERHOFER et. al, 2010). A **Tabela 1** apresenta alguns exemplos comumente encontrados deste tipo de fase estacionária.

Tabela 1. Exemplos de fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos (Adaptado de BARTH, T., 2012).

Seletor Quiral	Nome Comercial	Tamanho da Partícula de sílica (μm)
Amilose tris (3,5-dimetilfenil) carbamato	CHIRALPAK AD	10
Amilose tris (3,5-dimetilfenil) carbamato	CHIRALPAK AD-H	5
Amilose tris [(S)- α -metilbenzilcarbamato]	CHIRALCEL AS	10
Amilose tris [(S)- α -metilbenzilcarbamato]	CHIRALCEL AS-H	5
Celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	CHIRALCEL OD	10
Celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	CHIRALCEL OD-H	5
Celulose tris (4-metilbenzoato)	CHIRALCEL OJ	10
Celulose tris (4-metilbenzoato)	CHIRALCEL OJ-H	5

1.2.2. Fases Estacionárias Quirais Baseadas em Antibióticos Macroclícos

Antibióticos macroclícos apresentam vários centros quirais e grupos funcionais de caráter ácido, básico e neutro, possibilitando inúmeras interações com moléculas quirais. As interações mais importantes são: ligações de hidrogênio, formação de complexos de inclusão, interações π - π , interações estéricas, interações eletrostáticas, interações dipolo-dipolo, dispersões de London e ligações iônicas (WARD; FARRIS, 2001; WARD et al., 1995; GÜBITZ; SCHIMID, 2006). O tipo de interação dependerá das propriedades da fase móvel, como o uso de aditivos orgânicos (por exemplo, trietilamina, dietilamina, ácido acético, ácido fórmico e suas misturas de ácido e base) e o pH desta. Os antibióticos macroclícos utilizados nas separações quirais são: vancomicina, ristocetina A, teicoplanina, avoparcina, rifamicina B, tiostreptona e teicoplanina aglicona (**Tabela 2**). Eles são covalentemente ligados à sílica o que garante estabilidade mecânica e química sem a perda das propriedades de reconhecimento quiral. Estas fases estacionárias podem ser utilizadas em todos os modos de eluição e possuem enantiosseletividade diferente, dependendo do tipo de antibiótico ligado a fase estacionária (ARMSTRONG et al, 1994; ARMSTRONG et al., 1995). No entanto, quando o modo polar orgânico é utilizado, maiores eficiências de separação são observadas (ABOUL-ENEIN; ALI, 2000). O mecanismo de separação quiral empregando as fases estacionárias derivadas de antibióticos macroclícos ainda está em discussão, mas a formação de complexos de inclusão assim como as interações eletrostáticas entre os analitos e os grupamentos ionizáveis desta fase estacionária vem sendo responsáveis pelo enantiorreconhecimento (D'ACQUARICA et al., 2008).

Tabela 2. Exemplos de fases estacionárias quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos.

Seletor Quiral	Nome Comercial	Tamanho da Partícula de Sílica (µm)
Vancomicina	CHIROBIOTIC V	5
Vancomicina	CHIROBIOTIC V2	5
Teicoplanina	CHIROBIOTIC T	5
Teicoplanina	CHIROBIOTIC T2	5
Teicoplanina aglicona	CHIROBIOTIC TAG	5
Ristocetina A	CHIROBIOTIC R	5

1.2.3. Modo de eluição Polar Orgânico em Cromatografia Quiral

Os modos de eluição são classificados de acordo com a polaridade dos solventes empregados como fase móvel e de acordo com a polaridade da fase estacionária. No modo normal, a fase móvel apresenta polaridade menor que a fase estacionária e misturas de solventes apolares (hexano, por exemplo) com solventes polares, como a etanol, regulam a retenção dos analitos (KUNATH et al., 1996). Já no modo reverso, a fase móvel possui polaridade superior à da fase estacionária e utiliza-se água em grandes proporções na fase móvel, e solventes polares são adicionados (acetonitrila, por exemplo) com a finalidade de otimizar a retenção dos analitos.

Recentemente, o modo polar orgânico vem sendo empregado na separação de enantiômeros. Nessa técnica, a fase móvel é composta somente por solventes orgânicos polares (como exemplo: etanol, metanol, isopropanol, acetonitrila) ou misturas desses. Isso confere a técnica diversas vantagens, tais como: ausência do uso de solventes apolares tóxicos como hexano, possibilidade dos solventes utilizados serem tratados e reutilizados para outros fins, solubilizam melhor os analitos e, como estes solventes são facilmente evaporados, os analitos podem ser concentrados, destacando assim a

separação enantiosseletiva em escala preparativa (HILÁRIO et al., 2012; MATTHIJS et al., 2006; ATES et al., 2008).

Em análises por espectrometria de massas (MS), este modo de eluição também é vantajoso. A presença de água no modo reverso dificulta a dessolvatação dos analitos se comparado aos solventes orgânicos polares como etanol e metanol, pois a tensão superficial e energia de solvatação da água são maiores (VOYKSNER, 1997). Por outro lado, solventes altamente apolares, como o hexano, que são empregados no modo normal, acarretam problemas de segurança, precisando muitas vezes diluir a fase móvel antes de entrar na fonte de ionização, o que causa problemas de detectabilidade (PÉREZ, BACELÓ, 2008). Desta forma, o uso de fases móveis que contenham somente solventes orgânicos polares pode proporcionar uma vantagem adicional quando o espectrômetro de massas é empregado como detector.

1.3. Fármaco Selecionado Para os Estudos

Para este projeto, foi escolhido o fármaco bambuterol para ser empregado como substrato. Esse fármaco é utilizado como agente broncodilatador em casos de asma, bronquite alérgica, doença pulmonar obstrutiva crônica, pneumonia, entre outras doenças do trato respiratório, além de ser indicado como inibidor de partos prematuros (BOWLES et al, 2007; CARPENTER, 2005).

O bambuterol é um fármaco β_2 -agonista adrenérgico e pró-fármaco da terbutalina, outro fármaco β_2 -agonista adrenérgico. Quando metabolizado pela enzima butirilcolinesterase (BuChE), sofre reação de hidrólise e quando metabolizado pelas oxidases do citocromo P450 sofre oxidação, gerando a terbutalina, metabólito ativo com grande atividade broncodilatadora, sendo por isso, muito utilizado no tratamento de doenças respiratórias (LINDBERG et al., 1989; TUNEK et al., 1988; PARISE-FILHO et al., 2010; BANG et al., 1998). A **Figura 1** ilustra as vias metabólicas citadas. O bambuterol contém um centro quiral e ele é vendido comercialmente na forma de cloridrato, como mistura racêmica com nome comercial Bambec[®] pela empresa AstraZeneca (BARTOLINČIĆ et al., 2005). Seu enantiômero na configuração (R) é apontado como provável responsável pelo efeito broncodilatador (GAZIĆ et al., 2006 e

CAO et al., 2008). O (S)-bambuterol mostrou-se inativo como antiasmático e possui efeitos cardíacos adversos. Além disso, foi levantada a suspeita de que os enantiômeros na configuração (S) dos β_2 -agonistas adrenérgicos podem causar hiper-reatividade das vias aéreas e até mesmo levar a um aumento na morte por asma (CAO et al., 2008). Seu metabólito ativo terbutalina também apresenta um centro quiral, sendo também, produzido como uma mistura de enantiômeros. O efeito β -agonista está relacionado principalmente com o enantiômero na configuração (R) (KÄLLSTRÖM et al., 1996). As propriedades farmacológicas do bambuterol e da terbutalina são semelhantes.

Figura 1. Esquema do metabolismo do bambuterol. Os asteriscos indicam os centros quirais. As setas pontilhadas representam a via oxidativa e as setas sólidas, o mecanismo de hidrólise (Adaptado de Rosenberg, 2001)

O termo pró-fármaco designa compostos que são inativos ou pouco ativos em sua forma usual, mas que após a administração são convertidos quimicamente na substância ativa de que são derivados. No caso dos fármacos em questão, o bambuterol apresenta dois grupos carbamatos nas mesmas posições das hidroxilas na molécula de terbutalina, como pode ser visto na **Figura 1**. Isto confere prolongação de sua ação farmacológica, pois a fração fenólica original da terbutalina é passível de sofrer um rápido metabolismo pré-

sistêmico. Quando administrado, o bambuterol sofre uma cascata de reações de hidrólise e oxidação, resultando no seu metabólito ativo, a terbutalina. A complexa biotransformação do bambuterol em terbutalina é um fator contribuinte para a longa duração dos efeitos farmacológicos no organismo (LINDBERG et al., 1989; RAUTIO et al, 2008; TUNEK et al, 1988; PERRSON et al, 1995).

A terbutalina é um β -agonista adrenérgico que apresenta seus principais efeitos nos receptores β_2 encontrados na musculatura lisa bronquial, uterina e vascular, atuando como um broncodilatador. Quando administrada nas doses recomendadas para a estimulação do receptores β_2 , raramente apresenta efeitos nos receptores cardíacos, mas pode, ocasionalmente, causar taquicardia em resposta ao estímulo direto ou indireto que surge como resposta reflexo à vasodilatação periférica (PLUMB, 2005; PETERSEN, 2012).

Todos os β -agonistas adrenérgicos possuem a mesma base de estrutura química, que consistem em substituições no anel aromático responsáveis por afetar significativamente a meia vida destes no organismo. A terbutalina contém grupos substituintes 1-H e 2-OH no seu anel aromático, resultando num rápido metabolismo e desativação do fármaco no fígado e no intestino, onde é convertida em sua forma inativa como conjugado sulfato em humanos e cães e em ácido glicurônico em ratos (BILLINGTON, HALL, 2011; SMITH, 1998). A principal via de excreção em humanos e cães é a urinária, onde mais da metade da terbutalina é excretada de forma inalterada (SMITH, 1998; PETERSEN, 2012).

1.3.1 Análise Enantiosseletiva do Bambuterol e da Terbutalina

Estudos relatam a separação enantiomérica do bambuterol (BARTOLINČIĆ et al., 2005; GAZIĆ et al., 2006) e da terbutalina (KIM et al., 2001; SALEH et al., 2008) e de ambos simultaneamente (LUO et al., 2010) com o uso de FEQs. Bartolinčić e colaboradores (2005) avaliaram a separação enantiomérica do bambuterol por HPLC, utilizando a coluna Chiralcel OD-RH e a coluna Chiralpak AD. De acordo com os autores, a melhor resolução foi obtida com a coluna Chiralpak AD, empregando como fase móvel *n*-hexano:dietilamina:2-propanol na proporção 70:0,1:30 (v/v/v). O método mostrou-se linear e preciso, com limite de quantificação igual a 0,004 mg mL⁻¹

para ambos os enantiômeros do bambuterol. Gazić e colaboradores (2006) também concluíram que a melhor resolução para separação enantiomérica do bambuterol foi obtida com a coluna Chiralpak AD. Kim e colaboradores (2001) estudaram a separação enantiomérica da terbutalina por HPLC em amostras de urina e encontrou a melhor separação com o uso da coluna quiral Sumichiral AO-4900, usando como fase móvel uma mistura de *n*-hexano:acetato de etila:1,2-dicloroetano:metanol:ácido trifluoroacético na proporção de 240:200:120:25:1 (v/v/v/v/v). Saleh e colaboradores (2008) desenvolveram e validaram um método para a separação e quantificação dos enantiômeros da terbutalina por HPLC usando a coluna Chirobiotic V e como fase móvel uma mistura de metanol:ácidoacético:triethylamina na proporção de 100:0,1:0,1 (v/v/v). Luo e colaboradores (2010) utilizaram a coluna Chirobiotic T e fase móvel composta por metanol:acetato de amônio 20 mmolL⁻¹ na proporção de 90:10 (v/v). Nesse estudo foi possível a separação enantiosseletiva do bambuterol e da terbutalina simultaneamente, empregando LC-MS/MS.

1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)

A cromatografia líquida possibilita o acoplamento com diversos sistemas de detecção, tais como UV-Vis, fluorescência e eletroquímicos, aumentando seu desempenho e versatilidade. Ao acoplar um cromatógrafo com o espectrômetro de massas (**Figura 2**), há a obtenção de informações estruturais, como a massa molar dos analitos em questão, e um aumento adicional na seletividade (VÉKEY, 2001; CHIRARDIA et al., 2008). Para que o acoplamento funcione perfeitamente, é necessário que as características de cada equipamento sejam preservadas na conexão e que não ocorram modificações químicas não controladas dos analitos e/ou perda de amostra durante a passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas (ARDREY, 2003; CHIRARDIA et al., 2008).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que fornece informações qualitativas (estrutura) e quantitativas (massa molecular) sobre as moléculas após estas serem convertidas em espécies ionizadas. Os compostos

de interesse são primeiramente introduzidos na fonte de ionização do espectrômetro de massas, onde são ionizados a fim de adquirirem cargas positivas ou negativas. Os íons então atravessam o analisador de massas e atingem diferentes partes do detector de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Após o contato destes íons com o detector, os sinais são gerados e gravados por um sistema computacional, e são representados graficamente na forma de um espectro de massas, onde é mostrada a abundância relativa desses sinais de acordo com a razão m/z (HO et al., 2003).

No entanto, LC e MS são técnicas consideradas incompatíveis, apresentando dificuldades para serem acopladas devido ao fato de que quando o líquido da fase móvel evapora, uma grande quantidade de gás é produzida e não eliminada facilmente pelo sistema de vácuo do espectrômetro de massas. Além disso, os valores de vazão utilizados no HLPC são elevados, de forma que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro (THONSON, 1998; CHIRARDIA et al., 2008). Também existe o problema relacionado às moléculas que são submetidas à separação por HPLC serem pouco voláteis e/ou não termoestáveis, o que impossibilita o uso das técnicas de ionização comumente empregadas em MS (ARDREY, 2003; CHIRARDIA et al., 2008). O sucesso deste acoplamento só aconteceu perante o desenvolvimento de interfaces que permitem a ionização à pressão atmosférica (API, "*Atmospheric Pressure Ionisation*") (GATES et al., 2006), que também são conhecidas por técnicas de ionização branda, possibilitando assim a ionização dos analitos de maneira suave, de forma que as moléculas mais sensíveis cheguem à fase gasosa intactas. Essas interfaces facilitam a evaporação da fase móvel, além de auxiliar na ionização das moléculas para que possam ser analisadas por MS.

Figura 2. Esquema dos componentes de um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Adaptado de GATES et al., 2006).

1.4.1. Modos de Ionização em LC-MS

Diversas fontes de ionização foram desenvolvidas para o acoplamento LC-MS, entre elas, podemos citar como as mais importantes: ionização por eletronebulização (*“Electrospray Ionisation”*, ESI), ionização química à pressão atmosférica (*“Atmospheric Pressure Chemical Ionisation”*, APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (*“Atmospheric Pressure Photoionization”*, APPI). A técnica de ionização empregada neste trabalho foi a ESI, e esta será melhor discutida a seguir.

1.4.1.1. Ionização por Eletronebulização (ESI)

A ionização por eletronebulização na espectrometria de massas vem emergindo como uma técnica importante, pois é uma ferramenta sensível e robusta. O ESI é capaz de promover a ionização do analito mesmo em quantidade muito baixa (fentomols) e volume na ordem de microlitros. Além disso, permite a análise de moléculas não voláteis e que não são termicamente estáveis, possibilitando a análise de biomoléculas que não são possíveis de

serem analisadas por técnicas convencionais. Quando utilizada acoplada com HPLC o LC-ESI-MS torna-se uma ferramenta muito poderosa para analisar diversas moléculas, com polaridades diferentes em uma amostra biológica complexa (HO et al., 2003).

A técnica ESI utiliza energia elétrica para transferir os íons da solução para a fase gasosa antes de eles serem analisados pelo espectrômetro de massas. As espécies iônicas presentes na solução podem então ser analisadas por MS com aumento na sensibilidade e os compostos neutros podem ser convertidos na forma iônica na solução ou na fase gasosa, pelos processos que serão descritos a seguir, e assim, serem analisados por MS (HO et al., 2003).

No processo de ionização podem ser formados três tipos de íons: os íons moleculares, as moléculas protonadas/desprotonadas (íons *quasi*-moleculares) e as moléculas cationizadas ou anionizadas (CROTTI et al., 2006). A formação de cada um pode ser explicada pelo equilíbrio entre três processos distintos que ocorrem dentro do capilar, que são:

- Reações de oxidação/redução: produzem íons moleculares ($M^{+•}$) ou ($M^{-•}$);
- Reações ácido/base ou de protonação/desprotonação: formam moléculas protonadas $[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M-H]^-$;
- Formação de adutos com cátions (geralmente, os da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos): resultam em moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, ou anionizadas $[M+Cl]^-$ (CROTTI et al., 2006).

A transferência das espécies ionizadas da solução para a fase gasosa por ESI envolve três etapas: (1) dispersão de pequenas gotículas com carga na forma de *spray* (pulverização), seguida pela evaporação do solvente da fase móvel (2) e (3) a ejeção dos íons a partir das gotículas altamente carregadas. A

Figura 3 ilustra este mecanismo de ionização.

Figura 3. Esquema do mecanismo de ionização por eletronebulização (ESI) (Adaptado de HO et al., 2003)

Dentro de uma fonte de ESI, um fluxo contínuo de solução de amostra passa através de um capilar de aço inoxidável que é mantido a uma tensão elevada (por exemplo, 2,5-6,0 kV) em relação à parede da câmara circundante. Dessa forma uma névoa de gotículas altamente carregadas com a mesma polaridade que a tensão do capilar é então gerada. A aplicação de um gás de nebulização, como o nitrogênio, circunda a solução de amostra eluída e aumenta a velocidade de fluxo dessa amostra. As gotículas carregadas geradas na saída do “*electrospray*” passam abaixo de um gradiente de pressão e de um gradiente de potencial para o analisador do espectrômetro de massas. Com o auxílio de uma elevada temperatura e do fluxo de gás nitrogênio, há evaporação do solvente e as gotículas carregadas diminuem continuamente de tamanho, resultando em uma diminuição do diâmetro da gota, e consequentemente, no aumento de densidade de carga na superfície. Quando a força do campo elétrico no interior da gotícula atinge um ponto crítico que é cineticamente e energeticamente favorável, os íons presentes na superfície destas gotículas são ejetados para a fase gasosa. Estes íons emitidos são coletados por meio de um cone, e então são acelerados em direção ao analisador de massas para subsequente análise de massa molecular e medidas de intensidade (HO et al., 2003).

1.4.2. Analisadores de massa

O analisador de massas separa as espécies carregadas formadas na fonte de ionização e sua escolha é baseada nas características da amostra e na aplicação desejada. Os principais tipos existentes são:

- Quadrupolo (Q): Este tipo de analisador é constituído por quatro hastes metálicas e os pares opostos destas estão conectados eletricamente. Aplica-se uma diferença de potencial com radiofrequência em um valor específico de tensão. Dessa forma íons que possuem uma determinada razão m/z atravessam o quadrupolo numa trajetória estável e são detectados (ARDREY, 2003; CHIRARDIA et al., 2008).
- Tempo de Vôo ("*Time-of-Flight*", ToF): É baseado no princípio de que os íons gerados na mesma fonte de ionização de um espectrômetro de massas possuem a mesma energia cinética e suas velocidades devem ser diferenciadas apenas pelo valor de suas massas. Assim, os íons produzidos na fonte de ionização são acelerados através de um tubo, onde serão identificados através do tempo que gastam para atravessá-lo, já que este está relacionado com a razão m/z de cada íon (ARDREY, 2003; CHIRARDIA et al., 2008). Esse analisador possui grande resolução e exatidão de massas.
- Aprisionador de íons 2D e 3D ("*Ion Trap*"): É um quadrupolo tridimensional que captura e aprisiona todos os íons introduzidos em seu interior. Quando uma determinada radiofrequência é aplicada, os íons de determinada razão m/z tornam-se instáveis e são libertados e detectados (CHIRARDIA et al., 2008).

Existe a possibilidade de acoplar os analisadores, podendo este acoplamento ser feito entre analisadores do mesmo tipo, como o triplo quadrupolo (QqQ), ou entre tipos diferentes, por exemplo, quadrupolo acoplado ao ToF (Q-ToF), o que permite a análise de massas sequencial (MS-MS) (VÉKEY, 2001).

1.5. Preparo de Amostras

A etapa de preparação de amostras é fundamental para uma análise adequada dos analitos presentes em amostras complexas, tais como meios de cultura. Baseado nisto, há uma grande tendência para o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de extração (PACHECO et al., 2011). As razões para isso são muitas, destacando-se a complexidade das matrizes das quais os compostos são extraídos. Essas matrizes possuem muitos componentes e possíveis interferentes para a análise; a existência de proteínas que são

incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração das substâncias a serem analisadas, que muitas vezes estão presentes ao nível de traços torna a etapa de preparação da amostra crucial no desenvolvimento de um método (QUEIROZ et al., 2001).

O transporte de moléculas de uma fase para outra é o procedimento fundamental da separação de espécies químicas de uma matriz e/ou de outros componentes coexistentes. A extração líquido-líquido ou por solvente ("*Liquid Liquid Extraction*", LLE) é baseada no princípio de que um soluto pode se distribuir em uma certa proporção entre dois solventes imiscíveis, um que normalmente é a água e outro um solvente orgânico com caráter apolar. Algumas deficiências na LLE, como o uso de grande quantidade de solventes orgânicos; a necessidade de um grande volume de amostra e a possibilidade de contaminação da amostra pelas repetitivas etapas de extração assim como a falta de seletividade, levaram ao desenvolvimento de microtécnicas de extração, visando corrigir estes problemas. Uma técnica de extração de amostras é denominada microtécnica quando o volume da fase extratora é muito pequeno 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). A tendência atual aponta na utilização de microtécnicas de preparação de amostras onde o consumo de solventes orgânicos é nulo ou mínimo. Além disso, a utilização de técnicas de microextração permite que ocorra a pré-concentração e a extração do analito simultaneamente com a eliminação de possíveis interferentes.

Neste contexto, metodologias baseadas na LLE foram surgindo, entre elas, a extração líquido-líquido homogênea ("*Homogeneous Liquid-Liquid Extraction*", HLLE) e a extração em ponto nuvem ("*Cloud-Point Extraction*", CPE), que são técnicas que empregam o uso de sistema ternário de solventes, assim como a microextração líquido-líquido dispersiva ("*Dispersive Liquid Liquid Microextraction*", DLLME) (REZAEI et al., 2006).

O procedimento CPE é baseado na separação de fases, que ocorre em soluções aquosas de tensoativos não-iônicos quando aquecidos acima da temperatura do ponto denominado 'ponto nuvem'. Neste ponto, a solução inicial é separada em duas fases, uma de tensoativo de pequeno volume, rica em analito, e uma grande fase aquosa. Esta técnica tem como desvantagens o uso

de tensoativos, que muitas vezes são incompatíveis com o sistema analítico empregado, e o controle minucioso de temperatura e pressão que é necessário para que se atinja o ponto nuvem (YAZDI, 2011; HUNG et al., 2007). A HLLC utiliza o fenômeno de separação de fases a partir de uma solução homogênea, e, simultaneamente, extrai os analitos alvo para a fase de separação. A separação de fases é baseada no fenômeno *salting-out*, na temperatura, no pH e na formação de pares iônicos. A utilização de ácidos, bases e temperatura, podem degradar o analito, sendo esta a principal desvantagem desta técnica (ANTHEMIDIS; IOANNOU, 2009).

Estas técnicas apresentam como principal vantagem o fato de a área superficial inicial entre o solvente extrator e a fase aquosa ser muito grande, de forma que o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente e o tempo de extração é curto. Com base nesta vantagem, e procurando eliminar as desvantagens da CPE e da HLLC, Rezaee e colaboradores em 2006 desenvolveram a DLLME (REZAEI et al., 2006), que entre outras já existentes, vem ganhando espaço e aumentando consideravelmente o número de publicações nos últimos anos (HERRERA et al., 2010) e foi a técnica escolhida para ser utilizada neste trabalho.

1.5.1. Microextração Líquido – Líquido Dispersiva

A DLLME é uma técnica miniaturizada de extração, relativamente recente, desenvolvida por Rezaee e colaboradores em 2006 e vem sendo muito empregada desde então por apresentar vantagens tais como facilidade de operação, rapidez, altos valores de enriquecimento, baixo consumo de solventes orgânicos e baixo custo (REZAEI et al., 2010; REZAEI et al., 2006; ZANG et al., 2009). Além de possibilitar recuperações altas dos analitos, chegando até mesmo a ser próximas de 100% em alguns casos (KOKOSA, 2013).

1.5.1.1. Princípios da DLLME

A DLLME é uma técnica muito simples e consiste em um solvente dispersor, o qual promoverá a dispersão de um solvente extrator na fase aquosa. Após a mistura dos solventes com a fase aquosa, há a formação de

um estado de turbidez (ponto nuvem), o qual consiste a etapa fundamental do processo de extração, pois é quando o solvente extrator se dispersa na fase aquosa, formando diversas microgotículas proporcionando assim a passagem do analito para a fase orgânica. A superfície de contato nesta etapa de turbidez é enorme devido às gotículas, o que torna a extração praticamente instantânea. Após a extração, há a centrifugação para que a fase orgânica rica em analito se sedimente ao fundo do tubo cônico que, com o auxílio de uma microseringa, é coletada e analisada (REZAEI et al., 2010). Na **Figura 4** estão representadas as etapas da DLLME.

Como uma técnica miniaturizada derivada da LLE, o princípio de extração é o equilíbrio do processo de distribuição do analito entre a solução da amostra e o solvente extrator. O coeficiente de distribuição (K) é definido como a razão da concentração do analito no solvente e na amostra. A DLLME é aplicável, a princípio, apenas para analitos com $K > 500$, ou seja, com caráter lipofílico alto ou moderado e não se aplica a analitos com alto caráter hidrofílico (ZANG et al., 2009).

Figura 4. Etapas da DLLME. Primeiramente, um volume de solução da amostra é colocado em um tubo de ensaio de vidro com fundo cônico (A) e injeta-se rapidamente o solvente dispersor junto com o solvente extrator com o auxílio de uma seringa ou pipeta. Em seguida, a mistura é suavemente agitada e uma solução turva é formada no tubo de ensaio B (ponto nuvem). Posteriormente, centrifuga-se o tubo de ensaio e as partículas da fase de extração são depositadas no fundo deste tubo, solubilizadas no solvente extrator (C). Um pequeno volume desta fase inferior é então coletado utilizando uma microseringa (D) e analisado no sistema cromatográfico (Adaptado de ZANG et al., 2009).

a inferior, pois com o uso do tubo cônico no processo de extração é mais fácil de ser coletada sem haver perdas; e, sobretudo, devem ser capazes de extrair o analito de interesse. Hidrocarbonetos halogenados como clorobenzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, diclorometano e dicloroetano são normalmente selecionados como solventes extratores (REZAEE et al., 2010; ANDRUCH et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2012). O volume do solvente extrator influencia diretamente a quantidade de fase sedimentada formada e devido à toxicidade dos organoclorados empregados, é otimizado para que apresente o menor valor possível com um alto fator de enriquecimento da amostra (razão entre as concentrações do analito na fase sedimentada e inicialmente, quando é adicionado na fase aquosa) (REZAEE et al., 2010; CALDAS et al., 2011).

O solvente dispersor deve ser miscível tanto em água como no solvente extrator, pois sua função é facilitar a passagem do analito para a fase extratora, permitindo a dispersão do solvente extrator em partículas finas na fase aquosa para formar uma solução turva (ponto nuvem). A área da superfície entre a solução aquosa e solvente extrator deve ser infinitamente grande, para haver uma grande eficiência da extração, e é o solvente dispersor que garante que isso aconteça. Os solventes dispersores comumente usados são: metanol, etanol, acetonitrila, isopropanol e acetona (REZAEE et al., 2010; KAMANKESH et al., 2013).

(ii) Controle de pH e Força Iônica

O equilíbrio dos analitos entre a solução aquosa e o solvente orgânico extrator pode ser deslocado de forma a aumentar a extração e torná-la mais seletiva. Isto pode ser feito controlando alguns fatores, como o pH e a força iônica da solução, fatores estes que já demonstraram importância na eficiência da LLE, a precursora da DLLME (ZGOŁA-GRZÉSKOWIAKA; KACZOREKB, 2011). Analitos encontrados na forma ionizada estão mais solvatados pela fase aquosa, o que dificulta o processo de extração pelo solvente orgânico. Desta forma, é necessário conhecimentos prévios dos valores de pKa dos compostos para que haja um ajuste de pH da solução, garantindo que os analitos de interesse estejam na forma neutra (CAMPONE et al., 2012).

Com o aumento da força iônica da solução, a solubilidade dos analitos em água decresce e este se torna mais solúvel na fase extratora, o que aumenta a recuperação até certo ponto, pois além da solubilidade dos analitos de interesse em água ser diminuída, a do solvente extrator em água também o é, acarretando em um aumento do volume da fase sedimentada e conseqüentemente, no decréscimo da concentração dos analitos nesta (ZANG et al., 2009).

1.6. Estudos de Biotransformação

1.6.1 Emprego de Modelos Microbiológicos em Processos de Biotransformação

A biotransformação é um processo onde sistemas biológicos, tais como fungos, bactérias e células vegetais, produzem mudanças na composição química de uma molécula que não é seu substrato natural. Quando se trata de compostos quirais, esta mudança química na molécula pode ser estereosseletiva, e, a partir de uma mistura racêmica, pode haver a produção de um enantiômero puro (BORGES et al., 2007).

Os modelos microbiológicos em processos de biotransformação são um complemento ou até mesmo uma alternativa aos modelos que empregam animais, já que possibilitam a mimetização do metabolismo em mamíferos e proporcionam todas as informações pertinentes sobre a via metabólica do composto a ser estudado (VENISETTY; CIDDI, 2003; LOZADA et al., 2008). As vantagens consistem na redução do uso de animais, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento do fármaco; no fato de apresentar uma metodologia mais simples, de menor custo e de fácil operação e manipulação; na possibilidade de rastreio de um grande número de cepas e de os metabólitos serem produzidos em alta quantidade e diversidade, facilitando desta forma a detecção, isolamento e identificação estrutural (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; BORGES et al., 2009).

A biotransformação também apresenta inúmeras vantagens sobre o processo químico de síntese, reforçando o fato de ser um método útil para a produção de novos compostos, enriquecimento da produtividade do composto

desejado e ocasionando a superação dos problemas associados com as análises químicas que compostos quimicamente sintetizados apresentam normalmente, o que fornece as informações básicas para elucidação da via biossintética (SURESH et. al., 2006).

1.6.1.1. Biotransformação Estereosseletiva Mediada por Fungos

As reações de biotransformação estereosseletivas feitas por micro-organismos e/ou por suas enzimas isoladas estão se tornando cada vez mais utilizadas na síntese de moléculas com importante atividade biológica e na pesquisa por novos compostos de interesse para indústrias químicas e farmacêuticas (BORGES et al., 2009).

Relatos de biotransformação estereosseletiva mediada por fungos foram encontrados para os fungos endofíticos *Nigrospora sphaerica* e *Chaetomium globosum*, que foram capazes de biotransformar o fármaco quiral ibuprofeno, obtendo seu metabólito (+)-(S)-2-hidroxiibuprofeno com um razoável excesso enantiomérico (BORGES et al., 2011). O fungo *Phomopsis sp.* (TD2) foi capaz de biotransformar estereosseletivamente o fármaco quiral midodrina em seu metabólito ativo desglímidodrina, sendo que 1,1% da (-)-midodrina gerou a (-)-desglímidodrina e 6,1% da (+)-midodrina a (+)-desglímidodrina (BARTH et al., 2010). Hilário e colaboradores (2012) apresentaram um estudo de biotransformação enantiosseletiva do albendazol em seu metabólito quiral e ativo, ricobendazol. Nesse estudo, o metabólito ativo, (+)-albendazol sulfóxido foi obtido utilizando os fungos *Nigrospora sphaerica*, *Pestalotiopsis foedans*, *Papulaspora immersa* e *Mucor rouxii*, sendo que com este último fungo foi obtido 80,6% de excesso enantiomérico (HILÁRIO et al., 2012). Carrão e colaboradores (2011), avaliando também a biotransformação enantiosseletiva do albendazol obtiveram o metabólito ativo (-)-albendazol sulfóxido empregando o fungo endofítico *Penicillium crustosum* (CARRÃO et al., 2011). Nesse estudo, o excesso enantiomérico observado foi de 50,4%. Bocato e colaboradores (2012) utilizando o fungo *Cunninghamella echinulata*, obtiveram 100% de excesso enantiomérico na produção do enantiômero (+)-9-hidroxirisperidona a partir da risperidona, enquanto que o fungo *Cunninghamella elegans* produziu ambos os enantiômeros, porém o

enantiômero correspondente a (+)-9-hidroxirisperidona apresentou um excesso enantiomérico de 21%, após 192 horas de incubação (BOCATO et al., 2012). De Jesus e colaboradores (2011), empregando o fungo *Mucor rouxii*, obtiveram a formação preferencial do enantiômero (–)-9-hidroxirisperidona a partir da risperidona. Nesse estudo o excesso enantiomérico foi de 79,6%. (DE JESUS et al., 2011). Desta forma, diversos estudos vêm mostrando a potencialidade de fungos atuarem com catalisadores enantiosseletivos.

1.7. Catálise Oxidativa de Fármacos

Sistemas que mimetizam o citocromo P450 tem sido objeto de pesquisa de um grande número de laboratórios ao redor do mundo nestes últimos 30 anos (LAHAYE; GROVES, 2007; MANSUY, 2007). A grande força motivadora destes estudos é o desejo de entender em detalhes a ativação do oxigênio molecular e sua transferência para os substratos orgânicos, visando a aplicação desta química na síntese de catalisadores seletivos e viáveis do ponto de vista econômico. Atualmente a utilização de modelos sintéticos para o citocromo P450 tem como objetivos as principais aplicações:

- i) Na catálise de oxidações seletivas em síntese orgânica.
- ii) Na previsão do metabolismo oxidativo de fármacos, agroquímicos e outros xenobióticos.
- iii) Na preparação de grandes quantidades de metabólitos oxidados de fármacos ou outros compostos de interesse biológico (MANSUY, 2007).

O progresso da pesquisa na área de metaloporfirinas como catalisadores de oxidação nas três últimas décadas tem levado ao desenvolvimento de diversos sistemas que são capazes de reproduzir as reações de oxidação mediadas pelo citocromo P450 e peroxidases, ao menos em termos do tipo de reações, mecanismos e, frequentemente, velocidades (MANSUY, 2007; NAZARI et al., 2005). Estas conquistas têm estimulado o desenvolvimento de catalisadores metaloporfirínicos que sejam ambos, eficientes e estáveis suficientes para tornarem-se competitivos para processos industriais em larga escala. Embora este projeto esteja ainda longe de ser atingido, os esforços nesta direção têm levado à obtenção de sistemas já com possibilidades de

aplicação na química fina, como a oxidação seletiva de fármacos, visando à obtenção de seus metabólitos e também na detoxificação de poluentes (NAZARI et al., 2005).

1.7.1 Catálise Assimétrica Empregando Complexos de Salen

Os complexos salen tetradentados possuem como ligantes dois nitrogênios (formando bases de Schiff) e dois oxigênios (ao invés dos quatro nitrogênios porfirínicos), e vêm demonstrando poder formar complexos que mimetizam a química das metaloporfirinas e, portanto, são também compostos adequados para serem usados como modelos biomiméticos do citocromo P450 (MAC LEOD et al., 2007). Complexos Fe (III)-salen são similares à Fe(III)-porfirinas. Em ambos os tipos de compostos, os ligantes tetradentados adquirem uma geometria quadrado planar, e frequentemente, coordenam com um quinto ligante em uma posição axial (um átomo de cloro, por exemplo) e a sexta coordenação permanece livre para a ligação com o oxigênio (BOTTCHEER et. al., 1996). Uma característica de grande importância dos complexos salen está relacionada ao fato de serem sintetizados através de métodos padrões, como a condensação de derivados de salicilaldeído e etilenodiamina, os quais são precursores comerciais. Além disso, esta síntese geralmente apresenta um rendimento superior a 90 % (BOTTCHEER et. al., 1996; PUI; MAHY, 2007). Outra vantagem dessa síntese envolve o controle das propriedades estéricas e eletrônicas através de alterações nos substituintes precursores. Uma grande quantidade de complexos salen com Cr(III), Mn(III), Fe(III) ou Co(II) foram sintetizados e estudados. Por exemplo, os complexos Fe(III)-salen alcançaram aproximadamente 2/3 da atividade catalítica dos melhores catalisadores metaloporfirínicos em reações de epoxidações e hidroxilações (BOTTCHEER et. al., 1996). Há também a possibilidade de sintetizar complexos quirais que podem ter grande aplicabilidade na catálise enantiosseletiva (MORRIS et al, 2001). Um complexo salen muito estudado é o chamado catalisador de Jacobsen, que é essencialmente composto por um complexo quiral de Mn(III)-salen (**Figura 6**). Este catalisador é responsável pela alta enantiosseletividade na síntese de uma série de alcenoscís-di-substituídos com um alto rendimento enantiomérico

(RENEHAN et al., 2005). Uma vantagem deste catalisador é sua simples preparação por um custo relativamente baixo. O catalisador de Jacobsen é uma alternativa na busca de catalisadores quirais eficientes para a inserção seletiva de um átomo de oxigênio, a partir de vários doadores, como peróxido de hidrogênio, alquilhidroperóxidos, hipoclorito de sódio ou o próprio oxigênio molecular, em moléculas orgânicas, sob condições suaves de reação (PINTO et al., 2008). Reações que utilizam o catalisador de Jacobsen é um ótimo método para a síntese de intermediários quirais no campo farmacêutico e na química fina (RENEHAN et al., 2005). Este catalisador pode ser usado para mimetizar a ação do citocromo P450 no metabolismo de fármacos *in vitro*, apresentando as várias vantagens já descritas acima.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é desenvolver uma nova metodologia analítica e estudar a (bio)transformação enantiosseletiva do fármaco bambuterol em seu metabólito ativo terbutalina empregando fungos e complexo de salen. Para alcançar estes objetivos foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- a) Desenvolvimento de método analítico para separação enantiosseletiva do bambuterol e da terbutalina.
- b) Desenvolvimento de uma técnica de preparo de amostra miniaturizada para extração dos analitos de meio de cultura líquido.
- c) Validação do método analítico para a determinação dos analitos em meio de cultura líquido.
- d) Aplicação do método de separação desenvolvido em estudos preliminares de catálise assimétrica utilizando os catalisadores de Jacobsen.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Equipamentos e Acessórios

Para desenvolvimento e otimização do método de separação, foi empregado um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kioto, Japão), composto por detector UV-Vis SPD-10A, bombas de duplo pistão modelo LC-10AS e uma controladora SCL-10A todos também da marca Shimadzu (Kioto, Japão). O software utilizado para aquisição dos dados foi o CLASS-VP (Shimadzu, Kioto, Japão). Um injetor Rheodyne modelo 7125 (Cotati, CA, EUA) com amostrador de 20 μ L foi empregado nas análises. Os comprimentos de onda escolhidos para a análise dos analitos foram 225 nm e 275 nm.

Para a validação da metodologia analítica e os estudos de (bio)transformação foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas LC-MS Triplo Quadrupolo Varian(Califórnia, EUA),modelo 1200 L acoplado ao autoinjeter ProStar modelo 410 Varian equipado com fonte de ionização por eletronebulização operada em modo positivo. O software utilizado para aquisição de dados foi o Varian MS Workstation.

Os equipamentos utilizados para cultivo dos fungos e reações de biotransformação foram: estufa de incubação bacteriológica modelo SL 101, marca Solab (Piracicaba, SP, Brasil) e uma autoclave vertical Phoenix modelo AV 75 (Araraquara, SP, Brasil). Empregou-se também, capela de fluxo laminar vertical, modelo PCR T2 Echo, Pachane (Piracicaba, SP, Brasil), e mesa agitadora (tipo “*shaker*”) com controle de temperatura da marca CIENTEC, modelo CT-712RN (Piracicaba, SP, Brasil).

No preparo das amostras por DLLME foi empregado um agitador tipo “vórtex” da marca Phoenix, modelo AP 56 (Araraquara, SP, Brasil); seringas de 1250 μ L e de 500 μ L da marca Hamilton (Reno, EUA); centrífuga da marca Hitachi, modelo CF 16RXII (Tóquio, Japão).

Para o preparo das soluções da catálise assimétrica e das soluções padrões, foi utilizada a balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo

AG245 (Barueri, SP, Brasil) e agitadores/aquecedores da marca Corning (Tewksbury, EUA).

3.1.2. Reagentes e Solventes

Os reagentes (grau analítico) cloreto de potássio (KCl), fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato monossódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). *N-N*-dimetilformamida (DMF) foi obtida da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Para o preparo dos meios de cultura utilizados neste trabalho, foram utilizados os reagentes: hidróxido de sódio foi obtido da Nuclear (Diadema, SP, Brasil). PDA ("*Potato Dextrose Agar*"), sacarose, extrato de levedura, triptona, dextrose e extrato de malte foram obtidos da Acumedia (Lansing, EUA). A água utilizada no preparo de soluções foi purificada utilizando o sistema Milli-Q plus (Millipore, MA, EUA).

Os solventes (grau HPLC) metanol, etanol, acetonitrila, isopropanol, dicloroetano, diclorometano e clorofórmio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da J.T. Baker (Phillipsburg, EUA). A trietilamina 99%, ácido fórmico 85%, ácido acético glacial e tetracloreto de carbono foram obtidos da empresa Synth (Diadema, SP, Brasil). Dietil-hexilfosfato foi comprado da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Os catalisadores de Jacobsen utilizados foram: *(R,R)*-Jacobsen, com 100% de pureza e *(S,S)*-Jacobsen, com 98% de pureza, adquiridos da AcrosOrganics. Os oxidantes foram: ácido metacloroperbenzóico (*m*-CPBA) e terc-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH), obtidos da empresa AcrosOrganics (Nova Jersey, EUA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), obtido da empresa Fluka (São Paulo, Brasil) e iodosilbenzeno (PhIO), que foi sintetizado de acordo com método descrito por SHAREFKIN (1973). Essa síntese é realizada pela hidrólise do iodobenzenodiacetato. Sua pureza (95%), foi determinada por titulação iodométrica, segundo metodologia descrita por LUCAS e colaboradores (1963).

3.1.3. Fases Estacionárias e Coluna de Guarda

As fases estacionárias quirais avaliadas na resolução da terbutalina e do bambuterol foram baseadas em amilose: Chiralpak AD-H (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μm); em celulose: Chiralcel OJ (250 mm x 4,6 mm, partículas de 10 μm), Chiralcel OD (250 x 4,6 mm, partículas de 10 μm) e Chiralcel OD-R, 250 mm x 4,6 mm, partículas de 10 μm); Chiralcel OD-H (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μm) e em antibióticos macrocíclicos: Chirobiotic T (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μm) e Chirobiotic V (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μm). As FEQ derivadas de polissacarídeos foram obtidas da Chiral Technologies (Exton, EUA). Já as FEQ baseadas em antibióticos macrocíclicos foram obtidas da Astec Inc. (Whippany, EUA). A coluna de guarda empregada durante todos os estudos foi uma C18 (4,6 mm x 12,5 mm, partículas de 5 μm), obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.1.4. Soluções Padrão de Bambuterol, Terbutalina e Padrão Interno

O bambuterol (padrão analítico-USP) foi adquirido da empresa Las do Brasil e a terbutalina e o salbutamol (padrões analíticos) foram gentilmente cedidos pela empresa AstraZeneca. Soluções padrão de bambuterol foram preparadas no intervalo de concentrações de 40 a 1400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de uma solução estoque de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. Estas soluções foram utilizadas na validação analítica do método; o salbutamol, utilizado como padrão interno, foi preparado na concentração de 1 mg mL^{-1} . Para o desenvolvimento e otimização da separação cromatográfica e extração, foram utilizadas soluções de 1 mg mL^{-1} preparadas em metanol de cada fármaco citado neste parágrafo. Todas as soluções foram estocadas em tubos de vidro e armazenadas em freezer a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo da Fase Móvel

As soluções de fase móvel foram preparadas por simples mistura dos solventes orgânicos polares com posterior homogeneização. Aditivos orgânicos

foram utilizados (ácido fosfórico, trietilamina, ácido acético e acetato de amônio), sendo acrescentados à fase móvel recém-preparada com a finalidade de melhorar a resolução, detecção e a simetria dos picos.

3.2.2. Preparo da Solução Tampão

A solução tampão utilizada neste trabalho foi a de fosfato na concentração de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,6 e foi empregada durante a extração dos analitos em meio de cultura líquido, sendo preparada pesando-se os sais do tampão ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e adicionando água deionizada conforme a quantidade desejada. O pH era posteriormente ajustado com auxílio de um peagômetro e adição de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico.

3.2.3. Otimização da Separação Enantiosseletiva do Bambuterol e da Terbutalina e detecção por UV-Vis

Previamente a esta etapa, foi preparada uma solução estoque de cada fármaco na concentração de $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, pesando 1 mg deste e dissolvendo em 10 mL de metanol grau HPLC. Para preparar a amostra a ser injetada no HPLC, 25 μL de cada solução padrão eram pipetados em um tubo de ensaio de fundo cônico, e o solvente evaporado sob fluxo de ar comprimido. Ao final, o resíduo era solubilizada em 50 μL de fase móvel e injetada no sistema para cromatografia líquida de alta eficiência.

A escolha da fase móvel foi realizada sempre de forma que a análise fosse realizada no modo polar orgânico. Inicialmente, foram avaliados solventes puros como metanol, etanol, acetonitrila e isopropanol e posteriormente a resolução entre os analitos foi avaliada. Então, foi avaliado o uso de aditivos orgânicos à fase móvel. Os aditivos ácidos (ácido acético e ácido fórmico) foram avaliados em proporções de 0,1% a 0,4% (v/v), separadamente. Posteriormente, avaliou-se a adição do aditivo básico trietilamina, separadamente e juntamente a cada ácido em uma quantidade não superior a 0,1%, pois esta base aumenta muito os ruídos na linha de base e deve ser utilizada na menor quantidade possível. A soma de aditivos ácidos e básicos inseridos à fase móvel nunca ultrapassou 0,5%. Após esta etapa,

houve combinação entre os solventes avaliados em variadas proporções para melhorar a eficiência da separação dos analitos e selecionar tempos de retenção não muito elevados.

O parâmetro utilizado para avaliação da separação foi a resolução (R_s), calculada de acordo com a equação a seguir (SNYDER et al., 1997):

$$R_s = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{B1} + w_{B2})}$$

Onde R_s é a resolução, t_{R2} é o tempo de retenção do enantiômero mais retido, t_{R1} tempo de retenção do enantiômero menos retido, w_{B1} é a largura de base do primeiro e w_{B2} do segundo pico, respectivamente.

A vazão da fase móvel utilizada foi ajustada conforme a sua viscosidade, tempo de análise e resolução entre os analitos, sempre respeitando a pressão máxima permitida para cada tipo de coluna. Todas as análises foram realizadas a temperatura de $23 (\pm 2)^\circ\text{C}$.

3.2.4 Otimização da Separação Enantiosseletiva e Detecção por LC-MS

Os parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de massa foram: tensão do capilar 3,0 kV, tensão do cone 40 V, temperatura da fonte 40°C , temperatura de dessolvatação 350°C e varredura para análise em modo “fullscan” na faixa de massas de m/z 200 a 450. Para as análises por LC-MS utilizou-se a coluna cromatográfica quiral derivada do antibiótico macro cíclico teicoplanina, a Chirobiotic T. As análises por inserção direta em espectrômetro de massas (ID-MS) foram realizadas através de injeção da amostra, em fluxo de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ de MeOH aditivados 0,2% (v/v) de ácido acético e 0,1% (v/m) de acetato de amônio, na proporção 8:2. O método cromatográfico desenvolvido consiste em eluição isocrática de 96% de metanol grau HPLC aditivado de 0,2% (v/v) de ácido acético e 0,1% (v/m) de acetato de amônio em H_2O ultra-pura, com desenvolvimento cromatográfico de 10 minutos, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e divisor de fluxo 2:1 na interface cromatógrafo líquido e espectrômetro de massas. O volume de injeção utilizado foi de 25 μL .

3.2.5 Procedimentos para DLLME

O processo de DLLME foi realizado avaliando primeiramente a escolha dos solventes dispersor e extrator, e posteriormente, os respectivos volumes. Depois foi avaliada a concentração do reagente para a formação de par-iônico e o volume da matriz. Todos os estudos foram feitos em triplicata.

Os solventes dispersores avaliados foram: metanol, acetona, acetonitrila, etanol e isopropanol. Os solventes extratores avaliados foram: diclorometano, dicloroetano, tetracloreto de carbono e clorofórmio. Devido às características físico-químicas dos analitos não favorecerem a extração por esta técnica (terbutalina, $\log P = 1,4$ (*Drug Bank*) e $pK_{a1} = 8,8$; $pK_{a2} = 10,1$ e $pK_{a3} = 11,2$ (HOOVER, 1990); bambuterol, $\log P = 2,05$ (*Drug Bank*) e $pK_{a1} = 9,6$ e $pK_{a2} = 13,7$ (SCINFINDER) foi necessária a adição de 100 μL de uma solução de 0,1 mol L^{-1} de di(2-etil-hexil)fosfato em clorofórmio, um reagente para formação de par-iônico e assim facilitar a partição dos analitos para fase orgânica. Juntamente ao meio de cultura líquido era adicionado um volume de tampão fosfato 0,25 mol L^{-1} , pH 7,6; que foi otimizado juntamente com o volume da matriz (BRANDTS et al., 1982).

Após a formação do estado de turbidez, as amostras eram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, a uma temperatura de 4 °C. Então, a fase inferior contendo os analitos de interesse era coletada e evaporada sob fluxo de ar comprimido. Ao fim da extração as amostras eram ressuspensas em ácido clorídrico (BRANDTS et al., 1982) 0,01 mol L^{-1} (25 μL), juntamente com a fase móvel (25 μL) e injetada no sistema para cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV-Vis.

3.2.6 Estudos de Biotransformação

3.2.6.1 Fungos

Foram utilizados os fungos endofíticos *Glomerella cingulata* (VA1), *Fusarium oxysporum* (SS50), *Penicillium crustosum* (VR4), *Aspergillus fumigatus* (VR12), o fungo de solo *Mucor rouxii* e os fungos obtidos na ATTC® (*American Type Culture Collection*, University Boulevard, Manassas, VA, EUA),

Cunninghamella echinulata (ATCC 8688A) e *Cunninghamella elegans* (ATCC 10028B). Os fungos endofíticos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Mônica T. Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e o fungo *Mucor rouxii* foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Nieve A. J. C. Furtado também da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Os fungos endofíticos e de solo foram cedidos na forma de “plugs de ágar” e foram mantidos em meio de glicerol:água (8:2, v/v) a -20°C .

O processo de biotransformação empregando fungos foi realizado em três etapas:

- i) Incubação das espécies de fungo em meio sólido PDA, empregando placas de Petri, para o seu crescimento;
- ii) Transferência de três “plugs” de cada espécie de fungo do meio sólido para o meio líquido malte, que é rico em nutrientes, para o crescimento da massa micelial do fungo;
- iii) Transferência da massa micelial para o meio de cultura líquido Czapek, que é pobre em nutrientes. Nesta etapa ocorre a adição do fármaco selecionado para os estudos de biotransformação.

3.2.6.1.1 Preparo dos Meios de Cultura

(i) Meio de Cultura Sólido PDA

O meio de cultura Batata Dextrose Agar (“*Potato Dextrose Agar*”, PDA) é o utilizado na primeira etapa de crescimento dos fungos. Utiliza-se 15 mL desse meio sólido em cada placa de Petri e assim, a quantidade de PDA a ser pesada depende da quantidade de placas a serem empregadas. Após a pesagem, completa-se o volume com água ultra-pura e esta solução é esterilizada em autoclave por 30 minutos e em seguida, distribuída nas placas de Petri dentro de capela de fluxo laminar vertical.

(ii) Meio de Cultura Líquido Malte

O preparo deste meio pré-fermentativo é feito através da mistura dos seguintes reagentes nas concentrações: extrato de malte (10 g L^{-1}), dextrose

(10 g L⁻¹), triptona (5 g L⁻¹) e extrato de levedura (3 g L⁻¹) e água ultra-pura para completar o volume. Esta solução possui um pH próximo de 7, que é corrigido para 6,2 com HCl 0,5 mol L⁻¹ e posteriormente, esterilizado em autoclave.

(iii) Meio de Cultura Líquido Czapek

Este meio é onde os fungos permanecem durante o processo de biotransformação, totalizando 10 dias. Também é o meio utilizado nos processos de otimização de microextração e de validação da metodologia analítica deste trabalho. Seu preparo é feito misturando em massa os seguintes reagentes nas proporções: sacarose (2,5%), NaNO₃ (0,2%), K₂HPO₃ (0,1%), MgSO₄·7H₂O (0,05%), KCl (0,05%) e FeSO₄·7H₂O (0,001%). Esta mistura é dissolvida em água ultra-pura até completar o volume previamente calculado para as porcentagens em massa e resulta numa solução com pH próximo de 8, que é corrigido para 5,0 com HCl 1,0 mol L⁻¹. Em seguida, o meio Czapek é esterilizado em autoclave para que as massas miceliais dos fungos sejam transferidas.

3.2.6.2 Procedimento de Biotransformação do Bambuterol

Inicialmente os “plugs” em ágar dos fungos foram repicados, em triplicata, em placas de Petri contendo o meio de cultura PDA com auxílio de uma alça de platina esterilizada em capela de fluxo laminar vertical e incubados a 30°C em estufa bacteriológica, período que variou entre três e dez dias, dependendo da espécie de fungo.

Após esta etapa, três discos de 0,5 cm do meio de cultura com os fungos foram retirados com o auxílio de um “*Transfer Tube*”, inoculados assepticamente em 15 mL de meio pré-fermentativo de malte e colocados sob agitação de 120 rpm a uma temperatura de 30°C num agitador orbital tipo “*shaker*” por 5 dias para o crescimento da massa micelial dos fungos estudados.

Em seguida, esta massa formada foi transferida assepticamente com o auxílio de uma alça de platina para 100 mL de meio fermentativo de Czapek juntamente com 3 mg de bambuterol dissolvido em 200 µL de dimetilformamida

(DMF). A incubação (30°C, 120 rpm) no “*shaker*” foi realizada por 10 dias (**Figura 7**) sendo que a cada 48 horas uma alíquota de 8 mL foi coletada do fluido da cultura assepticamente e armazenado a -20° C até o momento da análise. Controles contendo apenas cada espécie de fungo separadamente em meio Czapek e apenas meio Czapek com a solução de bambuterol também foram coletados e armazenados. Para todas as espécies de fungo, o procedimento foi realizado da mesma maneira e em duplicata ($n = 2$).

Figura 7. Incubação dos fungos em meio Czapek com bambuterol no “*shaker*” durante o processo de biotransformação.

3.2.6.3 Estudos Preliminares de Catálise Assimétrica Empregando Complexo de Salen

As reações de catálise do bambuterol foram preparadas variando-se a proporção, em concentração (mmol L^{-1}), entre os reagentes, sendo estudadas as proporções de 1:20:10, 1:20:20; 1:20:50 e 1:20:100 de catalisador, substrato e oxidante, respectivamente. Para tanto, foi preparado primeiramente soluções estoque de catalisador (concentração: $0,374 \text{ mg mL}^{-1}$), de substrato (concentração: $2,2 \text{ mg mL}^{-1}$) e em alguns casos, quando a massa a ser pesada era muito pequena, também preparou-se soluções estoque de oxidante (*m*-CPBA ou iodosilbenzeno). Este procedimento era feito dissolvendo-se a massa de oxidante em 5 mL de acetonitrila.

As reações foram preparadas pipetando-se alíquotas da solução estoque de bambuterol, catalisador e oxidante, respectivamente, mantendo-se um volume constante de 500 µL. As reações se processavam por 24 horas, com agitação constante e eram interrompidas pela evaporação do solvente sob fluxo de ar comprimido. Posteriormente o resíduo era solubilizado na fase móvel e analisado por LC-MS.

Juntamente com as reações foram preparados dois tipos de controle. No controle *A* adicionou-se somente o substrato e o oxidante, sem o catalisador, e no controle *B*, adicionou-se somente substrato e catalisador, sem a presença do oxidante.

3.3. Validação da Metodologia Analítica para Análise do Bambuterol em meio de Cultura Líquido Czapek

O método foi validado conforme recomendações de guias oficiais (EMA, 2011; ANVISA, 2012) pela avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de quantificação, seletividade e estabilidade. A validação da metodologia analítica foi realizada empregando LC-MS empregando as condições de análise e extração otimizadas. Estudos preliminares de biotransformação mostraram um decaimento na quantidade de bambuterol do meio de cultura, porém, sem o surgimento do metabólito, terbutalina. Dessa forma, a metodologia analítica foi somente validada para quantificação do bambuterol em meio de cultura líquido Czapek.

3.3.1. Linearidade

A linearidade foi realizada fortificando 2 mL meio de cultura líquido Czapek na faixa de concentração de 500, 950, 4800, 6250, 15000 e 17500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero do bambuterol e realizada em triplicata ($n=3$). Os resultados foram ponderados empregando o peso $1/x^2$. A linearidade foi determinada avaliando coeficiente de correlação (r), o teste de falta de ajuste (*Lack of Fit*) e pela análise estatística de variância. O programa estatístico MINITAB Release versão 14.1 (State College, PA, EUA) foi utilizado para os cálculos estatísticos.

3.3.2. 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 EMA em seu “Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos”. O LQ do método foi determinado fortificando 2mL de meio de cultura líquido Czapek ($n = 5$) com 500ng mL⁻¹ de bambuterol e analisado com base em uma curva analítica preparada simultaneamente no mesmo dia de análise.

3.3.3. 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 2 mL de meio de cultura Czapek fortificadas com os enantiômeros de bambuterol nas concentrações de 500, 950, 6250 e 15000 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 ($n = 5$) para cada concentração. Já, o procedimento interensaio, foi realizado em três dias consecutivos, também em quintuplicata para cada concentração.

3.3.4. Recuperação

Na determinação da recuperação absoluta do procedimento de extração, alíquotas de 2 mL de meio de cultura líquido Czapek foram fortificadas com bambuterol nas concentrações de 950, 6250 e 15000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero ($n=3$) do bambuterol 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 na fase móvel. A recuperação foi expressa como porcentagem (%) da quantidade extraída.

3.3.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise de meio de cultura líquido Czapek estéril e meio de cultura líquido Czapek estéril incubado com os fungos estudados, sem a adição do analito.

3.3.6. Estabilidade

3.3.6.1. Ciclos 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 500ng mL^{-1} (baixa) e 15000 ng mL^{-1} (alta) de cada enantiômero de bambuterol 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 congeladas novamente e mantidas 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%.

3.3.6.2. 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 3.3.6.1 foram mantidas a temperatura ambiente $22 (\pm 2^{\circ}\text{C})$ 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%.

3.3.6.3. Condições de Biotransformação

Na determinação da estabilidade nas condições de biotransformação, uma alíquota de 3 mg de bambuterol dissolvido em DMF foi adicionado ao frasco empregado no procedimento de biotransformação contendo 100 mL de meio de cultura líquido Czapek (7500 ng mL^{-1} de cada enantiômero). Após essas amostras foram submetidos a mesma condição empregadas no procedimento de biotransformação (ver item **3.2.6.2**). Durante o período de biotransformação (10 dias), alíquotas de 2 mL ($n = 3$) destas amostras foram coletadas no primeiro (dia 0) e no último dia (dia 10) 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%.

3.3.6.4. 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 alta e baixa, descritas no item **3.3.6.1**. 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 as amostras que apresentaram E% e CV% inferiores a 15%.

3.3.7. Efeito da Matriz na Ionização dos Analitos

Este estudo foi realizado para verificar se a matriz empregada, no caso o meio de cultura líquido Czapek, interfere na ionização dos analitos em análises

por LC-MS. Para isso, amostras contendo apenas Czapek foram extraídas e posteriormente fortificadas com 50 μL de soluções de bambuterol nas concentrações de 950, 6250 e 15000 ng mL^{-1} . Estas amostras foram analisadas e comparadas com soluções padrão nas mesmas concentrações diluídas diretamente na fase móvel, sem passar pelo processo de extração. Os resultados foram expressos como porcentagem de erro relativo (considerando as áreas das soluções padrão como 100%) e coeficiente de variação.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização da Separação Enantiosseletiva do Bambuterol e da Terbutalina

Entre as colunas quirais avaliadas, somente a coluna Chirobiotic T, que possui como seletor quiral o antibiótico macrocíclico teicoplanina, possibilitou a separação enantiomérica do bambuterol e da terbutalina simultaneamente.

A melhor separação enantiomérica do bambuterol e da terbutalina foi realizada com a fase móvel composta por acetonitrila e metanol na proporção de 80:20 (v/v) acrescida de 0,3% de ácido fórmico e 0,1% de trietilamina, e uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. Esta vazão manteve-se alta para que a eluição de todos os analitos não fosse muito demorada, resultando em um tempo final de análise de, aproximadamente, 12 minutos. A resolução entre enantiômeros do bambuterol foi de 1,75 e a resolução entre os enantiômeros da terbutalina foi igual a 2,00 (**Figura 8**).

A utilização de aditivos orgânicos à fase móvel foi um determinante muito importante na separação dos analitos. A adição de aditivos ácidos podem protonar os grupamentos silanóis residuais da fase estacionária ou realizar par-iônico com analitos com características básicas. Já os aditivos básicos podem formar par-iônico com os grupamentos silanóis residuais da fase estacionária, o que resulta em uma menor interação destes com os compostos de interesse, melhorando, portanto a resolução da separação (YE; STRINGHAM, 2006). O mecanismo exato do efeito da mistura desses aditivos orgânicos na resolução quiral dos analitos ainda é desconhecido.

Figura 8. Separação enantiomérica do bambuterol e da terbutalina utilizando FEQ Chirobiotic T e fase móvel composta por acetonitrila e metanol 80:20 (v/v) + 0,3% ácido fórmico e 0,1% trietilamina a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. Detecção em 275 nm. Temperatura de análise 23(±2)°C. 1 e 2 enantiômeros do bambuterol, 3 e 4 enantiômeros da terbutalina.

4.2. Otimização da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Os principais parâmetros que influenciam a DLLME foram otimizados com o objetivo de extrair o máximo de analitos do meio com um mínimo de interferentes. Devido a característica altamente polar dos analitos foi necessário a adição do reagente para pareamento iônico di(etil-hexil)fosfato (DEHP) ao meio de cultura, como explicado no item **3.2.5**. Todo procedimento foi realizado adicionando 50 µL de cada fármaco na concentração de 1 mg mL⁻¹, em triplicata. Em cada caso foi construído um gráfico que relaciona a quantidade extraída, representada pela área dos picos dos analitos, frente à modificação realizada. Os enantiômeros do bambuterol e da terbutalina estão representados como enantiômero 1 (E1) e enantiômero 2 (E2), para cada fármaco, nas figuras a seguir. Os resultados da otimização da DLLME foram avaliados focando, principalmente, a recuperação da terbutalina, pois este analito, provavelmente estará em menor concentração do meio de cultura, caso haja biotransformação do bambuterol pelos fungos.

O primeiro parâmetro otimizado foi o tipo de solvente dispersor. A otimização do solvente dispersor foi feita utilizando-se, além das condições pré-estabelecidas acima, dicloroetano como solvente extrator (100 μL) e os solventes avaliados foram: metanol, etanol, acetonitrila, acetona e isopropanol, adicionando 500 μL destes (**Figura 9**). Como pode ser observado na **Figura 9**, o melhor solvente dispersor para a finalidade deste trabalho foi o isopropanol.

Figura 9. Otimização do solvente dispersor utilizando 500 μL de cada e dicloroetano como solvente extrator (100 μL). Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Volume de matriz: 2 mL. Concentração de DEHP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração dos analitos: $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Da mesma maneira, fixando agora o isopropanol como solvente dispersor em um volume de 500 μL , foi avaliado o tipo de solvente extrator. Foram avaliados os seguintes solventes extratores: tetracloreto de carbono, dicloroetano, diclorometano e clorofórmio empregando um volume de 100 μL . Como pode ser observado na **Figura 10**, o diclorometano foi o melhor solvente extrator.

Figura 10. Otimização do solvente extrator utilizando 100 μL de cada e isopropanol como solvente dispersor (500 μL). Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Volume de matriz: 2 mL. Concentração de DEHP 0,1 mol L^{-1} . Concentração dos analitos: 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Após a determinação do par de solventes (dispersador/extrator), o volume de cada um foi então otimizado, iniciando pelo volume do solvente dispersor. Para isto, utilizou-se 100 μL de diclorometano e o volume de isopropanol foi avaliado no seguinte intervalo: 300 μL , 400 μL , 500 μL , 600 μL e 700 μL . O melhor resultado foi obtido com o uso de 600 μL deste solvente (**Figura 11**). Conforme a quantidade de solvente dispersor é aumentada, ocorre uma melhora da dispersão dos analitos na fase orgânica, o que facilita a formação do estado de turbidez, e, portanto, a extração. Contudo esse processo continua até um ponto. A partir de um determinado volume de solvente dispersor (isopropanol) há um prejuízo na solubilidade dos analitos na fase extratora prejudicando e diminuindo a extração (REZAEI et al., 2006).

Figura 11. Otimização do volume de solvente dispersor. Solvente extrator: diclorometano. Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Volume de matriz: 2 mL. Concentração de DEHP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração dos analitos: $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O volume de solvente extrator foi otimizado variando o volume de diclorometano no seguinte intervalo: 50 μL , 70 μL , 100 μL , 200 μL e 300 μL (**Figura 12**). Como pode ser observado na **Figura 12**, considerando a barra de erros entre as replicatas, não houve diferença significativa na variação do volume de solvente extrator. Dessa forma, com o objetivo de empregar uma menor quantidade de solvente, foi empregado 50 μL para as análises posteriores.

Figura 12. Otimização do volume de solvente extrator. Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Solvente dispersor: isopropanol 600 μL . Volume de matriz: 2 mL. Concentração de DEHP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração dos analitos: $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Finalmente, foi realizado um experimento para avaliar o efeito do volume do meio de cultura na recuperação dos analitos. O estudo foi realizado variando o volume do meio de cultura Czapek e o volume da solução tampão fosfato, de forma que o volume final sempre fosse igual a 4 mL. A **Figura 13** apresenta o resultado referente ao efeito da variação de volume do meio. Como pode ser observado, até 2 mL a quantidade recuperada foi estatisticamente constante, sendo que em 3 mL de meio Czapek ocorre um decréscimo na recuperação dos analitos. Esse efeito pode ser devido ao efeito “salting-out” provocado pela solução tampão fosfato. Com o aumento da concentração de sal há um aumento na recuperação dos analitos devido a interação destes com a moléculas de água presente no meio, facilitando assim a partição dos analitos no solvente orgânico. Contudo, esse efeito é observável até uma determinada concentração de sal, sendo que em concentrações elevadas pode desfavorecer a extração. Além disso, a alta concentração iônica pode aumentar a viscosidade do meio e assim, diminuir a transferência do analito para a fase orgânica, prejudicando sua partição no solvente orgânico extrator (FLANAGAN et al., 2006). Dessa forma, foi empregado 2 mL de meio de cultura para os estudos posteriores.

Figura 13. Otimização dos volumes de meio de cultura Czapek e tampão fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,6. Temperatura de extração: $23(\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Solvente dispersor: isopropanol $600 \mu\text{L}$. Solvente extrator: diclorometano $50 \mu\text{L}$. Concentração de DEHP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração dos analitos: $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A **Tabela 3** mostra as condições finais estabelecidas para DLLME na análise dos enantiômeros do bambuterol e terbutalina em meio de cultura líquido Czapek.

Tabela 3. Condições finais para a DLLME na análise de bambuterol e terbutalina em meio de cultura.

Parâmetro	Condição otimizada
Solvente dispersor (volume)	Isopropanol (600 µL)
Solvente extrator (volume)	Diclorometano (50 µL)
Volume da matriz	2 mL Czapek + 2 mL tampão fosfato 0,25 mol L ⁻¹ ; pH 7,6
Centrifugação (velocidade, tempo e temperatura)	3000 rpm, 5 min, 4 °C
Tempo estimado para extração de 32 amostras (capacidade da centrífuga)	8 min

4.3. Adequação do método para análises por LC-MS

Até o momento, toda otimização foi realizada empregando HPLC e detecção por UV-Vis. Com o objetivo de melhorar a seletividade e a detectabilidade, o método foi readequado para análise por LC-MS. Dessa forma, a separação enantiomérica dos analitos foi reutilizada, empregando para tanto uma fase móvel composta por 96% de metanol aditivado de 0,2% (v/v) de ácido acético e 0,1% (v/m) de acetato de amônio em H₂O ultra-pura e vazão de 1,0 mL min⁻¹.

O resultado obtido pela separação cromatográfica acoplada a espectrometria de massas, nessas novas condições, é apresentado na **Figura 14**. A resolução dos enantiômeros do bambuterol foi de 1,52 e dos enantiômeros da terbutalina foi igual a 1,54, calculados de acordo com o método descrito na seção 3.2.3. Além disso, o salbutamol foi incluído para ser empregado como padrão interno (PI). As razões *m/z* dos analitos utilizadas no monitoramento por espectrometria de massas foram: 368 (bambuterol), 240

(salbutamol) e 226 (terbutalina), correspondentes a massa molar destes compostos protonados.

Figura 14. Cromatogramas da separação do bambuterol, salbutamol e terbutalina obtidos pela análise em LC-MS. O cromatograma A é o obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 226$ (terbutalina); C é a extração da razão $m/z = 368$ (bambuterol) e D é a extração da razão $m/z = 240$ (salbutamol). *O cromatograma referente a análise do salbutamol apresenta dois picos porque esse analito é quiral.

4.4. Estudos de Biotransformação com Fungos

Inicialmente, os produtos de biotransformação empregando fungos foram analisados por HPLC com detecção por UV-Vis. Entretanto, esta metodologia não se mostrou adequada, pois os picos referentes aos enantiômeros do metabólito terbutalina não surgiram, o que poderia indicar ausência de sua produção na biotransformação do bambuterol, como também uma produção em quantidade pequena, impossível de ser detectada por UV-Vis nas condições otimizadas. Além do baixo coeficiente de absorvidade molar da terbutalina, sua recuperação estimada na extração foi aproximadamente 55% para cada enantiômero. Dessa forma, caso fosse produzida em quantidades

ínfimas, não seria detectada por UV-Vis. As análises do décimo dia do processo de biotransformação, apenas para o fungo VR12, indicou uma possível biotransformação do bambuterol, pois surgiu um pico no tempo de retenção próximo ao esperado para o segundo enantiômero da terbutalina (**Figura 15**). Dessa forma, partiu-se para o emprego de uma técnica mais seletiva e sensível, a espectrometria de massas.

Nas análises do décimo dia de biotransformação dos fungos empregando a técnica LC-MS foi possível verificar que qualquer espécie estudada não foi capaz de produzir o metabólito terbutalina a partir do bambuterol, mesmo a espécie VR12 que aparentemente havia produzido o enantiômero 2 da terbutalina. A reanálise dessa amostra por LC-MS foi possível verificar que se tratava de outro composto (não elucidado) produzido por este fungo na presença de bambuterol, pois a razão m/z é diferente da razão da terbutalina (226u, analisada na forma protonada, modo positivo) mesmo com o tempo de retenção do composto produzido coincidindo com o da terbutalina (**Figura 16**).

No entanto, foi possível verificar um decaimento da concentração inicial do bambuterol acompanhando a diminuição de sua área ao longo da análise dos dias coletados (dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10). Foi possível também visualizar a formação de outros compostos pelo espectro de massas, que não foram elucidados neste trabalho. Como a via metabólica da formação da terbutalina pelo bambuterol é complexa, como pode ser observado na **Figura 1** do item 1.2, provavelmente intermediários tenham sido formados. A metabolização do bambuterol não se mostrou enantiosseletiva, contanto que a diminuição de área foi proporcional para ambos os enantiômeros. As áreas das análises das amostras em branco, contendo apenas meio de cultura Czapek e bambuterol se mantiveram constantes ao longo dos dias do processo de biotransformação, mostrando que este fármaco não se degradou ou reagiu com este meio de cultura no período avaliado.

Dessa forma, devido a não formação da terbutalina pelos fungos e condições propostas nesse trabalho, a metodologia analítica foi validada visando avaliar a reprodutibilidade do processo de preparação de amostras (DLLME mediada por par-iônico) para a extração e quantificação do bambuterol

no meio de cultura. Cabe destacar que esse trabalho relata pela primeira vez o emprego da DLLME mediada por par-iônico.

Figura 15. Sobreposição das análises feitas por HPLC com detector UV-Vis da amostra biotransformada do décimo dia para o fungo endofítico VR12. Em azul, amostra biotransformada. Em rosa e preto, controles. Nota-se que o pico supostamente referente ao enantiômero 2 da terbutalina (3) aparece apenas na amostra submetida à biotransformação. 1 e 2 são respectivamente os enantiômeros 1 e 2 do bambuterol.

Figura 16. A. Cromatograma da análise do décimo dia de biotransformação do fungo endofítico VR12 por LC-MS. Nota-se a presença de um composto em tempo de retenção similar ao da

terbutalina (ver Figura 14). Entretanto, observando o espectro de massas da Figura 16.B., é possível verificar que a substância formada não se trata da terbutalina, que possui razão m/z igual a 226.

4.5. Validação da Metodologia Analítica para Análise Enantiosseletiva do Bambuterol em meio de cultura líquido Czapek empregando a DLLME mediada por par-iônico

4.5.1. Linearidade

A linearidade do método foi determinada 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 $1/x^2$), no intervalo de concentrações de 500-17500 ng mL⁻¹ para cada um dos enantiômeros do bambuterol com coeficiente de correlação maior do que 0,998 e erro relativo para cada ponto da curva analítica inferior a 15% (Tabela 4). Além disso, as curvas analíticas construídas foram submetidas a análise estatística empregando a ANOVA e a validade das curvas foi demonstrada.

Tabela 4. Linearidade do método para análise de bambuterol em meio de cultura Czapek

Analito	Intervalo linear (ng mL ⁻¹)	Equação linear ^a	r ^b
(E1)-Bambuterol	500-17500	y= 0,000975594x +0,2546	0,999
(E2)- Bambuterol	500-17500	y= 0,000954571x +0,3038	0,998

^a Três replicatas ($n = 3$) para cada concentração.

^b coeficiente de correlação

4.5.2. Recuperação

As recuperações médias para os enantiômeros do bambuterol foram, respectivamente, 87% e 88%, com um desvio padrão relativo percentual inferior a 15% (Tabela 5).

Tabela 5. Recuperação do método para análise dos enantiômeros do bambuterol.

Concentração ^a (ng mL ⁻¹)	(E1)-Bambuterol		(E2)-Bambuterol	
	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b
CB	94,2	14,3	94,8	13,7
CM	95,9	3,8	94,3	6,6
CA	86,6	6,4	87,1	4,1
Média	92,2	4,1	92,1	3,5

^aAs concentrações de bambuterol avaliadas na recuperação foram 950, 6250 e 15000ng mL⁻¹. (CB)concentração baixa, (CM) concentração média, (CA) concentração alta.

^bcoeficiente de variação porcentual.

4.5.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método foi de 500 ng mL⁻¹ para os enantiômeros do bambuterol. Os valores de precisão (representado pelo CV,%) e exatidão (representado pelo E,%) foram inferiores a 20% (EMA, 2011) e são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva de bambuterol.

Analito	Concentração nominal	Concentração analisada (ng mL ⁻¹) ^a	E (%) ^b	CV (%) ^c
(E1)-Bambuterol	500,0	498,5	-1,3	1
(E2)-Bambuterol	500,0	501,1	-2,4	6

^aLimite de quantificação, $n = 5$.

^bE, erro relativo do limite de quantificação.

^cCV (%), coeficiente de variação porcentual.

4.5.4. Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão intra- e interensaio foram utilizadas alíquotas de meio de cultura líquido Czapek fortificas com concentrações baixa,

média e alta de cada um dos enantiômeros. A **Tabela 7** apresenta os valores de precisão (CV,%) e exatidão (E,%) intra- e interensaio dos enantiômeros do bambuterol. Os resultados foram inferiores a 15%, em todos os casos avaliados para ambos os enantiômeros.

Tabela 7. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros do bambuterol em meio Czapek.

Bambuterol	Concentração teórica (ng mL ⁻¹)	Intraensaio			Interensaio		
		Concentração (ng mL ⁻¹)	CV ^b (%)	E ^c (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV ^b (%)	E ^c (%)
E1	950,0	972,5	9	2,4	978,4	6	2,4
	6250,0	6138,4	5	-1,8	6374,0	4	-1,8
	15000,0	14577,9	3	-2,8	14591,1	2	-2,8
E2	950,0	961,5	10	1,2	961,5	2	0,9
	6250,0	6258,3	4	0,1	6413,1	2	0,1
	15000,0	14110,8	3	-5,9	14471,0	3	-5,9

Estudos realizados em quintuplicata ($n=5$).

^anúmero de dias.

^b coeficiente de variação percentual.

^c erro relativo percentual.

4.5.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da análise de amostras extraídas de meio de cultura Czapek sem adição de analito, amostras de meio de cultura Czapek fortificadas com os enantiômeros do bambuterol e amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos empregados nos estudos de biotransformação. Os cromatogramas referentes à análise do meio de cultura fortificado com os enantiômeros e meio de cultura sem a presença deste analito são apresentados na **Figura 17**. Como pode ser observado, a técnica de preparação de amostras foi eficaz no processo de extração, pois não há a presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos. Nenhuma espécie de fungo estudado produziu metabólitos secundários com

razão m/z igual a 226 (terbutalina); 240 (salbutamol) ou 368 (bambuterol). Dessa forma, essa metodologia apresentou uma seletividade adequada para a determinação dos analitos em estudo. A **Figura 17.B**, que apresenta o cromatograma obtido da extração do bambuterol e salbutamol por DLLME, apresentou um pico com tempo de retenção próximo a 8 minutos, que pode ser algum interferente dos padrões dos analitos. O espectro de massas deste pico está representado na **Figura 18**.

Figura 17. Cromatogramas representativos da avaliação do parâmetro seletividade na validação analítica. (A) Meio de cultura Czapek sem adição de analito. (B) Meio de cultura Czapek fortificado com (1) padrão interno, (2) E1-Bambuterol (6250 ng mL^{-1}) e (3) E2-Bambuterol (6250 ng mL^{-1}).

Figura 18. Espectro de massas relativo ao pico que apareceu sem correlação aos analitos no cromatograma da extração por DLLME do bambuterol e salbutamol em meio de cultura representado na Figura 17.B.

4.5.6. Estabilidade

A estabilidade dos enantiômeros do bambuterol foi avaliada durante ciclos de congelamento e descongelamento, em temperatura ambiente (bancada) por 12 horas e nas condições do autoinjeter por 12 horas. Também foi verificada a estabilidade do bambuterol nas condições de biotransformação descritas no item 3.3.6.3. Os enantiômeros mostraram-se estáveis nas condições estudadas, como pode ser observado na **Tabela 8** e na **Tabela 9**.

Tabela 8. Estabilidade dos enantiômeros de bambuterol nos ciclos de congelamento/descongelamento, bancada por 12 h e autoinjeter por 12 h em meio de cultura líquido Czapek. ($n=3$).

Estabilidade	(E1)-Bambuterol		(E2)-Bambuterol	
Ciclos congelamento e descongelamento	CB	CA	CB	CA
Concentração (ng mL ⁻¹)	957,9	14872,4	961,9	14835,2
Precisão (CV) ^{a)}	10	8	8	9
Exatidão (E, %) ^{b)}	0,8	-0,9	1,3	-1,1
Bancada por 12 h	CB	CA	CB	CA
Concentração (ng mL ⁻¹)	962,9	14466,9	979,8	14465,3
Precisão (CV) ^{a)}	8	3	8	3
Exatidão (E, %) ^{b)}	1,4	-3,5	3,1	-3,6
Autoinjeter por 12 h	CB	CA	CB	CA
Concentração (ng mL ⁻¹)	1006,8	15772,5	1006,2	15774,5
Precisão (CV) ^{a)}	3	3	1	4
Exatidão (E, %) ^{b)}	6,0	5,1	5,9	5,2

n = número de determinações.

^a Expresso como coeficiente de variação percentual.

^b Expresso como erro relativo percentual.

CA, concentração alta e CB, concentração baixa.

Tabela 9. Estabilidade do bambuterol em meio Czapek durante o processo de biotransformação.

Bambuterol	Concentração teórica (ng mL ⁻¹)	Dia 0			Dia 10		
		Concentração (ng mL ⁻¹)	CV ^b (%)	E ^c (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV ^b (%)	E ^c (%)
E1	7500,0	8122,3	4	8,3	7902,7	12	5,4
E2	7500,0	7928,7	2	5,7	8071,1	11	7,6

Estudos realizados em triplicata ($n=3$).^anúmero de dias.^bcoeficiente de variação porcentual.^cerro relativo porcentual.

4.5.7. Efeito da Matriz na Supressão da Ionização

As análises empregando LC-MS apresentam alta seletividade, de modo que mesmo se possíveis interferentes presentes na matriz apresentarem tempos de retenção semelhantes aos dos analitos de interesse, não haverá interferência nem prejuízo na detecção. Entretanto, estes interferentes podem afetar a ionização dos analitos, aumentando ou diminuindo a resposta do detector e causado uma variação no sinal de acordo com a composição da matriz (CASSIANO et al., 2009; ANVISA, 2012; EMA, 2011).

Desta forma, foi realizado um estudo sobre o efeito da matriz utilizada neste trabalho, o meio de cultura líquido Czapek, na supressão da ionização do bambuterol e do salbutamol, conforme descrito no item 3.3.7. Os resultados estão apresentados na **Tabela 10**. A relação entre as áreas obtidas dos cromatogramas obtidos com e sem a presença de meio de cultura líquido foram próximas de 1,0, indicando que componentes presentes nesta matriz não afetam significativamente na ionização dos analitos.

Tabela 10. Estudo do efeito da matriz na ionização dos analitos em meio de cultura líquido.

Concentração ^a (ng mL ⁻¹)	(E1)-Bambuterol		(E2)-Bambuterol	
	FM ^b	CV (%) ^c	FM ^b	CV (%) ^c
CB	1,0	5	1,0	2
CM	1,2	9	1,1	13
CA	9,8	6	9,8	5
Média	1,0	2	1,0	1

^aAs concentrações de bambuterol avaliadas foram 950, 6250 e 15000 ng mL⁻¹. (CB) concentração baixa, (CM) concentração média, (CA) concentração alta.

^bFator Matriz, relação das áreas dos cromatogramas na ausência e na presença de meio de cultura líquido.

^ccoeficiente de variação percentual.

4.6. Estudos Preliminares de Catálise Assimétrica

Neste trabalho, além dos modelos biológicos representados pelos fungos, foi também avaliada a catálise assimétrica empregando os catalisadores de Jacobsen. Além da quiralidade, a estrutura deste tipo de catalisador é semelhante ao grupo Heme das enzimas do citocromo P450, o que possibilita que reações estereossensíveis ocorram em condições otimizadas de concentração de substrato, oxidante e catalisador e tempo de reação. Contudo, o objetivo desta etapa foi realizar um estudo preliminar e, por isso, não houve uma otimização sistemática dos fatores reacionais.

Nenhuma combinação avaliada entre catalisador, substrato e oxidante nas proporções estudadas e tempo reacional constante de 24 horas resultou na produção do metabólito terbutalina. A proporção 1:20:100 de catalisador, substrato e oxidante, respectivamente, foi a proporção avaliada que levou ao consumo completo do bambuterol do meio reacional e será demonstrada nos resultados da análise destes estudos de catálise assimétrica por LC-MS. Os oxidantes *m*-CPBA e PhIO consumiram grande quantidade de bambuterol mesmo sem a adição do catalisador, como pode ser verificado na **Figura 19** e na **Figura 20**, que representam o controle da reação, sem a presença de catalisador.

Figura 19. Controle da reação sem a presença de catalisador, utilizando bambuterol como substrato e **PhIO** como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Figura 20. Controle da reação sem a presença de catalisador, utilizando bambuterol como substrato e **m-CPBA** como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Como a **Figura 19.A** possui um composto com pico próximo ao tempo de retenção esperado pela terbutalina (**Figura 14**) e grande parte do bambuterol foi consumido ao reagir com o oxidante *m*-CPBA, foi obtido o espectro de massas deste composto, e com isso verificou-se que não se tratava da terbutalina, pois a razão *m/z* foi diferente de 226, a correspondente à terbutalina. Este resultado está ilustrado na **Figura 21**

Figura 21. A-Cromatograma da corrente iônica total do controle da reação sem o catalisador, utilizando bambuterol como substrato e *m*-CPBA como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. Nestas condições, o bambuterol foi consumido e apareceu um pico em tempo de retenção similar ao da terbutalina (ver **Figura 14**). Entretanto, observando o espectro de massas desta figura (B), é possível verificar que a substância formada não se trata da terbutalina, que possui razão *m/z* igual a 226 e não corresponde ao *m*-CPBA, que possui razão *m/z* igual a 173.

Os controles, sem a presença de catalisador, dos oxidantes *t*-BuOOH e H₂O₂ não mostraram consumo de bambuterol (**Figura 22** e **Figura 23**). Conforme o esperado, nos controles da reação sem a presença de oxidante, o bambuterol não foi consumido (**Figura 24** e **Figura 25**).

Figura 22. Controle da reação sem a presença de catalisador, utilizando bambuterol como substrato e H_2O_2 como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Figura 23. Controle da reação sem a presença de catalisador, utilizando bambuterol como substrato e $t\text{-BuOOH}$ como oxidante na proporção de 20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Figura 24. Controle da reação sem a presença de oxidante, utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador e bambuterol como substrato na proporção de 1:20 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Figura 25. Controle da reação sem a presença de oxidante, utilizando (S,S)-Jacobsen como catalisador e bambuterol como substrato na proporção de 1:20 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Os oxidantes *m*-CPBA e PhIO já haviam reagido com o bambuterol na ausência de catalisador. No meio reacional, na presença de substrato e catalisador, no tempo de 24 horas, consumiram todo o bambuterol de maneira não enantiosseletiva sem produzir a terbutalina, como pode ser observado na **Figura 26** e na **Figura 27**. Não houve diferença entre os catalisadores (R,R)-Jacobsen e (S,S)-Jacobsen no consumo do substrato e por isso, apenas o (R,R)-Jacobsen está demonstrado nas figuras.

Figura 26. Reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e *m*-CPBA como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Figura 27. Reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e PhIO como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Os oxidantes t -BuOOH e H_2O_2 não reagiram com o bambuterol na ausência de catalisador, como mostrado anteriormente. E no meio reacional, na presença de oxidante, substrato e catalisador, estes oxidantes também não reagiram com o bambuterol, e, assim, também não houve a formação da terbutalina, como pode ser observado na **Figura 28** e na **Figura 29**. O emprego dos catalisadores (R,R)-Jacobsen ou (S,S)-Jacobsen foi indiferente, sendo que ambos não conseguiram catalisar reações do bambuterol com esses oxidantes. Desta forma, apenas os resultados utilizando (R,R)-Jacobsen foram apresentados.

Figura 28. Reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e *t*-BuOOH como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma A é obtido pela corrente iônica total, o B é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol.

Na **Figura 28.A**. É possível observar um composto com o pico próximo ao tempo de retenção da terbutalina (**Figura 14.**). O espectro de massas deste pico, representado na **Figura 30**, mostra que este composto não possui a razão $m/z = 226$, não se tratando da terbutalina. A **Figura 28.A**. mostra também que o pico que possui o tempo de retenção próximo ao do bambuterol apresenta compostos coeluídos. Como o bambuterol e a terbutalina eluem numa diferença de tempos de retenção não muito grande (**Figura 14.**), foi extraída a razão $m/z = 226$ para verificar se houve formação e coeluição da terbutalina. Como pode ser verificado na **Figura 29.C.**, não houve produção deste metabólito.

Figura 29. Reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e H_2O_2 como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. O cromatograma da **Figura 29.A** é obtido pela corrente iônica total, o da **Figura 29.B** é a extração da razão $m/z = 368$, correspondente ao bambuterol. Como o pico correspondente ao tempo de retenção dos enantiômeros do bambuterol apresenta compostos coeluídos, foi feita uma extração da razão m/z igual a 226, para verificar se havia terbutalina produzida e eluída em tempo de retenção muito próximo ao bambuterol e como pode ser visto na **Figura 29.C**, não houve formação deste metabólito.

Figura 30. Cromatograma da corrente iônica total da reação utilizando (R,R)-Jacobsen como catalisador, bambuterol como substrato e H_2O_2 como oxidante na proporção de 1:20:100 e tempo de reação de 24 horas. Nota-se a presença de um composto com pico em tempo de retenção similar ao da terbutalina (ver **Figura 14**). Entretanto, observando o espectro de massas, é possível verificar que a substância formada não se trata da terbutalina, que possui razão m/z igual a 226.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

A técnica HPLC com detector UV-Vis foi empregada para a separação enantiosseletiva do bambuterol e da terbutalina e de sua detecção em meio de cultura líquido. O emprego do modo polar orgânico mostrou-se eficaz e a metodologia desenvolvida e otimizada apresentou resolução adequada e tempo de análise relativamente curto. Entretanto, devido ao baixo coeficiente de absorvidade molar do metabólito ativo terbutalina, foi necessário a utilização da espectrometria de massas, como técnica de detecção. Para isso, uma metodologia foi desenvolvida e otimizada para a separação enantiosseletiva destes analitos e análise por LC-MS.

Para o preparo de amostra em meio de cultura, a microtécnica de extração DLLME foi a escolhida. Foi a primeira vez que a DLLME foi aplicada com o artifício de usar reagentes que possibilitam pareamento iônico com os analitos para extraí-los e também a primeira vez que bambuterol e terbutalina são extraídos juntos de uma matriz, que consiste em um meio de cultura líquido. Esta técnica de extração foi rápida, simples, seletiva, de baixo custo, fácil operação e empregou pequena quantidade de solventes orgânicos, utilizando apenas 50 microlitros de diclorometano, como solvente extrator. Com a utilização de reagente para pareamento iônico, alcançou elevados índices de recuperação (92% para os enantiômeros do bambuterol). A reprodutibilidade da técnica de extração foi confirmada, pois após a validação da metodologia os parâmetros avaliados corroboraram com as exigências da ANVISA.

Nenhuma das espécies de fungo avaliadas nas condições empregadas neste trabalho foi capaz de biotransformar o bambuterol em terbutalina e nem consumi-lo de forma enantiosseletiva, nas condições empregadas nesse estudo. Nos estudos empregando catálise oxidativa assimétrica também não foi possível observar o metabólito terbutalina, embora o sistema empregado fosse capaz de catalisar todo bambuterol do meio reacional. As reações de hidrólise e/ou oxidação que o bambuterol deve sofrer para gerar a terbutalina são complexas, dessa forma, principalmente nos sistemas biomiméticos, intermediários podem ter sido formados, pois o consumo de bambuterol do meio reacional foi completo. Dessa forma, estudos mais detalhados acerca dos

intermediários formados e variações nas condições de (bio)transformação podem auxiliar no entendimento das reações envolvidas.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Macrocyclic antibiotics as effective chiral selectors for enantiomeric resolution by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 52., p. 679-691, 2000.

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.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 de maio de 2012. Acesso em 5 de julho de 2013.

ARDREY, R. E.; Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction, Wiley: Huddersfield, 2003

ARMSTRONG, D.W.; TANG, Y.B.; CHEN, S.S.; ZHOU, Y.W.; BAGWILL, J.R. Macrocyclic antibiotic as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. **Analitical Chemistry**, Washington, v.66, p. 1473-1484, 1994.

ARMSTRONG, D.W.; LIU, Y.; EKBORG-OTT, K.H. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC. **Chirality**, Malden, v.7, p. 474-479, 1995.

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

ATES, H.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y.V.; Chiral Separations in Polar Organic Solvent Chromatography: Updating a Screening Strategy with New Chlorine-containing Polysaccharide-Based Selectors. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.875, p. 57 - 64, 2008.

BANG, U.; NYBERG, L.; ROSENBORG, J.; VIBY-MOGENSEN, J. Pharmacokinetics of bambuterol in subjects homozygous for the atypical gene for plasma cholinesterase. **British Journal of Pharmacology**, Londres, v. 45, p. 479-484, 1998.

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.

BARTOLINČIĆ, A., DRUŠKOVIĆ, A., ŠPOREC, A., VINKOVIĆ, V. Development and validation of HPLC methods for the enantioselective analysis of bambuterol and albuterol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**.Oxford,v.36, p.1003-1010, 2005.

BILLINGTON, C.K.,HALL, I.P. Real time analysis of β 2-adrenoceptor mediated signaling kinetics in human primary airway smooth muscle cells reveals both ligand and dose dependent differences. **Respiratory Research**, Londres,v.12, p. 89, 2011.

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.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.**Química Nova**.São Paulo, v. 28, p. 683-691, 2005.

BOWLES, H; LICHTENBERGER, M;LENNOX, A. Emergency and critical care of pet birds. **VeterinaryClinics of North America: Exotic Animal Practices**, (SI) v.10, p. 345-394, 2007.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PATRÓN, R. D.; PUPO, M. T.; BONATO, P.S.; GONZÁLEZ, I. StereoselectiveBiotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron Asymmetry**. Oxford, v. 20, p. 385-397, 2009.

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**, Nova Iorque, v. 77, p. 669-674, 2007.

BORGES, K. B.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BARTH, T.; JABOR, V. A. P.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; LC-MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing fungi; **Analytical and Bionalytical Chemistry**,Washington,v. 399, p. 915-925, 2011.

BÖTTCHER, A.; GRINSTAFF, M.W.; LABINGER, J.A.; GRAY, H.B. Aerobic oxidation of hydrocarbons catalyzed by electronegative iron salen complexes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, [SI] v.113, p.191-200, 1996.

BRANDTS, P.M.; MAES, R.A.A.; LEFERINK, J.G. Ion-pair extraction of some sympathomimetics: Description of an extraction model for terbutaline and investigation of some factors influencing the recovery of sympathomimetics. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.135, p. 85-98, 1982.

CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F.F.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; MARTINS, M.L.; ZANELLA, R.; Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**. V.34, p.1604-1617, 2011.

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.

CAO, G.; HU, A-X.; ZOU, K-S.; XU, L.; CHEN, J-L.; TAN, W. Highly enantioselective synthesis, crystal structure, and circular dichroism spectroscopy of (R)-bambuterol hydrochloride. **Chirality**. Malden, v.20, p. 856-862, 2008.

CARPENTER, J. Miscellaneous agents used in birds. In Carpenter J (ed): **Exotic Animal Formulary**. St. Louis, MO, Elsevier/W. B. Saunders (ed 3), p. 263, 2005.

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 albendazolesulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis**, Malden, v. 32, p. 2746–2756, 2011.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; CASSIANO, N. The use of a polysaccharide-based column on multimodal elution. **Journal Liquid Chromatography & Related Technologies**. Nova lorque, v.23, p.1029-1038, 2000.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R., OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**. São Paulo, v.32., p. 1021-1030, 2009.

CHIRARDIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**. São Paulo, v. 31, p. 623-636, 2008.

CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; CALLEGARI, J.L.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray : processos químicos envolvidos na formação de ions de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 287-292, 2006.

D'ACQUARICA, I.; GASPARRINI, F.; MISITI, D.; PIERINI, M.; VILLANI, C. HPLC chiral stationary phases containing macrocyclic antibiotics: practical aspects and recognition mechanism. **Advances in Chromatography**, Nova lorque, v.46, p. 109-173, 2008

DE 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.

DRUG BANK: <http://www.drugbank.ca>, acessado em 16 de julho de 2013.

FLANAGAN, R.J.; MORGAN, P.E.; SPENCER, E.P.; WHELPTON, R. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**. Chichester, v. 20, p. 530-538, 2006.

GATES, P.; SANTOS, M.D.; GOBBO-NETO, L.; CAROLLO, C.A.; CROTTI, A.E.M.; VESSECCI, R.; LOPES, N.P. Mass spectrometry ionization techniques and applications for the analysis of organic compounds. **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics**. Ontario, v. 37, p. 1-18, 2006.

GAZIĆ, I.; BOSAK, A.; ŠINKO, G.; VINKOVIĆ, V.; KOVARIK, V. Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Heidelberg, v. 385, p. 1513-1519, 2006.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M.G. Chiral Separation principles in chromatographic and electromigration techniques. **Molecular Biotechnology**, Nova Iorque, v. 32, p. 159- 179, 2006.

Guideline on bioanalytical method validation, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. Data de acesso: 05 de julho de 2013.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatography techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford, v. 27, p. 357-372, 2002.

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 p. 728-751, 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.

HYNECK, M. Press, DENT, J.; HOOK, J. B. Chirality: pharmacological action and drug development. In: BROWN, C. (Ed.) **Chirality in drug design and synthesis**. London: Academic, p. 1 -28, 1990.

HO, C.S.; LAM, C.W.K.; CHAN, M.H.M.; CHEUNG, R.C.K.; LAW, L.K.; LIT, L.C.W.; NG, K.F.; SUEN, M.W.K.; TAI, H.L. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **Clinical Biochemistry Reviews**. Bourke, v. 24, p.03 – 12, 2003.

HOOVER, J.E.; Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, p. 885, 1990.

HUNG, K.C.; CHEN, B.H.; YU, L.E. Cloud-Point extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. **Separation Purification Technology**. [S.l.], v. 57, p. 1-10, 2007.

ILISZ, I.; PATAJ, Z.; ARANYI, A.; PÉTER, A. Macrocyclic Antibiotic Selectors in Direct HPLC Enantioseparations. **Separation & Purification Reviews**, Londres, v. 41, p. 207-249, 2012.

KÄLLSTRÖM, B.L.; SJÖBERG, J.; WALDECK, B. Steric aspects of formoterol and terbutaline: is there an adverse effect of the distomer on airway smooth muscle function? **Chirality**. Malden, v. 8, p. 567-573, 1996.

KIM, K.H.; KIM, H.J.; KIM, J.H.; SHIN, S.D. Determination of terbutaline enantiomers in human urine by coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, v. 751, p. 69-77, 2001.

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.

KOKOSA, J.M. Advances in solvent microextraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, [S.l.], 2013.

KUNATH, A.; THEIL, F.; JÄHNISCH, K. Influence of the kind of the alcoholic modifier on chiral separation on a Chiralpak AD column. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 728, p. 249- 257, 1996.

LAHAYE, D.; GROVES, J.T. Modeling the haloperoxidases: Reversible oxygen atom transfer between bromide ion and an oxo-Mn(V) porphyrin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Nova Iorque, v.101, p.786-97, 2007.

LAMMERHOFER, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 1217, p. 814-856, 2010.

LINDBERG, C.; ROOS, C.; TUNEK, A.; SVENSSON, L. Metabolism of bambuterol in rat liver microsomes: identification of hydroxylated and demethylated products by liquid chromatography mass spectrometry. **Drug Metabolism and Disposition**. Nagoya, v.17, p.311-322, 1989.

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

LOURENÇO, T.C.; CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v.33, p. 2155-2164, 2010.

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.; ZOU, W.X.; MENG, J.C.; HU, J.; TAN, R.X. New bioactive metabolites produced by Colletotrichum sp. an endophytic fungus in Artemisia annua. **Plant Science [SI]**, v. 151, p. 67-73, 2000.

LUCAS, H.J.; KENEDY, E.R.; FORNO, N.W. Iodosobenzene. **Organic Synthesis Coll**, Amsterdam, v. 43, p. 60, 1963.

LUO, W.; ZHU, L.; DENG, J.; LIU, A.; GUO, B.; TAN, W.; DAI, R. Simultaneous analysis of bambuterol and its active metabolite terbutaline enantiomers in rat plasma by chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford, v. 52, p. 227-231, 2010.

MAC LEOD, T.C.O.; BARROS, V.P.; FARIA, A.L.; SCHIAVON, M.A.; YOSHIDA, I.V.P.; QUEIROZ, M.E.C.; ASSIS, M.D. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, [SI], v.273, n.1-2, p.259-64, 2007.

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, Issy-les-Moulineaux, v.10, p.329-413, 2007.

MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y.V. Screening Approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar Organic Solvent Chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1111, p. 48-61, 2006.

MISLANOVÁ, C., HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 797, p: 91-109, 2003.

MORRIS G.A.; NGUYEN S.T.; HUPP, J.T. Enhanced activity of enantioselective (salen)Mn(III) epoxidation catalysts through supramolecular complexation. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, [SI] v.174, p.15-20, 2001.

NAZARI, K.; SHOKROLLAHZADEH, S.; MAHMOUDI, A.; MESBAHI, F.; MATIN, N.S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. Iron(III)protoporphyrin/MCM41 catalyst as a peroxidase enzyme model: Preparation and typical test reactions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, [SI] v.239, p.1-9, 2005.

OLIVEIRA, A.R.M.; SANTANA, F.J.M., BONATO, P.S. Stereoselective determination of the major ibuprofen metabolites in human urine by off-line coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, p. 25-34, 2005.

ORLANDO, R.M.; CARDOSO-FILHO, N.; GIL, E.S.; STRINGHETTA, J.P.S. Importância Farmacêutica De Fármacos Quirais. **Revista Eletrônica De Farmácia**. Goiânia, Vol. IV (1), p: 08-14, 2007.

PACHECO, P. H., GIL, R. A. CERUTTIA, S.E., SMICHOWSKI, P., MARTINEZ, L.D. Biosorption: A new rise for Elemental solidphaseextractionmethods. **Talanta**, Amsterdam, v.85, p: 2290-2300, 2011.

PARISE-FILHO, R.; POLLI, M.C.; BARBERATO-FILHO, S.; GARCIA, M.; FERREIRA, E.I. Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivationpathways. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, p. 393-420, 2010.

PÉREZ, S. BACELÓ, D. Applications of LC-MS to quantitation and evaluation of the environmental fate of chiral drugs and their metabolites. **Trends in Analytical Chemistry**. Washington, v.27, p. 836-846, 2008.

PERSSON, G., PAHLM, O.;GNOSSPELIUS, Y. Oral bambuterol versus terbutaline in patients with asthma. **Current Therapeutic Research** [S.I.],v.56, p. 457-465, 1995.

PETERSEN, N.T. Therapeutic Review: Terbutaline. **Journal of Exotic Pet Medicine**. Amsterdam, v. 21, p: 260-263, 2012.

PINTO, L.D.; DUPONT, J.; SOUZA, R.F.; BERNARDO-GUSMÃO, K. Catalytic asymmetric epoxidation of limonene using manganese Schiff-base complexes immobilized in ionic liquids. **Catalysis Communications**, Ellicott City, v.9, p.135-139, 2008.

PLUMB DC: Terbutaline sulfate, in Plumb DC (ed): **Veterinary Drug Handbook** (ed 5). AMES, IA, BLACKWELL, P. p: 1061-1063, 2005

PUI, A.; MAHY, J. Synthesis, characterization and catalytic activity of halo-methyl-bis(salicylaldehyde)ethylenediamine cobalt(II) complexes. **Polyhedron**, [SI], v.26, p.3143-52, 2007.

QIU, H.D.; LIANG, X.J.; SUN, M. JIANG, S.X. Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Washington, v. 339, p. 3307-3322, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; OH, D.; JARVINEN, T.; SAVOLAINEN, J. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature**. Londres, v. 7 p. 255-270, 1998.

RENEHAN, M.F.; SCHANZ, H.; MCGARRIGLE, E.M.; DALTON, C.T.; DALY, A.M.; GILHEANY, D.G. Unsymmetrical chiral salen Schiff base ligands: Synthesis and use in metal-based asymmetric epoxidation reactions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, [SI] v.23, p.205-20, 2005.

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.

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.

ROSENBORG, J. Clinical-Pharmacokinetic Aspects of Prolonged Effect Duration as Illustrated by β 2-Agonists. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy, 41 p. Uppsala, Estocolmo. ISBN 91-554-5099-7, 2001.

SALEH, O.A.; EL-AZZOUNY, A.A.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; BADAWY, A.M. Validated HPLC method for separation and determination of terbutaline enantiomers. **Analytical Letters**. [SI] v.41, p. 3221-3231, 2008.

SHAREFKIN, J.G.; SALTZMAN, H. Iodosobenzene. **Organic Synthesis Coll.**, Amsterdam, v.5, p. 658, 1973.

SILVA-JUNIOR, I.J. VEREDAS, V.; SANTOS, M.A.G.; SANTANA, C.C. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantioméricas puras ou enriquecidas em larga escala. **Química Nova**, São Paulo, v.29, p; 1027-1037, 2006.

SMITH, D.J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76 p. 173-194, 1998.

SMITH, S.W. Chiral Toxicology: It's the same thing... Only different. **Toxicological Sciences**, Nova lorque, Cary v. 110, p. 4-30, 2009.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development (2 ed.) John Willey & Sons, Inc, Nova lorque, p. 765, 1997.

SURESH, B., RITU, T., RAVISHANKAR, G.A., Biotransformations as Applicable ,to Food Industries. In: **Food Biotechnology**. Nova lorque Taylor, SegundaEdição, p:1655–1690, 2006.

THONSON, B.A. Atmospheric pressure ionization and liquid chromatography mass spectrometry: together at last. **Journal American Society Mass Spectrometry**. Ontario, v.9, p. 187-193, 1998.

TUNEK, A.; LEVIN, E.; SVENSSON, L. Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamateprodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro.**Biochemical Pharmacology**. Oxford, v. 37, p. 3867- 3876, 1988.

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.

WARD, T.J. Chiral Separations. **Analytical Chemistry**. Washington, v. 78, p. 3947-3956, 2006.

WARD, T.J.; DANN, C.E III, BLAYLOCK, A. Enantiomeric resolution using the macrocyics antibiotics rifamycin B and rifamycin SV as chiral selectors for capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 715, p. 337-344, 1995.

WARD, T.J.; FARRIS, A.B. Chiral separations using macrocyclic antibiotics: a review. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 909, p. 73-89, 2001.

WALDECK, B. Biological significance of the enantiomeric purity of drugs. **Chirality** Malden,v. 5, p. 350–355, 1993.

VÉKEY,K. Mass spectrometry and mass-selective detection inchromatography.**Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 921, p.227-236, 2001.

VOYKSNER, R.D.; In: COLE, R.B.; (Ed). Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Fundamentals, Instrumentation and Applications. Willey, Nova lorque, v. 67, p. 323-341, 1997.

YASHIMA, E. OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives.**Bulletin of Chemical Society of Japan**. Tóquio, v. 68, p. 3289-3307, 1995.

YAZDI, A.S. Surfactant-based extraction methods. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v. 30, p. 918-929, 2011.

YE, Y.K.; STRINGHAM, R.H. The effect of acidic and basic additives on the enantioseparation of basic drugs using polysaccharide-based chiral stationary phases **Chirality**, Malden, v.18, p.519-530, 2006.

ZANG, X.H.; WU, Q.H.; ZHANG, M.Y.; XI, G.H.; WANG, Z.; Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Changchun, v.37, p: 161-168, 2009.

ZHANG, J.; CHAN, P.W.H.; CHE, C. Enantioselective intramolecular amidation of sulfamate esters catalyzed by chiral manganese(III) Schiff-base complexes. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.46, p.5403-8, 2005.