

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Análise enantiosseletiva do praguicida miclobutanil após metabolismo in vitro por microssomas hepáticos de humanos.

FRANCIELE SARAIVA FONSECA

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

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Análise enantiosseletiva do praguicida miclobutanil após metabolismo in vitro por microssomas hepáticos de humanos.

Versão corrigida da Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no dia 30/05/18, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. A versão original encontra-se disponível na unidade que aloja o programa de pós-graduação em Química.

Área de Concentração: Química

Orientada: Franciele Saraiva Fonseca

Orientador: Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira

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

Fonseca, Franciele Saraiva

Análise enantiosseletiva do praguicida miclobutanil após metabolismo in vitro por microssomas hepáticos de humanos. Ribeirão Preto, 2018.

120 p. : il. ; 30 cm

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.Miclobutanil. 2.Praguicida quiral. 3.Análise enantiosseletiva. 4.Metabolismo in vitro. 5.Microssomas hepáticos de humanos. 6.Inibição do CYP450

FOLHA DE APROVAÇÃO

FRANCIELE SARAIVA FONSECA

Análise enantiosseletiva do praguicida miclobutanil após metabolismo in vitro por microsomas hepáticos de humanos.

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**

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

*Dedico este trabalho aos meus
pais, Lucimara e Claudemar, por
todo amor, carinho, apoio e
motivação, de sempre.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira**, que além de orientador, é também, amigo. Agradeço pela oportunidade e por todo aprendizado transmitido. Você é um exemplo, de profissional e humano, a ser seguido. Obrigada por todo apoio e por sempre me lembrar que as dificuldades fazem parte do caminho para alcançar o sucesso. “Quem tem um sonho, nunca cansa”.

Aos meus pais, **Lucimara** e **Claudemar**, que durante toda a minha vida, não mediram esforços, para que eu pudesse conquistar meus objetivos. Muitas vezes deixando seus sonhos de lado, para que eu pudesse realizar os meus. Agradeço por todo amor, carinho, dedicação, apoio e companheirismo. Vocês são a razão de tudo isso.

Aos meus familiares, em especial, meus padrinhos **Edmara** e **Luciano**, meus tios **Carmem** e **Gilmar** e meus primos, **Edimárcio** e **Anne**, por sempre estarem presentes na minha vida e dispostos a ajudar com o que fosse necessário.

À **Gabriela**, minha melhor amiga e companheira de todas as horas. Agradeço imensamente por sua presença na minha vida e por caminhar ao meu lado, desde a graduação, me reerguendo depois dos meus tombos e aplaudindo minhas conquistas.

Às minhas amigas de infância, **Joice**, **Daniele**, **Bianca**, **Jussara** e **Cynthia**, que estão comigo desde o primeiro passo para chegar até aqui. Agradeço por sempre estarem presente na minha vida, independente da distância física, que nos separou nesses anos de Ribeirão Preto. Vocês são meu porto seguro.

Às meninas de casa, **Nayla, Thaíssa (Porta) e Bárbara**, por terem sido minha família em Ribeirão. Conhecer e morar com vocês, foi um dos melhores presentes que a vida me deu. Obrigada por cada momento dividido, cada conselho, risada, choro, drama, cerveja, macarrão, pipoca, Burger King, episódio de série. Vocês são minha saudade diária.

Aos “coleguinhas” de LabMets, **Daniel (Chiclete), Nayara e Maísa**, por terem sido muito mais que companheiros de bancada. Agradeço imensamente por todo apoio e conhecimento compartilhado, pelo auxílio nos momentos de dificuldades e pelas cervejas no Marcão para comemorar os resultados positivos. Aprendi e cresci muito com vocês, tanto profissionalmente, quanto pessoalmente.

Aos demais companheiros de LabMets, **Simone, Júlia, Ícaro, Isabel, Ana Maria e Jacqueline**, pelo auxílio nos experimentos, discussões produtivas e todo conhecimento científico compartilhado.

Ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes**, por ter gentilmente cedido o espectrômetro de massas, empregado na realização desse trabalho e ao seu orientando de pós doutorado, **Dr. Rodrigo Moreira**, pelo auxílio na realização das análises e discussão dos resultados.

Ao **Programa de Pós Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto**, e a todos os seus **professores, técnicos e funcionários**, que estiveram presentes e me auxiliaram de alguma maneira, durante esses anos de mestrado.

Às **Agências de Fomento**, Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

RESUMO

FONSECA, F. S. **Análise enantiosseletiva do praguicida miclobutanil após metabolismo in vitro por microssomas hepáticos de humanos**. 2018. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O miclobutanil é fungicida quiral da família dos triazóis, comercializado como mistura racêmica. Apesar dos enantiômeros apresentarem as mesmas propriedades físico-químicas, estes podem diferir em termos de atividade, metabolismo, excreção e toxicidade. No presente trabalho, foram realizados estudos in vitro enantiosseletivos de metabolismo empregando microssomas hepáticos de humanos cujos objetivos foram determinar os parâmetros cinéticos das enzimas do citocromo P450 (CYP450) após metabolismo do miclobutanil (na forma de racemato e enantiômeros isolados), determinar quais isoformas do CYP450 são responsáveis pelo metabolismo do praguicida e também a capacidade deste praguicida em inibir as principais enzimas do CYP450. Os estudos foram realizados empregando a mistura racêmica e também os enantiômeros isolados. Para tanto, foi desenvolvido e validado um método para análise enantiosseletiva do miclobutanil em meio microssomal empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. A separação dos enantiômeros foi realizada na coluna Chiralpak AD[®] empregando metanol (100%) como fase móvel. Após a validação do método, os parâmetros cinéticos foram determinados, com valores de $V_{m\acute{a}x}$, K_m e CL_{int} de $66,06 \pm 4,59$ nmol min⁻¹ mg⁻¹, $3,61 \pm 0,88$ μmol L⁻¹ e $18,30$ mL min⁻¹ mg⁻¹ respectivamente, quando o substrato foi o racemato e de $305,50 \pm 18,39$ nmol min⁻¹ mg⁻¹, $6,85 \pm 1,29$ μmol L⁻¹ e $44,60$ mL min⁻¹ mg⁻¹ respectivamente, quando o (+)-miclobutanil foi empregado como substrato. O (-)-miclobutanil não foi metabolizado pelas enzimas presentes nos microssomas hepáticos de humanos. As isoformas responsáveis pelo metabolismo do miclobutanil foram a CYP2C19 e a CYP3A4. Os estudos in vitro de inibição mostraram que o miclobutanil é um inibidor moderado das enzimas CYP2D6 e CYP2C9 um inibidor forte das enzimas CYP3A4/5 e CYP2C19.

Palavras-chave: miclobutanil; praguicida quiral; análise enantiosseletiva; metabolismo in vitro; microssomas hepáticos de humanos; inibição do CYP450

ABSTRACT

FONSECA, F. S. **Enantioselective analysis of myclobutanil pesticide after in vitro metabolism by human liver microsomes**. 2018. 120 f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Myclobutanil is a chiral triazole fungicide, sold as a racemic mixture. Although the enantiomers have the same physico-chemical properties, they may exhibit different bioactivity, metabolism, excretion and toxicity. In the present work, in vitro enantioselective metabolism studies were carried out by using human liver microsomes, aiming to determine the kinetic parameters of cytochrome P450 (CYP450) enzymes after myclobutanil metabolism and the main CYP450 isoforms involved in the metabolism. In addition, the myclobutanil inhibition capacity over the main CYP450 enzymes was evaluated. The studies were carried out with rac-myclobutanil as well as with the isolated enantiomers. To accomplish that, an enantioselective method for myclobutanil analysis was developed and validated by using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The separation of enantiomers was realized on a Chiralpak AD[®] column and methanol (100%) was used as mobile phase. The enzymatic kinetics, $V_{\text{máx}}$, K_m and CL_{int} , were: $66.06 \pm 4.59 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $3.61 \pm 0.88 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $18.30 \text{ mL min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectively, for rac-myclobutanil and $305.50 \pm 18.39 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $6.85 \pm 1.29 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $44.60 \text{ mL min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectively, for the (+)-myclobutanil. The (–)-myclobutanil was not metabolized by CYP450 enzymes. The isoforms involved in myclobutanil metabolism were CYP2C19 and CYP3A4. In vitro inhibition studies showed that myclobutanil is a medium inhibitor of CYP2D6 and CYP2C9 enzymes and a strong inhibitor of CYP3A4/A5 and CYP2C19 enzymes.

Keywords: myclobutanil; chiral pesticide; enantioselective analysis; in vitro metabolism; human liver microsomes; CYP450 inhibition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do miclobutanil. *centro de assimetria	4
Figura 2. Cinética michaeliana. (A) Perfil cinético de Michaelis-Menten. (B) Transformada de Eadie-Hosftée característica de cinética michaeliana. (Adaptado de SEIBERT; TRACY, 2014a).	12
Figura 3. Perfis cinéticos atípicos. (A) cinética bifásica. (B) cinética multienzimática. (C) cinética de Hill (Sigmoidal). (D) inibição pelo substrato. (Adaptado de SEIBERT; TRACY, 2014b).	14
Figura 4. Fluxograma para avaliação de diferentes colunas na separação dos enantiômeros do miclobutanil em modo normal.	24
Figura 5. Fluxograma para avaliação de diferentes colunas na separação dos enantiômeros do miclobutanil em modo polar orgânico.	25
Figura 6. Cromatograma referente a separação enantiosseletiva do miclobutanil. Condições cromatográficas: Coluna Chiracel OJ®, fase móvel hexano:etanol (82:18 v/v), vazão 0,8 mL min ⁻¹ , detecção em 223 nm, coluna em temperatura ambiente (23 ± 2oC) e volume de injeção 20 µL. Concentração da mistura racêmica: 10 µg mL ⁻¹ . E1: primeiro enantiômero a eluir. E2: segundo enantiômero a eluir.	42
Figura 7. Cromatograma referente a separação quiral dos enantiômeros do miclobutanil no modo polar orgânico. Detecção em 223 nm. Condições cromatográficas: Coluna Chiralpak AD-H®, fase móvel metanol (100%), vazão 0,9 mL min ⁻¹ , coluna em temperatura ambiente e volume de injeção 20 µL. Concentração da mistura racêmica: 10 µg mL ⁻¹ . E1: primeiro enantiômero a eluir. E2: segundo enantiômero a eluir.....	43
Figura 8. Estrutura química da fenacetina	45
Figura 9. Cromatograma referente a separação dos enantiômeros do miclobutanil no modo polar orgânico. (A) detecção em 223 nm, comprimento de onda de absorção máxima do miclobutanil e (B) detecção em 245 nm, comprimento de onda de absorção máxima do padrão interno, fenacetina. Condições cromatográficas: Coluna Chiralpak AD-H®, fase móvel metanol (100%), vazão 0,9 mL min ⁻¹ , coluna em temperatura ambiente (23 ± 2°C) e	

volume de injeção 20 μL . E1: primeiro enantiômero a eluir. E2: segundo enantiômero a eluir. Concentração da mistura racêmica: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	45
Figura 10. Cromatograma obtido após a segunda coleta dos enantiômeros do miclobutanil. (A) refere-se ao cromatograma obtido após injeção da fração correspondente a E1 e (B) ao cromatograma obtido após injeção da fração correspondente a E2. Condições cromatográficas: Coluna Chiralpak AD-H [®] , fase móvel metanol (100%), vazão 0,3 mL min^{-1} , detecção em 223 nm, coluna em temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e volume de injeção 20 μL	47
Figura 11. Espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros do miclobutanil na fase móvel metanol (100%). (E1) - primeiro enantiômero a eluir. (E2) - segundo enantiômero a eluir.....	48
Figura 12. Avaliação da solubilidade do miclobutanil em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4 0,1 mol L^{-1}) empregando diferentes concentrações do praguicida.....	49
Figura 13. Avaliação da solubilidade do miclobutanil em solução tampão fosfato (pH 7,4 0,1 mol L^{-1}) na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, agitando durante diferentes tempos em agitador orbital.....	50
Figura 14. Avaliação da solubilidade do miclobutanil em solução tampão fosfato (pH 7,4 0,1 mol L^{-1}) na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de diferentes agentes solubilizantes.....	51
Figura 15. Avaliação do tipo de solvente na extração dos enantiômeros do miclobutanil e do padrão interno do meio microssomal. Procedimentos realizados durante 30 min em agitador orbital Vibrax [®] a 1000 rpm. Volume do meio microssomal: 200 μL . Volume de solvente de extração: 1000 μL	52
Figura 16. Otimização do volume de solvente extrator empregado para a extração dos enantiômeros do miclobutanil de meio microssomal. Extração realizada durante 30 min em agitador orbital Vibrax [®] a 1000 rpm. Volume do meio microssomal: 200 μL . Solvente extrator, acetato de etila.	53
Figura 17. Otimização do tempo de agitação empregado para extração do miclobutanil de meio microssomal. Extração realizada em agitador orbital Vibrax [®] a 1000 rpm. Volume do meio microssomal: 200 μL . Solvente extrator, acetato de etila. Volume do solvente extrator, 600 μL	53

Figura 18. Espectro de fragmentação do miclobutanil em modo positivo avaliando diferentes energias de colisão. (A) 10 eV; (B) 20 eV; (C) 35 eV; (D) 45 eV.....	55
Figura 19. Estrutura química do diazepam.....	56
Figura 20. Cromatograma referente a análise enantiosseletiva do miclobutanil por LC-MS/MS no modo MRM. 1: (+)-miclobutanil, 2: (-)-miclobutanil e PI: diazepam. Concentração de miclobutanil: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas na Tabela 15. Volume de injeção: 10 μL	57
Figura 21. Avaliação da estabilidade do miclobutanil nas condições de incubação. A) 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$; B) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; C) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Temperatura de incubação: 37°C.....	58
Figura 22. Avaliação prévia do metabolismo in vitro do miclobutanil pelas enzimas microssomais de humanos. A) 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$; B) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; C) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Tempo de incubação: 50 minutos. Concentração proteica: 0,3 mg mL ⁻¹ . Temperatura de incubação: 37°C.....	59
Figura 23. Seletividade do método analítico. (A) branco. (B) limite inferior de quantificação curva baixa. Condições cromatográficas descritas na Tabela 6. Volume de injeção: 10 μL	61
Figura 24. Seletividade do método analítico. (A) branco. (B) limite inferior de quantificação curva alta. Condições cromatográficas descritas na Tabela 6. Volume de injeção: 10 μL	62
Figura 25. Gráfico de resíduos para análise do miclobutanil com ponderação de 1/x ² . (A) (+)-miclobutanil curva baixa; (B) (-)-miclobutanil curva baixa; (C) (+)-miclobutanil curva alta; (D) (-)-miclobutanil curva alta.	64
Figura 26. Avaliação da depleção do miclobutanil (0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de incubação. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil.....	70
Figura 27. Avaliação da depleção do miclobutanil (1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de incubação. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil.....	71
Figura 28. Avaliação da depleção do miclobutanil (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de incubação. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil.....	71
Figura 29. Avaliação da depleção do miclobutanil (0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em função da concentração de proteínas microssomais. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil	73

Figura 30. Avaliação da depleção do miclobutanil ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função da concentração de proteínas microssomais. A-(+)-miclobutanil. B-(–)-miclobutanil	73
Figura 31. Avaliação da depleção do miclobutanil ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função da concentração de proteínas microssomais. A-(+)-miclobutanil. B-(–)-miclobutanil.	73
Figura 32. Proporção enantiomérica do miclobutanil em função do tempo de incubação.....	75
Figura 33. (A) Cinética enzimática michaeliana do metabolismo do (+)-miclobutanil empregando o racemato como substrato. (B) Gráfico de Eadie-Hofstee.....	76
Figura 34. (A) Cinética enzimática michaeliana do metabolismo do (+)-miclobutanil empregando o enantiômero isolado como substrato. (B) Gráfico de Eadie-Hofstee.....	76
Figura 35. Determinação das isoformas envolvidas no metabolismo do rac-, (+)- e (–)-miclobutanil. (A) (+)-miclobutanil empregando o racemato como substrato. (B) (+)-miclobutanil empregando o enantiômero isolado como substrato.	79
Figura 36. Determinação do IC ₅₀ do miclobutanil frente a CYP1A2. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (–)-miclobutanil.....	81
Figura 37. Determinação do IC ₅₀ do miclobutanil frente a CYP2C9. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (–)-miclobutanil.....	81
Figura 38. Determinação do IC ₅₀ do miclobutanil frente a CYP2C19. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (–)-miclobutanil.....	82
Figura 39. Determinação do IC ₅₀ do miclobutanil frente a CYP2D6. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (–)-miclobutanil.....	83
Figura 40. Determinação do IC ₅₀ do miclobutanil frente a CYP2E1. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (–)-miclobutanil.....	84
Figura 41. Determinação do IC ₅₀ do miclobutanil frente a CYP3A4/5 usando o midazolam como substrato. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (–)-miclobutanil.	84
Figura 42. Determinação do IC ₅₀ do miclobutanil frente a CYP3A4/5 usando a nifedipina como substrato. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (–)-miclobutanil.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos associados a exposição aos praguicidas	2
Tabela 2. Tempo de meia-vida de degradação dos enantiômeros do miclobutanil observados em diferentes estudos.....	5
Tabela 3. Tempo de meia-vida dos enantiômeros do miclobutanil em diferentes modelos.....	5
Tabela 4. Vantagens e desvantagens das técnicas analíticas em separações quirais.....	8
Tabela 5. Concentração das principais isoformas do CYP450 em HLM (Adaptado de: RODRIGUES, 1999).	17
Tabela 6. Substratos utilizados como marcadores para as principais isoformas do CYP450 (Adaptado de: SPPAGIARI, et. al., 2014).	19
Tabela 7. Concentrações de miclobutanil em meio microssomal empregadas na validação analítica.....	30
Tabela 8. Transições Monitoradas.....	39
Tabela 9. Condições de Incubação para ensaios de inibição in vitro do miclobutanil. (Adaptado de: Habenschus et. al., 2017).	40
Tabela 10. Condições de preparo de amostra para os ensaios in vitro de inibição das enzimas do CYP450. (Adaptado de: Habenschus et. al., 2017).	40
Tabela 11. Condição para análise enantiosseletiva do miclobutanil no modo normal	42
Tabela 12. Condição para análise enantiosseletiva do miclobutanil no modo polar orgânico.....	43
Tabela 13. Analitos avaliados para serem utilizados como padrão interno	45
Tabela 14. Condições finais para extração do miclobutanil do meio microssomal	54
Tabela 15. Condições otimizadas para análise enantiosseletiva do miclobutanil por LC-MS/MS.....	56
Tabela 16. Valores de área equivalentes ao miclobutanil e ao padrão interno no branco em relação as amostras de LIQ.	63

Tabela 17. Linearidade do método para análise do miclobutanil em microsomas hepáticos.....	64
Tabela 18. Precisão e exatidão intraensaio para curva baixa.....	65
Tabela 19. Precisão e exatidão intraensaio para curva alta	66
Tabela 20. Precisão e exatidão interensaio para curva baixa.....	66
Tabela 21. Precisão e exatidão interensaio para curva alta	66
Tabela 22. Fator de matriz normalizado para a curva baixa.	67
Tabela 23. Fator de matriz normalizado para a curva alta.....	67
Tabela 24. Estabilidade do miclobutanil nas condições de incubação.....	68
Tabela 25. Estabilidade no auto-injetor.....	69
Tabela 26. Predição dos parâmetros toxicocinéticos in vivo.....	78
Tabela 27. Valores de IC50 do miclobutanil frente as enzimas do CYP450	86
Tabela 28. Alguns fármacos sensíveis a inibição das CYP3A4 e CYP2C19. (Adaptado de: Straight Healthcare, 2018).	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[CYP]HLM _{nativo}	Concentração média de cada isoforma presente no fígado humano
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C _{exp}	Concentração experimental
CG	Cromatografia gasosa
CIVIV	Correlação in vitro-in vivo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
CL _H	Clearance hepático
CL _{int}	Clearance intrínseco
C _{nom}	Concentração nominal
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CYP450	Citocromo P450
DC	Dicroísmo Circular
DPR%	Desvio padrão relativo percentual
E	Taxa de extração hepática
E1	Primeiro enantiômero a eluir
E2	Segundo enantiômero a eluir

EC	Eletroforese capilar
EC	Energia de colisão
ECC	Eletrocromatografia capilar
ELL	Extração líquido-líquido
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ER%	Erro relativo percentual
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Ionização por eletrospray
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Fator de matriz normalizado
$f_{u_{mic}}$	Fração não ligada as proteínas microssomais
f_{u_p}	Fração não ligada ao plasma
HLM	Microssomas hepáticos de humanos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentração de um composto que inibe em 50% a atividade de uma determinada enzima
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
m/z	Razão massa carga
MCL	Miclobutanil
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de β -nicotinamida e adenina
P	Produto
PI	Padrão interno

Q	Fluxo sanguíneo hepático
r	Coefficiente de correlação
RN	Razão normalizada
RNT	Razão normalizada total
s	Desvio padrão
S	Substrato
v	Velocidade da reação enzimática
V_0	Velocidade inicial da reação enzimática
$V_{máx}$	Velocidade máxima da reação enzimática
x	Média da concentrações obtidas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Praguicidas	1
1.2 Miclobutanil	3
1.3 Análise Enantiosseletiva	6
1.4 Estudos de Metabolismo in Vitro	9
1.4.1 Cinética Enzimática	11
1.4.2..... Correlação in Vitro-in Vivo (CIVIV) e Predição Parâmetros Toxicocinéticos	14
1.4.3 Fenotipagem	15
1.4.4 Estudos de Inibição Enzimática	17
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Preparo das Soluções Padrão	21
3.2 Reagentes e Solventes	22
3.3 Microssomas Hepáticos e Enzimas Recombinantes	22
3.4 Desenvolvimento de um método enantiosseletivo para análise do miclobutanil	23
3.5 Método para o isolamento dos enantiômeros do miclobutanil	25
3.6 Identificação da atividade óptica dos enantiômeros do miclobutanil	25
3.7 Estudo de solubilidade do miclobutanil	26
3.8 Meio microssomal para os estudos de metabolismo in vitro	26
3.9 Preparo de amostra	27
3.10 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS)	28

3.11 Estabilidade do miclobutanil em meio microsomal	28
3.12 Estudo Prévio de Metabolismo in Vitro	29
3.13 Validação do Método Analítico	29
3.13.1 Seletividade	30
3.13.2 Linearidade	31
3.13.3 Efeito Residual.....	31
3.13.4 Limite Inferior de Quantificação	31
3.13.5 Precisão e Exatidão	32
3.13.6. Efeito Matriz.....	32
3.13.7 Estabilidade	33
3.13.7.1 Condições de Incubação	33
3.13.7.2 Auto-Injetor por 20 horas	33
3.14 Otimização das Condições de Metabolismo (Pré-Cinética)	33
3.14.1 Avaliação do tempo de incubação	34
3.14.2 Avaliação da concentração proteica	34
3.15 Cinética Enzimática	35
3.16 Ligação as proteínas microsomais e plasmáticas	36
3.17 Determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do miclobutanil (fenotipagem)	36
3.18 Estudos de Inibição Enzimática do CYP450	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Desenvolvimento de um método enantiosseletivo para análise do miclobutanil por CLAE	41
4.2. Isolamento dos enantiômeros do miclobutanil	46
4.3. Determinação da atividade óptica dos enantiômeros do miclobutanil	47
4.4 Avaliação da solubilidade do miclobutanil em meio microsomal	

4.5 Avaliação do preparo de amostras através da extração líquido-líquido	51
4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.....	54
4.7 Estudo Prévio de Estabilidade.....	57
4.8. Estudo Prévio de Metabolismo in Vitro.....	59
4.9 Validação do Método Analítico	60
4.9.1 Seletividade	60
4.9.2 Linearidade	63
4.9.3 Efeito Residual.....	64
4.9.4 Limite Inferior de Quantificação	65
4.9.5 Precisão e Exatidão	65
4.9.6 Efeito Matriz.....	67
4.9.7. Estabilidade	68
4.9.7.1 Condições de Incubação	68
4.9.7.2 Auto-Injetor por 20 horas	69
4.10. Otimização das Condições de Metabolismo in vitro (Pré-cinética).....	69
4.10.1 Tempo de Incubação	70
4.10.2 Concentração de Proteínas Microssomais	72
4.11 Cinética Enzimática.....	74
4.12 Correlação in Vitro-in Vivo e Predição dos Parâmetros Toxicocinéticos in vivo.....	77
4.13 Determinação das enzimas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do miclobutanil (fenotipagem).....	79
4.14 Estudos de inibição enzimática do CYP450	80
5 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Praguicidas

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2018), a classificação vigente define como praguicidas as substâncias obtidas a partir de processos químicos, físicos ou biológicos, que são empregadas no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, para preservá-los da ação de seres vivos considerados nocivos. Os praguicidas atuam no controle de insetos (inseticidas), no controle de fungos (fungicidas), no combate as plantas invasoras (herbicidas), no combate as bactérias do solo (fumigantes), no combate a algas (algicidas), no combate a aves (avicidas), no combate aos nematoides (nematicidas), no combate aos moluscos (moluscicidas), no combate aos ácaros (acaricidas), no combate as folhas indesejadas (desfolhantes) e na secagem de fluidos (dessecantes) (BRAIBANTE, ZAPPE, 2012). Ao longo dos anos, o uso de praguicidas nas lavouras tem aumentado, o que pode ser creditado a busca por uma maior produtividade, independente das condições climáticas serem favoráveis ou não e também por alimentos que possam ser conservados por mais tempo, sem perdas na sua qualidade (SANTOS FERMAM; SOUZA ANTUNES, 2009).

O Brasil é o quinto país com maior consumo de agroquímicos do mundo, com um consumo de 76 milhões de Kg por ano (WORLDDATLAS, 2017), correspondendo a um crescimento maior que 100% nos últimos dez anos, sendo que muitos dos princípios ativos que são comercializados livremente no país são proibidos em países da União Europeia e nos Estados Unidos (ROSSI, 2015). Embora o consumo de praguicidas no país apresente números elevados, é importante considerar também o aumento na área cultivada, considerando que o Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, com uma área agrícola cultivada, de aproximadamente, 75 milhões de hectares, segundo o IBGE (IBGE, 2017), o que contribui com a alta demanda por defensivos agrícolas. Estudos publicados apontam que 70% dos produtos in natura consumidos no país estão contaminados com resíduos de praguicidas (ROSSI, 2015), isso sem considerar os alimentos processados, obtidos a partir de grãos geneticamente modificados que também apresentam essas substâncias

químicas. Os produtos agrícolas que mais empregam agroquímicos no Brasil, segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO, 2015), são: soja (40%); milho (15%); cana-de-açúcar e algodão (10% cada); cítricos (7%); café, trigo e arroz (3% cada); feijão (2%); batata (1%); tomate (1%); maçã (0,5%); banana (0,2%), que são também as culturas com maior área plantada no país (IBGE, 2017).

Idealmente um praguicida deveria ser tóxico para o organismo alvo e ao mesmo tempo, inofensivo para as espécies não-alvo, porém o aumento no uso dessas substâncias ao longo dos anos tem gerado uma alarmante preocupação, uma vez que os agroquímicos podem apresentar riscos à saúde ambiental, animal e humana. O uso elevado dos praguicidas nas lavouras gera danos ao meio ambiente, pois estes podem causar contaminação do solo, de espécies vegetais não-alvo e da água, afetando as demais espécies que vivem nesses habitat, como os peixes e os pássaros que se alimentam desses peixes (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009). O homem é exposto diariamente aos praguicidas através de diferentes maneiras, podendo ser uma exposição direta, como a do trabalhador responsável por aplicar esse produto nas lavouras ou até mesmo por uma exposição indireta, causada pela ingestão de alimentos e água contaminados com resíduos destes (WANG et al., 2015). Como consequência, o número de mortes e de doenças crônicas, causadas por essa exposição do homem aos praguicidas é maior que um milhão por ano (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009). Na Tabela 1 estão listados diferentes efeitos que estão relacionados a exposição do homem aos praguicidas.

Tabela 1. Efeitos associados a exposição aos praguicidas

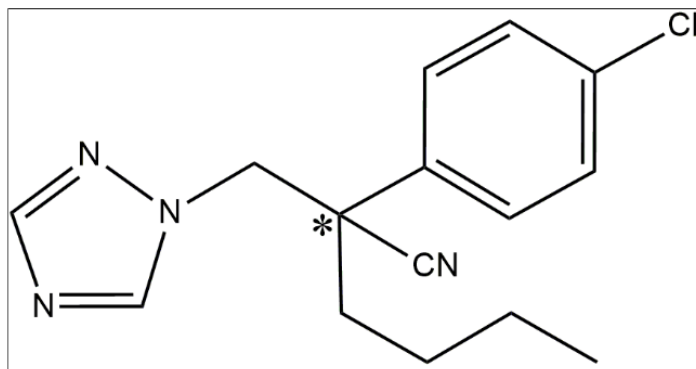
Efeito	Referência
Doença de Alzheimer	HAYDEN et al., 2010
Desenvolvimento de câncer	VOPHAM et. al., 2015
Distúrbios neurológicos	KEIFER; FIRESTONE, 2007
Distúrbio no sistema reprodutor	CHEVRIER et al., 2013
Distúrbios Metabólicos	EVANGELOU et al., 2016

Atualmente 30% dos praguicidas comercializados possuem um ou mais centros de assimetria, sendo moléculas quirais (DE ALBUQUERQUE, et. al., 2018). Na China, maior produtor agrícola do mundo e maior consumidor de agroquímicos, esse número corresponde a 40% dos produtos empregados nas lavouras (DONG et al., 2012). Na maioria dos casos, os praguicidas quirais, são comercializados como mistura racêmica de seus enantiômeros e embora estes apresentem as mesmas propriedades físico químicas, em um ambiente quiral podem diferir consideravelmente na atividade biológica, excreção, metabolismo e toxicidade, sendo assim, enquanto um enantiômero pode atuar contra os organismos desejados, o outro pode não ter atividade ou até mesmo causar efeitos indesejados, como uma degradação mais lenta no ambiente (WANG et al., 2008) e também acarretar alterações fisiológicas em plantas (DONG et al., 2012). Apenas 7% dos praguicidas quirais são comercializados como enantiômero puro ou como mistura enriquecida do enantiômero ativo (GARRISON; GAN; LIU, 2011), como é o caso do metalaxil (ZHANG et al., 2012) e benalaxil (QIU et al., 2007), que são comercializados como uma mistura enriquecida contendo 97% do enantiômero R, uma vez que estudos demonstraram que este apresenta uma maior atividade e também uma menor toxicidade para espécies não-alvo. Com isso, o desenvolvimento de métodos enantiosseletivos para análise e quantificação desses enantiômeros é de grande relevância.

1.2 Miclobutanil

O miclobutanil (Figura 1) é um fungicida da família dos triazóis, amplamente utilizado no Brasil e no mundo, sendo aplicado como foliar nas culturas de arroz, batata, café, maçã, melão, soja e uva (ANVISA, 2011) e atuando no controle de diversas doenças da planta, como ferrugem e cancro. Sua ação está envolvida com a inibição da enzima esterol 14-dimetilase, responsável pela produção de ergosterol, um dos principais compostos envolvido na formação da parede celular do fungo (YAN et al., 2014).

Figura 1. Estrutura química do miclobutanil. *centro de assimetria



O miclobutanil possui um grupo ciano com um átomo de carbono assimétrico, o que configura quiralidade para a molécula, sendo, portanto constituído pela mistura racêmica de seus dois enantiômeros (WANG et al., 2008). Embora os enantiômeros do miclobutanil apresentem as mesmas propriedades físico-químicas, estes diferem entre si em termos de atividade, uma vez que o (+)-miclobutanil apresenta uma maior atividade fúngica contra a espécie alvo quando comparado ao outro enantiômero (DENG; HU, 2011). Essa diferença de atividade entre os enantiômeros do miclobutanil foi observada também avaliando o efeito deste sobre as espécies *Cercospora arachidicola*, *Fulvia fulvae* e *Phytophthora infestans*, onde o (+)-miclobutanil foi de 1,79 a 1,96 vezes mais ativo do que o (-)-miclobutanil (SUN et. al., 2014). Apesar de ser possível comercializar o agroquímico como enantiômero puro ou como uma mistura enriquecida do enantiômero com maior atividade fúngica, diminuindo assim a concentração de praguicida no ambiente e conseqüentemente o risco de contaminação para espécies não-alvo, este continua sendo comercializado como mistura racêmica de seus dois enantiômeros.

Por ser comercializado como mistura racêmica, as ações dos enantiômeros separados do miclobutanil não são bem conhecidas e não podem ser ignoradas, pois este composto produz um aumento nos níveis de testosterona, alterando a capacidade reprodutiva além de provocar também mudanças na concentração de hormônios tireóideos (YAN et al., 2014) e causar diferentes graus de toxicidade hepática (DONG et al., 2012). Além disso, estudos realizados por Song et al (2017) demonstraram que o potencial do miclobutanil

de atuar como desregulador endócrino foi enantiosseletivo, com atividade antiestrogênica na ordem de R-(-)-miclobutanil > rac-miclobutanil > S-(+)-miclobutanil.

Estudos vêm apontando uma preferência de degradação de um dos enantiômeros desse fungicida em relação ao outro, quando a mistura racêmica é empregada, o que já foi comprovado por análises de amostras de morango (ZHANG et al., 2011), solo e pepino (DONG et al., 2012), o que pode ser avaliado através dos tempos de meia-vida dos enantiômeros (Tabela 2). Essas diferenças no tempo de meia-vida, também foram observadas em estudos de metabolismo empregando microsomas hepáticos de ratos (YAN et. al., 2014) e hepatócitos de ratos (WANG et. al., 2015), nos quais foi observada uma preferência maior de metabolização por um enantiômero em relação ao outro (Tabela 3). O que pode acarretar em uma série de problemas. (PÉREZ-FERNANDEZ; GARCÍA; MARINA, 2011).

Tabela 2. Tempo de meia-vida de degradação dos enantiômeros do miclobutanil observados em diferentes estudos

Alvo	t_{1/2} (+)-MCL (dias)	t_{1/2} (-)-MCL (dias)	Referência
Morango	3,63	4,25	ZHANG et al., 2011
Pepino	2,30	2,56	DONG et al., 2012
Solo	6,23	6,59	DONG et al., 2012

Tabela 3. Tempo de meia-vida dos enantiômeros do miclobutanil em diferentes modelos

Modelo	t_{1/2} (+)-MCL (h)	t_{1/2} (-)-MCL (h)	Referência
Microsomas de ratos	0,14	1,60	YAN et. al., 2014
Hepatócitos de ratos	10,66	15,07	WANG et. al., 2015

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de avaliar a toxicidade do miclobutanil para organismos não-alvo. Os resultados encontrados apontaram uma toxicidade enantiosseletiva entre os enantiômeros do praguicida, uma vez que foram observados diferentes graus de toxicidade entre a mistura racêmica, o (+)-miclobutanil e o (-)-miclobutanil, o que já foi comprovado para lagartos da espécie *Eremias argus* (CHEN et. al., 2017), e organismos aquáticos das espécies *Scenedesmus obliquus* (CHENG et. al., 2013; LI et. al., 2015), *Daphnia magna* (LI et. al., 2015; SUN et.al., 2014) e *Danio rerio* (LI et. al., 2015). Além disso, foi possível observar também uma distribuição desigual do miclobutanil entre diferentes tecidos avaliados, com uma maior concentração deste no fígado e no intestino (CHEN et. al., 2017; CHENG et. al., 2017).

O homem é exposto aos praguicidas por diferentes maneiras, seja pelo contato direto ou até mesmo pela ingestão de alimentos pulverizados com estes (WANG et al., 2015). Essa exposição combinada com as diferenças enantiosseletivas encontradas entre os enantiômeros do miclobutanil para diversas espécies, faz com que seja de grande importância conhecer seus possíveis efeitos sistêmicos, avaliando assim os efeitos dos enantiômeros sobre as enzimas do citocromo P450 (CYP450), as principais enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos (CLARKE; JONES, 2008; MARTIN, et. al., 2013).

1.3 Análise Enantiosseletiva

Um determinado praguicida será quiral quando for capaz de desviar um plano de luz polarizada e sua imagem no espelho não se sobrepõe a molécula original. Essa quiralidade pode ser devido a presença de um átomo de carbono assimétrico na estrutura, ou seja, com quatro substituintes diferentes, como é o caso do miclobutanil (Figura 1); além disso, a falta de um plano ou eixo de simetria, a presença de outros átomos estereogênicos trivalentes ou trivalentes e a restrição de rotação causada por algum outro fator também são causas de quiralidade (SMITH; MARCH, 2007).

Um praguicida que possui em sua estrutura um único centro quiral, é constituído de apenas dois isômeros que são denominados enantiômeros e diferem entre si pela direção em que desviam o plano de luz polarizada, sendo

que o enantiômero que desvia a luz para a direita é denominado (+) e chamado de dextrógiro e o que desvia a luz para a esquerda é denominado (-) e chamado de levógiro (SMITH; MARCH, 2007). Quando um composto é constituído de quantidades iguais dos dois enantiômeros, as rotações se cancelam e estes passam a ser opticamente inativos, sendo chamados de mistura racêmica ou racemato (SMITH; MARCH, 2007).

Como dito anteriormente, os enantiômeros possuem as mesmas propriedades físico químicas, porém em ambientes quirais podem diferir em termos de atividade e toxicidade. O crescente interesse em estudar e entender a individualidade dos enantiômeros de praguicidas quirais, comercializados na maioria dos casos como mistura racêmica, vem gerando um aumento no número de métodos enantiosseletivos desenvolvidos. Esses métodos permitem a diferenciação entre as atividades dos enantiômeros para que possam ser analisados separadamente.

Diferentes técnicas analíticas são capazes de realizar a separação quiral entre enantiômeros. Dentre elas, as mais utilizadas são a cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (EC) e eletrocromatografia capilar (ECC) (PÉREZ-FERNÁNDEZ; GARCÍA; MARINA, 2011). Na Tabela 4 são listadas vantagens e desvantagens de cada uma dessas técnicas.

Tabela 4. Vantagens e desvantagens das técnicas analíticas em separações quirais

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Referência
CG	Alta eficiência; elevado poder de detectabilidade	Analito deve ser termicamente estável e volátil; possibilidade de racemização	SCHURIG, 2001; ZHANG, 2005
CLAE	Técnica não destrutiva; baixa possibilidade de racemização, grande número de fases estacionárias disponíveis	Moderado consumo de solvente orgânico; custo das colunas quirais	PÉREZ-FERNÁNDEZ; GARCÍA; MARINA, 2011
EC	Alta eficiência; flexibilidade no uso de seletores quirais, ausência de consumo solvente orgânico	Menor poder detectabilidade, maior dificuldade no desenvolvimento do método	GONG, 2005
ECC	Alta eficiência; emprego de diferentes fases estacionárias; baixo consumo de solvente orgânico	Dificuldade no preparo das colunas	KANG, 2002

Dentre as técnicas analíticas acima citadas, a cromatografia líquida de alta eficiência domina a separação e análise de praguicidas quirais, possuindo um maior número de métodos enantiosseletivos desenvolvidos (DE ALBUQUERQUE, et. al., 2018). Os três modos de CLAE existentes em análise enantiosseletiva (normal, reversa e polar orgânico) combinados com diversas fases estacionárias, constituídas por diferentes seletores quirais, aumentam a capacidade enantiosseletiva da técnica, proporcionando uma separação eficiente para uma grande variedade de praguicidas de classes distintas. Dentre esses modos, o polar orgânico vem se destacando, já que por empregar apenas solventes orgânicos polares como fase móvel (MATTHIJS; MAFTOUH; HEYDEN, 2006a) consegue combinar as vantagens do modo em fase reversa tais como, alta solubilidade, interações iônicas e polares com as vantagens apresentadas pelo modo em fase normal, como a facilidade de evaporação do solvente (em caso de análises em escala preparativa) e alto potencial de separação, além de análises muito mais rápidas (MATTHIJS; MAFTOUH; HEYDEN, 2006b).

A versatilidade da cromatografia líquida de alta eficiência em análises enantiosseletivas de praguicidas quirais é muito em parte devido a existência de diversos tipos de fases estacionárias, constituídas por diferentes seletores quirais, que podem ser empregadas nessa técnica cromatográfica. As principais fases estacionárias quirais utilizadas são as constituídas de proteínas, polissacarídeos, tipo Pirkle, ciclodextrinas, antibióticos macrocíclicos e polímeros quirais (WARD; BAKER, 2008). Dentre as fases estacionárias citadas, as constituídas de polissacarídeos amilose e celulose, têm apresentado um melhor desempenho em separação para um número elevado de compostos e diferem entre si na sua estrutura tridimensional, sendo que a celulose é linear e mais rígida, enquanto que a amilose apresenta uma estrutura helicoidal e possui cavidades bem definidas (TIAN et al., 2012). A separação nessas colunas se dá pelas diferentes energias entre diastereoisômeros transientes formados pela interação do composto com a fase estacionária (ZHANG et al., 2005) e essas interações dependem do tipo de polissacarídeo (amilose ou celulose), da estrutura tridimensional e também dos substituintes que são adicionados (grupamentos ésteres e carbamatos) e acontece através de ligações de hidrogênio, interações π - π , interações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas (ANDERSSON et al., 2003).

1.4 Estudos de Metabolismo in Vitro

A biotransformação ou metabolismo é o principal processo responsável pela eliminação de xenobióticos do corpo. Nesta etapa, os compostos geralmente lipofílicos, são convertidos em derivados com um maior caráter hidrofílico, que podem ser eliminados mais facilmente do organismo (RAUNIO et al, 2015). Diferentes órgãos do corpo humano, tais como fígado, rins, intestinos e pulmões, são capazes de realizar processos de biotransformação, porém o fígado ganha destaque, uma vez que contém o grupo de enzimas do citocromo P450 (CYP450), que desempenha um papel fundamental e importante no metabolismo de xenobióticos, devido a sua abundância e baixa seletividade (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Com isso, estudos in vitro, utilizando sistemas derivados de fígado humano, vêm se mostrando muito eficaz na estimativa do metabolismo de um composto quando comparado com estudos in vivo.

A conversão de compostos em derivados que são eliminados mais facilmente do organismo pelo metabolismo, pode ocorrer através de diferentes reações, que são divididas em reações de funcionalização (Fase 1) e reações de conjugação (Fase 2) (GIBSON; SKETT, 2001). Diferentes isoenzimas hepáticas do CYP450 participam do processo de Fase 1, sendo responsáveis por reações de redução, oxidação e hidrólise. Enquanto que, na Fase 2, estão envolvidas as enzimas glutatona-S-transferase, UDP-glucuronosiltransferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e metiltransferases (RAUNIO et al., 2015).

As enzimas do CYP450 responsáveis pelas reações de Fase 1 constituem uma grande família de proteínas ligadas ao metabolismo de uma grande variedade de compostos. Todas as enzimas nessa superfamília recebem o nome de CYP. Enzimas com mais de 40% de aminoácidos homólogos na sequência são colocadas na mesma família e denominadas com um número (CYP1, CYP2, CYP3). Dentro de uma mesma família, podem existir subfamílias que são denominadas com uma letra (CYP1A, CYP2C, CYP3A). Por fim, a letra é seguida de um número, que representa a enzima individual (por exemplo, CYP1A2, CYP2C8, CYP3A4) (COLEMAN, 2005). As isoformas do CYP450 mais importantes envolvidas no metabolismo de fármacos são CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C9, CYP2A6, CYP2E1, CYP1A2, CYP2C19 e CYP2D6 (CLARKE; JONES, 2008; MARTIN, et. al., 2013).

Em estudos de metabolismo *in vitro*, diferentes modelos podem ser empregados, tais como hepatócitos, fração S9, linhagem de células, microsomas hepáticos de humanos (HLM), sendo este último um dos modelos mais utilizado, uma vez que contém as enzimas importantes do CYP450 (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Microsomas hepáticos são oriundos do retículo endoplasmático liso das células do fígado, e são obtidos através de processo de homogeneização e posterior centrifugação diferencial. Além disso, esse modelo apresenta como vantagens a facilidade de manejo e armazenamento, podendo ser mantido congelado por longos períodos de tempo; é um modelo muito bem caracterizado para a realização de estudos de metabolismo e também apresenta um relativo baixo custo (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

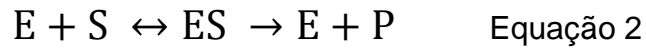
O modelo *in vitro* empregando microsomas hepáticos pode ser utilizado na identificação de metabólitos, na determinação dos parâmetros cinéticos, em reações de fenotipagem e em estudos de inibição enzimática (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Além disso, um outro fator a ser considerado é a enantiosseletividade no metabolismo de moléculas quirais, pois os enantiômeros podem apresentar interações específicas com as enzimas responsáveis pelo metabolismo, possuindo tempos distintos de degradação (YAN et al., 2014). Com isso torna-se de fundamental importância o estudo enantiosseletivo do metabolismo de praguicidas quirais.

1.4.1 Cinética Enzimática

A caracterização *in vitro* da rota metabólica de xenobióticos geralmente começa com uma análise dos parâmetros cinéticos relacionados à velocidade de formação do metabólito ou consumo do substrato. Para transformações mediadas pelo CYP450, uma análise típica envolve uma descrição matemática da velocidade metabólica, que é NADPH-dependente, em função da concentração do substrato (S). O modelo matemático de cinética enzimática mais empregado é o modelo de Michaelis-Menten que pode ser representado pela Equação 1:

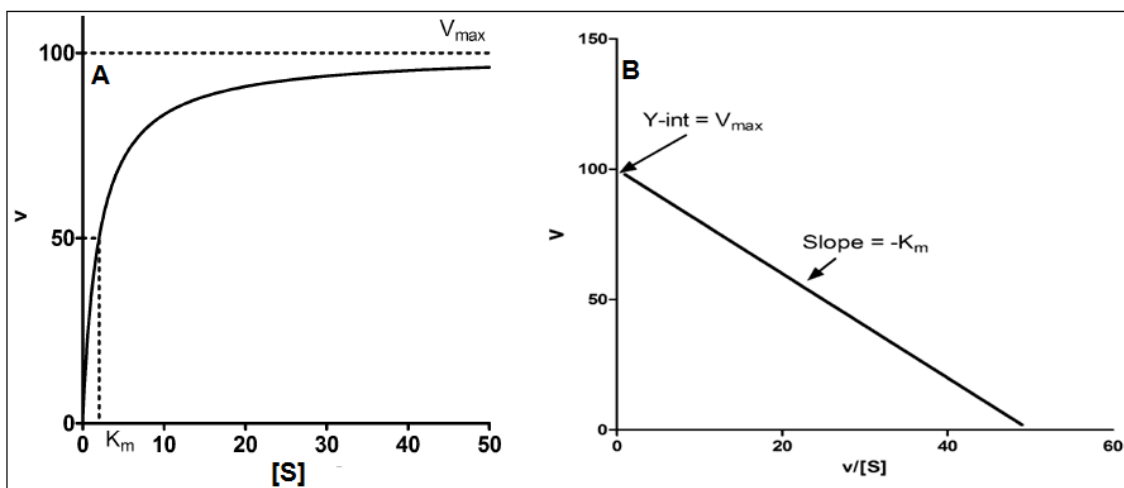
$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 1}$$

A equação de Michaelis-Menten corresponde à equação da velocidade de uma reação catalisada por uma enzima que tem afinidade por um único substrato. A enzima (E) se liga ao substrato (S), formando o complexo enzima-substrato (ES) que é decomposto, obtendo-se o produto (P) (Equação 2). Por se tratar de um equilíbrio químico, a dissociação do complexo enzima-substrato em enzima e substrato é muito mais rápida que a velocidade de formação do produto, sendo esta então, a etapa limitante da reação (SEIBERT; TRACY, 2014a).



No modelo descrito por Michaelis-Menten, a curva que expressa a relação entre a $[S]$ e V_o (velocidade inicial) se aproxima de uma hipérbole retangular (Figura 2A), sendo a velocidade inicial máxima obtida durante a reação representada por V_{max} , que ocorre na região de platô, quando o aumento da concentração de substrato não resulta em variações significativas na velocidade da reação, e K_m (constante de Michaelis-Menten) a concentração de substrato correspondente à metade de V_{max} , e indica a afinidade de uma enzima pelo seu substrato, sendo que quanto maior o valor de K_m , menor é a afinidade da enzima pelo substrato (NELSON; COX, 2002). O perfil cinético que descreve uma determinada reação catalisada por uma enzima pode ser graficamente determinado através de programas como o GraphPad Prism® e podem ser confirmados pela transformada de Eadie-Hosftree, que equivale a velocidade em função da razão entre velocidade e concentração de substrato (Figura 2B) (KORZEKWA, 2008).

Figura 2. Cinética michaeliana. (A) Perfil cinético de Michaelis-Menten. (B) Transformada de Eadie-Hosftree característica de cinética michaeliana. (Adaptado de SEIBERT; TRACY, 2014a).

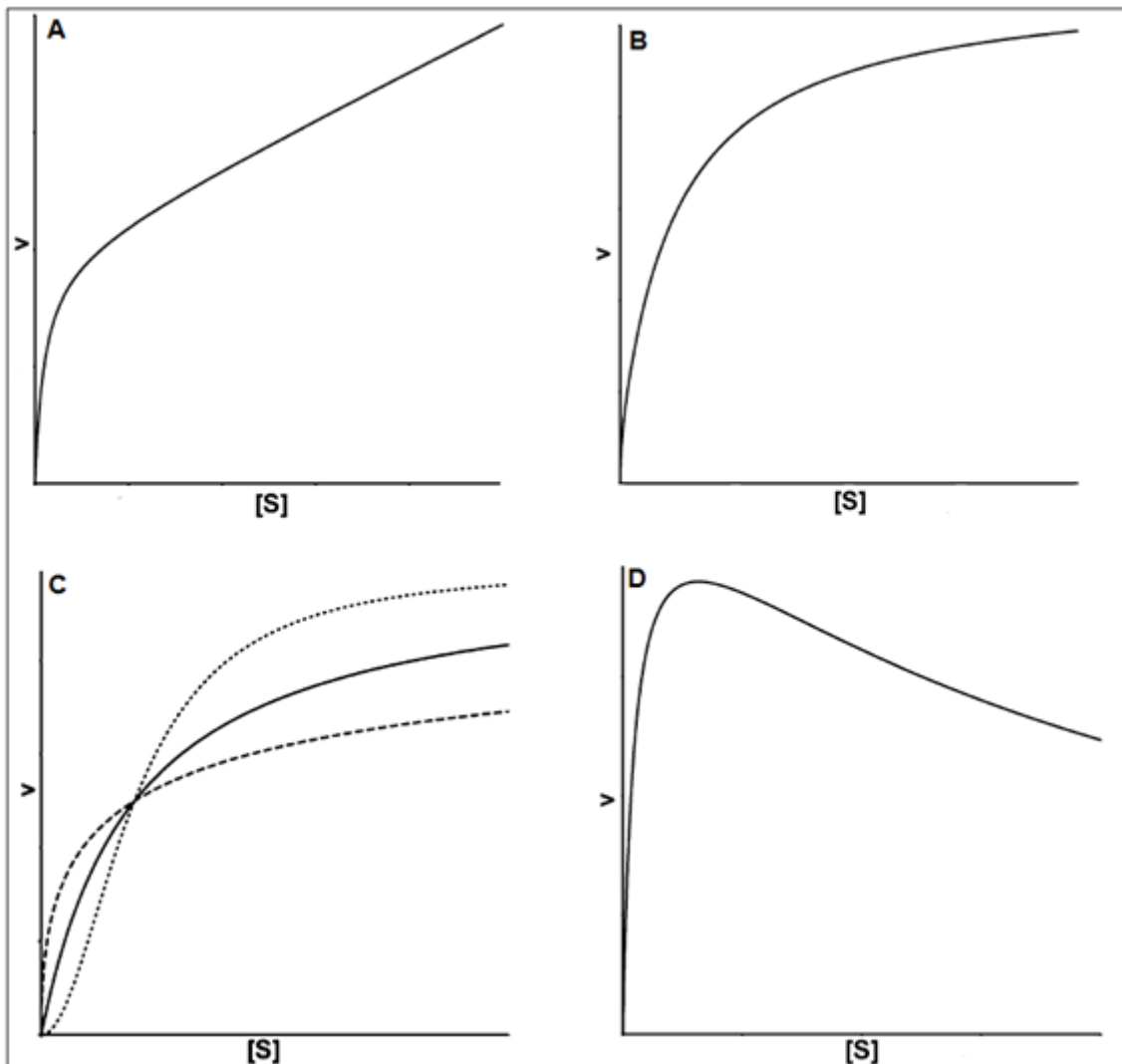


O estudo de cinética enzimática deve ser realizado em condições de V_o que é a medida da cinética sob as condições em que não há uma mudança significativa na concentração do substrato, uma vez que a velocidade de formação do complexo enzima-substrato e a velocidade de dissociação desse

em produto é a mesma (SEIBERT; TRACY, 2014a). O estado estacionário é determinado por uma velocidade de reação linear em função do tempo (KORZEKWA, 2008). O conhecimento dos parâmetros enzimáticos é fundamental para posteriores estudos de inibição enzimática (MULHOLLAND et al., 2011).

As enzimas do CYP450 apresentam uma eficiência catalítica reduzida, devido aos seus sítios ativos maiores e menos específicos, assim, além do modelo michaeliano, alguns modelos atípicos de cinéticas podem ser observados nos estudos de metabolismo in vitro, como resultado da ligação de múltiplas moléculas de substrato no sítio ativo da enzima e outras equações matemáticas descrevem o perfil de cada uma delas. São elas: cinética bifásica, multienzimática, cinética de Hill (sigmoidal) e inibição pelo substrato (Figura 3) (SEIBERT; TRACY, 2014b).

Figura 3. Perfis cinéticos atípicos. (A) cinética bifásica. (B) cinética multienzimática. (C) cinética de Hill (Sigmoidal). (D) inibição pelo substrato. (Adaptado de SEIBERT; TRACY, 2014b).



1.4.2 Correlação in Vitro-in Vivo (CIVIV) e Predição Parâmetros Toxicocinéticos

Através dos parâmetros cinéticos obtidos, V_{\max} e K_m , torna-se possível determinar o clearance intrínseco (CL_{int}), que corresponde a capacidade do fígado em depurar um determinado xenobiótico (SEIBERT; TRACY, 2014a) na ausência de ligação as proteínas e fluxo sanguíneo hepático e é obtido através da Equação 3.

$$CL_{int} = \frac{V_{\max}}{K_m + [S]} \approx \frac{V_{\max}}{K_m} \quad \text{Equação 3}$$

O CL_{int} determinado a partir dos resultados obtidos pelo estudo de metabolismo *in vitro* difere do clearance hepático (CL_H), *in vivo*, uma vez que podem ocorrer ligações não específicas do xenobiótico tanto com as proteínas plasmáticas quanto com as proteínas microssomais (CHANG et. al., 2010). Sendo assim, a extrapolação dos resultados deve ser realizada, levando em consideração as frações não ligadas as proteínas plasmáticas e microssomais, o que fornece melhores previsões da capacidade de depuração hepática humana (CHIBA; ISHII; SUGIYAMA, 2009). Valores de CL_H próximos ao fluxo sanguíneo hepático indicam que o fígado é o principal órgão responsável pela eliminação do xenobiótico (DAMRE; IYER, 2012).

Além do clearance hepático, um outro parâmetro importante, a taxa de extração hepática (E), também pode ser obtida, por extrapolação dos resultados *in vitro*. Esse parâmetro se refere a razão entre a quantidade do composto que entra no fígado (por exemplo, via veia porta hepática) e a quantidade dele que não é metabolizada (COLEMAN, 2005). Taxas de extração superiores a 0,7 indicam uma grande capacidade de metabolização, enquanto que taxas inferiores a 0,3 indicam uma metabolização lenta (COLEMAN, 2005). Taxas de extração elevadas provocam o efeito de primeira passagem pelo fígado, no qual a concentração do xenobiótico é diminuída significativamente antes de atingir a circulação sistêmica.

1.4.3 Fenotipagem

Após a obtenção dos parâmetros cinético-enzimáticos e a predição dos parâmetros toxicocinéticos *in vivo*, comprovando assim a participação das enzimas do CYP450 no metabolismo de um determinado xenobiótico, um outro parâmetro importante é a determinação das isoformas do CYP450 que estão envolvidas no metabolismo do composto em questão, conhecido também como fenotipagem (RODRIGUES, 1999). A realização desse estudo é de grande importância, uma vez que, se um determinado xenobiótico é metabolizado por uma única enzima e algum medicamento administrado concomitantemente inibir a atividade dessa enzima específica, poderá ocorrer um acúmulo do xenobiótico no organismo (OLGIVIE et. al., 2008).

A reação de fenotipagem pode ser realizada através de quatro experimentos distintos. São eles: (i) análise de correlação, que relaciona a taxa de metabolismo do xenobótico em várias amostras de microsomas hepáticos de humanos com as taxas de reação variando o nível ou a atividade das enzimas do CYP nas mesmas amostras microsomais; (ii) inibição química, que avalia o efeito de inibidores conhecidos das enzimas do CYP no metabolismo do xenobiótico por microsomas hepáticos; (iv) inibição por anticorpos monoclonais específicos do CYP450, avaliando o efeito de inibição das enzimas do CYP causadas por esses anticorpos, no metabolismo do xenobiótico por microsomas hepáticos; (v) metabolismo utilizando as isoformas recombinantes do CYP (por exemplo, Superssomas[®]), no qual o composto em análise e a enzima individual do CYP450 (por exemplo, CYP3A4) são incubados juntamente e posteriormente verifica-se a capacidade dessa enzima em metabolizar o xenobiótico (OLGIVIE et. al., 2008).

As enzimas recombinantes do CYP não são expressas nas células na mesma concentração que reflete seus níveis em microsomas hepáticos de humanos (OLGIVIE et. al., 2008). Com isso, o Superssoma[®] pode apresentar valores de atividade maiores quando comparado aos obtidos utilizando pool de microsomas. Para anular esse efeito é necessário realizar a normalização dos dados obtidos com Superssomas[®], o que é feito multiplicando a velocidade da reação obtida para cada isoforma pela concentração da mesma em microsomas hepáticos de humanos. Os valores normalizados são somados e expressos, para cada isoforma, como porcentagem (RODRIGUES, 1999). A Tabela 5 apresenta a concentração de cada isoforma presente nos microsomas hepáticos de humanos (HLM).

Tabela 5. Concentração das principais isoformas do CYP450 em HLM (Adaptado de: RODRIGUES, 1999).

Isoforma do CYP450	Concentração em HLM (pmol CYP/mg)
CYP1A2	45
CYP2B6	39
CYP2C8	64
CYP2C9	96
CYP2C19	19
CYP2D6	10
CYP3A4	108
CYP3A5	1

1.4.4 Estudos de Inibição Enzimática

As enzimas do citocromo P450, encontradas em grande abundância no fígado humano, são as principais envolvidas no metabolismo da maioria dos xenobióticos. Esse fato, combinado com a elevada exposição do homem aos praguicidas, torna necessário o estudo de possíveis interações destes com medicamentos metabolizados por essas enzimas (ABASS; PELKONEN, 2012).

O uso concomitante de medicamentos com a exposição a praguicidas pode acarretar em interações que resultam em indução ou inibição enzimática (WALSKY; BOLDT, 2008). A indução causa um aumento da atividade enzimática, levando a uma maior eliminação do fármaco, o que reduz a concentração deste no organismo, podendo perder seu efeito terapêutico (PELKONEN, et. al., 2008). Enquanto que a inibição resulta em uma diminuição ou perda da atividade enzimática, levando a um aumento da concentração do fármaco no organismo, podendo causar efeitos tóxicos (PELKONEN, et. al., 2008).

A inibição da atividade enzimática pode ocorrer através de duas maneiras: (i) inibição direta e (ii) inibição tempo dependente (OGILVIE et. al., 2008). A inibição direta ocorre quando um determinado composto inibe a enzima, assim que a exposição ocorre e sem necessidade de biotransformação. Enquanto que

na inibição tempo dependente, o potencial do inibidor aumenta com o tempo de contato entre o inibidor e a enzima, sendo quase irreversível ou irreversível (OGILVIE et. al., 2008).

As principais isoformas do CYP450 para as quais deve ser avaliado o efeito de inibição de um determinado praguicida são: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A, uma vez que correspondem a 70% do conteúdo de CYP do fígado humano (WALSKY; BOLDT, 2008) e são responsáveis pelo metabolismo de 75% dos fármacos comercializados (SPPAGIARI, et. al., 2014).

A primeira etapa do estudo de inibição de um praguicida sobre as enzimas do CYP450 é a determinação do seu valor de IC_{50} , que corresponde a concentração do praguicida responsável pela inibição de 50% da atividade enzimática (OGILVIE et. al., 2008). Os ensaios de IC_{50} são utilizados como uma triagem inicial, uma vez que a partir deles, é possível determinar quais isoformas são inibidas e o potencial dessa inibição, classificado como fraco, moderado ou forte, dependendo do valor obtido para este parâmetro (SPPAGIARI, et. al., 2014). Esses ensaios acarretam em uma diminuição de tempo e custos gastos no estudo.

Para a determinação do IC_{50} são utilizadas reações denominadas como marcadores, que são características e seletivas para uma determinada isoforma do CYP450 e recomendadas pelo FDA (Tabela 6) (ABASS; TURPEINEN; PELKONEN, 2009). A concentração de praguicida empregada deve ser a mesma obtida no estudo de cinética enzimática, sendo equivalente ou inferior ao valor de K_m e as condições de incubação (tempo e concentração proteica) devem ser estabelecidas respeitando as condições de estado estacionário da reação enzimática do marcador (OGILVIE et. al., 2008). Os resultados obtidos são comparados com controles negativos, preparados na ausência do praguicida, correspondendo a 100% da atividade enzimática e expressos pela porcentagem de atividade enzimática remanescente em função do logaritmo da concentração do substrato marcador empregada.

Tabela 6. Substratos utilizados como marcadores para as principais isoformas do CYP450 (Adaptado de: SPPAGIARI, et. al., 2014).

Isoforma do CYP450	Substratos
CYP1A2	Fenacetina; cafeína; tacrina
CYP2A6	Cumarina
CYP2B6	Bupropiona
CYP2C8	Paclitaxel; amodiaquina; repaglinida
CYP2C9	Diclofenaco; tolbutamida
CYP2C19	(S)-mefenítina; omeprazol
CYP2D6	Bufuralol; dextrometorfano
CYP2E1	Clorzoxazona; anilina
CYP3A	Midazolam; testosterona; nifedipina;

2. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo a realização de um estudo de metabolismo *in vitro* enantiosseletivo do praguicida miclobutanil empregando microsomas hepático de humanos. Além disso, foi avaliada a capacidade do miclobutanil em inibir as principais enzimas do CYP450. Os estudos foram realizados empregando a mistura racêmica e também os enantiômeros individuais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo das Soluções Padrão

O padrão miclobutanil ($\geq 99,4\%$) foi obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e a solução padrão foi preparada em metanol na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. O diazepam ($\geq 99,0\%$), a fenacetina ($\geq 98,0\%$), a nifedipina ($\geq 98,0\%$), o ibuprofeno ($\geq 98,0\%$) e a isradipina ($\geq 98,0\%$), testados para serem utilizados como padrão interno, também foram obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e preparados em metanol na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Todas as soluções padrão foram armazenadas em tubos de vidro âmbar à -20°C . No preparo dessas soluções foi utilizada uma balança analítica Sartorius, modelo CPA225D (Goettingen, Alemanha) e o agitador de tubos tipo *mixer* Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, Brasil).

Os substratos e metabólitos utilizados nos ensaios de inibição enzimática foram: fenacetina ($\geq 98,0\%$), acetaminofeno ($\geq 98,0\%$), diclofenaco ($\geq 98,0\%$), clorzoxazona ($\geq 98,0\%$) e nifedipina ($\geq 98,0\%$) adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA); 4'-hidroxiclofenaco ($\geq 98,0\%$), S-mefenitoína ($\geq 98,0\%$), 4'-hidroximefenitoína ($\geq 98,0\%$), bufuralol ($\geq 98,0\%$), 1'-hidroxibufuralol ($\geq 98,0\%$), 6-hidroxiclorzoxazona ($\geq 98,0\%$) e deidronifedipina ($\geq 98,0\%$) obtidos da empresa Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá); midazolam ($\geq 98,0\%$) e 1'-hidroximidazolam ($\geq 95,0\%$) adquiridos da empresa Cayman Chemicals (Ann Arbor, EUA). Tobultamida ($\geq 97,0\%$) e bisfenol A-d16 ($\geq 98,0\%$), utilizados como padrão interno, foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As soluções padrão de substrato foram preparadas nas seguintes concentrações e solventes: fenacetina ($962 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetonitrila), diclofenaco ($3956 \mu\text{mol L}^{-1}$, metanol), S-mefenitoína ($8000 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetonitrila), bufuralol ($432 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetonitrila), clorzoxazona ($11672 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetonitrila), nifedipina ($560 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetonitrila), midazolam ($433 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetonitrila). As soluções padrões dos metabólitos (acetaminofeno, 4'-hidroxiclofenaco, 4'-hidroximefenitoína, 1'-hidroxibufuralol, 6-hidroxiclorzoxazona, deidronifedipina, 1'-hidroximidazolam) foram preparadas na concentração de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ no mesmo solvente do seu substrato. As soluções de diazepam, tolbutamida e

bisfenol A-d16, utilizados como padrão interno, foram preparadas na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, em metanol. Todas as soluções foram estocadas em tubo âmbar a -20°C .

3.2 Reagentes e Solventes

Água ultrapura foi obtida no Sistema Direct-Q 3 MilliQ da Millipore (Massachusetts, EUA).

As soluções tampão que compõem o meio microssomal foram preparadas utilizando fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico di-hidratado adquiridos da Synth (Diadema, Brasil); tris(hidroximetil)aminometano da J. T. Baker (Philipsburg, EUA) e cloreto de potássio granular da Mallinckrodt Chemicals (Xalostoc, México), todos grau analítico.

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas e no preparo das amostras foram hexano, acetonitrila, isopropanol, etanol, metanol, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano, todos grau HPLC obtidos da Panreac (Barcelona, Espanha).

Os agentes solubilizantes utilizados na avaliação da solubilidade do miclobutanil em meio microssomal foram Cremophor EL[®] (triricinoleato de polioxietileno glicerol), polisorbato 80 (Tween 80[®]), hidroxipropil- β -ciclodextrina obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e glicerina obtida da empresa Synth (Diadema, Brasil).

3.3 Microssomas Hepáticos e Enzimas Recombinantes

Um pool de microssomas hepáticos de humanos de 150 doadores distintos, de ambos os sexos, na concentração proteica de 20 mg mL^{-1} , foi obtido da empresa Corning Life Science (Arizona, EUA) e armazenado a -80°C .

As isoformas recombinantes do CYP450 (Superssomas[®]): rCYP1A1, rCYP1A2, rCYP3A4, rCYP3A5, rCYP2B6, rCYP2C8, rCYP2C9, rCYP2C19, rCYP2D6 e rCYP2E1, juntamente com o controle negativo constituído de células de inseto, foram também obtidas da empresa Corning Life Science (Arizona, EUA) e armazenado a -80°C .

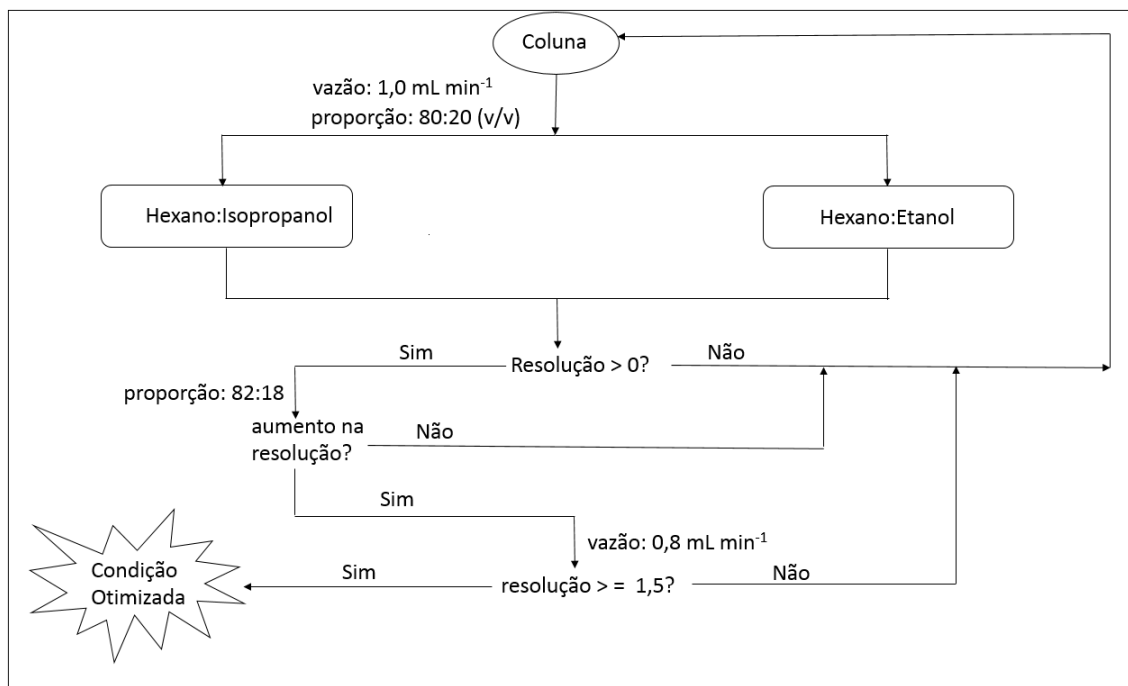
3.4 Desenvolvimento de um método enantiosseletivo para análise do miclobutanil

A avaliação das colunas quirais no desenvolvimento do método para análise dos enantiômeros do praguicida foi realizada em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Shimadzu (Quioto, Japão), composto por duas bombas LC-6AD, controladora SCL-10AVP e detector UV/VIS SPD-10AV operando em 223 nm (comprimento de onda de máxima absorção do miclobutanil). A aquisição dos dados foi realizada através do software Class-VP, também da Shimadzu.

Na realização da triagem para separação enantiosseletiva do miclobutanil, tanto no modo normal, quanto no modo polar orgânico, foram utilizadas as colunas Chiralpak AD[®] (amilose-tris-3,5-dimetilfenilcarbamato) (250 x 4,6 mm, 10 µm), Chiralpak AD-H[®] (amilose-tris-3,5-dimetilfenilcarbamato) (150 x 4,6 mm, 5 µm), Chiralcel OJ[®] (celulose tris 4-metilbenzoato) (250 x 4,6 mm, 10 µm), Chiralpak AS[®] (amilose tris[(S)-1-feniletilcarbamato]) (250 x 4,6 mm, 10 µm).

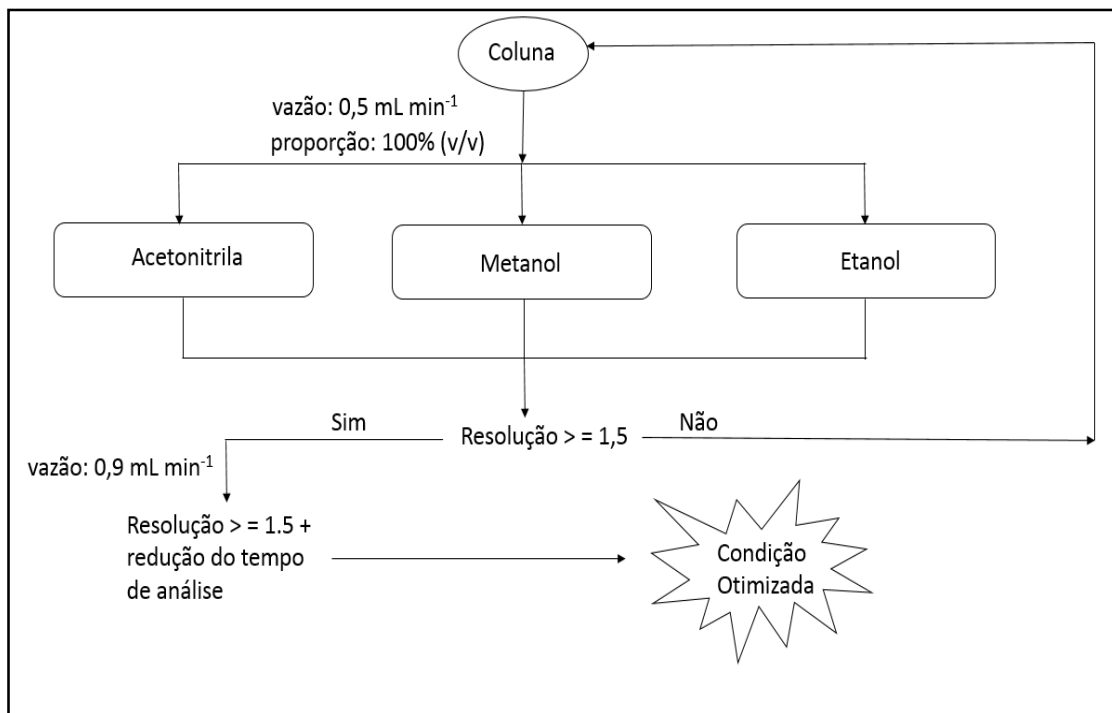
O desenvolvimento do método para análise enantiosseletiva do praguicida foi realizada primeiramente no modo normal, baseada no trabalho descrito por Perrin et al (2002), de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 4.

Figura 4. Fluxograma para avaliação de diferentes colunas na separação dos enantiômeros do miclobutanil em modo normal.



Na sequência foi realizada a otimização de um método enantiosseletivo para a análise do miclobutanil em modo polar orgânico, baseada no trabalho descrito por Matthijs et al (2006b), de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 5.

Figura 5. Fluxograma para avaliação de diferentes colunas na separação dos enantiômeros do miclobutanil em modo polar orgânico.



3.5 Método para o isolamento dos enantiômeros do miclobutanil

A coleta dos enantiômeros isolados do miclobutanil foi realizada utilizando a coluna Chiralpak AD-H[®] e fase móvel composta por metanol (100% v/v). A vazão foi de 0,3 mL min⁻¹ e a coluna foi mantida em temperatura ambiente (23 ± 2°C). Para tanto, após a injeção da mistura racêmica no sistema cromatográfico, os picos correspondentes a cada enantiômero foram coletados, a fase móvel evaporada sob fluxo de ar comprimido, e em seguida, o resíduo foi solubilizado em metanol e a solução resultante foi armazenada à -20°C.

3.6 Identificação da atividade óptica dos enantiômeros do miclobutanil

A atividade óptica dos enantiômeros coletados foi realizada por dicroísmo circular da marca Jasco (J-810, Easton, EUA). Para tanto, cada enantiômero isolado foi solubilizado na fase móvel (metanol) e em seguida as leituras foram realizadas no intervalo de 210 nm a 300 nm, em um total de quatro acumulações, após a correção com o branco. As análises foram realizadas a 25° C, utilizando-se uma cubeta de 1 mm de comprimento.

3.7 Estudo de solubilidade do miclobutanil

A solubilidade do miclobutanil em meio microssomal foi determinada por meio de uma análise aquiral, utilizando um equipamento de cromatografia líquida da Shimadzu (Quioto, Japão) equipado com bombas LC-20AT, forno CTO-20A, detector DAD SPD-M20A e controladora CBM-20A. Para tanto foi empregada a coluna Ascentis Express Fused Core[®] C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 μm , da Supelco, Pensilvânia, EUA) e uma coluna de guarda Ascentis Express[®] C18 (5 x 4,6 mm, 2,7 μm). A fase móvel empregada foi metanol:água 50:50 (v/v) e vazão de 1,2 mL min⁻¹.

Na avaliação da solubilidade do miclobutanil no meio microssomal (n=5) foi adicionado o substrato (miclobutanil) em 200 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), na ausência e na presença dos seguintes agentes solubilizantes: Cremophor EL[®], Tween 80[®], glicerina ou hidroxipropil- β -ciclodextrina. A solubilidade desse praguicida no meio foi avaliada numa faixa de concentração de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ até 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo esta última a concentração máxima empregada nos estudos de metabolismo in vitro. Posteriormente, as amostras foram analisadas diretamente por cromatografia líquida de alta eficiência aquiral, de acordo com as condições descritas acima. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos para análise desse praguicida em etanol (100% de solubilidade), na mesma concentração e analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 (CA, EUA), no qual foi empregado o teste estatístico *t-Student* (não pareado), onde valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.8 Meio microssomal para os estudos de metabolismo in vitro

O meio microssomal foi constituído por 5 μL da solução de miclobutanil em etanol, 40 μL de microssomas hepáticos de humanos na concentração proteica de 0,5 mg mL⁻¹, 105 μL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 + 0,25% (m/v) de Cremophor EL[®]. As amostras foram pré-incubadas em banho-maria sob agitação (Marconi, modelo MA093, São Paulo, Brasil), durante 5 minutos à 37°C. O metabolismo foi iniciado pela adição de 50 μL do sistema de regeneração de NADPH o qual é composto por (5 mmol L⁻¹ de glicose-6-fosfato,

0,25 mmol L⁻¹ de fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina e 0,5 unidades de enzima glicose-6-fosfato desidrogenase), completando um volume de 200 μL. A reação foi encerrada após 50 minutos pelo início do procedimento de preparo de amostra.

3.9 Preparo de amostra

A extração do miclobutanil do meio microsomal foi realizada empregando-se a extração líquido-líquido (ELL). Os parâmetros otimizados foram o tipo de solvente orgânico (acetado de etila, clorofórmio, diclorometano e hexano), o volume do solvente orgânico (200; 400; 600; 800 e 1000 μL) e o tempo de extração (5; 10; 15; 20 e 30 min). Para tanto foi empregado uma solução de miclobutanil na concentração de 50 μmol L⁻¹. Após o período de incubação do meio microsomal foi adicionado ao meio o solvente extrator juntamente com 50 μL do padrão interno. As amostras foram agitadas em agitador orbital Vibrax VXR Basic® da IKA (Staufen, Alemanha) durante 10 min e posteriormente centrifugadas à 1600 x g por 10 min na temperatura de 4°C em centrífuga Hitachi HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão). A fração orgânica foi coletada (400 μL), evaporada sob fluxo de ar comprimido, e em seguida, o resíduo foi solubilizado em 200 μL de metanol 100% para análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

A eficiência do processo de preparação da amostra foi determinada através da avaliação da porcentagem de recuperação e da seletividade. Para tanto, foi feita a comparação das áreas obtidas para as amostras extraídas, com amostras que não passaram pelo processo de extração as quais continham apenas o analito e o padrão interno, considerados como 100% de recuperação. A seletividade foi avaliada pela análise do “branco” microsomal. Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism® versão 5.0. Esse experimento foi realizado em quintuplicata.

3.10 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS)

As análises por LC-MS/MS foram realizadas utilizando um sistema para cromatografia líquida da Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence, composto por bomba LC-20AD, degaseificador online DGU-20A3R, injetor automático SIL-20A8HT, forno para coluna CTO-20AC, módulo de comunicação CBM-20A acoplado ao espectrômetro de massas da AB Sciex (Toronto, Canadá), modelo API 3200 equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador triplo quadrupolo.

Nas análises por LC-MS/MS foi utilizada uma coluna cromatográfica Chiralpak AD-H[®] (150 x 4,6 mm, 5 µm) e uma coluna guarda Ascentis Express Fused Core C₁₈ (3,0 mm x 4,6 mm 2,7 µm) da Supelco (Pensilvânia, EUA). A fase móvel foi composta por metanol (100%) contendo 0,1% de ácido fórmico. A vazão da fase móvel foi de 0,9 mL min⁻¹, com temperatura de análise de 35 °C e volume de injeção de 10 µL. Os espectros foram adquiridos empregando ionização por eletrospray em modo positivo. A transição do íon precursor protonado do miclobutanil, m/z 289 para os íons produtos m/z 70 (quantificação) e m/z 125 (confirmação), e do íon precursor protonado do PI (diazepam) m/z 285 para os íons produtos, m/z 193 (quantificação) e m/z 154 (confirmação), foram monitoradas em resolução unitária no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM – *Multiple Reaction Monitoring*), com *dwell time* de 200 ms por transição. A energia de colisão foi de 35 eV. Os gases do nebulizador, do turbo e de colisão foram de 50, 40 e 4 psi, respectivamente, enquanto a tensão do capilar e a temperatura de secagem foram de 5000 V e 700 °C, respectivamente. A aquisição e análise dos dados foram realizadas no Software Analyst, versão 1.5.2 (Ontário, Canadá).

3.11 Estabilidade do miclobutanil em meio microssomal

A fim de avaliar a estabilidade do analito durante o metabolismo *in vitro*, um estudo prévio foi realizado nas condições de incubação (37°C). O meio microssomal foi composto por 5 µL da solução de miclobutanil em etanol, 40 µL de microssomas hepáticos humanos na concentração final de 0,5 mg mL⁻¹, 105 µL de solução tampão fosfato pH 7,4 0,1 mol L⁻¹ + 0,25% (m/v) de Cremophor

EL[®], sem a adição do cofator NADPH, o qual foi substituído por 50 µL de solução tampão Tris/KCl. A estabilidade do substrato foi avaliada em três concentrações: 0,01 µmol L⁻¹, 1,00 µmol L⁻¹ e 20,0 µmol L⁻¹, nos tempos 0 (controle) e 50 minutos (tempo máximo de incubação). Posteriormente as amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra e analisadas por LC-MS/MS, nas condições descritas no item 3.11. Os resultados obtidos foram analisados através do programa GraphPad Prism[®] versão 5.0, pelo teste estatístico *t-Student* (não-pareado). Foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram valores de p superiores a 0,05, para as quais não há diferença significativa entre o controle e as amostras que foram submetidas ao tempo máximo de incubação. Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

3.12 Estudo Prévio de Metabolismo in Vitro

Anterior a validação do método analítico, um estudo prévio de metabolismo in vitro com o miclobutanil foi realizado, a fim de garantir que este é metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 de humanos presentes nos microsomas hepáticos.

Para tanto, três concentrações diferentes de miclobutanil foram avaliadas: 0,01 µmol L⁻¹, 1,00 µmol L⁻¹ e 20 µmol L⁻¹, no meio microssomal, (n=5). As amostras foram pré-incubadas à 37°C durante 5 minutos e em seguida a reação foi iniciada pela adição do sistema de regeneração de NADPH. Simultaneamente, controles (sem adição de NADPH) e brancos (sem a adição do miclobutanil) foram realizados. Após 50 minutos de incubação, a reação foi encerrada pelo início do procedimento de preparo de amostra e as amostras foram analisadas por LC-MS/MS.

3.13 Validação do Método Analítico

O método analítico desenvolvido foi validado de acordo com o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Em tubos de polipropileno do tipo Falcon[®] foram adicionados 5 µL de miclobutanil, juntamente com 105 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 + Cremophor EL[®] 0,25% (m/v), 40 µL de microsomas hepáticos na

concentração final de 0,5 mg mL⁻¹ e 50 µL de solução tampão Tris/KCl. As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostras (item 3.9) e analisadas por LC-MS/MS (item 3.10).

Devido ao extenso intervalo de concentração do substrato a ser empregado nos estudos de cinética, a validação do método analítico foi realizada empregando duas curvas analíticas, nomeadas como curva baixa e curva alta. A Tabela 7 mostra as concentrações de miclobutanil, no meio microssomal, empregadas para a validação do método.

Tabela 7. Concentrações de miclobutanil em meio microssomal empregadas na validação analítica

	Conc. Curva Baixa (µmol L⁻¹)	Conc. Curva Alta (µmol L⁻¹)
Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	0,025	2,49
Controle de Qualidade Baixo (CQB)	0,050	3,74
Controle de Qualidade 1 (CQ1)	0,38	7,47
Controle de Qualidade 2 (CQ2)	0,50	9,96
Controle de Qualidade Médio (CQM)	1,25	19,91
Controle de Qualidade Alto (CQA)	1,56	31,55
Limite Superior de Quantificação (LSQ)	2,49	49,78

3.13.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método foram analisadas (n=3) amostras do meio microssomal sem adição de miclobutanil e de padrão interno, observando a ocorrência de interferentes da matriz com o mesmo tempo de retenção destes. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito e do padrão interno foram consideradas aceitáveis se inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e 5% da resposta para o padrão interno (ANVISA, 2012).

3.13.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi realizada no intervalo de concentração de miclobutanil de 0,025 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 2,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a curva baixa e de 2,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 49,78 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a curva alta (Tabela 6). Curvas analíticas foram construídas pela correlação entre as concentrações e as razões de área do miclobutanil e do PI obtidas, com ponderação de $1/x^2$. A correlação dos dados foi avaliada a partir do coeficiente de correlação (r) das curvas, do erro relativo de cada ponto e do gráfico de resíduos.

3.13.3 Efeito Residual

O efeito residual foi avaliado através da injeção de uma amostra “branco” (sem a adição de miclobutanil e de PI), seguida pela injeção de uma amostra correspondente ao limite superior de quantificação e na sequência, outras duas amostras do “branco”. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito e do padrão interno foram consideradas aceitáveis se inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e 5% da resposta para o padrão interno (ANVISA, 2012).

3.13.4 Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação foi determinado ($n=5$) como a menor concentração de miclobutanil que poderia ser determinada, dentro dos limites de precisão (expresso como desvio padrão relativo percentual, DPR%, Equação 4) e exatidão (expresso como erro relativo percentual, ER%, Equação 5) aceitáveis (20% e $\pm 20\%$, respectivamente).

$$\text{DPR (\%)} = \frac{s}{x} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde, s é a estimativa do desvio padrão e x a média das concentrações obtidas.

$$ER (\%) = \frac{C_{exp} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

onde, C_{exp} é a concentração experimental e C_{nom} a concentração nominal.

3.13.5 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas (n=5) nas concentrações de miclobutanil correspondentes ao limite inferior de quantificação, 0,025 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva baixa) e 2,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva alta), ao controle de qualidade baixo, 0,050 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva baixa) e 7,47 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva alta), ao controle de qualidade médio, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva baixa) e 19,91 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva alta) e ao controle de qualidade alto, 1,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva baixa) e 31,55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva alta). A exatidão foi expressa como erro relativo percentual (ER%) e a precisão como desvio padrão relativo percentual (DPR%). As amostras foram consideradas aceitáveis para ER% de $\pm 20\%$ e DPR% de até 20% para o limite inferior de quantificação e de $\pm 15\%$ e de até 15%, respectivamente, para as demais concentrações (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

Na determinação da precisão/exatidão intraensaio foram realizados experimentos no mesmo dia. Já na precisão/exatidão interensaio, os experimentos foram realizados em 3 dias consecutivos, sendo realizadas curvas analíticas para a quantificação do miclobutanil, diariamente.

3.13.6. Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado (n=5) para as concentrações correspondentes ao controle de qualidade baixo e ao controle de qualidade alto, para ambas as curvas analíticas. Para tal, foram analisadas amostras de “branco” da matriz biológica, submetidas ao procedimento de preparo de amostra e posteriormente adicionadas de analito e padrão interno. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado (FMN) pelo PI através da Equação 6 e foram considerados aceitáveis valores de desvio padrão relativo inferiores a 15% (ANVISA, 2012).

$$FMN = \frac{(\text{área do analito em matriz}/\text{área do PI em matriz})}{(\text{média das áreas do analito em solução}/\text{média das áreas do PI em solução})} \quad (\text{Equação 6})$$

3.13.7 Estabilidade

A estabilidade do miclobutanil em amostras microssomais foi avaliada (n =5) nas concentrações correspondentes ao controle de qualidade baixo, 0,050 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva baixa) e 7,47 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva alta) e ao controle de qualidade alto 1,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva baixa) e 31,55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva alta). As amostras foram quantificadas com o emprego de curvas analíticas preparadas no mesmo dia do estudo, onde a concentração média obtida para estas foi comparada com a respectiva concentração nominal. As amostras foram consideradas estáveis se os valores de ER% e DPR% fossem inferiores $\pm 15\%$ e 15% , respectivamente.

3.13.7.1 Condições de Incubação

Na avaliação da estabilidade nas condições de incubação, as amostras foram deixadas a 37°C em banho-maria durante 50 minutos, condição esta empregada nos estudos de metabolismo in vitro do miclobutanil. Após esse período, as amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostras (item 3.9) e analisadas por LC-MS/MS (3.10).

3.13.7.2 Auto-Injetor por 20 horas

Na avaliação da estabilidade no auto-injetor, as amostras foram submetidas a incubação e posteriormente ao procedimento de preparo de amostra (item 3.9). Após, essas amostras foram acondicionadas no auto-injetor e analisadas por LC-MS/MS (3.10), após 20 horas.

3.14 Otimização das Condições de Metabolismo (Pré-Cinética)

As condições de velocidade inicial (V_0) foram determinadas através da otimização do tempo de incubação e da concentração de proteína microssomal para posterior determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas do CYP450 presentes nos microssomas de humanos.

3.14.1 Avaliação do tempo de incubação

A faixa linear de depleção do miclobutanil do meio microssomal, em função do tempo de incubação foi determinada avaliando-se três concentrações do praguicida: 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (baixa), 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (média) e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (alta). Para tanto foram preparadas (n=5) amostras contendo 5 μL de miclobutanil, juntamente com 105 μL de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 + Cremophor EL[®] 0,25% (m/v) e 40 μL de microssomas hepático de humanos na concentração proteica final de 0,5 mg mL^{-1} . As amostras foram pré-incubadas sob agitação durante 5 minutos à 37°C e a reação foi iniciada pela adição de 50 μL do sistema de regeneração de NADPH, completando o volume de 200 μL . Os tempos de incubação foram de 0 (controle), 5, 10, 20, 30, 40 e 50 minutos e após estes a reação foi encerrada pelo início do procedimento de preparo de amostra. Posteriormente as amostras foram analisadas por LC-MS/MS.

Os dados obtidos foram plotados em um gráfico da área da amostra normalizada pela área do padrão interno *versus* o tempo de incubação. Realizou-se a regressão linear e através da faixa linear de depleção do miclobutanil foi determinado o tempo de incubação a ser utilizado nos estudos para a determinação dos parâmetros enzimáticos.

3.14.2 Avaliação da concentração proteica

A faixa linear de depleção do miclobutanil, em função da concentração proteica, foi determinada avaliando três concentrações do praguicida: 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (baixa), 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (média) e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (alta). Para tanto, foram preparadas (n=5) amostras contendo 5 μL de miclobutanil, juntamente com 105 μL de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 + Cremophor EL[®] 0,25% (m/v) e 40 μL de microssomas hepático de humanos nas concentrações proteicas finais de 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg mL^{-1} . As amostras foram pré-incubadas sob agitação durante 5 minutos à 37°C e a reação foi iniciada pela adição de 50 μL do sistema de regeneração de NADPH, completando o volume de 200 μL . Após 50 minutos a reação foi encerrada pelo início do procedimento de preparo de amostra e na sequência as amostras foram analisadas por LC-MS/MS.

Os dados obtidos foram plotados em um gráfico da área da amostra normalizada pela área do padrão interno *versus* a concentração proteica. Realizou-se a regressão linear e através da faixa linear de depleção do

miclobutanil foi determinada a concentração proteica a ser utilizada para a determinação dos parâmetros enzimáticos.

3.15 Cinética Enzimática

O estudo para determinação do perfil e dos parâmetros cinéticos após metabolismo do miclobutanil pelas enzimas do CYP450 presentes nos microsomas hepáticos foi realizado empregando como substrato a mistura racêmica do miclobutanil e os enantiômeros isolados, (+)-miclobutanil e (-)-miclobutanil.

Para tanto, foi utilizada a condição de velocidade inicial previamente otimizada (item 3.14), empregando microsomas hepáticos de humanos na concentração proteica final de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e tempo de incubação de 50 minutos. As concentrações de miclobutanil ($n=5$) foram avaliadas na faixa de $0,10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Para tal, em tubos de polipropileno do tipo Falcon®, foram adicionados, $5 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de miclobutanil em etanol, juntamente com $105 \text{ } \mu\text{L}$ de solução tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 + Cremophor EL® 0,25% (m/v) e $40 \text{ } \mu\text{L}$ de microsomas hepáticos de humanos. As amostras foram pré-incubadas a 37°C durante 5 min e na sequência a reação foi iniciada pela adição de $50 \text{ } \mu\text{L}$ do sistema de regeneração de NADPH. Após 50 minutos a reação foi interrompida pelo início do procedimento de preparo de amostra. As amostras foram analisadas e quantificadas por LC-MS/MS através de uma curva analítica preparada no mesmo dia do estudo. As concentrações obtidas foram subtraídas das concentrações nominais, obtendo-se assim a concentração que foi metabolizada pelas enzimas do CYP450. Para cada concentração foi determinada a velocidade da reação enzimática, normalizando, posteriormente, a concentração metabolizada obtida pelo tempo de incubação (50 min) e pela concentração de proteínas microsomais ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Um gráfico com os resultados obtidos da velocidade da reação enzimática pela concentração de miclobutanil empregada foi construído e analisado por regressão não-linear pelo programa GraphPad Prism® versão 5.0 (CA, EUA), através dos modelos cinéticos enzimáticos, afim de obter os parâmetros enzimáticos ($V_{\text{máx}}$ e K_m) do miclobutanil frente as enzimas do CYP450 presentes nos microsomas hepáticos de humanos.

3.16 Ligação as proteínas microsossomais e plasmáticas

A determinação da fração de miclobutanil não ligada as proteínas microsossomais e plasmáticas foi realizada empregando tanto o racemato, quanto os enantiômeros isolados, (+)-miclobutanil e (-)-miclobutanil, em concentrações equivalentes ao valor de K_m . No ensaio para a determinação da fração não ligada as proteínas microsossomais foram adicionados aos tubos de polipropileno do tipo Falcon® 5 µL da solução de miclobutanil em etanol, juntamente com 105 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 + Cremophor EL® 0,25% (m/v), 40 µL de microsomas hepáticos na concentração final de 0,5 mg mL⁻¹, concentração proteica empregada nos estudos de metabolismo in vitro e 50 µL de solução tampão Tris/KCl 0,05 mol L⁻¹ pH 7,4, em substituição a solução do cofator NADPH. No ensaio para a determinação da fração não ligada as proteínas plasmáticas de humanos, foram adicionados 5 µL da solução de miclobutanil em etanol, 145 µL de plasma humano na concentração final de 42 mg mL⁻¹, equivalente a concentração média presente no corpo humano (DAVIES; MORRIS, 1993) e 50 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 + Cremophor EL® 0,25% (m/v). Controles foram preparados, na ausência de proteínas microsossomais e plasmáticas, contendo 5 µL da solução de miclobutanil em etanol e 195 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 + Cremophor EL® 0,25% (m/v). As amostras (n=3) foram incubadas a 37°C durante 10 min e posteriormente transferidas para os dispositivos de ultracentrifugação Amicon, (0,5 mL, membrana de celulose regenerada, 30000 daltons, Millipore, MA, EUA), sendo centrifugadas à 10000 x g por 20 min. O filtrado foi coletado e analisado por LC-MS/MS, conforme descrito no item 1.4. A fração de miclobutanil não ligada as proteínas foi calculada utilizando a razão entre as áreas das amostras e do controle.

3.17 Determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do miclobutanil (fenotipagem)

O estudo de fenotipagem para a determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do miclobutanil foi realizado utilizando as isoformas humanas recombinantes do CYP450 e empregando como substrato a mistura racêmica e também os enantiômeros isolados, (+)-miclobutanil e (-)-

miclobutanil, em concentrações equivalentes ao valor de K_m . As isoformas avaliadas foram: CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 E CYP2E1, na concentração final de 50 pmol mL^{-1} . Para tal, em tubos de polipropileno do tipo Falcon®, foram adicionados $5 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de miclobutanil em etanol, juntamente com $40 \text{ }\mu\text{L}$ das isoformas humanas recombinantes e $105 \text{ }\mu\text{L}$ de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 + Cremophor EL® 0,25% (m/v). Controles negativos também foram preparados os quais eram constituídos apenas de células de insetos. As amostras ($n=3$) foram pré-incubadas durante 5 min à 37°C e posteriormente a reação foi iniciada através da adição de $50 \text{ }\mu\text{L}$ do sistema de regeneração de NADPH. Após 50 minutos a reação foi encerrada pelo início do procedimento de preparo de amostras. As amostras foram analisadas por LC-MS/MS, conforme descrito no item 3.10 e as áreas obtidas para cada isoforma foi comparada as áreas do controle. O resultado foi normalizado de acordo com a porcentagem de cada isoforma presente no fígado humano, obtendo-se assim a RN e expresso em função da porcentagem de RNT (somatória das RN de cada isoforma que atua no metabolismo do praguicida), seguindo as Equações 7 e 8 (RODRIGUES, 1999).

$$RN = v \times [CYP]HLM_{\text{nativo}} \text{ (Equação 7)}$$

$$\%RNT = \frac{RN}{RNT} \times 100 \quad \text{(Equação 8)}$$

Onde, RN indica a razão normalizada, v corresponde a velocidade da reação enzimática, $[CYP]HLM_{\text{nativo}}$ a concentração média de cada isoforma presente no fígado humano e RNT a razão normalizada total.

3.18 Estudos de Inibição Enzimática do CYP450

O potencial de inibição do miclobutanil sobre as enzimas do citocromo P450 presentes nos microssomas hepáticos de humanos foi avaliado. Para tal, foram comparadas as taxas de metabolismo para cada isoforma do CYP na presença e na ausência do praguicida e os valores de IC_{50} , concentração do praguicida que causa redução de 50% da atividade, foram determinados. Para

cada isoforma do CYP foi utilizado um substrato marcador, foram eles: fenacetina para a CYP1A2, diclofenaco para a CYP2C9, S-mefenitoína para a CYP2C19, bufuralol para a CYP2D6, clorzoxazona para a CYP2E1, e midazolam e nifedipina para a CYP3A4/5. A concentração de marcador utilizada foi aproximadamente igual aos seus valores de K_m . O estudo foi realizado tanto para o racemato quanto para os enantiômeros, (+)-miclobutanil e (-)-miclobutanil, isolados, em sete diferentes concentrações, no meio microssomal: 10 nmol L⁻¹, 50 nmol L⁻¹, 200 nmol L⁻¹, 1 µmol L⁻¹, 4,6 µmol L⁻¹, 21,5 µmol L⁻¹ e 100 µmol L⁻¹. Os resultados obtidos foram comparados com controles negativos, na ausência de miclobutanil, e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As condições de incubação para os ensaios de inibição já haviam sido determinadas anteriormente por nosso grupo (Habenschus et. al., 2017) e estão resumidas na Tabela 9. O meio microssomal foi constituído de 5 µL da solução de miclobutanil, juntamente com 5 µL de solução do marcador, 80 µL de microssomas hepáticos de humanos, 210 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 e 100 µL do sistema de regeneração de NADPH, em um volume final de 400 µL. O meio microssomal foi pré-incubado por 5 minutos à 37°C e a reação iniciada pela adição do sistema de regeneração de NADPH. Ao final do tempo de reação previamente determinado (Tabela 9), a reação foi encerrada pela adição de 1 mL de solvente orgânico, seguida da adição de modificador, quando necessário, e da solução do padrão interno (Tabela 10). As amostras foram agitadas em agitador orbital Vibrax VXR Basic® da IKA durante 15 min e posteriormente centrifugadas à 1800 x g por 10 min na temperatura de 4°C em centrífuga Hitachi HIMAC CF 15D2. A fração orgânica foi coletada (700 µL), e evaporada utilizando um Concentrador Plus speed vacuum Eppendorf. Em seguida, o resíduo foi solubilizado em 200 µL de fase móvel e analisado por LC-MS/MS.

As amostras foram analisadas pelo mesmo equipamento descrito no item 3.10, utilizando uma coluna Ascentis Express Fused Core C18® (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e uma coluna de guarda Ascentis Express C18® (3,0 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) da Supelco. Para análise das isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, a fase móvel foi composta por metanol:solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (90:10, v/v) e para análise da isoforma CYP2C19, a fase móvel foi

composta de metanol:solução aquosa de hidróxido de amônia 0,1% (90:10, v/v). As análises foram realizadas à 35°C e o volume de injeção foi de 10 µL. O modo de monitoramento de reação múltiplas (MRM) foi empregado e duas transições foram monitoradas, uma para quantificação e outra para confirmação. As transições monitoradas são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Transições Monitoradas

	Quantificação	Confirmação	Modo	EC (V)
acetaminofeno	152,2→110,1	152,2→ 64,9	ESI ⁺	19 e 31
4'-	312,1→230,1	312,1→231,2	ESI ⁺	37 e 25
hidroxiclofenaco				
4'-	233,1→190,1	233,1→161,2	ESI ⁻	-18 e -26
hidroximefenitoína				
1'- hidroxibufuralol	278,2→186,3	278,2→115,2	ESI ⁺	21 e 75
6'-	184,0→ 64,0	184,0→120,0	ESI ⁻	-44 e -22
hidroxiclorzoxazona				
1'-	342,5→324,1	342,5→168,2	ESI ⁺	25 e 45
hidroximidazolam				
deidronifedipina	345,1→284,0	345,1→268,0	ESI ⁺	35 e 33
diazepam	285,1→154,2	285,1→193,3	ESI ⁺	35 e 37
bisfenol A-d16	241,2→223,3	241,2→142,1	ESI ⁻	-20 e -32
tolbutamida	269,1→170,1	269,1→106,1	ESI ⁻	-24 e -38

Os valores de IC₅₀ foram determinados, através de uma regressão não linear da porcentagem de atividade enzimática remanescente para cada isoforma avaliada, em função do logaritmo da concentração de miclobutanil no meio microsomal, utilizando o programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 (CA, EUA).

Tabela 9. Condições de Incubação para ensaios de inibição in vitro do miclobutanil. (Adaptado de: Habenschus et. al., 2017).

Isoforma do CYP	Reação do marcador	Concentração de Substrato ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração Proteica (mg mL^{-1})	Tempo de Incubação (min)
CYP1A2	O-deetilação da fenacetina	12,03	0,30	30
CYP2C9	4'-hidroxilação do diclofenaco	49,45	0,10	20
CYP2C19	4' -hidroxilação da S-mefenitoína	44,83	0,20	60
CYP2D6	1'-hidroxilação do bufuralol	5,40	0,25	30
CYP2E1	6-hidroxilação da cloroxazona	145,90	0,40	20
CYP3A4/5	1'-hidroxilação do midazolam	5,41	0,10	10
CYP3A4/5	Oxidação da nifedipina	7,00	0,15	15

Tabela 10. Condições de preparo de amostra para os ensaios in vitro de inibição das enzimas do CYP450. (Adaptado de: Habenschus et. al., 2017).

Isoforma do CYP	Substrato / Metabólito	Padrão Interno	Solvente Orgânico	Modificador
CYP1A2	Fenacetina / acetaminofeno	Diazepam	Acetato de etila	-
CYP2C9	Diclofenaco / 4'-hidroxiclofenaco	Diazepam	Clorofórmio	100 μL HCl 1,2 mol L^{-1}
CYP2C19	S-mefenitoína / 4'-hidroximefenitoína	Bisfenol A-d16	Acetato de etila	-
CYP2D6	Bufuralol / 1'-hidroxibufuralol	Diazepam	Acetato de etila	100 μL NaOH 4 mol L^{-1}
CYP2E1	Cloroxazona / 6-hidroxicloroxazona	Tolbutamida	Clorofórmio	-
CYP3A4/5	Midazolam / 1'-hidroximidazolam	Diazepam	Acetato de etila	100 μL NaOH 1 mol L^{-1}
CYP3A4/5	Nifedipina / deidronifedipina	Diazepam	Acetato de etila	-

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento de um método enantiosseletivo para análise do miclobutanil por CLAE

Para o desenvolvimento do método analítico para análise enantiosseletiva desse praguicida foram avaliadas colunas cromatográficas compostas por diferentes seletores quirais e fases móveis distintas, tanto no modo normal seguindo o esquema de triagem proposto no trabalho de Perrin et al (2002), quanto no modo polar orgânico segundo Matthijs et al (2006b), avaliando-se qual a melhor condição para separação dos mesmos.

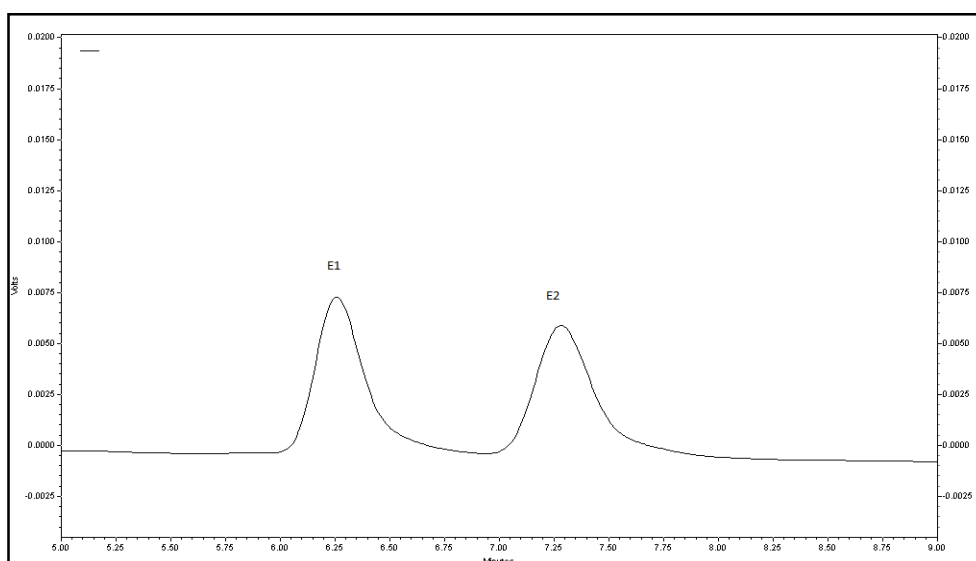
O miclobutanil ($C_{15}H_{17}ClN_4$) possui massa molecular equivalente a 288,78 g mol⁻¹. É um fungicida hidrofóbico, com um valor de log P correspondente a 2,9 (SCIFINDER WEB, 2017), resultando em uma baixa solubilidade deste em água (132 mg L⁻¹) (SCIFINDER WEB, 2017). Além disso, esse praguicida é considerado um ácido forte, com constante de dissociação (pKa) de 2,3 (SCIFINDER WEB, 2017).

Primeiramente, as colunas foram avaliadas no modo normal, utilizando-se como fase móvel hexano:isopropanol ou hexano:etanol, na proporção 80:20 (v/v) e vazão de 1,0 mL min⁻¹. Após a realização desse experimento inicial, foi observado que a coluna Chiralcel OJ[®] apresentou uma melhor resolução entre os enantiômeros do miclobutanil, sendo então otimizadas outras condições cromatográficas, como a força e a vazão da fase móvel. A condição de análise que resultou na melhor resolução no modo normal é descrita na Tabela 11. O cromatograma relativo a essa separação é apresentado na Figura 6.

Tabela 11. Condição para análise enantiosseletiva do miclobutanil no modo normal

Parâmetro	Condição Otimizada
Coluna	Chiralcel OJ®
Modo	Normal
Fase Móvel	Hexano:Etanol
Proporção (v/v)	82:18
Vazão (mL min ⁻¹)	0,8
Resolução entre os enantiômeros	2,4

Figura 6. Cromatograma referente a separação enantiosseletiva do miclobutanil. Condições cromatográficas: Coluna Chiralcel OJ®, fase móvel hexano:etanol (82:18 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, detecção em 223 nm, coluna em temperatura ambiente (23 ± 2oC) e volume de injeção 20 µL. Concentração da mistura racêmica: 10 µg mL⁻¹. E1: primeiro enantiômero a eluir. E2: segundo enantiômero a eluir.



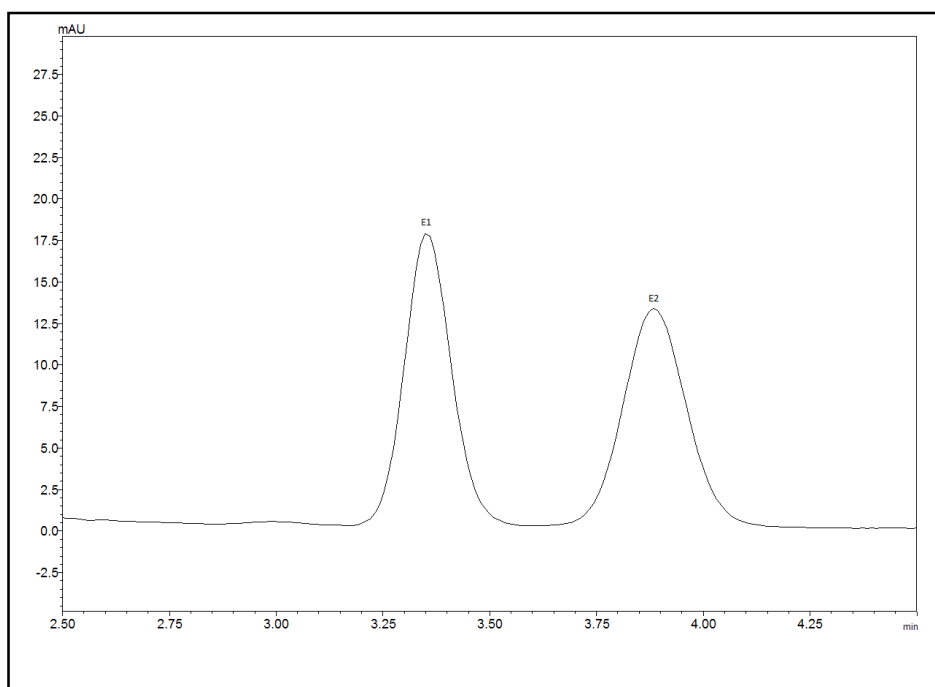
Buscando-se uma condição de análise que pudesse ser mais facilmente acoplada ao sistema LC-MS/MS, foi realizada uma segunda triagem com as colunas quirais, porém no modo polar orgânico, na qual, foram avaliadas como fase móvel os solventes etanol, metanol e acetonitrila, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹. A coluna que apresentou melhor resolução entre os enantiômeros do miclobutanil foi a Chiralpak AD-H® empregando 100% de metanol como fase móvel. Posteriormente foi otimizada a vazão, visando um menor tempo de

análise porém sem prejudicar a resolução entre os picos. Dessa forma, a condição final para análise enantiosseletiva do praguicida é apresentada na tabela 12. O cromatograma relativo a separação dos enantiômeros no modo polar orgânico é apresentado na Figura 7.

Tabela 12. Condição para análise enantiosseletiva do miclobutanil no modo polar orgânico

Parâmetro	Condição Otimizada
Coluna	Chiralpak AD-H®
Modo	Polar Orgânico
Fase Móvel	Metanol (100%)
Vazão (mL min ⁻¹)	0,9
Resolução entre os enantiômeros	2,1

Figura 7. Cromatograma referente a separação quiral dos enantiômeros do miclobutanil no modo polar orgânico. Detecção em 223 nm. Condições cromatográficas: Coluna Chiralpak AD-H®, fase móvel metanol (100%), vazão 0,9 mL min⁻¹, coluna em temperatura ambiente e volume de injeção 20 µL. Concentração da mistura racêmica: 10 µg mL⁻¹. E1: primeiro enantiômero a eluir. E2: segundo enantiômero a eluir.



Com as condições para a análise enantiosseletiva do miclobutanil otimizadas, é possível observar que, apesar do modo normal apresentar uma ligeira maior resolução entre os picos correspondentes aos enantiômeros do

praguicida, nesse modo o tempo de análise é maior (7,5 min *versus* 4 min). Além disso, o modo polar orgânico apresenta uma melhor compatibilidade com o sistema LC-MS/MS, o qual possibilita um limite de detecção menor, devido à sua alta sensibilidade, permitindo que concentrações baixas de substrato sejam empregadas nos estudos de metabolismo *in vitro*, além de elevada seletividade. No modo normal, é possível utilizar o sistema LC-MS/MS desde que a fase móvel seja diluída com um solvente polar no momento anterior a sua entrada na fonte ESI. Essa diluição deve ser realizada pois o uso da fonte ESI e a alta concentração de hexano na fase móvel eleva o risco de explosão (SHANG; IKONOMOU; MACDONALD, 1999; HENDERSON; MCINDOE, 2006). Portanto, sempre que possível essa combinação (modo normal e ESI) deve ser evitada. Sendo assim, o método enantiosseletivo otimizado em modo polar orgânico será empregado nos estudos cinéticos.

O método desenvolvido no presente estudo apresenta vantagens quando comparada aos métodos enantiosseletivos para análise do miclobutanil descritos na literatura, uma vez que combina os ganhos da cromatografia líquida em modo polar orgânico, com resolução satisfatória (2,1), redução no tempo total de análise (4 minutos) e maior facilidade de evaporação do solvente utilizado (ausência de água). No trabalho de Yan et al (2014) foi desenvolvido um método empregando a cromatografia líquida em fase reversa, com tempo total de análise de 35 minutos, enquanto que no trabalho de Wang et al (2015), um método também foi desenvolvido empregando a cromatografia líquida em modo fase reversa, porém com tempo total de análise de 13 minutos.

Após o desenvolvimento do método para análise enantiosseletiva do miclobutanil, foram avaliados analitos que poderiam ser empregados como padrão interno para ser utilizado na validação do método e nas análises quantitativas. Dentre os avaliados (Tabela 13), a fenacetina (Figura 8) foi selecionada, uma vez que esta apresenta características físico-químicas semelhantes ao substrato estudado e, além disso, não coeluiu com os mesmos, portanto não interferindo nas análises (Figura 9).

Tabela 13. Analitos avaliados para serem utilizados como padrão interno

Padrão	Tempo de Retenção (min)	Log P ^a	pKa ^a
Ibuprofeno	3,0	3,5	4,4
Isradipina	3,7	3,7	2,5
Nifedipina	3,8	2,2	2,6
Fenacetina	2,7	1,6	2,2
Diazepam	3,2	2,9	3,4

^aSCIFINDER WEB, 2017.

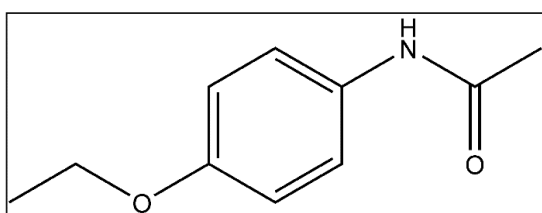
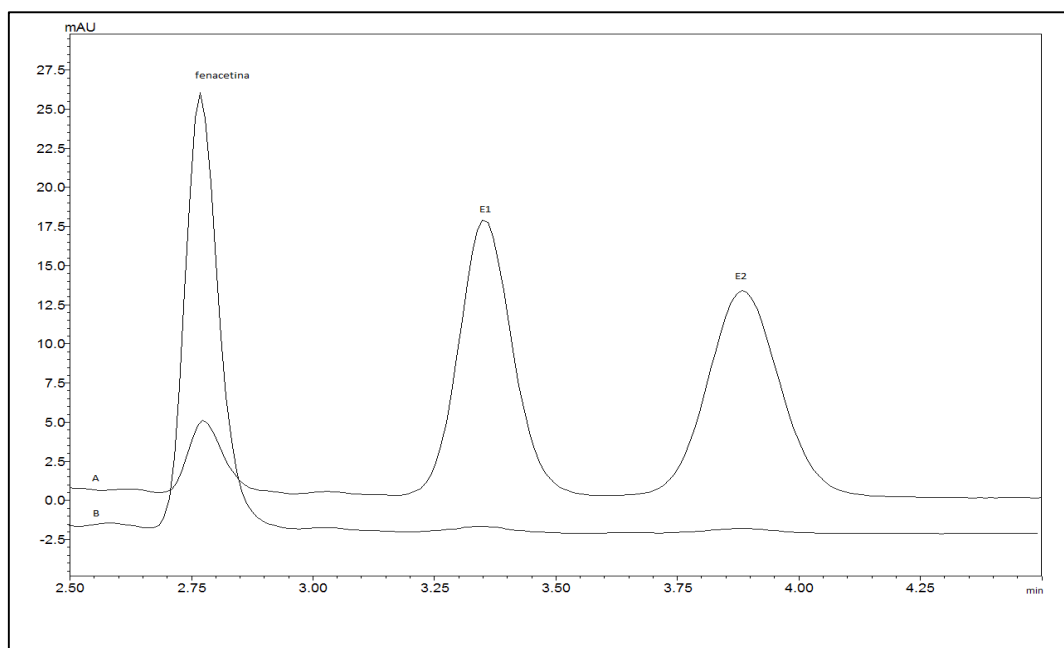
Figura 8. Estrutura química da fenacetina

Figura 9. Cromatograma referente a separação dos enantiômeros do miclobutanil no modo polar orgânico. (A) detecção em 223 nm, comprimento de onda de absorção máxima do miclobutanil e (B) detecção em 245 nm, comprimento de onda de absorção máxima do padrão interno, fenacetina. Condições cromatográficas: Coluna Chiralpak AD-H[®], fase móvel metanol (100%), vazão 0,9 mL min⁻¹, coluna em temperatura ambiente (23 ± 2°C) e volume de injeção 20 µL. E1: primeiro enantiômero a eluir. E2: segundo enantiômero a eluir. Concentração da mistura racêmica: 10 µg mL⁻¹



4.2. Isolamento dos enantiômeros do miclobutanil

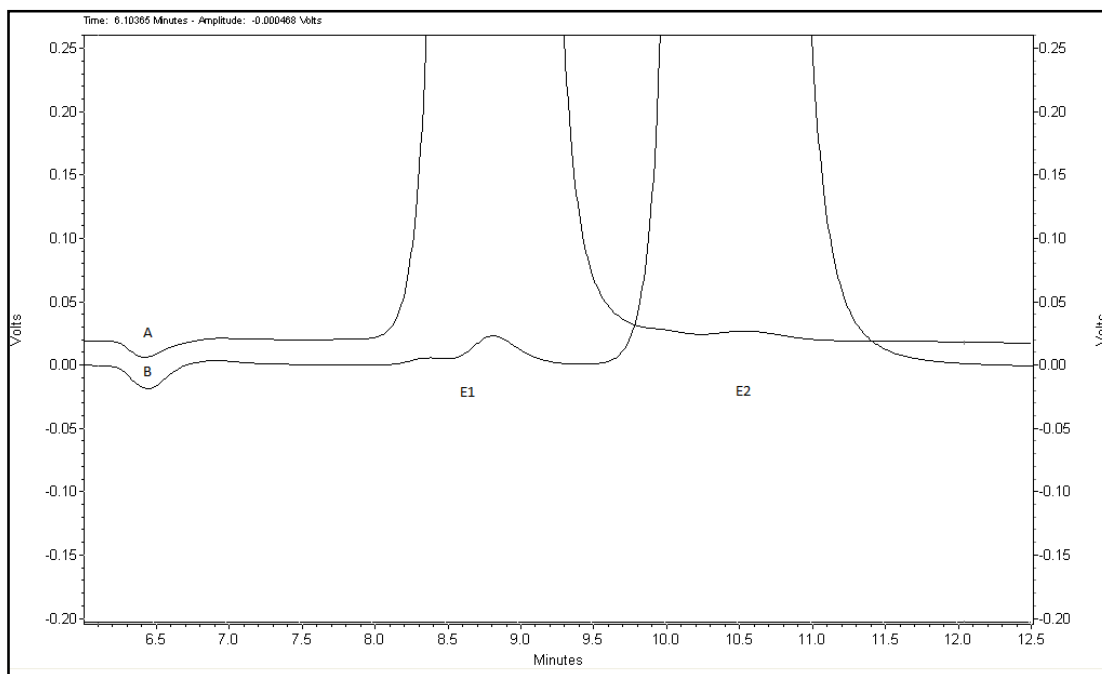
A separação, seguida da coleta dos enantiômeros do miclobutanil foi realizada a fim de obter estes isolados para serem empregados nos estudos de metabolismo *in vitro* e posterior determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas do CYP450 na presença dos enantiômeros isolados. Para tanto, foi utilizada a mesma condição de análise descrita na Tabela 11, porém com um ajuste na vazão, para 0,3 mL min⁻¹. Optou-se por utilizar essa condição, uma vez que apresenta considerável resolução entre os picos correspondentes aos enantiômeros, sendo possível assim a injeção de uma concentração elevada do praguicida, o que aumenta a massa coletada e reduz o tempo gasto nesta etapa.

Após a primeira coleta, foi feita uma repurificação, buscando a obtenção de uma maior pureza enantiomérica de cada pico. Para tanto, a massa de cada pico coletada foi solubilizada em metanol e em seguida novamente injetada nas condições descritas na Tabela 11. O cromatograma obtido após essa segunda coleta é mostrado a seguir (Figura 10), a partir do qual foi calculada a fração enantiomérica de cada pico coletado, Equação 9 (Ribeiro et al, 2014). A fração enantiomérica (%) obtida para o pico correspondente ao primeiro enantiômero a eluir (E1) é 99,9% e para o segundo (E2) é 99,7%.

$$\text{fração enantiomérica (\%)} = \frac{\text{Área Pico 1}}{\text{Área Pico 1} + \text{Área Pico 2}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Após coleta dos enantiômeros, a fase móvel foi evaporada sob fluxo de ar comprimido e o pó resultante foi armazenado em tubo âmbar a -20°C. Posteriormente foi realizada a quantificação dos mesmos para determinação da concentração, para então, serem empregados nos estudos de metabolismo *in vitro*.

Figura 10. Cromatograma obtido após a segunda coleta dos enantiômeros do miclobutanil. (A) refere-se ao cromatograma obtido após injeção da fração correspondente a E1 e (B) ao cromatograma obtido após injeção da fração correspondente a E2. Condições cromatográficas: Coluna Chiralpak AD-H®, fase móvel metanol (100%), vazão 0,3 mL min⁻¹, detecção em 223 nm, coluna em temperatura ambiente (23 ± 2°C) e volume de injeção 20 µL.

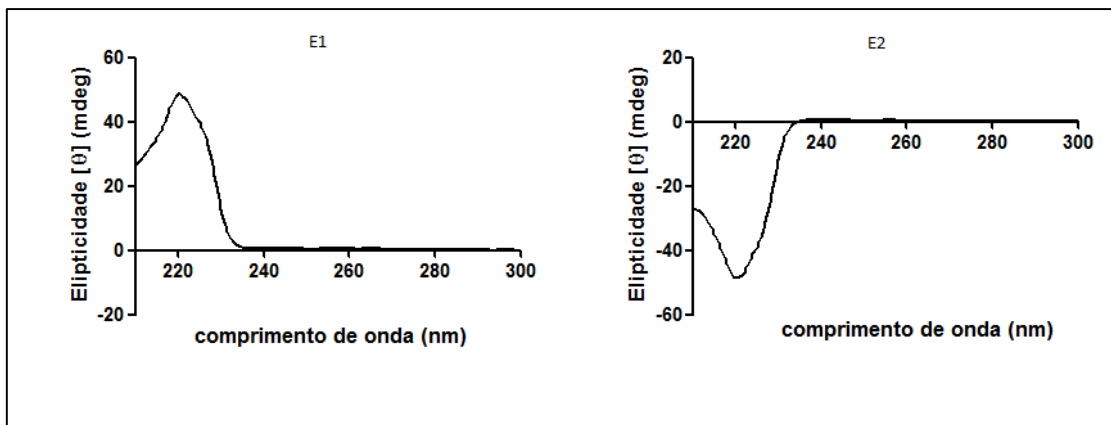


4.3. Determinação da atividade óptica dos enantiômeros do miclobutanil

A determinação da atividade óptica dos enantiômeros do miclobutanil foi realizada por dicroísmo circular. Para tanto, a fração coletada correspondente a cada enantiômero foi solubilizada na fase móvel (metanol) até uma concentração na qual fosse possível observar uma resposta dentro dos limites considerados aceitáveis pelo equipamento.

Após a análise pode-se concluir que o primeiro enantiômero a eluir (E1) corresponde ao (+)-miclobutanil (Figura 11), uma vez que apresentou um efeito Cotton positivo em 223 nm, enquanto que o segundo enantiômero a eluir (E2) apresentou um efeito Cotton negativo, no mesmo comprimento de onda, correspondendo ao (-)-miclobutanil (Figura 11). Logo, a ordem de eluição dos enantiômeros no método de análise desenvolvido é: (+)-miclobutanil seguido pelo (-)-miclobutanil.

Figura 11. Espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros do miclobutanil na fase móvel metanol (100%). (E1) - primeiro enantiômero a eluir. (E2) - segundo enantiômero a eluir.

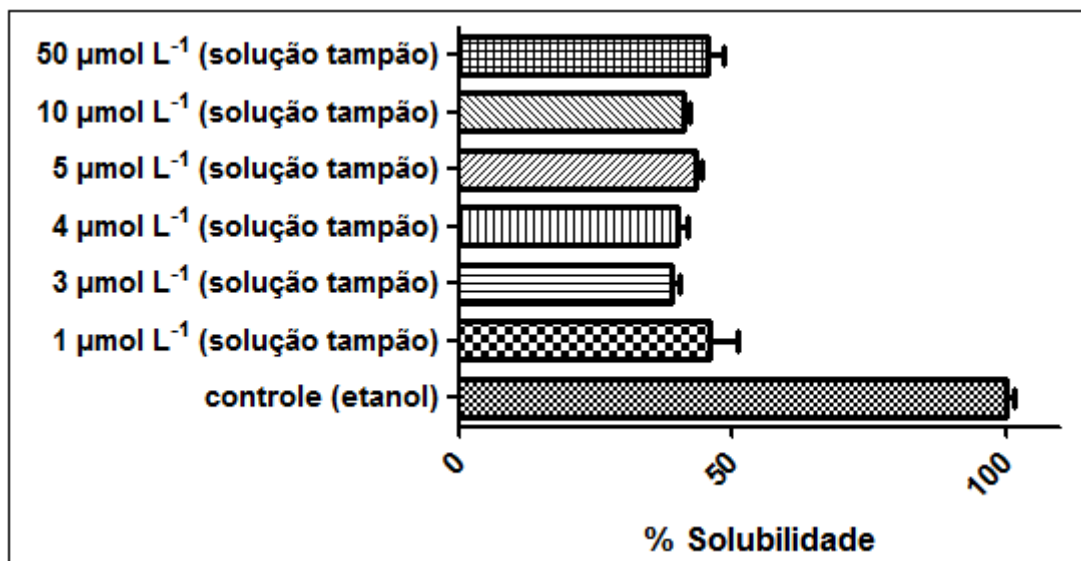


4.4 Avaliação da solubilidade do miclobutanil em meio microsomal

O estudo da solubilidade no meio microsomal é muito importante, uma vez que os parâmetros cinéticos a serem determinados dependem da concentração de substrato, sendo então necessário garantir que toda a quantidade adicionada estará disponível para a reação, tornando os resultados mais confiáveis.

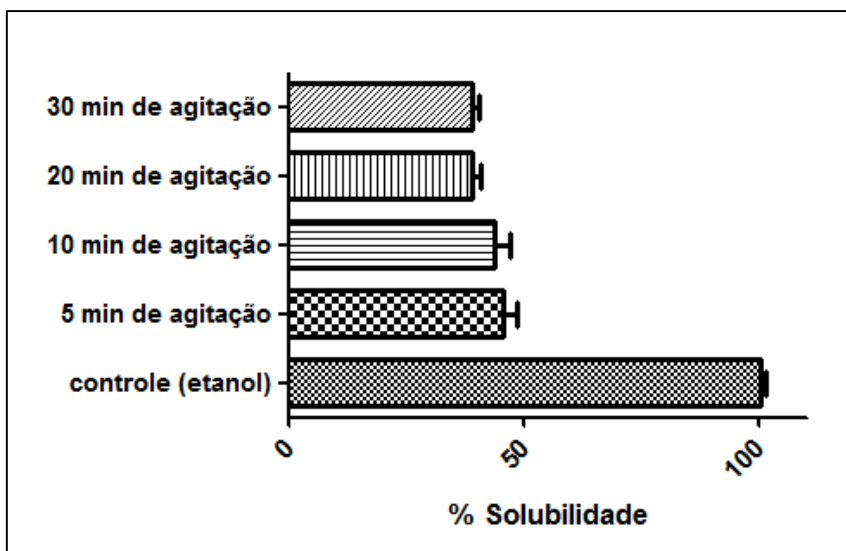
O miclobutanil, por ser hidrofóbico, apresentou uma baixa solubilidade (47%) em solução tampão fosfato (pH 7,4 0,1 mol L⁻¹) (condição do meio em que os estudos cinéticos serão realizados) na concentração de 50 μmol L⁻¹, concentração máxima que será empregada nos estudos de metabolismo in vitro. Com isso, buscando garantir a solubilidade do miclobutanil em meio microsomal, a faixa de concentração deste foi reduzida até a menor resposta do equipamento, com precisão aceitável, sendo essa de 1,0 μmol L⁻¹. Os resultados obtidos para as diferentes concentrações são mostrados abaixo (Figura 12).

Figura 12. Avaliação da solubilidade do miclobutanil em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4 0,1 mol L⁻¹) empregando diferentes concentrações do praguicida



Como é possível observar na Figura 12, independente da concentração de miclobutanil avaliada, a solubilidade deste em solução tampão fosfato (pH 7,4 0,1 mol L⁻¹) manteve-se baixa, já que os valores obtidos apresentam diferenças estatisticamente significativas quando são analisados através do teste *t-Student* ($p < 0,05$). Assim, novos ensaios de solubilidade foram realizados na concentração máxima, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, desta vez agitando-se as amostras em agitador orbital Vibrax[®] a 1000 rpm durante diferentes tempos. Porém, como é apresentado na Figura 13, esse parâmetro não exerceu influência sobre a solubilidade, já que esta foi constante independente do tempo de agitação.

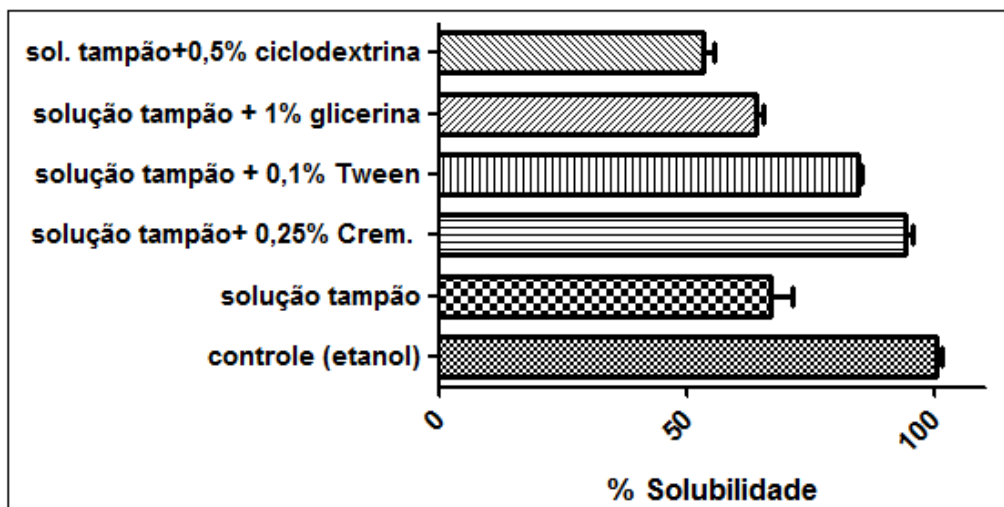
Figura 13. Avaliação da solubilidade do miclobutanil em solução tampão fosfato (pH 7,4 0,1 mol L⁻¹) na concentração de 50 µmol L⁻¹, agitando durante diferentes tempos em agitador orbital.



A adição de tensoativos é uma estratégia adotada para auxiliar na solubilização de analitos apolares, como o miclobutanil, a fim de aumentar a solubilidade destes em meio aquoso; porém, esses surfactantes devem ser utilizados com precaução, uma vez que ao mesmo tempo em que auxiliam na solubilização, podem também reduzir a atividade enzimática, sendo necessário avaliar seus efeitos sobre as enzimas estudadas (MARTIN et al., 2013).

Randall et al (2011) demonstraram que triricinoleato de polioxietileno glicerol (Cremophor EL[®]) e polisorbato 80 (Tween 80[®]) apresentam elevada eficiência em termos de solubilização sem afetar significativamente a atividade catalítica das enzimas do CYP450. Assim, foi adicionado Cremophor EL[®] 0,25% e Tween 80[®] 0,1% à solução tampão fosfato juntamente com o praguicida, na concentração de 50 µmol L⁻¹. Além desses tensoativos, foram avaliados também, a glicerina 1% (Zhang et al., 2014) e a hidroxipropil-β-ciclodextrina 0,5% (Argikar et al., 2011). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 14.

Figura 14. Avaliação da solubilidade do miclobutanil em solução tampão fosfato (pH 7,4 0,1 mol L⁻¹) na concentração de 50 µmol L⁻¹ na presença de diferentes agentes solubilizantes.



Como pode ser observado na Figura 14 a adição de 0,25% de Cremophor EL[®] aumentou a solubilidade do miclobutanil significativamente (94%), condição esta que será empregada durante a realização dos estudos de metabolismo *in vitro*.

4.5 Avaliação do preparo de amostras através da extração líquido-líquido

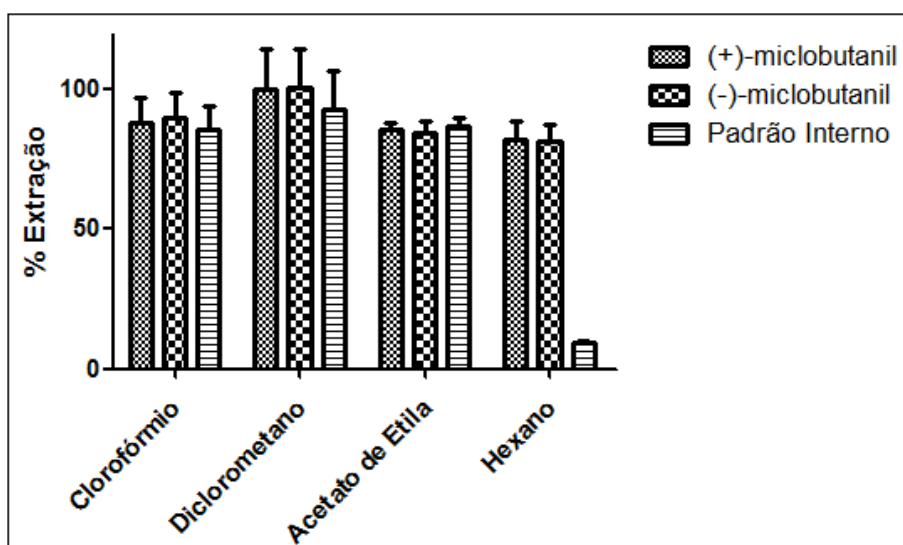
O preparo de amostras torna-se necessário, uma vez que o miclobutanil precisa ser extraído da matriz biológica, o meio microsomal, para ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. Para tanto escolheu-se a extração líquido-líquido, que se baseia na partição do analito entre as duas fases, uma aquosa e outra orgânica.

Quatro solventes orgânicos foram avaliados: clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e hexano. Os ensaios foram realizados na presença do padrão interno, fenacetina (5 µg mL⁻¹), para avaliar também a recuperação do mesmo. A concentração de miclobutanil empregada foi de 50 µmol L⁻¹.

É possível observar na Figura 15, que todos os solventes avaliados no estudo mostraram-se eficientes para a extração do miclobutanil, porém a extração do padrão interno não foi satisfatória com o uso de hexano, logo, este foi descartado. Portanto, foi escolhido como solvente extrator o acetato de etila,

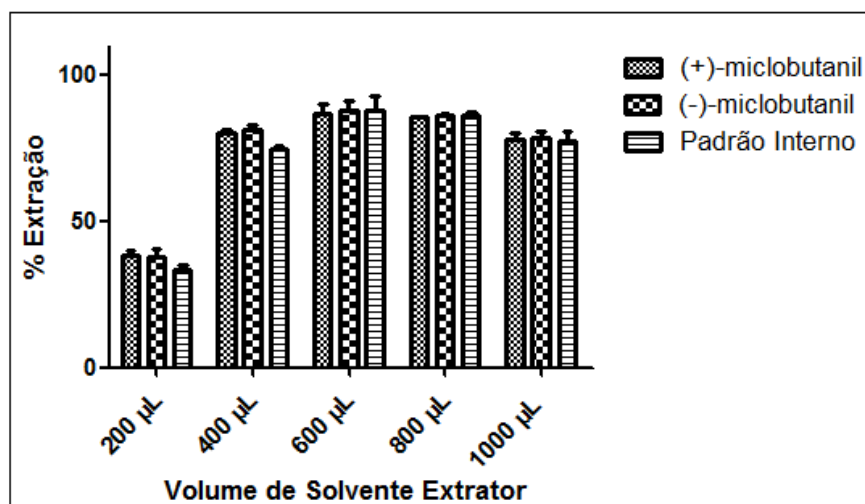
uma vez que este apresentou uma taxa elevada de recuperação (aproximadamente, 90%), com menor variação entre as replicatas (coeficiente de variação equivalente a 4%), além de ser mais fácil sua recuperação, pois ao contrário dos solventes clorados, diclorometano e clorofórmio, após a centrifugação, o acetato de etila fica na parte superior da amostra aquosa.

Figura 15. Avaliação do tipo de solvente na extração dos enantiômeros do miclobutanil e do padrão interno do meio microssomal. Procedimentos realizados durante 30 min em agitador orbital Vibrax® a 1000 rpm. Volume do meio microssomal: 200 μ L. Volume de solvente de extração: 1000 μ L.



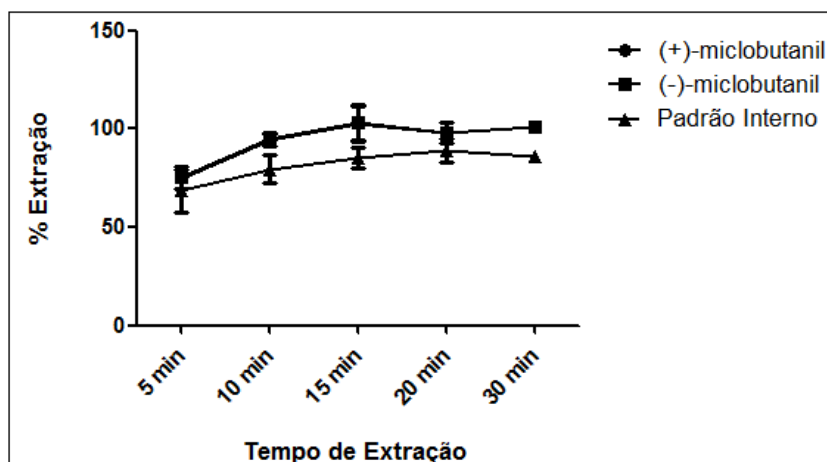
Uma vez escolhido qual solvente seria empregado como extrator, foi otimizado o volume de solvente orgânico e o tempo de extração. Como é possível observar na Figura 16, a partir de 600 μ L a recuperação do miclobutanil se torna constante e próximo a 90%. Dessa forma, escolheu-se como volume de trabalho, 600 μ L.

Figura 16. Otimização do volume de solvente extrator empregado para a extração dos enantiômeros do miclobutanil de meio microssomal. Extração realizada durante 30 min em agitador orbital Vibrax® a 1000 rpm. Volume do meio microssomal: 200 μ L. Solvente extrator, acetato de etila.



Após otimização do tipo e volume de solvente extrator, o tempo de extração foi otimizado. Os tempos avaliados foram de 5, 10, 15, 20 e 30 min. Como pode ser observado na Figura 17, o menor tempo que apresentou extração satisfatória e com uma pequena variação foi o de 10 minutos, sendo portanto, definido como o tempo de extração para o presente trabalho.

Figura 17. Otimização do tempo de agitação empregado para extração do miclobutanil de meio microssomal. Extração realizada em agitador orbital Vibrax® a 1000 rpm. Volume do meio microssomal: 200 μ L. Solvente extrator, acetato de etila. Volume do solvente extrator, 600 μ L.



A condição final estabelecida para a extração dos enantiômeros do miclobutanil de meio microssomal é apresentada na Tabela 14.

Tabela 14. Condições finais para extração do miclobutanil do meio microssomal

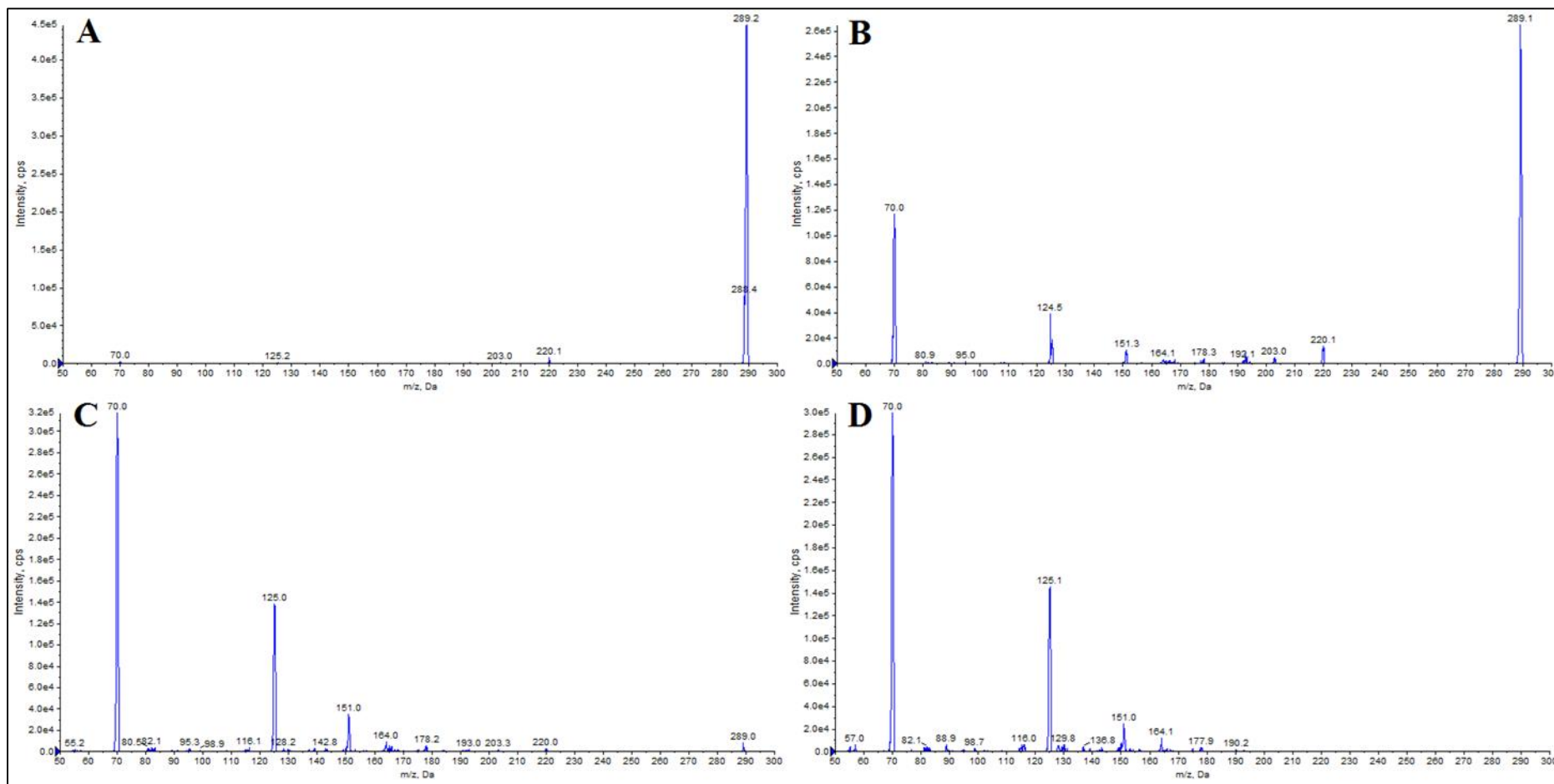
Parâmetro	Condição Otimizada
Solvente Extrator	Acetato de Etila
Volume (µL)	600
Tempo (min)	10

4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

Na tentativa de obter uma maior seletividade, uma vez que o comprimento de onda de máxima absorção do miclobutanil é relativamente baixo (223 nm), levando assim a um aumento nas possibilidades de interferentes, pois outros componentes do meio microssomal, como o NADPH, podem absorver nessa mesma região, e também buscando uma maior sensibilidade, possibilitando avaliar uma concentração mais baixa do praguicida para obtenção do perfil cinético-enzimático, foi desenvolvido um método analítico empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, com analisador do tipo triplo quadrupolo tendo como base as condições cromatográficas obtidas por CLAE-DAD (item 4.1).

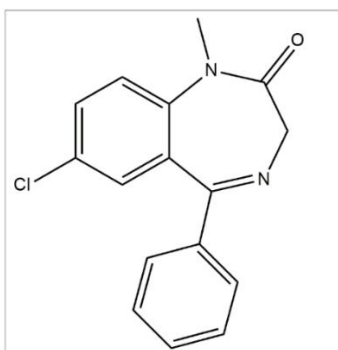
A otimização das condições de ionização foi realizada em modo positivo, considerando as características estruturais do miclobutanil (Figura 1). O íon molecular $[M+H]^+$ possui razão massa/carga 289. Avaliou-se a energia de colisão utilizada, de modo que fosse possível observar a formação dos fragmentos de maior intensidade do miclobutanil (Figura18) e assim optou-se pela energia de 35 eV. As fragmentações selecionadas para serem monitoradas em resolução unitária no modo de monitoramento de reações múltiplas, foram m/z 289 > 70 para quantificação e m/z 289 > 125 para confirmação, uma vez que estes foram os íons produto do miclobutanil com maior intensidade.

Figura 18. Espectro de fragmentação do miclobutanil em modo positivo avaliando diferentes energias de colisão. (A) 10 eV; (B) 20 eV; (C) 35 eV; (D) 45 eV.



A fenacetina, escolhida como padrão interno anteriormente, não apresentou ionização satisfatória nas condições otimizadas para análise do miclobutanil, assim optou-se por substituí-la pelo diazepam (Figura 19), que também apresenta características físico-químicas semelhantes ao praguicida (Tabela 13). O íon molecular $[M+H]^+$ do diazepam possui m/z 285 e as fragmentações selecionadas para serem monitoradas foram m/z 285 > 193 e m/z 285 > 154, para quantificação e confirmação, respectivamente.

Figura 19. Estrutura química do diazepam.



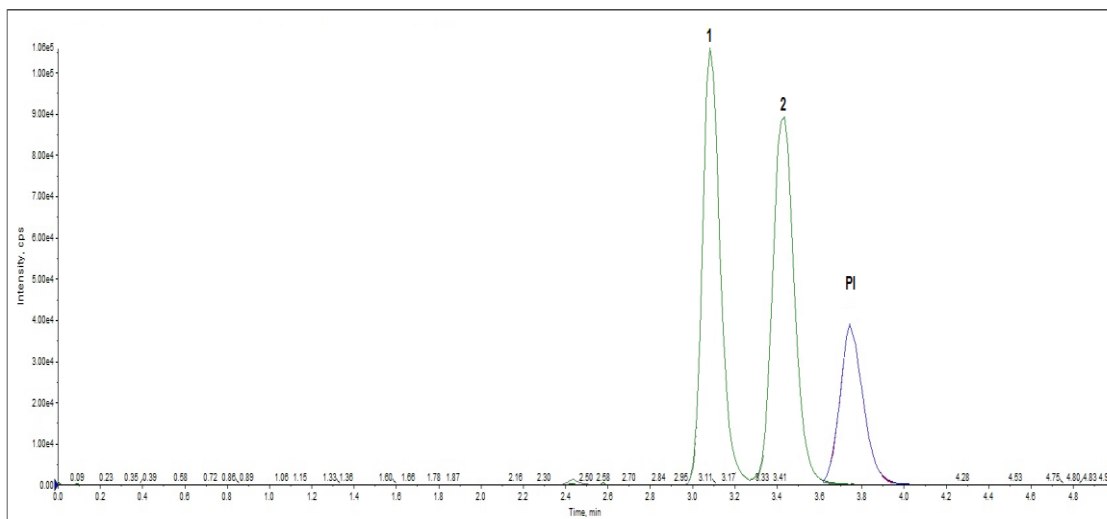
A Tabela 15 mostra as condições de análise do miclobutanil empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.

Tabela 15. Condições otimizadas para análise enantiosseletiva do miclobutanil por LC-MS/MS

Parâmetro	Condição Otimizada
Coluna	Chiralpak AD-H® (150 x 4,6 mm, 5 µm)
Fase Móvel	Metanol + Ácido Fórmico 0,1%
Vazão	0,9 mL min ⁻¹
Temperatura de Análise	35°C
Volume de Injeção	10 µL
Energia de Colisão	35 eV
Miclobutanil (transição)	m/z 289 > 70 (quantificação) e m/z 289 > 125 (confirmação)
Padrão Interno (transição)	m/z 285 > 193 (quantificação) e m/z 285 > 154 (confirmação)

A Figura 20 mostra o cromatograma da análise dos enantiômeros do miclobutanil por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, empregando o modo MRM.

Figura 20. Cromatograma referente a análise enantiosseletiva do miclobutanil por LC-MS/MS no modo MRM. 1: (+)-miclobutanil, 2: (-)-miclobutanil e PI: diazepam. Concentração de miclobutanil: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas na Tabela 15. Volume de injeção: 10 μL



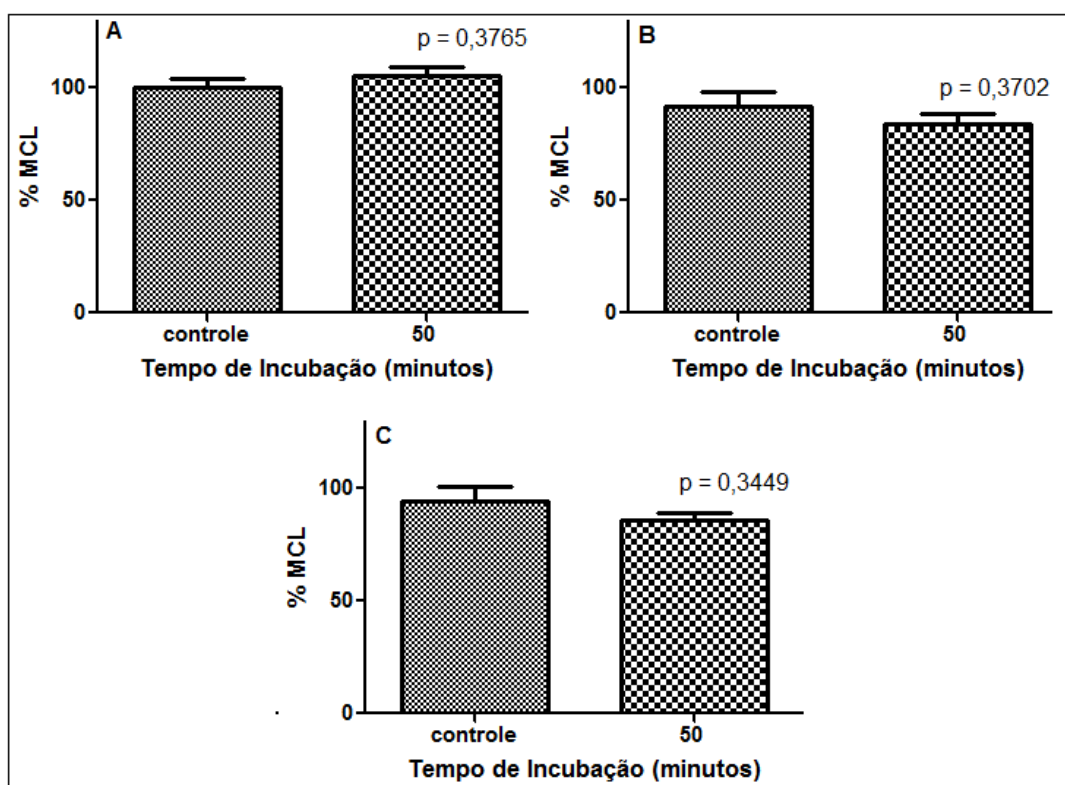
Após o desenvolvimento do método analítico para a análise enantiosseletiva do miclobutanil por LC-MS/MS, optou-se pela utilização desta nos estudos cinéticos, pois além de apresentar ganhos em termos de seletividade e sensibilidade, não apresentou perda no tempo de análise.

4.7 Estudo Prévio de Estabilidade

A fim de garantir que o miclobutanil é estável nas condições de incubação, foi realizado um estudo prévio de estabilidade, na ausência do cofator NADPH, garantindo assim que qualquer decaimento na área do praguicida durante os estudos de metabolismo in vitro seja devido a atividade das enzimas do CYP450 e não ocasionado pela degradação deste nas condições empregadas (temperatura de 37°C e concentração de proteínas de 0,5 mg mL⁻¹). Três concentrações de miclobutanil no meio microsomal foram avaliadas: 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (baixa), 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (média) e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (alta), em dois tempos distintos de incubação, o tempo zero, no qual as amostras não foram submetidas a

incubação e, portanto, utilizadas como controle, no qual a área obtida corresponde a 100% de miclobutanil (MCL) e o tempo de 50 minutos, tempo máximo de incubação empregado durante os estudos de metabolismo in vitro. Os resultados obtidos no estudo prévio de estabilidade nas condições de incubação são mostrados na Figura 21.

Figura 21. Avaliação da estabilidade do miclobutanil nas condições de incubação. A) $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$; B) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; C) $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Temperatura de incubação: 37°C .

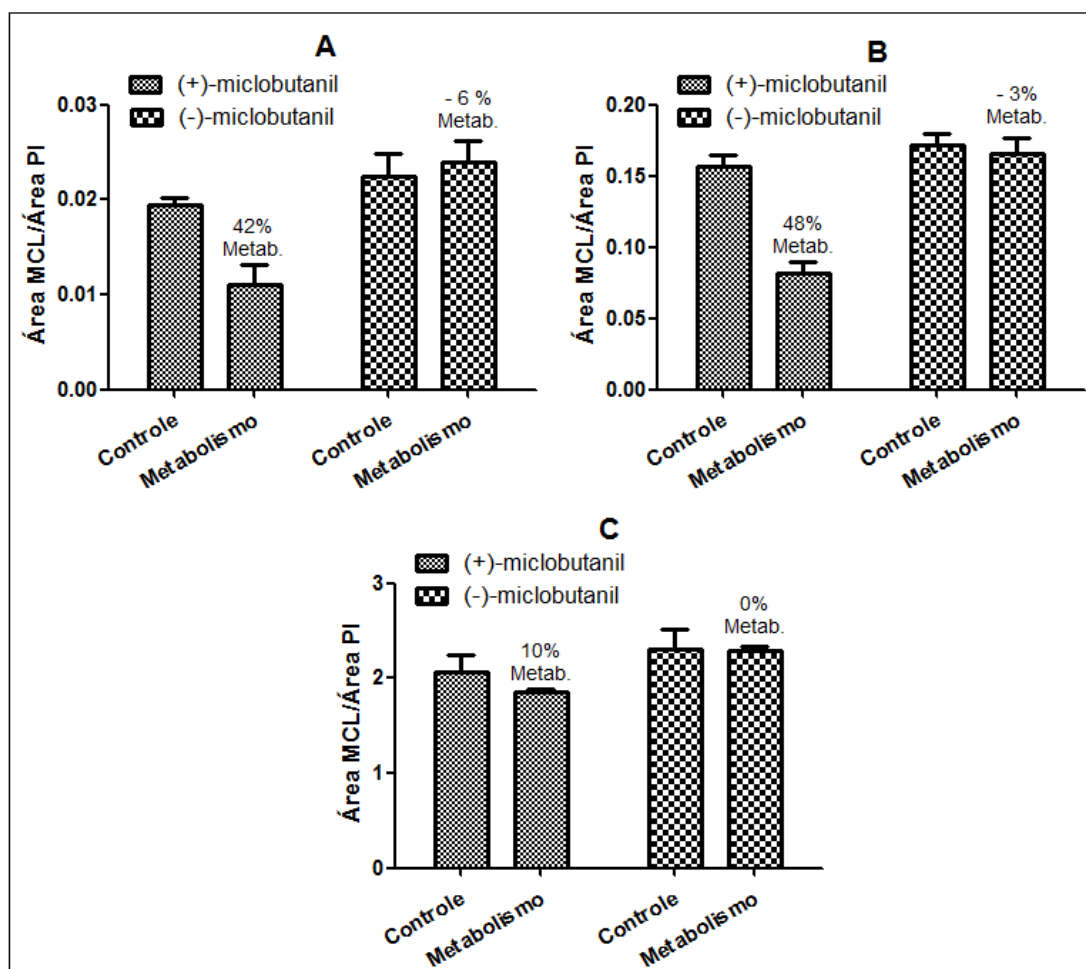


Os resultados obtidos e apresentados na Figura 21, mostraram que não ocorreu variação significativa na concentração do miclobutanil quando submetido as condições de incubação, independente da concentração empregada. O que pode ser comprovado estatisticamente pelo teste *t Student*, pois os valores obtidos de *p* são todos superiores a 0,05. Portanto, o decaimento da área de miclobutanil durante os estudos de metabolismo in vitro será devido a atividade das enzimas do CYP450.

4.8. Estudo Prévio de Metabolismo in Vitro

Anterior a validação analítica, um estudo prévio de metabolismo in vitro foi realizado para garantir que as enzimas do CYP450 presentes nos microsomas hepáticos de humanos seriam capazes de metabolizar o miclobutanil. Para tanto, foi empregada uma concentração proteica de 0,3 mg mL⁻¹ de proteínas microsossomais e tempo de incubação de 50 minutos, para três concentrações distintas de miclobutanil, 0,01 µmol L⁻¹, 1,0 µmol L⁻¹ e 20 µmol L⁻¹. As amostras submetidas ao metabolismo foram comparadas com controles, nos quais não houve adição do cofator NADPH e posteriormente as taxas de metabolização foram determinadas, tanto para o (+)- quanto para o (-)-miclobutanil. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 22.

Figura 22. Avaliação prévia do metabolismo in vitro do miclobutanil pelas enzimas microsossomais de humanos. A) 0,01 µmol L⁻¹; B) 1,0 µmol L⁻¹; C) 20 µmol L⁻¹. Tempo de incubação: 50 minutos. Concentração proteica: 0,3 mg mL⁻¹. Temperatura de incubação: 37°C.



A partir dos resultados obtidos no estudo prévio de metabolismo *in vitro* é possível constatar que as enzimas do CYP450 são capazes de metabolizar o miclobutanil, o que pode ser comprovado pelas taxas de metabolização encontradas. Além disso, quando o racemato é empregado como substrato, ocorre uma preferência pela metabolização do (+)-miclobutanil, uma vez que a concentração do (-)-miclobutanil não sofre variação quando as amostras submetidas ao metabolismo são comparadas com os controles. Um outro fator que pode ser observado é uma diminuição na taxa de metabolização com o aumento da concentração do substrato, que pode ser devida à uma velocidade menor da reação enzimática, dificultando a análise pelo método utilizado, ou então à uma possível inibição devido o aumento da concentração do substrato (SEIBERT; TRACY, 2014b). Esse fator será analisado mais detalhadamente durante os estudos futuros para determinação do perfil cinético enzimático.

4.9 Validação do Método Analítico

4.9.1 Seletividade

A seletividade do método garante que a análise do miclobutanil e do padrão interno ocorra sem a interferência de outros constituintes da amostra (ANVISA, 2012). As Figuras 23 e 24 apresentam os cromatogramas obtidos para a análise de um branco juntamente com o de uma amostra de concentração equivalente ao limite inferior de quantificação (LIQ), na qual é possível observar que não ocorre a presença de nenhum interferente da matriz com tempo de retenção equivalente aos enantiômeros do miclobutanil ou ao padrão interno. As respostas obtidas no branco apresentaram valores inferiores a 20% da resposta obtida para o analito e a 5% da resposta obtida para o padrão interno nas amostras de LIQ, como pode ser observado na Tabela 16, garantindo assim a seletividade do método analítico.

Figura 23. Seletividade do método analítico. (A) branco. (B) limite inferior de quantificação curva baixa. Condições cromatográficas descritas na Tabela 6. Volume de injeção: 10 μ L.

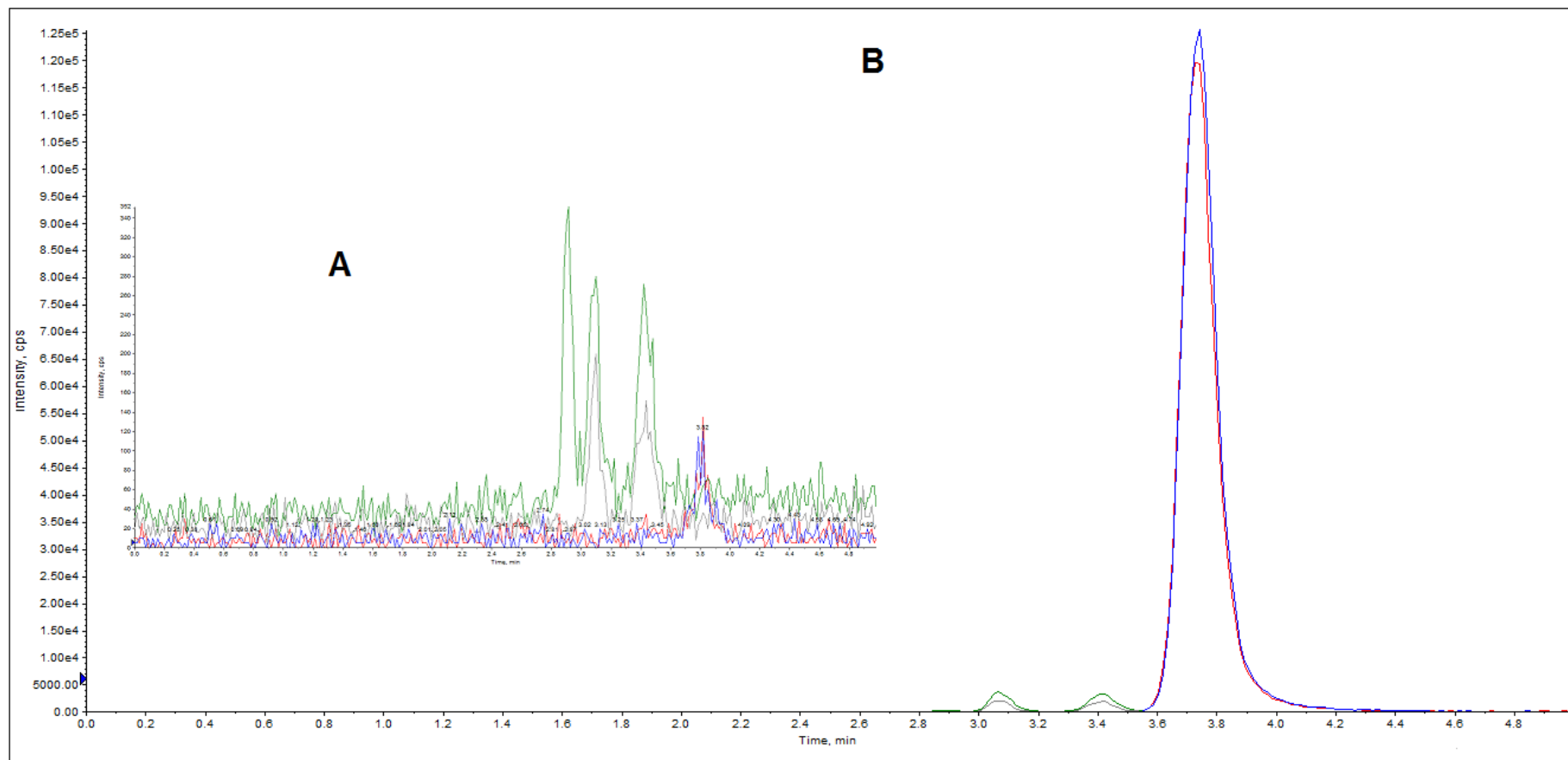


Figura 24. Seletividade do método analítico. (A) branco. (B) limite inferior de quantificação curva alta. Condições cromatográficas descritas na Tabela 6. Volume de injeção: 10 μ L.

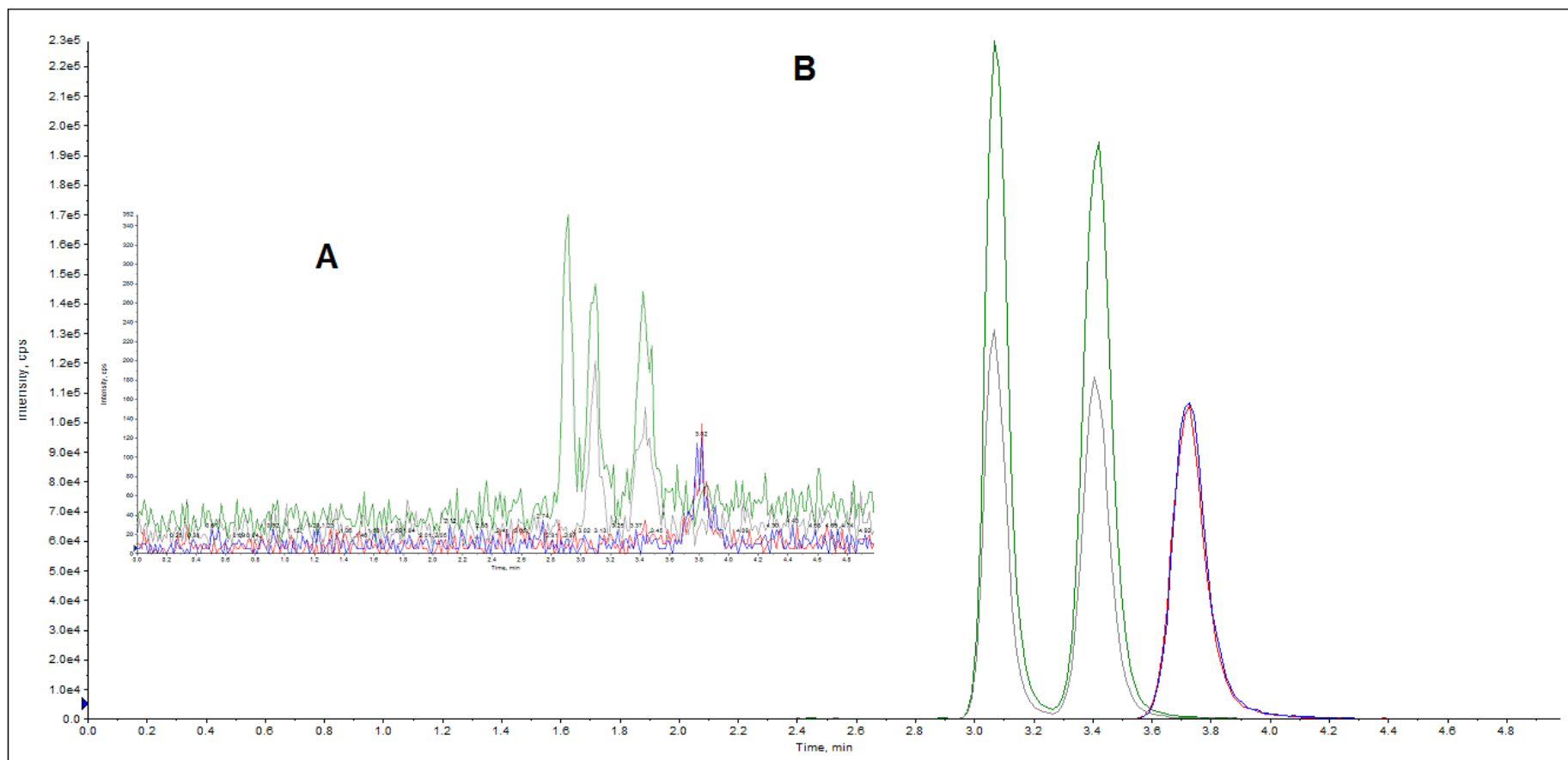


Tabela 16. Valores de área equivalentes ao miclobutanil e ao padrão interno no branco em relação as amostras de LIQ.

	Branco	LIQ (curva baixa)	%	LIQ (curva alta)	%
(+)-MCL	1010	22343	4,5	754714	0,1
(-)-MCL	891	22786	3,9	796000	0,1
Padrão interno	722	796286	0,1	765571	0,1

4.9.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada no intervalo de 0,025 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 2,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a curva baixa e de 2,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 49,78 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a curva alta. Não foi possível assegurar a linearidade do método empregando os métodos de mínimos quadrados sem ponderação, uma vez que, ao realizar a regressão linear, a exatidão não foi obtida para todas as concentrações avaliadas (ER% > 15%).

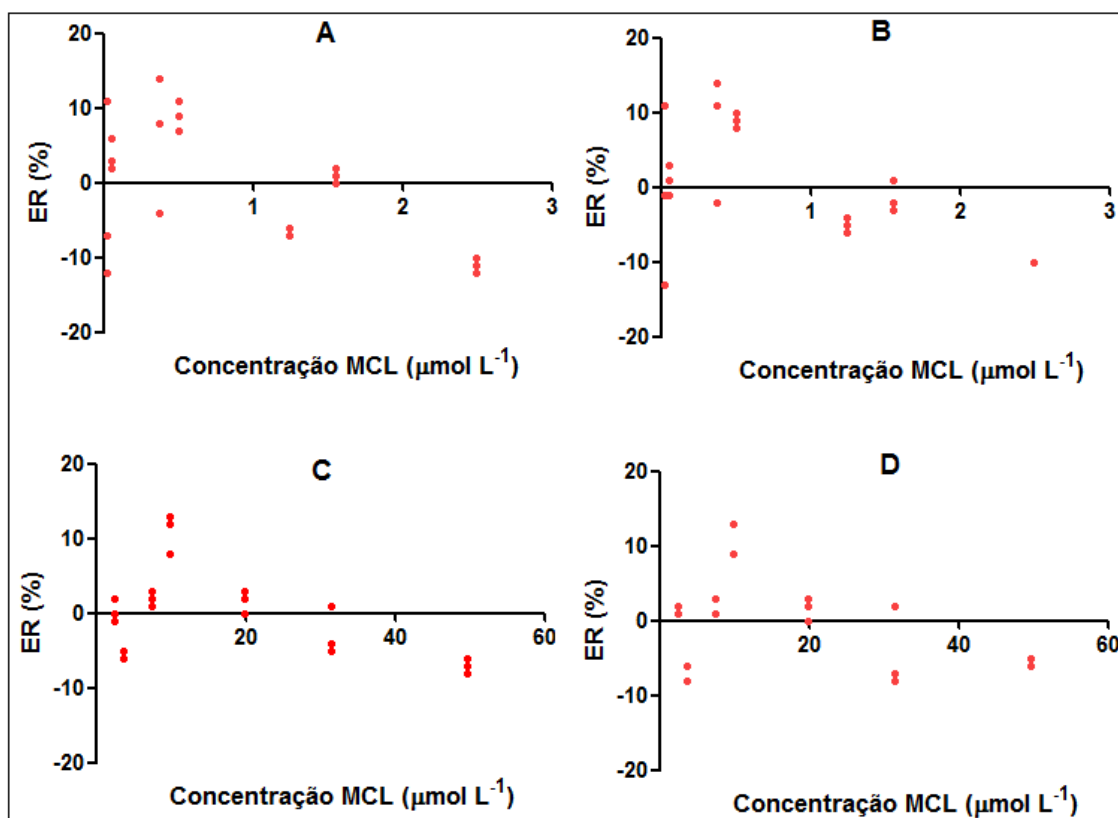
A ponderação da curva analítica é uma importante ferramenta utilizada na validação de métodos bioanalíticos (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). Sendo assim, foram realizadas regressões lineares com ponderação de diferentes pesos $1/x$, $1/x^2$ e $1/x^{1/2}$. A ponderação com peso $1/x^2$ apresentou o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais e portanto esse peso foi utilizado. A equação da reta e o coeficiente de correlação encontram-se na Tabela 17. O erro relativo para cada ponto da curva foi inferior 15% (dados não apresentados) e o gráfico de resíduos mostrou uma distribuição aleatória dos pontos ao longo curva analítica (Figura 25), garantindo assim uma adequada linearidade para o método desenvolvido.

Tabela 17. Linearidade do método para análise do miclobutanil em microsomas hepáticos.

Curva	Analito	Intervalo ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Equação Linear	r^a
Baixa	(+)-MCL	0,025 – 2,49	$y = 0,4713x + 0,0146$	0,9951
Baixa	(-)-MCL	0,025 – 2,49	$y = 0,4799x + 0,0146$	0,9960
Alta	(+)-MCL	2,49 – 49,78	$y = 0,3542x + 0,1727$	0,9976
Alta	(-)-MCL	2,49 – 49,78	$y = 0,3486x + 0,2106$	0,9977

r^a – coeficiente de correlação

Figura 25. Gráfico de resíduos para análise do miclobutanil com ponderação de $1/x^2$. (A) (+)-miclobutanil curva baixa; (B) (-)-miclobutanil curva baixa; (C) (+)-miclobutanil curva alta; (D) (-)-miclobutanil curva alta.



4.9.3 Efeito Residual

As amostras “branco” foram analisadas antes e depois de amostras de concentração correspondente ao limite superior de quantificação e as respostas obtidas para estas foram inferiores aos limites considerados aceitáveis pelos guias de validação (15% para o analito e 5% para o padrão interno), quando comparadas as respostas obtidas para o LIQ (ANVISA 2012). Portanto, o método

desenvolvido não apresenta efeito residual, assim, durante uma análise de várias amostras, não há interferência da análise anterior na seguinte.

4.9.4 Limite Inferior de Quantificação

O método desenvolvido permite a quantificação mínima de $0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$ de miclobutanil em meio microssomal para a curva baixa com erro relativo percentual de -10% e desvio padrão relativo percentual de 15% para o (+)-miclobutanil e de -8% e 15% , respectivamente, para o (-)-miclobutanil. Já para a curva alta, a concentração mínima possível de ser quantificada é $2,49 \mu\text{mol L}^{-1}$ com erro relativo percentual de -7% e desvio padrão relativo percentual de 2% , para o (+)-miclobutanil e de -6% e 2% , respectivamente, para o (-)-miclobutanil, uma vez que os valores de exatidão e precisão encontram-se dentro dos critérios de aceitabilidade (ANVISA, 2012).

4.9.5 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão intraensaio (Tabelas 18 e 19) e interensaio (Tabelas 20 e 21) foram avaliadas em quatro concentrações distintas, correspondentes ao LIQ, CQB, CQM e CQA, tanto para a curva baixa e quanto para a curva alta. Como pode ser observado nas Tabelas 18-21 os valores obtidos para o erro relativo e desvio padrão relativo estão dentro dos limites aceitáveis (ANVISA, 2012).

Tabela 18. Precisão e exatidão intraensaio para curva baixa

	(+)-MCL	(-)-MCL
$C_{\text{nom}} (\mu\text{mol L}^{-1})$	0,025 / 0,050 / 1,25 / 1,56	0,025 / 0,050 / 1,25 / 1,56
$C_{\text{exp}} (\mu\text{mol L}^{-1})$	0,022 / 0,050 / 1,18 / 1,54	0,023 / 0,050 / 1,19 / 1,57
ER (%)	-10 / 0 / -6 / -1	-8 / 0 / -4 / 0,5
DPR (%)	15 / 7 / 3 / 3	15 / 9 / 3 / 3

C_{nom} – Concentração nominal

C_{exp} – Concentração experimental

ER (%) – Erro relativo percentual

DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

Tabela 19. Precisão e exatidão intraensaio para curva alta

	(+)-MCL	(-)-MCL
C_{nom} (μmol L⁻¹)	2,49 / 7,47 / 19,91 / 31,55	2,49 / 7,47 / 19,91 / 31,55
C_{exp} (μmol L⁻¹)	2,31 / 7,59 / 19,90 / 29,89	2,34 / 8,05 / 21,29 / 32,03
ER (%)	-7 / 2 / -0,1 / -5	-6 / 8 / 7 / 2
DPR (%)	2 / 2 / 3 / 4	2 / 2 / 1 / 3

C_{nom} – Concentração nominal

C_{exp} – Concentração experimental

ER (%) – Erro relativo percentual

DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

Tabela 20. Precisão e exatidão interensaio para curva baixa

	(+)-MCL	(-)-MCL
C_{nom} (μmol L⁻¹)	0,025 / 0,050 / 1,25 / 1,56	0,025 / 0,050 / 1,25 / 1,56
C_{exp} (μmol L⁻¹)	0,025 / 0,051 / 1,19 / 1,59	0,025 / 0,052 / 1,20 / 1,58
ER (%)	0 / 2 / -4 / 2	0 / 4 / -4 / 1
DPR (%)	14 / 10 / 4 / 4	17 / 9 / 4 / 3

C_{nom} – Concentração nominal

C_{exp} – Concentração experimental

ER (%) – Erro relativo percentual

DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

Tabela 21. Precisão e exatidão interensaio para curva alta

	(+)-MCL	(-)-MCL
C_{nom} (μmol L⁻¹)	2,49 / 7,47 / 19,91 / 31,55	2,49 / 7,47 / 19,91 / 31,55
C_{exp} (μmol L⁻¹)	2,38 / 7,56 / 19,74 / 31,19	2,39 / 7,67 / 21,90 / 31,37
ER (%)	-4 / 1 / -1 / -1	-4 / 3 / 10 / -0,5
DPR (%)	3 / 3 / 2 / 5	4 / 4 / 11 / 3

C_{nom} – Concentração nominal

C_{exp} – Concentração experimental

ER (%) – Erro relativo percentual

DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

4.9.6 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado a fim de garantir a ausência de efeitos na resposta do analito e do padrão interno que poderiam ser causados por componentes da matriz biológica (ANVISA, 2012). Assim, amostras “branco” foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra e posteriormente fortificadas com miclobutanil e padrão interno, nas concentrações correspondentes ao controle de qualidade baixo e ao controle de qualidade alto, tanto para a curva baixa, quanto para a curva alta. O fator de matriz normalizado foi calculado e valores de desvio padrão relativo inferiores a 15% foram obtidos, como pode ser observado nas Tabelas 22 e 23.

Tabela 22. Fator de matriz normalizado para a curva baixa.

	(+)-MCL CQB	(-)-MCL CQB	(+)-MCL CQA	(-)-MCL CQA
1	0,81	0,88	0,87	0,90
2	0,93	0,98	1,0	1,0
3	1,0	1,1	0,95	0,97
4	0,94	1,0	1,0	1,0
5	0,98	1,0	1,0	1,1
Média	0,93	0,99	0,97	1,0
DPR (%)	8	7	6	7

Tabela 23. Fator de matriz normalizado para a curva alta.

	(+)-MCL CQB	(-)-MCL CQB	(+)-MCL CQA	(-)-MCL CQA
1	0,94	0,96	0,94	0,95
2	1,1	1,1	1,0	1,0
3	1,1	1,1	0,99	1,0
4	1,0	1,0	1,1	1,1
5	1,1	1,1	1,1	1,1
Média	1,0	1,0	1,0	1,0
DPR (%)	6	6	6	5

4.9.7. Estabilidade

A avaliação da estabilidade do miclobutanil foi realizada a fim de garantir que a concentração do analito se mantém dentro dos limites estabelecidos (ANVISA, 2012), uma vez que este pode sofrer degradação devido as condições a que é submetido durante a execução do experimento. Para tal, os parâmetros avaliados foram a condição de incubação que será empregada durante o estudo do metabolismo in vitro e no auto-injetor do equipamento por 20 horas.

4.9.7.1 Condições de Incubação

A estabilidade do miclobutanil nas condições de incubação foi avaliada em duas concentrações distintas, equivalentes ao controle de qualidade baixo (CQB) e ao controle de qualidade alto (CQA) para ambas as curvas analíticas. As amostras foram mantidas em banho-maria à 37°C durante 50 minutos, e posteriormente quantificadas com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia. Os resultados obtidos (Tabela 24) comprovaram a estabilidade do miclobutanil, assegurando-se assim que qualquer diminuição na concentração deste durante os estudos de metabolismo in vitro é devida a atividade das enzimas do citocromo P450.

Tabela 24. Estabilidade do miclobutanil nas condições de incubação

	Curva Baixa		Curva Alta	
	(+)-MCL	(-)-MCL	(+)-MCL	(-)-MCL
C_{nom} (µmol L⁻¹)	0,050 / 1,56	0,050 / 1,56	7,47 / 31,55	7,47 / 31,55
C_{exp} (µmol L⁻¹)	0,057 / 1,54	0,055 / 1,55	7,09 / 30,70	7,40 / 31,65
ER (%)	13 / -1	10 / -1	-5 / -3	-1 / 0,3
DPR (%)	15 / 4	13 / 4	4 / 3	4 / 1

C_{nom} – Concentração nominal

C_{exp} – Concentração experimental

ER (%) – Erro relativo percentual

DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

4.9.7.2 Auto-Injetor por 20 horas

A estabilidade do miclobutanil no auto-injetor por 20 horas, tempo máximo de duração de análise para um experimento, foi avaliada em duas concentrações distintas, CQB e CQA, para ambas as curvas analíticas. Para tanto, as amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostras, armazenadas no auto-injetor do equipamento e após 20 horas analisadas por LC-MS/MS. As amostras foram quantificadas com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia e os resultados obtidos (Tabela 25) comprovaram a estabilidade do miclobutanil no auto-injetor, sendo então, possíveis análises com até 20 horas de duração, sem que os resultados sejam comprometidos.

Tabela 25. Estabilidade no auto-injetor

	Curva Baixa		Curva Alta	
	(+)-MCL	(-)-MCL	(+)-MCL	(-)-MCL
C_{nom} (μmol L⁻¹)	0,050 / 1,56	0,050 / 1,56	7,47 / 31,55	7,47 / 31,55
C_{exp} (μmol L⁻¹)	0,048 / 1,56	0,053 / 1,54	7,31 / 30,93	7,25 / 30,04
ER (%)	-4 / 0	7 / -1	-2 / -2	-3 / -5
DPR (%)	7 / 4	10 / 4	3 / 2	4 / 1

C_{nom} – Concentração nominal

C_{exp} – Concentração experimental

ER (%) – Erro relativo percentual

DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

4.10. Otimização das Condições de Metabolismo in vitro (Pré-cinética)

Em estudos de metabolismo é muito importante realizar a otimização das condições empregadas, a fim de assegurar que a velocidade que está sendo medida corresponde a velocidade inicial (V_0) da reação enzimática. Para tanto foi otimizado a concentração de proteínas microsossomais e o tempo de incubação, uma vez que no estado estacionário, a concentração do substrato diminui linearmente em relação a estes parâmetros (NELSON; COX, 2002).

Três concentrações de miclobutanil no meio microsossomal foram avaliadas 0,10 μmol L⁻¹ (baixa), 1,0 μmol L⁻¹ (média) e 20 μmol L⁻¹ (alta), para garantir que toda a faixa de concentração trabalhada esteja nas condições de velocidade inicial de consumo de substrato. Para a realização desses estudos o racemato foi empregado como substrato.

4.10.1 Tempo de Incubação

Primeiramente foi determinado o tempo de incubação no qual a taxa de decaimento da concentração do miclobutanil manteve-se linear. Optou-se por primeiro avaliar o tempo, uma vez que, com o emprego de um tempo maior de incubação uma menor concentração de proteínas microsossomais pode ser empregada e conseqüentemente um gasto menor de microsossomas hepático de humanos é requerido, reduzindo assim o custo do estudo.

A concentração proteica foi fixada em $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e foram avaliados ($n = 5$) os tempos de 0, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 minutos para as três concentrações estudadas, $0,10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (baixa), $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (média) e $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (alta). As amostras foram compostas de $5 \text{ } \mu\text{L}$ do substrato, $40 \text{ } \mu\text{L}$ de microsossomas hepático de humanos e $105 \text{ } \mu\text{L}$ de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 + 0,25% de Cremophor EL® e pré-incubadas por 5 min. A reação foi iniciada pela adição de $50 \text{ } \mu\text{L}$ do sistema de regeneração de NADPH e encerrada após atingir os tempos avaliados pelo início do procedimento de preparo de amostra.

As amostras foram analisadas nas condições otimizadas por LC-MS/MS e as Figuras abaixo apresentam os resultados obtidos para a concentração baixa, média e alta para ambos os enantiômeros.

Figura 26. Avaliação da depleção do miclobutanil ($0,10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de incubação. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil..

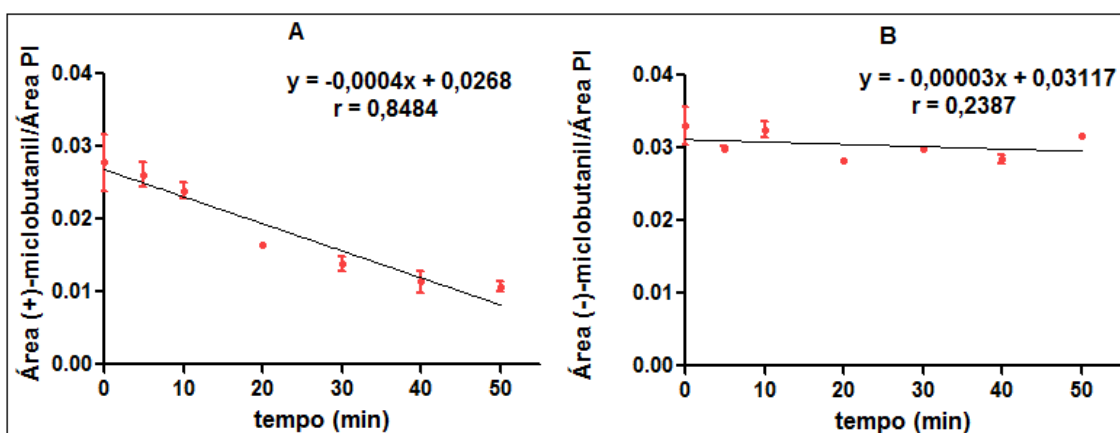


Figura 27. Avaliação da depleção do miclobutanil ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de incubação. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil.

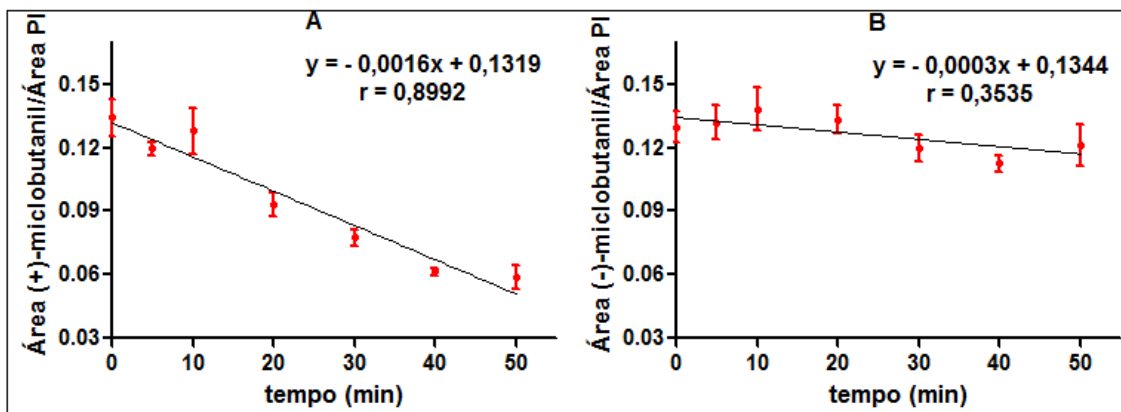
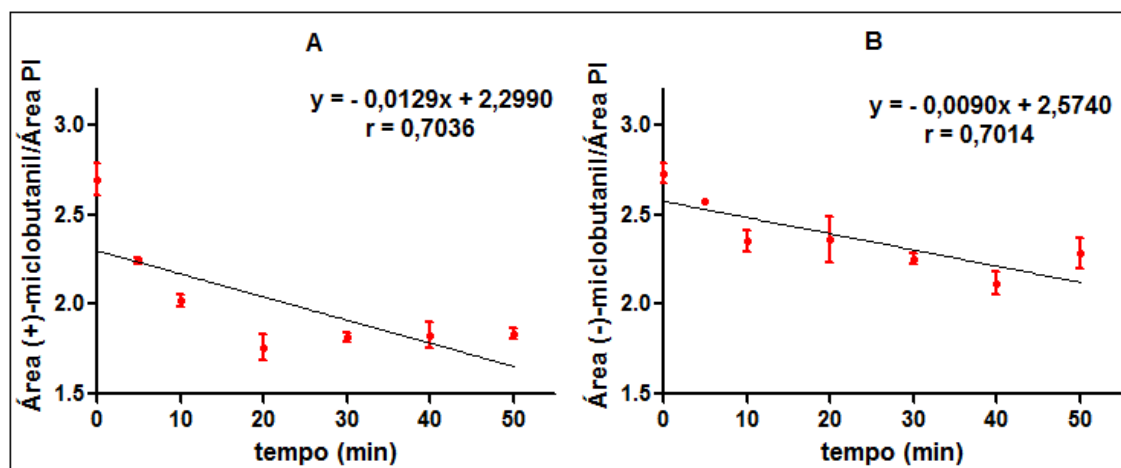


Figura 28. Avaliação da depleção do miclobutanil ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo de incubação. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil.



Através dos gráficos obtidos e apresentados nas Figuras acima, foi possível observar que para o (+)-miclobutanil, nas concentrações de $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a taxa de depleção foi mantida linear em toda faixa de tempo analisada (0-50 minutos). Por outro lado, na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, como pode ser observado na Figura 28, a linearidade é mantida até aproximadamente 20 minutos, com um valor de r para essa faixa de tempo (0-20 min) de 0,9231, valor esse melhor do que quando comparado ao apresentado no gráfico ($r = 0,7036$) que compreendeu todo o intervalo avaliado. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato da taxa de depleção ser baixa, indicando, como dito anteriormente, uma menor velocidade da reação enzimática nesta concentração ou ainda uma possível inibição em função do aumento concentração do

substrato. Além disso, foi possível verificar que o (-)-miclobutanil apresentou o mesmo comportamento observado no estudo prévio de metabolismo *in vitro* (item 4.8), confirmando uma preferência pela metabolização do enantiômero (+), uma vez que não é notada uma depleção significativa do (-)-miclobutanil em qualquer concentração avaliada. Portanto, considerando apenas o resultado para o (+)-miclobutanil, optou-se por trabalhar com o tempo de incubação de 50 minutos, visando uma redução da concentração proteica empregada, e conseqüentemente, um menor custo para a realização do estudo de metabolismo *in vitro* desse praguicida.

4.10.2 Concentração de Proteínas Microssomais

Após determinar o tempo de incubação a ser empregado no estudo cinético, realizou-se a otimização da concentração de proteínas microssomais para determinar a faixa em que a depleção do miclobutanil se mantém linear. Para tanto, avaliou-se as seguintes concentrações de proteínas: 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 e 0,50 mg mL⁻¹ (n=5) para as três concentrações de substrato, 0,10 µmol L⁻¹ (baixa), 1,0 µmol L⁻¹ (média) e 20 µmol L⁻¹ (alta). As amostras foram compostas de 5 µL do substrato, 40 µL de microssomas hepático de humanos e 105 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 + 0,25% de Cremophor EL[®] e pré-incubadas por 5 min. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do sistema de regeneração de NADPH e encerrada após 50 minutos pelo início do procedimento de preparo de amostra.

As amostras foram analisadas por LC-MS/MS e as Figuras abaixo apresentam os resultados obtidos para a concentração baixa, média e alta para ambos os enantiômeros.

Figura 29. Avaliação da depleção do miclobutanil ($0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função da concentração de proteínas microsossomais. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil

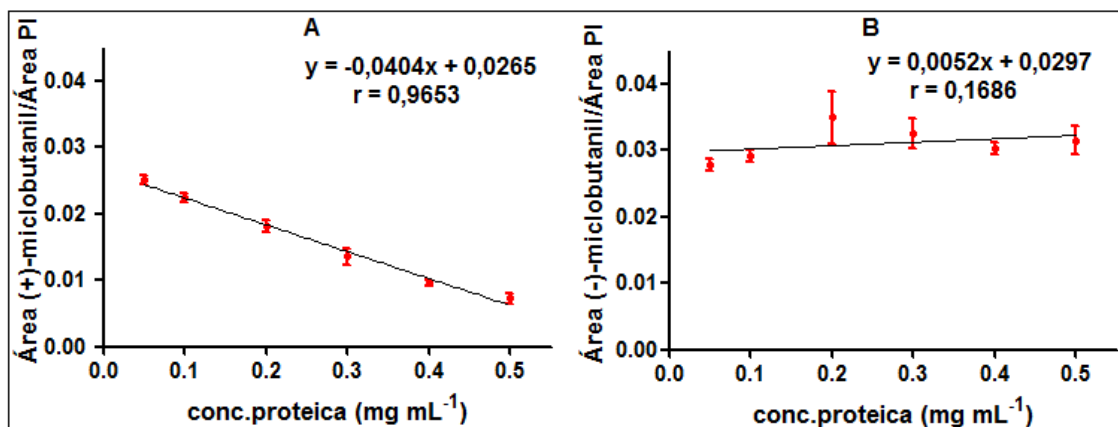


Figura 30. Avaliação da depleção do miclobutanil ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função da concentração de proteínas microsossomais. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil

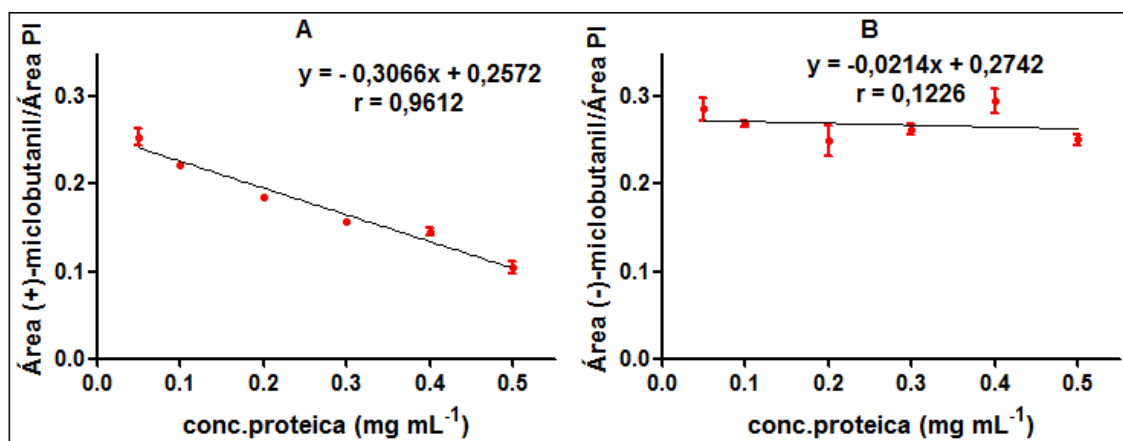
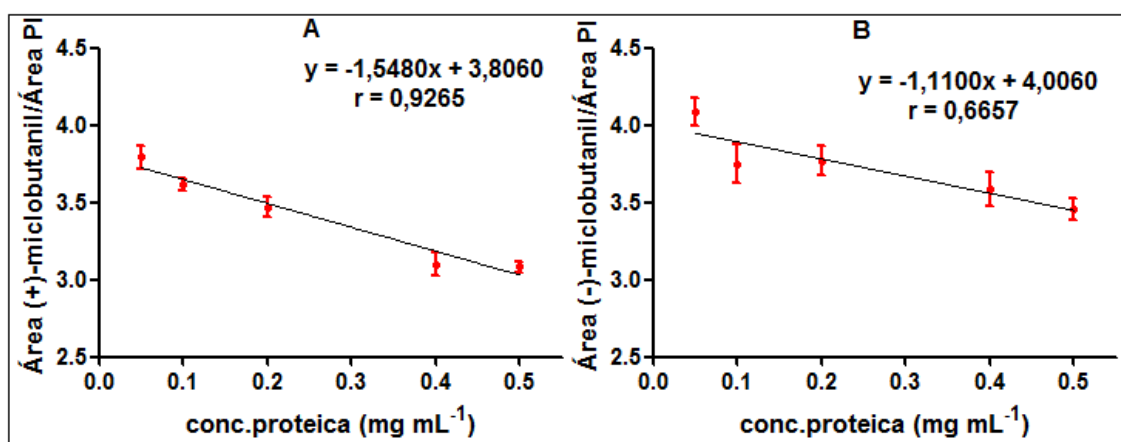


Figura 31. Avaliação da depleção do miclobutanil ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função da concentração de proteínas microsossomais. A-(+)-miclobutanil. B-(-)-miclobutanil.



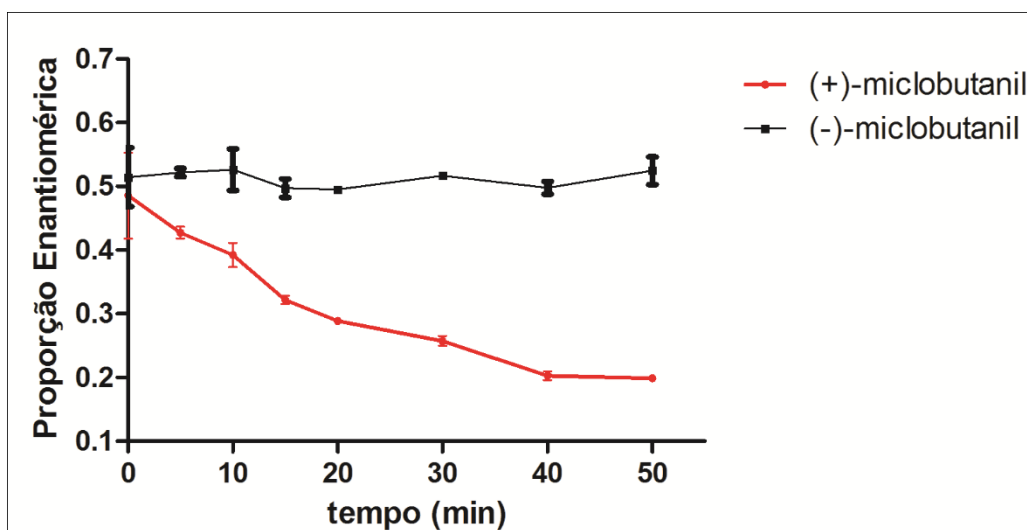
A partir das Figuras apresentadas acima, foi possível observar que para as três concentrações empregadas, a depleção de miclobutanil manteve-se linear em toda a faixa de concentração proteica estudada.

Assim, optou-se por empregar na realização dos estudos cinéticos a concentração proteica de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Nessa concentração de proteínas microsossomais, a depleção do substrato encontra-se dentro da faixa linear, assegurando-se assim que a velocidade da reação enzimática medida encontra-se em velocidade inicial (V_0). Além disso, nessa concentração há um apreciável consumo do substrato levando assim a uma melhor interpretação dos resultados obtidos.

4.11 Cinética Enzimática

Na determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos do metabolismo do miclobutanil pelas enzimas do CYP450 foram empregadas as condições de velocidade inicial otimizadas na pré-cinética (item 4.10), com tempo de incubação de 50 minutos e concentração proteica de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. A faixa de concentração de substrato empregada foi de $0,10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, tanto para o racemato, quanto para os enantiômeros isolados, (+)-miclobutanil e (-)-miclobutanil. Os resultados obtidos demonstraram o mesmo comportamento que já havia sido observado durante o estudo prévio de metabolismo in vitro (item 4.8) e durante a otimização das condições de velocidade inicial (item 4.10), uma vez que, quando o substrato empregado foi o racemato, ocorreu uma preferência pela metabolização do (+)-miclobutanil em relação ao (-)-miclobutanil, o que pode ser observado através do gráfico da proporção enantiomérica (Figura 32). Utilizando como substrato os enantiômeros individuais, não foi possível observar a metabolização do (-)-miclobutanil, sendo obtido apenas o perfil cinético para o (+)-miclobutanil (Figuras 33 e 34).

Figura 32. Proporção enantiomérica do miclobutanil em função do tempo de incubação.



O perfil cinético observado para o (+)-miclobutanil é melhor descrito pelo modelo matemático de Michaelis-Menten, o que pode ser observado através das Figuras 33A e 34A e confirmado pelo gráfico de Eadie-Hofstee (Figuras 33B e 34B), onde foi obtida uma reta o que caracteriza um perfil cinético michaeliano. Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m foram de $66,06 \pm 4,59 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $3,61 \pm 0,88 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, quando o substrato foi o racemato e de $305,50 \pm 18,39 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $6,85 \pm 1,29 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, quando o substrato foi o (+)-miclobutanil. Os parâmetros obtidos mostraram uma maior velocidade da reação e um maior valor de K_m , quando o substrato empregado foi o (+)-miclobutanil isolado em relação ao racemato, indicando uma possível inibição causada pelo (-)-miclobutanil.

Figura 33. (A) Cinética enzimática michaeliana do metabolismo do (+)-miclobutanil empregando o racemato como substrato. (B) Gráfico de Eadie-Hofstee.

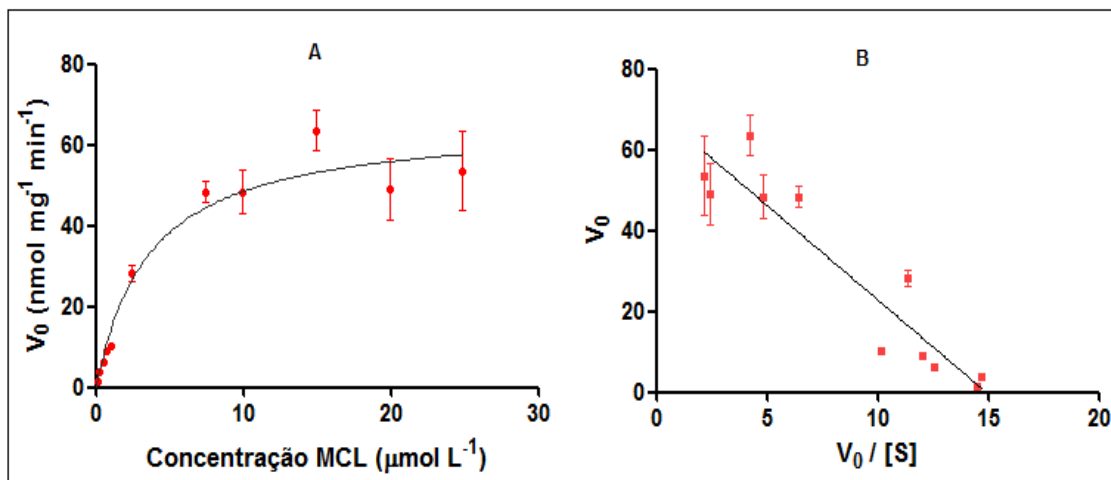
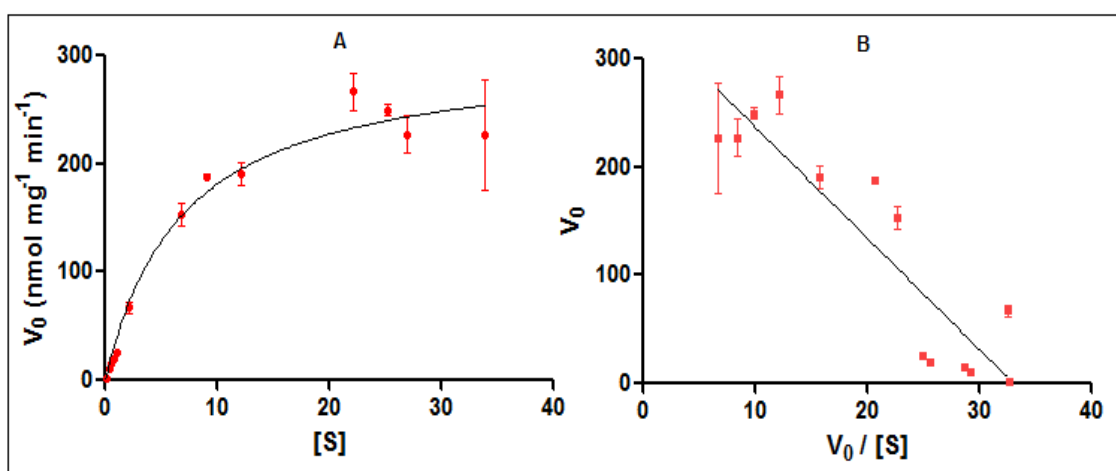


Figura 34. (A) Cinética enzimática michaeliana do metabolismo do (+)-miclobutanil empregando o enantiômero isolado como substrato. (B) Gráfico de Eadie-Hofstee.



Através dos parâmetros cinéticos enzimáticos obtidos é possível determinar o clearance intrínseco (CL_{int}) (Equação 3), que indica a capacidade do fígado em depurar um determinado xenobiótico (YAN et al., 2014). O CL_{int} obtido para o (+)-miclobutanil foi de 18,30 mL min⁻¹ mg⁻¹, utilizando o racemato como substrato e de 44,60 mL min⁻¹ mg⁻¹, utilizando como substrato o enantiômero (+).

Yan et al (2014), utilizando microssomas hepáticos de ratos, demonstraram um perfil cinético michaeliano para os enantiômeros do miclobutanil, empregando como substrato o racemato. Os valores obtidos de

$V_{\text{máx}}$ e de K_m foram de $2405,53 \pm 205,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $16,88 \pm 3,64 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e CL_{int} de $142,51 \text{ mL min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para o (+)-miclobutanil. Para o (-)-miclobutanil os valores obtidos de $V_{\text{máx}}$ e de K_m foram de $696,69 \pm 64,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $11,79 \pm 3,24 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e CL_{int} de $59,09 \text{ mL min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. A diferença entre os parâmetros obtidos utilizando os dois modelos distintos sugere uma maior exposição aos enantiômeros do praguicida em humanos, porém essa comparação é limitada, devido as diferenças no conteúdo das isoformas em humanos e animais (MARTIGNONI; GROOTHUIS; DE KANTER, 2006).

4.12 Correlação in Vitro-in Vivo e Predição dos Parâmetros Toxicocinéticos in vivo

Para a predição dos parâmetros toxicocinéticos in vivo, a fração de miclobutanil não ligada as proteínas microssomais foi determinada empregando a mesma concentração proteica utilizada nos estudos de metabolismo in vitro do praguicida, $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; enquanto que a fração não ligada as proteínas plasmáticas foi realizada na concentração de 42 mg mL^{-1} , equivalente a concentração média presente no corpo humano (DAVIES; MORRIS, 1993). O estudo foi realizado empregando tanto o racemato, quanto os enantiômeros isolados do miclobutanil. A fração não ligada do (+)-miclobutanil as proteínas microssomais (f_{Umic}) foi de 0,73 e ao plasma (f_{Up}) foi de 0,17 quando o substrato foi o racemato. Para o (+)-miclobutanil isolado a f_{Umic} foi de 0,83 e a f_{Up} de 0,18. A fração não ligada do (-)-miclobutanil ao meio microssomal (f_{Umic}) foi de 0,66 e ao plasma (f_{Up}) foi de 0,10, quando o substrato foi o racemato. Para o (-)-miclobutanil isolado a f_{Umic} foi de 0,90 e a f_{Up} de 0,12.

A ligação não específica as proteínas microssomais e plasmáticas deve ser considerada na extrapolação dos resultados obtidos in vitro (CHANG et al., 2010). Assim, a partir dos valores de clearance intrínseco e da fração não ligada as proteínas, é possível determinar o clearance hepático (CL_H) e a taxa de extração hepática (E) do (+)-miclobutanil (Tabela 26), através das Equações 10 e 11. Não foi possível realizar a extrapolação dos parâmetros para o (-)-miclobutanil, uma vez que este não foi metabolizado pelas enzimas do CYP450 nas condições estudadas, não sendo possível visualizar o perfil cinético e, portanto, determinar os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m .

$$CL_H = \frac{Q \times \frac{f_{up}}{f_{umic}} \times CL_{int}}{Q + \left(\frac{f_{up}}{f_{umic}}\right) \times CL_{int}} \quad \text{Equação 10}$$

$$E = \frac{(f_{up} \times CL_{int})}{Q + (f_{up} \times CL_{int})} \quad \text{Equação 11}$$

Onde, Q indica o fluxo sanguíneo hepático, equivalente a 20 mL min⁻¹ kg⁻¹. CL_H ao clearance hepático; f_{up} a fração não ligada ao plasma; f_{umic} a fração não ligada as proteínas microssomais; CL_{int} ao clearance intrínseco; E a taxa de extração hepática.

Tabela 26. Predição dos parâmetros toxicocinéticos in vivo

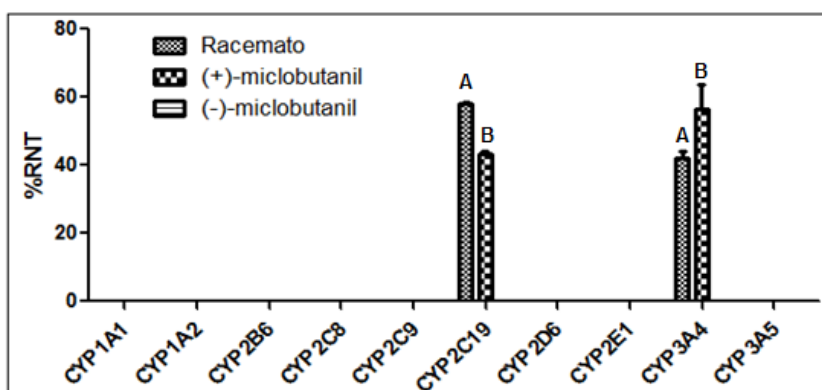
(+)-miclobutanil	Clearance Hepático (mL min⁻¹ kg⁻¹)	Taxa de Extração Hepática (mL min⁻¹ kg⁻¹)
Racemato	19,99	0,99
Enantiômero isolado	19,99	0,99

Os valores de clearance hepático obtidos para o (+)-miclobutanil indicam que esse agroquímico pode ser prioritariamente eliminado do corpo pelo fígado, uma vez que estes foram próximos de 20 mL min⁻¹ kg⁻¹, valor equivalente ao fluxo sanguíneo hepático. Além disso, os valores obtidos para a taxa de extração hepática, próximos de 1, indicam que o miclobutanil poderá sofrer o efeito de primeira passagem pelo fígado, portanto, caso o praguicida seja ingerido, sua concentração será diminuída significativamente antes de atingir a circulação sistêmica. Esse fenômeno já foi relatado para o agroquímico fenamifós (DE ALBUQUERQUE; DE MATOS; DE OLIVEIRA, 2016). Além disso, apesar de ter sido observado valores de CL_{int} diferentes entre o racemato e o (+)-MLC, a predição do CL_H e do E mostraram valores similares, indicando assim uma possível ausência de enantiosseletividade no processo.

4.13 Determinação das enzimas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do miclobutanil (fenotipagem)

A fim de determinar quais isoformas do CYP450 atuam no metabolismo dos enantiômeros do miclobutanil, foi realizado um estudo de fenotipagem, empregando as isoformas recombinantes do CYP, Superssomas[®]. As isoformas estudadas foram: CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 E CYP2E1, uma vez que estas são as principais enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos (OGILVIE et al., 2008). A concentração de miclobutanil empregada nesse estudo foi mantida abaixo do valor de K_m e tanto o racemato quanto os enantiômeros individuais foram utilizados como substrato. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 35.

Figura 35. Determinação das isoformas envolvidas no metabolismo do rac-, (+)- e (-)-miclobutanil. (A) (+)-miclobutanil empregando o racemato como substrato. (B) (+)-miclobutanil empregando o enantiômero isolado como substrato.



A partir dos resultados obtidos, é possível constatar que as isoformas envolvidas no metabolismo do rac- e (+)-miclobutanil são a CYP2C19 e CYP3A4. Para o cálculo da RN das isoformas que atuam no metabolismo do miclobutanil foram consideradas as concentrações destas presente no fígado humano, sendo a da CYP2C19 de 19 pmol CYP/mg e da CYP3A4 de 108 pmol CYP/mg (RODRIGUES, 1999). Já havia sido constatado que a isoforma CYP3A4 é a principal enzima responsável pelo metabolismo do trans-bromuconazol, um fungicida da família dos triazóis, como é o caso do miclobutanil (MAZUR et al., 2007), e que a CYP2C19 atua no metabolismo de diferentes praguicidas como deltametrina e esfenvalerato (GODIN et al, 2007). Como já havia sido observado

anteriormente, o (-)-miclobutanil não foi metabolizado pelas enzimas do CYP450. Além disso, foi possível observar também que, quando o substrato empregado foi o racemato ocorre uma maior contribuição da CYP2C19 para o metabolismo do (+)-miclobutanil, enquanto que quando o substrato é o enantiômero isolado (+)-miclobutanil a contribuição da CYP3A4 no metabolismo desse enantiômero é maior, o que pode ser justificado por uma possível inibição desta isoforma pelo (-)-miclobutanil presente no racemato.

4.14 Estudos de inibição enzimática do CYP450

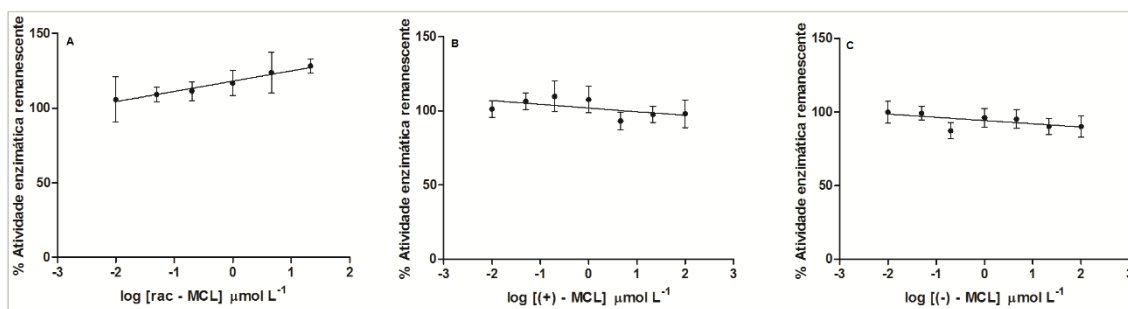
O potencial de inibição do miclobutanil nas enzimas do CYP450 foi avaliado através da determinação do IC_{50} , que corresponde a concentração do praguicida responsável pela inibição de 50% da atividade enzimática. A determinação do IC_{50} é importante, uma vez que indica quais enzimas são potencialmente inibidas pelo praguicida e ainda, qual a concentração de substrato que deve ser empregada nos estudos de mecanismo de inibição (OLGIVIE et. al., 2008). Se o valor de IC_{50} obtido para o composto estudado for menor que $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, este é considerado um inibidor forte da enzima. Valores de IC_{50} entre 10 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, correspondem a inibidores moderados e valores de IC_{50} maiores que $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ equivalem a um inibidor fraco (SPPAGIARI et. al., 2014).

As isoformas do CYP450 para as quais foi avaliado o efeito de inibição do miclobutanil foram: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4/5. As condições de incubação empregadas foram previamente determinadas por Habenschus et. al. (2017). As análises foram realizadas empregando tanto o racemato, quanto os enantiômeros, (+)-miclobutanil e (-)-miclobutanil isolados, em sete concentrações distintas: 10 nmol L^{-1} , 50 nmol L^{-1} , 200 nmol L^{-1} , $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $21,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

➤ CYP1A2

O IC₅₀ do miclobutanil para a avaliação do CYP1A2 foi determinado utilizando como marcador a reação de O-deetilação da fenacetina, sendo monitorada a formação do metabólito acetaminofeno. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 36.

Figura 36. Determinação do IC₅₀ do miclobutanil frente a CYP1A2. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (-)-miclobutanil.

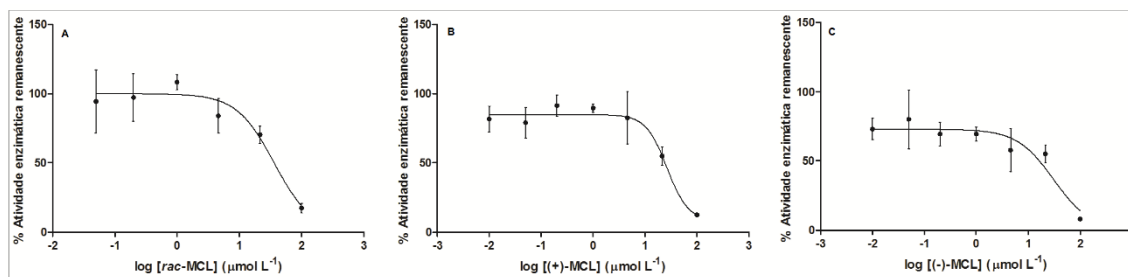


Como pode ser observado na Figura 36, o miclobutanil não apresentou efeito de inibição sobre a CYP1A2 até a concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, uma vez que a porcentagem de atividade enzimática remanescente permaneceu constante e próxima a 100% em toda faixa de concentração estudada.

➤ CYP2C9

A reação de 4'-hidroxilação do diclofenaco foi utilizada como marcador na determinação do IC₅₀ do miclobutanil para a avaliação da CYP2C9, monitorando a formação do metabólito 4'-hidroxiclofenaco. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 37.

Figura 37. Determinação do IC₅₀ do miclobutanil frente a CYP2C9. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (-)-miclobutanil.

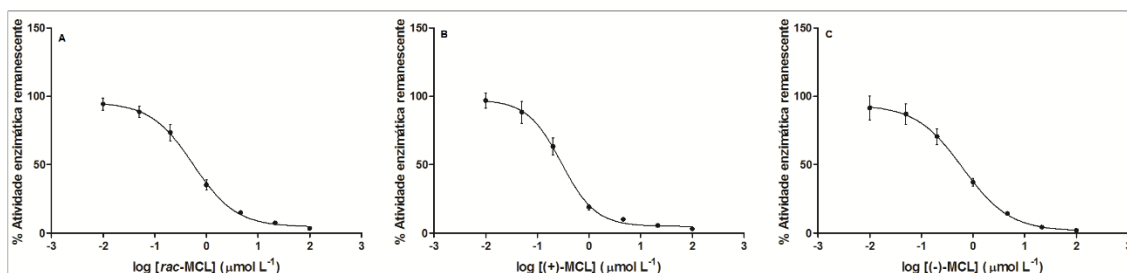


Como pode ser observado na Figura 37, o miclobutanil apresentou um efeito de inibição moderado sobre a CYP2C9, com valores de IC_{50} de $36,35 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o racemato, $26,49 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o (+)-miclobutanil e $31,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o (-)-miclobutanil. Contudo, não foi observado enantiosseletividade no processo, considerando que todos os inibidores (rac-; (+)- e (-)-miclobutanil) apresentaram valores de IC_{50} próximos.

➤ CYP2C19

Na Figura 38 são apresentados os resultados de IC_{50} do miclobutanil para a avaliação da CYP2C19, que foram determinados utilizando como marcador a reação de 4'-hidroxilação da S-mefenitoína. O metabólito monitorado foi a 4'-hidroximefenitoína.

Figura 38. Determinação do IC_{50} do miclobutanil frente a CYP2C19. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (-)-miclobutanil.

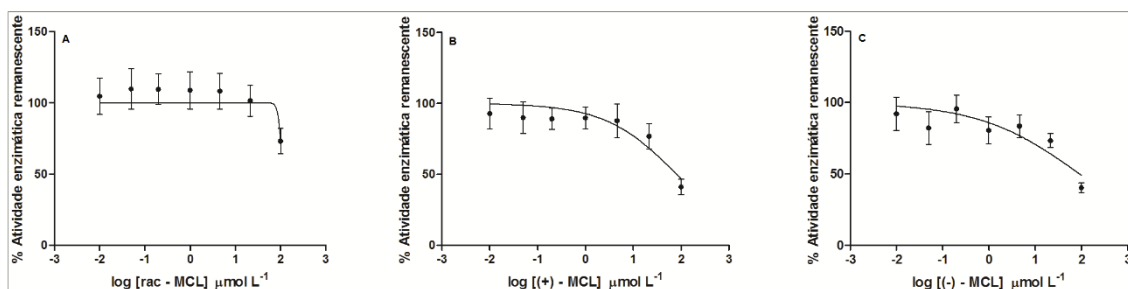


O miclobutanil apresentou um efeito forte de inibição sobre a CYP2C19 (Figura 38), com valores de IC_{50} de $0,56 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o racemato, $0,29 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o (+)-miclobutanil e $0,63 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o (-)-miclobutanil. Valores de IC_{50} inferiores a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram obtidos, tanto para o racemato quanto para os enantiômeros isolados. A inibição causada a CYP2C19 por praguicidas já havia sido observada anteriormente, onde os inseticidas organofosforados, fenitrotiona, fentoato, profenofós e clorpirifós, inibiram de 51% a 72% a atividade dessa isoforma (ABASS; TURPEINEN; PELKONEN, 2009). O efeito de inibição causado pelo miclobutanil na CYP2C19, parecem não ser enantiosseletivo, uma vez que os valores obtidos de IC_{50} para o racemato e para os enantiômeros isolados foram próximos.

➤ CYP2D6

Para a CYP2D6 a reação utilizada como marcador foi a 1-hidroxilação do bufuralol com a formação do metabólito 1-hidroxibufuralol. Na Figura 39 são apresentados os resultados obtidos.

Figura 39. Determinação do IC₅₀ do miclobutanil frente a CYP2D6. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (-)-miclobutanil.

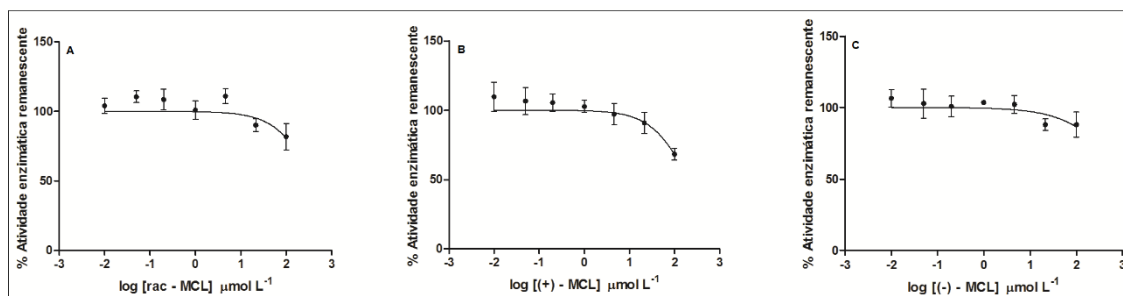


Os valores de IC₅₀ do miclobutanil foram maiores que 100 μmol L⁻¹ para o racemato, 81,03 μmol L⁻¹ para o (+)-miclobutanil e 91,04 μmol L⁻¹ para o (-)-miclobutanil. Assim, é possível observar que o racemato é um inibidor fraco da CYP2D6 (IC₅₀ > 100 μmol L⁻¹) enquanto que os enantiômeros isolados são inibidores moderado-fracos dessa isoforma, com valores de IC₅₀ próximos a 100 μmol L⁻¹. Apesar da diferença entre o potencial de inibição que foi observado para o racemato e para os enantiômeros isolados, os valores obtidos para o IC₅₀ foram próximos, não evidenciando um possível efeito enantiosseletivo nesse processo.

➤ CYP2E1

A formação do metabólito 6'-hidroxiclorzoxazona a partir da clorzoxazona foi utilizada como marcador na determinação do IC₅₀ do miclobutanil para a CYP2E1 (Figura 40).

Figura 40. Determinação do IC₅₀ do miclobutanil frente a CYP2E1. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (-)-miclobutanil.



Os valores de IC₅₀ do miclobutanil foram maiores que 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ tanto para o racemato, quanto para os enantiômeros, (+)-miclobutanil e (-)-miclobutanil isolados, sendo portanto, um inibidor fraco da CYP2E1.

➤ CYP3A4/5

O IC₅₀ do miclobutanil para a CYP3A4/5 foi determinado utilizando como marcador duas reações distintas: a reação de 1-hidroxilação do midazolam, gerando o metabólito 1'-hidroximidazolam (Figura 41) e a reação de oxidação da nifedipina, formando o metabólito deidronifedipina (Figura 42). As enzimas CYP3A4/5 são responsáveis pela metabolização de diversos compostos de diferentes classes, com isso, o FDA recomenda a utilização de dois substratos estruturalmente distintos para avaliar a inibição de um determinado composto sobre essas enzimas (SPPAGIARI et. al., 2014).

Figura 41. Determinação do IC₅₀ do miclobutanil frente a CYP3A4/5 usando o midazolam como substrato. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (-)-miclobutanil.

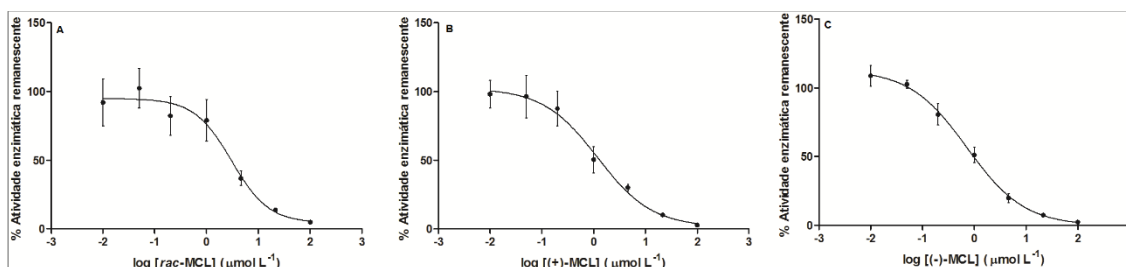
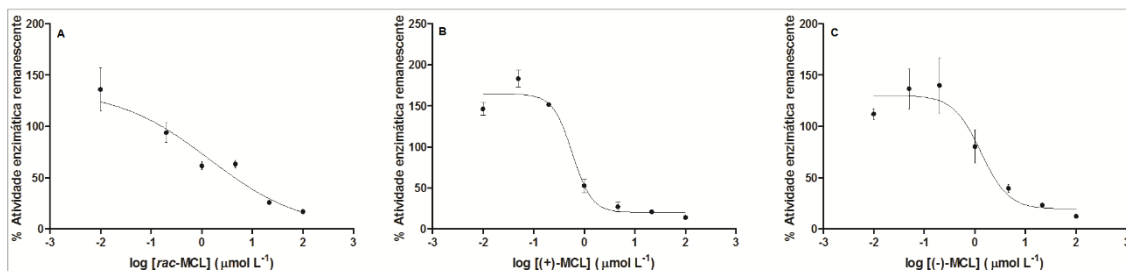


Figura 42. Determinação do IC₅₀ do miclobutanil frente a CYP3A4/5 usando a nifedipina como substrato. (A) racemato; (B) (+)-miclobutanil; (C) (-)-miclobutanil.



Como pode ser observado nas Figuras 41 e 42 o miclobutanil apresentou efeito de inibição na atividade CYP3A4/5. Utilizando o midazolam como substrato, os valores de IC₅₀ obtidos foram: 1,42 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o racemato, 0,58 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o (+)-miclobutanil e 1,31 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o (-)-miclobutanil. Já, utilizando como substrato, a nifedipina, os valores de IC₅₀ obtidos foram equivalentes a 3,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o racemato, 1,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o (+)-miclobutanil e 0,72 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o (-)-miclobutanil. Os valores de IC₅₀ observados tanto para o racemato quanto para os enantiômeros isolados, para os dois marcadores distintos, midazolam e nifedipina, foram inferiores a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, portanto o miclobutanil é um inibidor forte da CYP3A4/5. Os resultados obtidos para o racemato e para os enantiômeros individuais, foram próximos, e portanto, parece não haver enantiosseletividade no efeito inibitório do miclobutanil sobre a CYP3A4/5, para ambos marcadores. A inibição causada por fungicidas da família dos triazóis, como é o caso do miclobutanil, já havia sido observada anteriormente, para difenoconazol, que apresentou um valor de IC₅₀ equivalente a 0,41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a CYP3A4/5 (LV, et. al., 2017).

Na Tabela 27 estão sumarizados os valores obtidos de IC₅₀ do miclobutanil para cada uma das isoformas do CYP450 avaliadas nesse projeto.

Tabela 27. Valores de IC50 do miclobutanil frente as enzimas do CYP450

Isoformas do CYP450	rac-MCL ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(+)-MCL ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(-)-MCL ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
CYP1A2	_*	_*	_*
CYP2C9	36,35 \pm 1,16	26,49 \pm 1,57	31,04 \pm 1,28
CYP2C19	0,56 \pm 1,08	0,29 \pm 1,08	0,63 \pm 1,28
CYP2D6	> 100	81,03 \pm 1,33	91,04 \pm 1,12
CYP2E1	> 100	> 100	> 100
CYP3A4/5 nifedipina	1,42 \pm 1,30	0,58 \pm 1,18	1,31 \pm 1,31
CYP3A4/3A5 midazolam	3,04 \pm 1,27	1,19 \pm 1,25	0,72 \pm 1,13

* Sem inibição significativa até 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Como foi possível observar pelos resultados obtidos, o miclobutanil mostrou-se como um inibidor forte para a CYP2C19 e para a CYP3A4/5, duas isoformas bem significativas do ponto de vista de metabolização de fármacos (CLARKE; JONES, 2008). A CYP3A4/5 é responsável por catalisar a reação de metabolismo de uma grande variedade de compostos de diferentes classes e para muitos outros compostos as reações catalisadas pela CYP3A4/5 são mecanismos secundários de eliminação (CLARKE; JONES, 2008). Enquanto que a CYP2C19 atua no metabolismo do omeprazol e do diazepam (CLARKE; JONES, 2008), fármacos que são amplamente utilizados. Assim, o uso dessas substâncias, combinado com uma exposição ao praguicida, pode resultar em interações fármaco-praguicida, aumentando a concentração dos medicamentos, que são prioritariamente metabolizados por esses grupos de enzimas, no organismo humano. Além disso, através do estudo de fenotipagem (item 4.13), foi possível constatar que as isoformas CYP2C19 e CYP3A4, que foram fortemente inibidas, são também as isoformas responsáveis pelo metabolismo do praguicida, o que sugere uma possível inibição competitiva, porém estudos para determinar o mecanismo de inibição são necessários para confirmar o tipo de inibição envolvida. A Tabela 28 apresenta alguns fármacos que podem ter sua farmacocinética alterada na presença do miclobutanil pois são substratos altamente sensíveis a inibição da CYP2C19 e CYP3A4.

Tabela 28. Alguns fármacos sensíveis a inibição das CYP3A4 e CYP2C19. (Adaptado de: Straight Healthcare, 2018).

CYP2C19	CYP3A4
Carisoprodol, Citalopram, Clobazam, Diazepam, Lansoprazol, Omeprazol, Fenitoína	Albendazol, Alprazolam, Amlodipina, Budesonida, Buprenorfina, Butorfanol, Buspirona, Clindamicina, Clonazepam, Ciclofosfamida, Ciclosporina, Diazepam

A inibição sobre a CYP2C9, causada tanto pelo racemato quanto pelos enantiômeros isolados do miclobutanil, e da CYP2D6 provocada pelos enantiômeros isolados, foi moderada, com valores de IC_{50} entre 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com isso a probabilidade de que ocorram interações fármaco-praguicida com fármacos metabolizados por essas enzimas é reduzida. Enquanto que para a CYP2E1, o miclobutanil é um inibidor fraco e para a CYP1A2 não foi observada inibição significativa, não correndo risco, portanto, de que interações fármaco-praguicida sejam observadas.

Além disso, os resultados obtidos para a mistura racêmica e para os enantiômeros, (+)-miclobutanil e (-)-miclobutanil, separadamente, foram próximos, não sendo observadas, portanto, diferenças enantiosseletivas.

5 CONCLUSÃO

A realização dos estudos enantiosseletivos *in vitro* do miclobutanil permitiu avaliar, pela primeira vez o metabolismo, tanto da mistura racêmica quanto dos enantiômeros individuais do praguicida, frente as enzimas do CYP450 presentes em microsomas hepáticos de humanos. Para isso, um método enantiosseletivo, que permitiu a separação e quantificação dos enantiômeros, foi desenvolvido e validado, empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.

Os estudos demonstraram diferenças enantiosseletivas no metabolismo desse agroquímico, uma vez que o (-)-miclobutanil não foi metabolizado pelas enzimas do CYP450, não sendo possível obter seu perfil cinético. Além disso, a correlação *in vitro-in vivo* demonstrou que o fígado parece ser o principal órgão responsável pela eliminação do praguicida e que as isoenzimas CYP2C19 e CYP3A4 estão envolvidas nesse processo.

Os ensaios de inibição demonstraram que o praguicida apresenta um forte efeito de inibição sobre essas mesmas enzimas (CYP2C19 e CYP3A), o que indica uma possível inibição competitiva; porém estudos para determinação do mecanismo de inibição devem ser realizados. A forte inibição causada pelo miclobutanil nas enzimas CYP2C19 e CYP3A, pode resultar em interações praguicida-fármaco, levando a um aumento da concentração dos fármacos no organismo podendo então causar efeitos tóxicos.

REFERÊNCIAS

ABASS, K., PELKONEN, O. The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: Comparison of the N-in-one and single substrate approaches. **Toxicology in Vitro**, v.27 p.1584-1588, 2012.

ABASS, K., TURPEINEN, M., PELKONEN, O. An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.44, p.553-563, 2009.

ABRASCO. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**, 2015. Disponível em: <https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wpcontent/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf>. Acessado em: 08 de janeiro de 2018.

AKTAR, W., SENGUPTA, D., CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v.2, p.1-12, 2009.

ALMEIDA, A. M., CASTEL-BRANCO, M. M., FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatographic B**, v.774, n.2, p.215-222, 2002.

ANDERSSON, M. E., ASLAN, D., CLARKE, A., ROERAADE, J., HAGMAN, G. Evaluation of generic chiral liquid chromatography screens for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1005, p.83-101, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública nº 62 de 9 de setembro de 2011. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B27714-1-0%5D.PDF>>. Acessado em 21 de março de 2017.

ARGIKAR, U.A., LIANG, G., BUSHEE, J.L., HOSAGRAHARA, V.P., LEE, W. Evaluation of Pharmaceutical Excipients as Cosolvents in 4-Methyl Umbelliferone Glucuronidation in Human Liver Microsomes: Applications for Compounds with Low Solubility. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.26, p.102-106, 2011.

ASHA, S., VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs – A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.1699-1722, 2010.

BRAIBANTE, M. E. F., ZAPPE, J. A. A. Química dos Agrotóxicos.321 **Química Nova na Escola**, v.34, n.1, p.10-15, 2012.

CHANG, G., STEYN, S. J., UMLAND, J. P., SCOTT, D. O. Strategic Use of Plasma and Microsome Binding To Exploit in Vitro Clearance in Early Drug Discovery. **ACS Medical Chemistry Letters**, v.1, p.50-53, 2010.

CHEN, L., LI, R., DIAO, J., TIAN, Z., DI, S., ZHANG, W., CHENG, C., ZHOU, Z. Tissue distribution and toxicity effects of myclobutanil enantiomers in lizards (*Eremias argus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.145, p.623-629, 2017.

CHENG, C., DI, S., CHEN, L., ZHANG, W., DIAO, J., ZHOU, Z. Enantioselective Bioaccumulation, Tissue Distribution, and Toxic Effects of Myclobutanil Enantiomers in *Pelophylax nigromaculatus* Tadpole. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, p.3096-3102, 2017.

CHENG, C., HUANG, L., DIAO, J., ZHOU, Z. Enantioselective Toxic Effects and Degradation of Myclobutanil Enantiomers in *Scenedesmus obliquus*. **Chirality**, v.25, p.858-864, 2013.

CHEVRIER, C., WAREMBOURG, C., GAUDREAU, E., MONFORT, C., LE BLANC, A., GULDNER, L., CORDIER, S. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, seafood consumption, and timeto-pregnancy. **Epidemiology**, v.24, p.251-260, 2013.

CHIBA, M., ISHII, Y., SUGIYAMA, T. Prediction of Hepatic Clearance in Human from In Vitro Data for Successful Drug Development. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v.11, p.262-276, 2009.

CLARKE, S. E.; JONES, B. C. Human Cytochromes P450 and Their Role in Metabolism-Based Drug-Drug Interactions. In: RODRIGUES, A. D. **Drug- Drug Interactions**. 2^a. ed. Informa Healthcare, v. 179, 2008. Cap. 3, p. 53- 85.

COLEMAN, M. D. **Human Drug Metabolism: An Introduction**. 2^a. Ed. John Wiley & Sons, 2005.

DAMRE, A. A., IYER, K. R. The significance and determination of plasma protein binding. In: **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interations**, LYUBIMOV, A. V. Editor. John Wiley & Sons, p.1-18, 2012.

DAVIES, B.; MORRIS, T. Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. **Pharmaceutical Research**, v.10, n^o.7, 1993.

DE ALBUQUERQUE, N. C. P., CARRÃO, D. B., HABENSCHUS, M. D., DE OLIVEIRA, A. R. M. Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.147, p.89-109, 2018.

DE ALBUQUERQUE, N. C. P.; DE MATOS, J. V.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; In-line coupling of an achiral-chiral column to investigate the enantioselective in vitro metabolism of the pesticide Fenamiphos by human liver microsome. **Journal of Chromatography A**, v.1467, p.326-334, 2016.

DENG, Z., HU, J. Bioactivity investigation of fungicide myclobutanil enantiomers. **Agrochemicals**, v.50, p.371-373, 2011.

DONG, F., CHENG, L., LIU, X., XU, J., LI, J., LI, Y., KONG, Z., JIAN, Q., ZHENG, Y. Enantioselective Analysis of Triazole Fungicide Myclobutanil in Cucumber and Soil under Different Application Modes by Chiral Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.1929-1936, 2012.

EMA – EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on bioanalytical method validation, 21 de julho de 2011. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 14 de abril de 2017.

EVANGELOU, E., NTRITSOS, G., CHONDROGIORGI, M., KAVVOURA, F. K., HERNANDEZ, A. F., NTZANI, E. E., TZOULAKI, I. Exposure to pesticides and diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Environmental International**, v.91, p.60-68, 2016.

GARRISON, A. W. An Introduction to pesticide chirality and the consequence of stereoselectivity, in: GARRISON, A. W., GAN, J., LIU, W (Eds). **Chiral Pesticides: Stereoselectivity and Its Consequence**. American Society, p.1-7, 2011.

GIBSON, G. G., SKETT, P. **Introduction to Drug Metabolism**. 3^a. Ed. Nelson Thornes Published, 2001.

GODIN, S. J., CROW, J. A., SCOLLON, E. J., HUGHES, M. F., DEVITO, M. J., ROSS, M. K.; Identification of rat and human cytochrome P450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroid insecticides Deltamethrin and Esfenvalerate. **Drug Metabolism and Disposition**, v.35, n.9, p.1664-1671, 2007.

GONG, X. Y., KUBÁN, P., TANYANYIWA, J., HAUSER, P. C. Separation of enantiomers in capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v.1082, p.230-234, 2005.

HABENSCHUS, M.D., MOREIRA, F.L., LOPES, N.P., DE OLIVEIRA, A.R.M. In Vitro Inhibition of Human CYP450s 1A2, 2C9, 3A4/5, 2D6 and 2E1 by Grandisin. **Planta Medica**, v.83, p.727-736, 2017.

HAYDEN, K. M., NORTON, M. C., DARCEY, D., OSTBYE, T., ZANDI, P. P., BREITNER, J. C., WELSH-BOHMER, K. A. Occupational exposure to pesticides the risk of incident AD: the cache county study. **Neurology**, v.74, p.1524-1530, 2010.

HENDERSON, M. A., MCINDOE, J. S. Ionic liquids enable electrospray ionisation mass spectrometry in hexane. **Chemical Communications**, v.27, p.2872-2874, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistêmico da produção agrícola**, 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?&t=resultados>>. Acessado em: 08 de janeiro de 2018.

KANG, J., WISTUBA, D., SCHURIG, V. Recent progress in enantiomeric separation by capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v.23, p.4005-4021, 2002.

KEIFER, M. C., FIRESTONE, J. Neurotoxicity of pesticides. **Journal of Agromedicine**, v.12, p.17-25, 2007.

KORZEKWA, K. R. In Vitro Enzymes Kinetics Applied to Drug-Metabolizing Enzymes, cap.2. In: **Drug-Drug Interactions**, RODRIGUES, A. D. Editor. Informa Healthcare, 2008.

LI, Y., DONG, F., LIU, X., XU, J., HAN, Y., ZHENG, Y. Enantioselectivity in tebuconazole and myclobutanil non-target toxicity and degradation in soils. **Chemosphere**, v.122, p.145-153, 2015.

LV, X., PAN, L., WANG, J., LU, L., YAN, W., ZHU, Y., XU, Y., GUO, M., ZHUANG, S. Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity. **Environmental Pollution**, v.222, p.504-512, 2017.

MARTIGNONI, M., GROOTHUIS, G. M. M., DE KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v.2, p.875-894, 2006.

MARTIN, P., GIARDIELLO, M., MCDONALD, T. O., RANNARD, S. P., OWEN, A. Mediation of in Vitro Cytochrome P450 Activity by Common Pharmaceutical Excipients. **Molecular Pharmaceutics**, v.10, p.2739-2748, 2013.

MATTHIJS, N., MAFTOUH, M., HEYDEN, Y. V. Chiral separation strategy in polar organic solvent chromatography and performance comparison with normal-phase liquid and supercritical-fluid chromatography. **Journal of Separation Science**, v.29, p.1353-1362, 2006a.

MATTHIJS, N., MAFTOUH, M., HEYDEN, Y. V. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar organic solvent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1111, p.48-61, 2006b.

MAZUR, C. S., KENNEKE, J. F., TEBES-STEVENSON, C., OKINO, M. S., LIPSCOMB, J. C. In vitro metabolism of the fungicide and environmental contaminant trans-bromuconazole and implications for risk assessment. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v.70, p.1241-1250, 2007.

MMA. Ministerio do Meio Ambiente. **Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acessado em: 08 de janeiro de 2018.

MULHOLLAND, A.J., MCGEAGH, J.D., RANAGHAN, K.E. Protein dynamics and enzyme catalysis: Insights from simulations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, p. 1077, 2011.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger**. 3^a. ed. [S.l.]: W.H. Feeman and Company, 2002.

OGILVIE, B. W., USUKI, E., YERINO, P., PARKINSON, A. In Vitro Approaches for Studying the Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes and Identifying the Drug-Metabolizing Enzymes Responsible for the Metabolism of Drugs (Reaction Phenotyping) with Emphasis on Cytochrome P450, cap.7. In: **Drug-Drug Interactions**, RODRIGUES, A. D. Editor. Informa Healthcare, 2008.

PELKONEN, O., MAEENPAEA, J., TAAVITSAINEN, P., RAUTIO, A., RAUNIO, H. inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. **Xenobiotica**, v.28, p.1203-1253, 2008.

PÉREZ-FERNANDEZ, V., GARCÍA, M. A., MARINA, M. L. Chiral separation of agricultural fungicides. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.6561-6582, 2011.

PERRIN, C., VU, V.A., MATTHIJS, N., MAFTOUH, M., MASSART, D.L., HEYDEN, Y. V. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part I. Normal-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.947, p.69-83, 2002.

QIU, J., WANG, Q., ZHU, W., JIA, G., WANG, X., ZHOU, Z. Stereoselective Determination of Benalaxyl in Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Application to Pharmacokinetic Studies in Rabbits. **Chirality**, v.19, p.51-55, 2007.

RANDALL, K., CHENG, S. W., KOTCHEVAR, A. T. Evaluation of surfactants as solubilizing agents in microsomal metabolism reactions with lipophilic substrates. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, Columbia, v. 47, n. 9, p. 631–639, 2011.

RAUNIO, H., KUUSISTO, M., JUVONEN, R. O., PENTIKAINEN, O. T. Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. **Frontiers in Pharmacology**, v.8, p.123, 2015.

RIBEIRO, A. R., SANTOS, L. H. M. L. M., MAIA, A. S., DELERUE-MATOS, C., CASTRO, P. M. L., TIRITANA, M. W. Enantiomeric fraction evaluation of pharmaceuticals in environmental matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1363, p.226-235, 2014.

RODRIGUES, A. D. Integrated Cytochrome P450 Reaction Phenotyping. **Biochemical Pharmacology**, v.57, p.465-480, 1999.

ROSSI, M. O “alarmante” uso de agrotóxicos no Brasil atinge 70% dos alimentos. **EL PAÍS**, 30 de abril de 2015.

SANTOS FERREIRA, R. K., SOUZA ANTUNES, A. M. Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: estudo de caso. **Revista de Economia e Agronegócio**, v.7, n.2, 2009.

SCHURIG, V. Separation of enantiomers by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.906, p.275-299, 2001.

SCIFINDER WEB. **SciFinder - Chemical Abstracts Service**, 2017. Disponível em: <<https://scifindercas.ez67.periodicos.capes.gov.br/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 14 Abril 2017.

SEIBERT, E., TRACY, T.S. Different Enzyme Kinetics Models, cap.3. In: **Enzyme Kinetics in Drug metabolism: Fundamentals and Applications**, NAGAR, S., ARGIKAR, U.A., TWEEDIE, D. Editors. Springer Science Business Meddia, 2014b.

SEIBERT, E., TRACY, T.S. Fundamentals of Enzyme Kinetics, cap.2. In: **Enzyme Kinetics in Drug metabolism: Fundamentals and Applications**, NAGAR, S., ARGIKAR, U.A., TWEEDIE, D. Editors. Springer Science Business Meddia, 2014a.

SHANG, D. Y., IKONOMOU, M. G., MACDONALD, R. W. Quantitative determination of nonylphenol polyethoxylate surfactants in marine sediment using normal-phase liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 467-482, 1999.

SMITH, M.B., MARCH, J. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. 6 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, cap.4, p.136-233, 2007.

SONG, K., ZHANG, Y., YAN, L., WANG, J., LU, C., ZHANG, Q., ZHAO, M. Risk assessment of the endocrine-disrupting effects of nine chiral pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v.338, p.57-65, 2017.

SPPAGIARI, D. A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: An overview of current methodologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.101, p.221-237, 2014.

STRAIGHT HEALTHCARE. Cytochrome P450. Disponível em: <<http://www.straighthealthcare.com/cytochrome-p450-2c19.html#substrates>>.

Acessado em: 12 de março de 2018.

SUN, M., LIU, D., QIU, X., ZHOU, Q., SHEN, Z., WANG, P., ZHOU, Z. Acute Toxicity, Bioactivity, and Enantioselective Behavior with Tissue Distribution in Rabbits of Myclobutanil Enantiomers. **Chirality**, v.26, p.784-789, 2014.

TIAN, Q., ZHOU, Z., LV, C., YANG, J. Direct enantiomeric separation of chiral pesticides by liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phases under reversed phase conditions. **Analytical Methods**, v.4, p.2307-2317, 2012.

VOPHAM, T., BROOKS, M. M., YUAN, J. M., TALBOTT, E. O., RUDDELL, D., HART, J. E., CHANG, C. C. H., WEISSFELD, J. L. Pesticide exposure and hepatocellular carcinoma risk: a case-control study using a geographic information system (GIS) to link SERR-Medicare and California pesticide data. **Environmental Research**, v.143, p.68-82, 2015.

WANG, P., LIU, D., GU, X., JIANG, S., ZHOU, Z. Quantitative Analysis of Three Chiral Pesticide Enantiomers by High-Performance Column Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 91, nº 5, 2008.

WANG, Y., QIU, J., ZHU, W., WANG, X., ZHANG, P., WANG, D., ZHOU, Z. Enantioselective metabolism and interference on tryptophan metabolism of myclobutanil in rat hepatocytes. **Chirality**, v. 27, p. 643-649, 2015.

WALSKY, R. L., BOLDT, S. E. In Vitro Cytochrome P450 Inhibition and Induction. **Current Drug Metabolism**, v.9, p.928-939, 2008.

WORLDDATLAS. Top Pesticide Using Countries, 2017. Disponível em: <<https://www.worldatlas.com/articles/top-pesticide-consuming-countries-of-the-world.html>>. Acessado em: 08 de janeiro de 2018.

YAN, J., ZHANG, P., WANG, X., WANG, Y., ZHOU, Z., ZHU, W. Stereoselective Degradation of Chiral Fungicide Myclobutanil in Rat Liver Microsomes. **Chirality**, v. 60, p. 51-55, 2014.

ZHANG, C., XU, Y., ZHONG, Q., LI, X., GAO, P., FENG, C; CHU, Q.; CHEN, Y.; LIU, D. In Vitro Evaluation of the Inhibitory Potential of Pharmaceutical Excipients on human carboxylesterase 1A and 2. **Plos one**, v. 9, n. 4, p. 1–8, 2014.

ZHANG, H., WANG, X., QIAN, M., WANG, X., XU, H., XU, M., WANG, Q. Residue Analysis and Degradation Studies of Fenbuconazole and Myclobutanil in Strawberry by Chiral High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.12012-12017, 2011.

ZHANG, P., SHEN, Z., XU, X., ZHU, W., DANG, Z., WANG, X., LIU, D., ZHOU, Z. Stereoselective Degradation of Metalaxyl and Its enantiomers in rat and rabbit hepatic microsomes in vitro. **Xenobiotica**, v.42, p.580-586, 2012.

ZHANG, Y., WU, D. R., WANG-IVERSON, D. B., TYMIAK, A. A. Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.10. p.571-577, 2005.