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

**Avaliação de fungos no metabolismo enantiosseletivo da Zopiclona e
análise por Eletroforese Capilar**

NAYARA CRISTINA PEREZ DE ALBUQUERQUE

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

2014

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

**Avaliação de fungos no metabolismo enantiosseletivo da Zopiclona e
análise por Eletroforese Capilar**

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

Área: Química

Orientada: Nayara Cristina Perez de Albuquerque

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes
de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

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

De Albuquerque, Nayara Cristina Perez

Avaliação de fungos no metabolismo enantiosseletivo da Zopiclona e análise por Eletroforese Capilar. Ribeirão Preto, 2014.

98 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes de.

1. Biotransformação.
2. DLLME.
3. *N*-desmetilzopiclona.
4. Separação enantiomérica.
5. Zopiclona.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: De Albuquerque, Nayara Cristina Perez

Título: Avaliação de fungos no metabolismo enantiosseletivo da Zopiclona e análise por Eletroforese Capilar

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Yolanda, por ter sempre mesmo acreditado em mim. Sei que orou por mim todos os dias, e graças a suas orações e incentivo, estou onde estou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua presença em minha vida, por me carregar no colo tantas vezes, e me dar sabedoria e paciência para percorrer as trilhas corretas.

Agradeço à minha mãe Nadir, por ter dedicado sua vida a mim e ao meu irmão. Você é meu exemplo de mulher batalhadora. Meu exemplo de força. E se cheguei aqui, foi porque você me ensinou que nada “cai do céu”, que é preciso coragem pra buscar um sonho. Obrigada!

Agradeço ao meu irmão Diego por estar sempre ao meu lado, incondicionalmente. Você que tantas vezes foi o meu protetor, obrigada! É bom ser cuidada por você. Agradeço também minha cunhada Shimeni e minha sobrinha Ana Luiza por todo amor e carinho que recebo, e por alegrarem meus dias.

Agradeço ao meu pai Paulo. Tantas coisas acontecem na vida para nos ensinar. Você tem me ensinado a recomeçar. E este aprendizado tem sido único. É bom ver o respeito que você fala das minhas escolhas, e o orgulho. Obrigada!

Agradeço ao meu tio Alcides por tantas vezes se preocupar comigo. Agradeço também ao meu primo Reinaldo pelas horas de conversa, por tantas vezes ser meu conselheiro e meu amigo. Por sempre estar disposto a me ajudar. Você tem sido meu presente de Deus.

Um agradecimento especial ao meu orientador Professor Anderson. Tenho muito orgulho de ser sua orientada. Você é um profissional incomum, espero que saiba disso e que nunca desista de ser assim. Vejo em você um desejo de ensinar e um respeito enorme por quem está aprendendo. Obrigada por tanto tempo de dedicação à minha formação, por me construir enquanto profissional e por tantas vezes ser também meu amigo. Pelas vezes que me disse calma, e pelas vezes que me incentivou. Muito obrigada!

Um super obrigada aos meus amigos membros, ex-membros e agregados do “LABMETS”, a professora Marilda e o técnico Thiago pelos dias de convívio. Foi um prazer ter vocês ao meu lado durante esta trajetória. Agradeço às horas de estudo, de trabalho, e os momentos de diversão. Vocês tornaram tudo melhor.

Obrigada às minhas amigas de república. Quando saímos da casa dos nossos pais para vir para Ribeirão Preto, viemos construir uma família, porque nem sempre os membros

de uma família são criados sob o mesmo teto. Vocês foram e são a minha família! Amo muito vocês! Obrigada pelos anos de convívio e por terem tanta paciência, cuidado e parceria. Vocês foram únicas! Obrigada Vivi, Lu, Gabi, Moni, Amanda, Claudia, Jessamine e Roberta, e também todos os agregados que tivemos a honra de ganhar Hugo, Thiago, Marcelo's, Junior, Regis, Cyntia e Layci.

Agradeço aos meus amigos de Catanduva por estarem comigo por tanto tempo, pelas horas de conversa e descontração, por acreditarem nos meus sonhos e por terem paciência com minha ausência. Prometo melhorar! Obrigada Victor, Kairo, Michelli, Mariana, Gabriel, Gustavo, Ives e Renan.

Não poderia deixar de agradecer à Dinagro Agropecuária Ltda pela confiança nos período que trabalhei com vocês. Obrigada por entenderem tão bem minha escolha e por terem sido meus incentivadores. Dois anos com vocês acrescentou muito em minha vida, seja como experiência profissional, seja como amigos. É uma felicidade ter feito parte da história e família de vocês.

Marcia e Gabriel, obrigada por serem tão presentes em minha vida e por permitirem me sentir um pouquinho da família de vocês! Marcia, obrigada pela sua amizade. É uma felicidade ter você ao meu lado. Obrigada por todas as vezes que me ajudou, pelas vezes que me ouviu chorando, por compartilhar minhas alegrias e por torcer tanto por mim! Eu consigo ver em seu sorriso a felicidade que sente com minhas conquistas. Você faz parte da minha construção.

Aos funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP e da seção de pós-graduação por todo auxílio, paciência e dedicação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2012/21578-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPQ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Por fim agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Resumo

DE ALBUQUERQUE, N. C. P. **Avaliação de fungos no metabolismo enantiosseletivo da Zopiclona e análise por Eletroforese Capilar**. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A zopiclona (ZO) é um fármaco quiral extensivamente metabolizado em N-desmetilzopiclona (N-Des) e zopiclona-N-óxido (N-Ox). A (S)-N-Des apresenta atividade ansiolítica, o que indica que este metabólito possui potencial para ser empregado no tratamento da ansiedade. Uma alternativa para obtenção deste metabólito pode ser a biotransformação empregando fungos como agentes catalisadores. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de fungos em realizar o metabolismo da ZO em seu metabólito N-Des assim como verificar a enantiosseletividade desse processo. A análise da ZO e seus metabólitos em meio de cultura líquido proveniente do estudo de biotransformação foi realizada por eletroforese capilar (CE) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi empregada como técnica de preparo de amostras. As análises por CE foram realizadas empregando uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescido de 0,5% (m/v) de carboximetil-β-cilcodextrina com tensão constante de +25 kV e temperatura do capilar de 20°C. A condição estabelecida para extração por DLLME foi: 2 mL de meio de cultura líquido Czapek, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5, clorofórmio (100 µL) e metanol (300 µL) como solventes extrator e dispersor, respectivamente. Anterior aos estudos de biotransformação, o método foi validado seguindo as exigências do EMA e ANVISA para análise de fármacos em matrizes biológicas. O método foi linear no intervalo de concentração de 90-6000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da ZO ($r > 0,999$) e 50-1000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da N-Des ($r > 0,998$); a recuperação absoluta média foi de 52% para N-Des e 83% para ZO. Os demais parâmetros, como precisão, exatidão, seletividade e estabilidade apresentaram-se dentro das normas exigidas. O estudo de biotransformação foi realizado com os fungos *Penicillium crustosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason, *Fusarium oxysporum*, *Mucor rouxii*, *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e *Cunninghamella echinulata* var *elegans* ATCC 8688A. Entre esses fungos avaliados, os fungos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e *Cunninghamella echinulata* var *elegans* ATCC 8688A foram capazes de biotransformar a ZO para seu metabólito ativo N-Des. Utilizando o fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A, após 360 horas de incubação foi obtida uma concentração máxima de (-)-(R)-N-Des e (+)-(S)-N-Des de 508 ng mL⁻¹ e 221 ng mL⁻¹, respectivamente com excesso enantiomérico de 39%. O fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B formou preferencialmente o metabólito (+)-(S)-N-Des. Após 240 horas de incubação, a concentração dos metabólitos (-)-(R)-N-Des e (+)-(S)-N-Des foi 120 ng mL⁻¹ e 228 ng mL⁻¹, respectivamente com excesso enantiomérico de 35%.

Palavras-chave: Biotransformação, DLLME, N-desmetilzopiclona, Separação enantiomérica, Zopiclona.

Abstract

DE ALBUQUERQUE, N. C. P. **Evaluation of fungi in enantioselective metabolism of Zopiclone and analysis by Capillary Electrophoresis.** 2014. 98 f. Thesis (Master) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Zopiclone (ZO) is a chiral drug extensively metabolized into N-desmethylzopiclone (N-Des) and zopiclone-N-oxide (N-Ox). Pharmacological studies showed that the metabolite (S)-N-Des presents anxiolytic activity, which indicates that this metabolite has a potential to be used in the treatment of anxiety. An alternative way for obtaining this metabolite may be the biotransformation employing fungi as catalytic agent. Therefore, the aim of this study was to evaluate if fungi are able to biotransform ZO into its active metabolite N-Des and to verify if this process is enantioselective. To perform ZO and its metabolites analysis from liquid culture medium, an enantioselective method by capillary electrophoresis (CE) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) was developed. The CE analyses were carried out in 50 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 2.5 containing 0.5% (w/v) carboxymethyl- β -CD with a constant voltage of +25 kV and capillary temperature of 20°C. The extraction conditions established for DLLME were: 2 mL of sample (pH adjusted using 2 mL of 0.1 mol L⁻¹ tris-HCl buffer pH 9.5), chloroform (100 μ L) and methanol (300 μ L) as extraction and disperser solvent, respectively. Before the biotransformation study, the method was validated according to EMA and ANVISA guidelines for analysis of drug and metabolites in biological matrices. The method was linear over a concentration range of 90-6000 ng mL⁻¹ for each ZO enantiomer ($r > 0.999$) and 50-1000 ng mL⁻¹ for each N-Des enantiomer ($r > 0.998$); the absolute recovery was 52% for N-Des and 83% for ZO. Other parameters, such as: accuracy, precision, selectivity and stability were all in agreement with guideline. The developed method was employed in biotransformation studies using the following fungi: *Penicillium crustosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason, *Fusarium oxysporum*, *Mucor rouxii*, *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B and *Cunninghamella echinulata* var *elegans* ATCC 8688A. Among all evaluated fungi, *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B and *Cunninghamella echinulata* var *elegans* ATCC 8688A were able to biotransform the ZO to its active metabolite N-Des. Using the fungus *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A, after 360 hours of incubation it was obtained a maximum concentration of (-)-(R)-N-Des and (+)-(S)-N-Des of 508 ng mL⁻¹ and 221 ng mL⁻¹, respectively with an enantiomeric excess of 39%. The fungus *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B formed preferentially the metabolite (+)-(S)-N-Des. After 240 hours of incubation, the concentration of metabolites (-)-(R)-N-Des and (+)-(S)-N-Des was 120 ng mL⁻¹ and 228 ng mL⁻¹, respectively with enantiomeric excess of 35%.

Keywords: Biotransformation; DLLME; Enantiomeric separation; N-desmethylzopiclone; Zopiclone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metabolismo da zopiclona. *Centro quiral.....	3
Figura 2.	Esquema da microextração líquido-líquido dispersiva. (A) Amostra aquosa em um tubo de ensaio; (B) Injeção da mistura de solventes extrator e dispersor na amostra com o auxílio de uma microseringa, formando o ponto nuvem e ocorrendo a partição do analito da amostra para o solvente extrator; (C) Centrifugação da mistura; (D) Retirada da fase sedimentada enriquecida com o analito de interesse; (E) Transferência da fase sedimentada para um frasco para posterior análise (Adaptado de Caldas et al., 2011).....	10
Figura 3.	Influencia da mobilidade eletroforética e do fluxo eletrosmótico na análise de cátions, ânions e moléculas neutras.....	15
Figura 4.	Influência do seletor quiral na separação quiral da ZO, <i>N</i> -Des e <i>N</i> -Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L ⁻¹ pH 2,5, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25°C e 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi. (A) CM-β-CD 1%, (B) CM-β-CD 1% + β-CD 10 mmol L ⁻¹ , (C) CM-β-CD 1% + HP-β-CD 10 mmol L ⁻¹ . (1) e (3) enantiômeros da <i>N</i> -Des; (2) e (4) enantiômeros da ZO; (5) e (6) enantiômeros da <i>N</i> -Ox.....	38
Figura 5.	Influência do comprimento do capilar na separação quiral da ZO, <i>N</i> -Des e <i>N</i> -Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L ⁻¹ pH 2,5 acrescida de 1% de CM-β-CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25°C, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi. (A) Capilar de 50 cm de comprimento total. (B) Capilar de 40 cm de comprimento total. (1) e (3) enantiômeros da <i>N</i> -Des; (2) e (4) enantiômeros da ZO; (5) e (6) enantiômeros da <i>N</i> -Ox.....	39
Figura 6.	Estrutura química e valores de pK _a e logP referentes a (A) Zopiclona, (B) <i>N</i> -desmetilzopiclona e (C) Zopiclona- <i>N</i> -óxido. *Centro quiral.....	40
Figura 7.	Influência do valor de pH na separação da ZO, <i>N</i> -Des e <i>N</i> -Ox.	

Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ acrescida de 1% de CM-β-CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi. (A) pH 2,0, (B) pH 2,5, (C) pH 3,0. (1) e (3) enantiômeros da *N*-Des; (2) e (4) enantiômeros da *ZO*; (5) e (6) enantiômeros da *N*-Ox.....41

Figura 8. Influência da concentração da solução tampão na separação da *ZO*, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio pH 2,5 acrescida de 1% de CM-β-CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura de capilar 25°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi.....43

Figura 9. Influência da concentração de CD na separação da *ZO*, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescida de CM-β-CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi.....44

Figura 10. Influência da tensão aplicada na separação da *ZO*, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescida de 0,5% de CM-β-CD, temperatura do capilar 25°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi.....45

Figura 11. Influência da temperatura na separação da *ZO*, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescida de 0,5% de CM-β-CD, tensão aplicada +25 kV, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi.....47

Figura 12. Influência do tempo de injeção na separação da *ZO*, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescido de 0,5% de CM-β-CD, tensão aplicada de +25 kV, temperatura do capilar 20°C, capilar de 50 cm de comprimento total,

- injeção hidrodinâmica a 1 psi.....48
- Figura 13. Gráfico de Ohm. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescido de 0,5% de CM-β-CD, temperatura do capilar 20°C, capilar de 50 cm de comprimento total.....49
- Figura 14. Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Concentração dos analitos: 10 µg mL⁻¹ de cada enantiômero. (1) (-)-(R)-*N*-Des; (2) (-)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO; (5) (-)-(R)-*N*-Ox e (6) (+)-(S)-*N*-Ox. Resolução: Rs_{1,2} = 2,06; Rs_{2,3} = 3,24; Rs_{3,4} = 2,06; Rs_{4,5} = 5,32; Rs_{5,6} = 8,11.....50
- Figura 15. Avaliação da combinação de solventes extrator/dispersor na extração da ZO e *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek. A: Dicloroetano / Etanol; B: Dicloroetano / Metanol; C: Clorofórmio / Metanol; D: Dicloroetano / Acetonitrila; E: Diclorometano / Acetonitrila; F: Dicloroetano / Acetona; G: Diclorometano / Acetona; H: Clorofórmio / Acetona. Condições de extração: 2 mL de amostra, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5, 200 µL de solvente extrator, 500 µL de solvente dispersor e 5 minutos de centrifugação a 1800×g a 20°C.....53
- Figura 16. Avaliação do volume de solvente dispersor (metanol) na extração da ZO e *N*-Des de meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: 2 mL de meio de cultura líquido Czapek, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5; 200 µL de solvente extrator (clorofórmio) e 5 minutos de centrifugação a 1800×g a 20°C.....54
- Figura 17. Avaliação do volume de solvente extrator (clorofórmio) na extração da ZO e *N*-Des de meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: 2 mL de meio de cultura líquido Czapek, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5; 300 µL de solvente dispersor (metanol) e 5 minutos de centrifugação a 1800×g a 20°C.....55
- Figura 18. Avaliação da agitação da amostra na extração da ZO e *N*-Des de meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: 2 mL de meio de

- cultura líquido Czapek, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5; 200 µL de solvente extrator (clorofórmio), 500 µL de solvente dispersor (metanol) e 5 minutos de centrifugação a 1800×g a 20°C. PN: Ponto nuvem; Vx: Vórtex; US: Ultrassom.....56
- Figura 19. Eletroferograma representativo da análise dos enantiômeros da ZO e seu metabólito *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek após extração por DLLME. (A) Meio de cultura sem adição dos analitos (branco de matrix) (B) Meio de cultura fortificado com (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO. Condições de análise descritas no item 1.1.9.....57
- Figura 20. Estrutura química e valores de pK_a e logP da mirtazapina *Centro quiral.....58
- Figura 21. Eletroferograma referente à análise do PI, ZO, *N*-Des e *N*-Ox. (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO; (5) (–)-(R)-*N*-Ox e (6) (+)-(S)-*N*-Ox.....58
- Figura 22. Eletroferogramas representativos da análise da ZO e seu metabólito *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek após extração por DLLME. (A) Meio de cultura Czapek sem adição dos analitos (B) Meio de cultura fortificado com (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO.....64
- Figura 23. Eletroferogramas representativos das amostras de meio de cultura líquido Czapek incubado com os fungos (A) *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688A, (B) *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e (C) Meio de cultura fortificado com (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO.....64
- Figura 24. Eletroferograma representativo da biotransformação da ZO pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A após 360 horas de incubação. (A) Extração do meio de cultura com o fungo na ausência do fármaco (controle do fungo); (B) Análise após 360 horas de

incubação. (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO.....66

Figura 25. Gráfico de concentração *versus* tempo de incubação na formação de *N*-Des pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A.....67

Figura 26. Eletroferograma representativo da biotransformação da ZO pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B após 240 horas de incubação. (A) Extração do meio de cultura com o fungo na ausência do fármaco (controle do fungo); (B) Análise após 240 horas de incubação. (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO.....68

Figura 27. Gráfico de concentração *versus* tempo de incubação na formação da *N*-Des pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Influência da tensão aplicada no tempo de migração do último analito.....	46
Tabela 2.	Influência da temperatura no tempo de migração do último analito.....	47
Tabela 3.	Linearidade do método para análise da ZO e <i>N</i> -Des em meio de cultura líquido Czapek.....	59
Tabela 4.	Precisão e exatidão do método para análise da ZO e <i>N</i> -Des em meio de cultura líquido Czapek.....	60
Tabela 5.	Limite de quantificação do método para análise da ZO e <i>N</i> -Des em meio de cultura líquido Czapek.....	61
Tabela 6.	Recuperação do método para análise da ZO e <i>N</i> -Des em meio de cultura líquido Czapek.....	62
Tabela 7.	Estabilidade da ZO e <i>N</i> -Des em meio de cultura líquido Czapek.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BDA	Batata dextrose Ágar
CD	Ciclodextrina
CE	Eletroforese capilar
CM- β -CD	Carboximetil- β -ciclodextrina
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CV%	Coeficiente de variação percentual
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
E%	Erro relativo percentual
EOF	Fluxo eletrosmótico
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido
MIC	Concentração inibitória mínima
N-Ox	Zopiclona- <i>N</i> -óxido
N-Des	<i>N</i> -desmetilzopiclona
PI	Padrão interno
R _s	Resolução
USADLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom
VADLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex
ZO	Zopiclona

Sumário

1. Introdução	2
1.1. Zopiclona	2
1.2. Biotransformação de fármacos por fungos	5
1.3. Técnica de Preparo de amostra: Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	8
1.4. Eletroforese Capilar	12
1.5. Análise enantiosseletiva da ZO e metabólitos em matrizes biológicas	17
2. Objetivos	20
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1. Otimização da separação enantiomérica da ZO e seus metabólitos	22
3.1.1. Materiais	22
3.1.2. Métodos.....	23
3.2. Determinação da ordem de migração eletroforética dos enantiômeros	24
3.2.1. Materiais	24
3.2.2. Métodos.....	25
3.3. Otimização do procedimento de preparação de amostra por DLLME	25
3.3.1. Materiais	25
3.3.2. Métodos.....	26
3.4. Validação analítica.....	26
3.4.1. Linearidade.....	27
3.4.2. Precisão e Exatidão.....	27
3.4.3. Limite inferior de quantificação	28
3.4.4. Recuperação	28
3.4.5. Estabilidade	28
3.4.6. Seletividade	30
3.5. Estudo de biotransformação da ZO empregando fungos	30
3.5.1. Materiais	30
3.5.2. Métodos.....	31
4. Resultados e Discussão.....	36
4.1. Otimização da separação enantiomérica da ZO e seus metabólitos	36
4.1.1. Avaliação dos seletores quirais	36
4.1.2. Avaliação do comprimento do capilar	39

4.1.3.	Avaliação do pH e concentração da solução tampão	40
4.1.4.	Avaliação da concentração de CD.....	43
4.1.5.	Avaliação da tensão aplicada	44
4.1.6.	Avaliação da temperatura do capilar	46
4.1.7.	Avaliação da detectabilidade	47
4.1.8.	Efeito Joule e gráfico de Ohm.....	49
4.1.9.	Condições finais para análise por CE.....	50
4.2.	Otimização do procedimento de preparo de amostra por DLLME	51
4.2.1.	Avaliação dos solventes extrator e dispersor	52
4.2.2.	Avaliação do volume de solvente dispersor.....	53
4.2.3.	Avaliação do volume de solvente extrator	54
4.2.4.	Avaliação da agitação (DLLME assistida)	55
4.2.5.	Condições finais para extração por DLLME	57
4.3.	Validação analítica.....	58
4.3.1.	Linearidade.....	59
4.3.2.	Precisão e Exatidão.....	59
4.3.3.	Limite inferior de quantificação	60
4.3.4.	Recuperação	61
4.3.5.	Estabilidade	62
4.3.6.	Seletividade	63
4.4.	Estudo de biotransformação da ZO empregando fungos	65
4.4.1.	Fungos no gênero <i>Cunninghamella</i>	65
5.	Conclusões	70
	Referências	72

Introdução

1. Introdução

1.1. Zopiclona

A insônia é um problema de saúde generalizado que acarreta perdas na qualidade de vida do indivíduo. Estudos apontam que, aproximadamente, 25-30% dos adultos sofrem de algum distúrbio do sono, e 10% apresentam distúrbios graves que cumprem os critérios de classificação de insônia¹ (FORTIER-BROCHU et al., 2012). Os medicamentos benzodiazepínicos são a escolha mais comum para a terapia farmacológica da insônia, no entanto, são responsáveis por um grande número de efeitos indesejáveis, como sedação residual durante o dia, tolerância e dependência (VERSTER; VELDHUIJZEN; VOLKERTS, 2004). O fármaco ideal para o tratamento da insônia deve ser eficaz e de rápida sedação durante a noite, sem os efeitos residuais no dia seguinte. Neste sentido, no final da década de 80 foram introduzidos novos fármacos para o tratamento da insônia, os chamados “fármacos-Z”, não-benzodiazepínicos, tais como: zopiclona, zolpidem e zaleplon. Esses fármacos oferecem melhor tolerância em comparação com as terapias anteriores, e estudos recentes demonstram que são eficazes a longo prazo e em diferentes populações (NUTT; STAHL, 2010).

A zopiclona (ZO) (Figura 1) é uma ciclopirrolona pertencente à classe dos fármacos-Z, e segundo as recomendações do NICE (*National Institute for Health and Care Excellence*) é indicada para o tratamento a curto prazo da insônia, incluindo dificuldade em adormecer, despertares noturno, despertar precoce, insônia situacional ou crônica e insônia secundária de distúrbios psiquiátricos (NICE, 2004). Em países da Europa, Canadá e Japão, a zopiclona é o hipnótico mais prescrito (LEUFKENS; VERMEEREN, 2014).

A ZO é um fármaco quiral e quando as atividades farmacodinâmicas dos enantiômeros são avaliadas separadamente, observa-se que o (+)-(S)-ZO apresenta atividade farmacológica significativamente maior que o (-)-(R)-ZO (NAJIB, 2006). Baseado nisso, em 15 de dezembro de 2004 nos Estados Unidos, foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) a comercialização da eszopiclona, enantiômero

¹ Segundo a classificação internacional de transtornos do sono, a insônia é definida como a dificuldade de iniciar ou manter o sono por um período de quatro semanas, e que provoque consequências como sonolência durante o dia, perturbação de humor, desmotivação, comprometimento da memória, entre tantos outros fatores (BAGLIONI et al., 2010).

(+)-(S)-ZO, para o tratamento de insônia para pacientes com mais de 18 anos. A eszopiclona é comercializada pela empresa Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda, com o nome Lunesta®. Estudos comprovam que o tratamento com a eszopiclona levou a melhorias na duração e qualidade do sono em pacientes com quadro de insônia crônica, sem o risco de comprometimento do dia seguinte ou tolerância (WIEGAND, 2008; GOMIS et al., 2009).

Figura 1. Metabolismo da zopiclona. *Centro quiral

No Brasil e na Europa, a zopiclona é comercializada apenas como mistura racêmica, pela empresa Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda, com o nome comercial de Imovane®. A dose clinicamente recomendada é 7,5 mg, com pico de concentração plasmática de 60 ng mL⁻¹ após 90 minutos de sua administração, com biodisponibilidade de 80%, sendo rapidamente distribuído para todas as partes do organismo (FERNANDEZ et al., 1995; MISTRI et al., 2008).

Em humanos, a ZO é principalmente metabolizada no fígado com meia vida de 5 horas, e apenas 5% do fármaco é eliminado pela urina. Após administração oral da ZO são produzidos dois principais metabólitos: zopiclona-*N*-óxido (*N*-Ox) e *N*-desmetilzopiclona (*N*-Des) (TORNIO; NEUVONEN; BACKMAN, 2006) (Figura 1). Estudos mostram que a citocromo P450 isoforma 3A4 (CYP3A4) é a principal

enzima responsável pelo metabolismo da ZO, e a CYP2C8 contribui significativamente para a formação do metabólito *N*-Des (Becquemont et al., 1999). O metabólito *N*-Ox possui atividade inferior ao fármaco precursor e tempo de meia vida semelhante, enquanto que o metabólito *N*-Des possui meia vida superior (7 a 11 horas), no entanto sem atividade hipnótica, mas com significativa atividade ansiolítica (TORNIO; NEUVONEN; BACKMAN, 2006).

A estrutura do fármaco ZO e seus metabólitos *N*-Des e *N*-Ox está representada na Figura 1. A oxidação na formação do *N*-Ox e a demetilação na formação do *N*-Des ocorrem no nitrogênio da piperazina; desta forma, não há qualquer reação no centro estereogênico e os metabólitos permanecem quirais.

A atividade ansiolítica do metabólito *N*-Des foi comprovada em 2001 em um estudo realizado por Carlson e seus colaboradores. O teste comportamental mais comum visando avaliar as propriedades ansiolíticas de fármacos é o modelo de conflito. Testes foram feitos comparando a (+)-(S)-*N*-Des com diazepam. Nesse estudo verificou-se que a (+)-(S)-*N*-Des apresenta efeito ansiolítico em todas as doses testadas, sem causar depressão relevante no sistema nervoso central. Este fato indica que este metabólito tem grande potencial de ser utilizado para o tratamento clínico de ansiedade (CARLSON et al., 2001; FLECK, 2002).

Os transtornos de ansiedade são caracterizados por medo excessivo, sem que exista uma ameaça real, ou que seja desproporcional a situação (LEUNER, SHORS, 2013). Tratamentos farmacológicos para transtorno de ansiedade generalizado tornaram-se mais seguros e toleráveis, embora apenas 50% dos pacientes atingem a cura (NANDHRA; MURPHY; SULE, 2013). Bilhões de dólares têm sido investidos em pesquisa de desenvolvimento de novos medicamentos, no entanto, ainda não chegou ao mercado qualquer tratamento inovador (FARACH et al., 2012)

Baseado na busca pelo desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento clínico da ansiedade e em estudos que indicavam a atividade ansiolítica do *N*-Des, no ano de 2000 foi realizado um pedido de patente pela empresa SEPRACOR INC. para a produção e uso da mistura racêmica do metabólito *N*-Des, e dos enantiômeros puros (+)-(S)-*N*-Des e (-)-(R)-*N*-Des para o tratamento da ansiedade, distúrbios convulsivos e outros distúrbios relacionados (JERUSSI et al., 2000). Atualmente, o (+)-*N*-Des está em fase I de teste pela empresa Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda, no entanto, até o momento nenhum resultado foi divulgado. Os

dados pré-clínicos sugerem que este candidato a fármaco pode fornecer ação inicial rapidamente com menor sedação do que os fármacos atualmente comercializados para ansiedade aguda (Thomson Reuters IntegritySM).

Os autores da patente propõem diversas metodologias para o preparo do metabólito *N*-Des através de uma reação apropriada de *N*-dealquilação da ZO, e propõem a obtenção dos enantiômeros puros (+) ou (-)-*N*-Des pela resolução da mistura racêmica do *N*-Des. No entanto, as rotas de síntese constituem um processo trabalhoso e com elevado consumo de reagentes, fazendo-se pertinente o desenvolvimento de metodologias mais atrativas. A obtenção de substâncias quirais em suas formas enantiomericamente puras usando processos enzimáticos é uma estratégia promissora, uma vez que os processos são pouco poluidores e há a possibilidade de atingir elevado rendimento enantiomérico (MARSAIOLI; PORTO, 2010). Este trabalho se propôs a realizar um estudo de biotransformação da ZO empregando fungos como “agentes catalisadores” para obtenção do metabólito *N*-Des em sua mistura racêmica ou como enantiômero puro.

1.2. Biotransformação de fármacos por fungos

Os micro-organismos são frequentemente utilizados nas indústrias para a obtenção de diversos produtos, como suplementos alimentares (aminoácidos), enzimas, produtos químicos (etanol, butanol e ácido cítrico) e alimentos (pães, cerveja, vinho, vinagre, queijos e iogurtes). São também empregados para biorremediação e em processos de biocatálise, convertendo substâncias de maneira mais rápida e com menor custo do que por processos totalmente químicos (LOPES; GUIMARÃES; PUPO, 2011). Recentemente, vem sendo empregados também para mimetizar as reações metabólicas de fármacos em mamíferos (PERVAIZ, et al., 2013).

Biotransformação pode ser definida como o uso de um agente biológico para provocar transformações em uma substância que não seja seu substrato natural (MARSAIOLI; PORTO, 2010; PIMENTEL et al., 2011). O crescimento, alimentação e reprodução dos micro-organismos dependem de uma fonte de carbono, que em condições normais são os açúcares. Devido à capacidade de adaptação dos micro-organismos, outras substâncias de interesse podem ser usadas como substituintes de fonte de carbono. A molécula pode ser modificada, alterando os grupos

funcionais, com ou sem degradação do esqueleto carbônico, formando novos produtos que dificilmente seriam obtidos por métodos químicos (PIMENTEL et al., 2011).

O uso de modelos microbiológicos oferece diversas vantagens, como simplicidade, baixo custo, possibilidade de realizar uma triagem (*screening*) com grande variedade de micro-organismos e os metabólitos formados são facilmente detectados, isolado e identificados. Além disso, em muitos casos essas reações são régio e/ou estereosseletivas, o que exclui futuros complexos processos de purificação (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

As reações de biotransformação podem ser realizadas empregando enzimas isoladas, ou células íntegras de organismos vivos, ou micro-organismos (leveduras, bactérias e fungos). As bactérias e fungos possuem uma ampla diversidade de espécies, no entanto, esses modelos ainda são pouco estudados considerando proporcionalmente o número de espécies existentes (MARSAIOLI; PORTO, 2010).

Em processos de biotransformação os fungos são usados com maior frequência, pois são capazes de realizar diversos tipos de reações, como oxidação, redução e hidrólise, o que torna possível a obtenção de uma grande variedade de produtos. Além disso, o crescimento é rápido, o cultivo é barato e processos em escala ampliada podem ser facilmente atingidos (BORGES et al., 2009). Estima-se que haja cerca de 1,5 bilhões de espécies de fungos em nosso planeta, entre os quais apenas 5% (69.000) estão descritas. Entre as espécies descritas, apenas 16% (11.500) vem sendo cultivadas. Estes valores demonstram o potencial a ser explorado com estudos de metabolismo empregando fungos (MARSAIOLI; PORTO, 2010).

Os fungos endofíticos habitam o interior das plantas sem lhes causar qualquer dano ou doença. Estes também promovem o crescimento da planta e formação dos metabólitos secundários responsáveis pela defesa vegetal (CHANDRA, 2012). Os fungos endofíticos destacam-se devido ao seu potencial de biotransformação, em especial na transformação de compostos complexos (WANG; DAÍ, 2011).

Carrão et al., (2011) avaliou a capacidade do fungo endofítico *Penicillium crustosum* (VR4) em realizar o metabolismo enantiosseletivo do albendazol em seu metabólito ativo e quiral albendazol sulfóxido (ASOX). As análises foram realizadas por eletroforese capilar e como técnica de preparo de amostras foi empregada a

microextração em fase líquida (HF-LPME). Neste estudo foi obtido um excesso enantiomérico de 50,4 % para o enantiômero (–)-ASOX após 96 horas de incubação.

Os fungos do gênero *Cunninghamella* são encontrados em solo e plantas, particularmente no mediterrâneo e em zonas subtropicais, em animais, queijos e castanhas do Brasil. As espécies *C. echinulata*, *C. elegans* e *C. bertholletiae* são as mais comuns, sendo que a última espécie é patogênica para animais e humanos. Os fungos do gênero *Cunninghamella* são capazes de metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos com régio e estereosseletividade (ASHA, VIDYAVATHI, 2009). Há diversos relatos na literatura demonstrando que espécies de *Cunninghamella* possuem a capacidade de imitar o metabolismo dos mamíferos e geração de novos produtos, o que torna o emprego desses fungos uma alternativa atraente em estudos de biotransformação (ASHA, VIDYAVATHI, 2009).

Bocato et al., (2012) avaliaram a capacidade de diversos fungos em realizar o metabolismo enantiosseletivo do fármaco risperidona. Nesse estudo foi empregado como técnica de análise a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e como técnica de preparação de amostras foi empregada a microextração em fase sólida (SPME). Os fungos do gênero *Cunninghamella* foram capazes de metabolizar enantiosseletivamente a risperidona em seu metabólito ativo, 9-hidroxirisperidona (9-RispOH), sendo que a biotransformação pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A rendeu um excesso enantiomérico de 100 % para formação da (+)-9-RispOH a partir de 96 horas de incubação. Fortes et al., (2013) avaliaram a capacidade de alguns fungos metabolizarem o fármaco hidroxizina em seu metabólito cetirizina (outro fármaco) enantiosseletivamente. As análises foram realizadas por eletroforese capilar e como técnica de preparação de amostras foi empregado a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Neste estudo o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B foi capaz de converter 19% da (S)-hidroxizina para (S)-cetirizina com 65% de excesso enantiomérico.

O *Mucor rouxii* é um fungo de solo que também vem sendo empregado em estudos de biotransformação. De Jesus et al., (2011) avaliaram a capacidade do fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894 em realizar o metabolismo enantiosseletivo da risperidona em seu metabólito quiral e ativo 9-hidroxirisperidona (9-RispOH). Os estudos foram conduzidos por eletroforese capilar e após 168 horas de incubação foi possível obter um excesso enantiomérico de aproximadamente 80 % para (–)-9-

RispOH. Hilário et al., (2012) avaliaram a capacidade de diversos fungos no metabolismo enantiosseletivo do albendazol. As análises foram conduzidas por cromatografia líquida de alta eficiência e foram monitorados os metabólitos albendazol sulfóxido (fármaco comercializado com o nome de ricobendazol) e albendazol sulfona. Os fungos *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67), *Pestalotiopsis foedans* (VR8), *Papulaspora immerse* Hotson (SS13) e *Mucor rouxii* NRRL 1894 foram capazes de metabolizar enantiosseletivamente o albendazol em seu metabólito ativo, albendazol sulfóxido. Entre esses fungos, o *Mucor rouxii* foi capaz de metabolizar o fármaco em seu metabólito ativo com um excesso enantiomérico de 80 % para (+)-ASOX após 144 horas de incubação. Além disso, mostrou uma eficiência de biotransformação de aproximadamente 80%, sendo que quase todo o albendazol foi consumido do meio fermentativo após esse período.

Durante o processo de biotransformação, uma pequena quantidade do fármaco é adicionada junto ao meio de cultura e ao micro-organismo. Após o período de incubação, o fungo poderá ter metabolizado total ou parcialmente o fármaco, e formado diversos metabólitos. Devido à complexidade desse extrato, a análise do fármaco e metabólitos requer uma técnica de preparação de amostra seletiva e capaz de pré-concentrar os analitos, de forma a obter uma alíquota que represente a amostra original. O principal objetivo do preparo de amostra é promover a máxima extração dos analitos e a mínima extração dos interferentes. Este trabalho empregou uma técnica miniaturizada de preparo de amostra, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), e como técnica de análise e separação dos enantiômeros a eletroforese capilar.

1.3. Técnica de Preparo de amostra: Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

As técnicas de preparo de amostra tradicionalmente empregadas são a extração líquido-líquido (LLE - *Liquid-Liquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*); no entanto, estas técnicas consomem grande volume de solvente orgânico. Atualmente as tendências apontam para o emprego de técnicas de extração miniaturizadas, visando atingir maior seletividade e redução no consumo de solventes orgânicos. Neste sentido destacam-se a microextração em fase sólida (SPME - *Solid Phase Microextraction*), a microextração em fase líquida

empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME – *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*), a extração sortiva em barras de agitação (SBSE – *Stir Bar Sorvente Extraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME - *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (ALBUQUERQUE; BORTOLETO; DE OLIVEIRA, 2013)

A DLLME, desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores, é baseada na formação de um sistema ternário de solventes (REZAEI et al., 2006). Uma mistura de solvente extrator e solvente dispersor é rapidamente injetada na amostra aquosa, formando um estado de elevada turbulência denominado “ponto nuvem”. Neste estado, são formadas microgotas de solvente dispersor e extrator que se dispersam por toda amostra aquosa. Estas microgotas garantem uma extensa área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator, favorecendo a partição do analito para a fase extratora. Após essa etapa, a solução é centrifugada, as microgotas se depositam no fundo do tubo e são então coletadas com o auxílio de uma microseringa. Esta fase sedimentada pode ser injetada diretamente no equipamento de análise ou pode ser evaporada e redissolvida em outro solvente mais adequado para posterior análise (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; CALDAS, et al., 2011).

A DLLME apresenta diversas vantagens como rapidez, baixo custo, simplicidade de operação, reduzido consumo de solvente orgânico, alto fator de enriquecimento, e quando comparada às demais microtécnicas de extração, apresenta altos valores de recuperação. Além disso, é compatível com os métodos analíticos convencionais (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

Em DLLME, o tempo de extração é o intervalo entre a injeção da mistura de solvente dispersor e solvente extrator e a centrifugação. Devido à elevada superfície de contato entre o solvente extrator e a amostra, a transferência do analito da fase aquosa para a fase orgânica é rápida, e o estado de equilíbrio é atingido quase que instantaneamente, sendo a centrifugação a etapa que consome mais tempo (MARTINS et al., 2012).

O desenvolvimento de um método de extração por DLLME depende essencialmente do tipo e volume de solvente extrator e de solvente dispersor. Outros parâmetros podem influenciar a eficiência da extração, e podem ser otimizados, como pH da amostra e adição de sal na amostra (ZGOTA-GRZESKOWIAK; GRZESKOWIAK, 2011).

Figura 2. Esquema da microextração líquido-líquido dispersiva. (A) Amostra aquosa em um tubo de ensaio; (B) Injeção da mistura de solventes extrator e dispersor na amostra com o auxílio de uma microseringa, formando o ponto nuvem e ocorrendo a partição do analito da amostra para o solvente extrator; (C) Centrifugação da mistura; (D) Retirada da fase sedimentada enriquecida com o analito de interesse; (E) Transferência da fase sedimentada para um frasco para posterior análise (Adaptado de Caldas et al., 2011)

A escolha do solvente extrator é o parâmetro mais importante no desenvolvimento do método. O solvente extrator deve possuir baixa solubilidade na amostra, preferencialmente densidade maior que a água para que se deposite no fundo do tubo e ter afinidade para extrair o analito. Além disso, deve possuir baixa pressão de vapor e alta temperatura de ebulição para evitar perdas (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; MARTINS, et al., 2012). A escolha de solvente extrator com maior densidade que a água limita o número de solventes compatíveis para este método. Para superar este inconveniente, pesquisadores desenvolveram alternativas para utilização de solventes de baixa densidade, como a DLLME com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO - *Solidification of a Floating Organic Drop*) (LEONG; FUH; HUANG, 2014). O volume de solvente extrator deve ser o menor volume capaz de extrair o analito, obtendo-se um alto fator de enriquecimento (E) (Equação 1):

$$E = \frac{V_d.R}{100.V_{org}} \quad [1]$$

Onde: V_d é o volume de fase doadora; V_{org} é o volume de fase orgânica e R é a recuperação.

A escolha do solvente dispersor é fundamentada em sua solubilidade tanto no solvente extrator quanto na amostra aquosa, para permitir a dispersão do solvente extrator na fase aquosa. Assim como o solvente extrator, também é desejável que tenha baixa pressão de vapor e alta temperatura de ebulição (MARTINS et al., 2011). O volume de solvente dispersor afeta diretamente a formação do ponto nuvem, o grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa, e consequentemente, influencia a eficiência da extração. A variação no volume de solvente dispersor altera também o volume de fase sedimentada (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

Outro parâmetro que deve ser avaliado é o pH da fase doadora para os casos de analitos ionizáveis. O ajuste no valor de pH deve ser feito de acordo com as características do analito (ácido ou básico). Quando o analito está em sua forma ionizada, é mais solúvel em água. O controle do pH deve ser feito para garantir que o analito permaneça em sua forma neutra, diminuindo sua solubilidade em água e aumentando na fase extratora (ZGOŁA- GRZÉSKOWIAK; GRZÉSKOWIAK, 2011).

A influência da força iônica também deve ser investigada. A adição de sais à amostra provoca o efeito *salting-out*, o que diminui a solubilidade dos analitos na fase aquosa. As moléculas de água da fase doadora passam a hidratar também os íons dos sais adicionados, reduzindo a solubilidade dos analitos polares na fase aquosa por competição. O aumento na concentração de sais também aumenta o volume de fase sedimentada, devido a redução da solubilidade do solvente na amostra. Este parâmetro irá variar de acordo com a característica de cada analito (MARTINS et al., 2012)

A DLLME assistida surgiu recentemente como uma opção para melhorar a extração dos analitos, e são elas: a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (USADLLME - *Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex (VADLLME - *Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*). A

USADLLME difere da DLLME convencional, pois pode não utilizar solvente dispersor. A energia do ultrassom é aplicada como meio de promover a dispersão do solvente extrator, formando uma emulsão. O analito é então extraído para a fase orgânica. Depois, como na DLLME convencional, a amostra é centrifugada e a fase sedimentada é coletada para ser analisada. Contudo, o uso do ultrassom pode ocasionar alguns problemas, como degradação do analito, dificuldade de assegurar a uniformidade da energia aplicada e formação de emulsões estáveis, resultando em elevado tempo de centrifugação. Como alternativa, vem se destacando a VADLLME, onde a dispersão do solvente extração é aumentada pela mistura em agitadores tipo vórtex. Com esta técnica, estão eliminados os problemas de degradação dos analitos, e a dispersão formada utilizando esses agitadores é termodinamicamente instável, o que significa que a fase sedimentada é rapidamente separada (ANDRUCH et al., 2013).

1.4. Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (CE - *Capillary electrophoresis*) é uma técnica analítica de separação introduzida em 1981 por Jorgenson e Lukacs (JORGENSEN *et al*, 1981). A separação em CE ocorre no interior de um capilar, normalmente de sílica (10-75 μm de diâmetro interno e 30 a 60 cm de comprimento total) preenchido com uma solução de eletrólitos (aquoso ou orgânico) e sujeito a um elevado campo elétrico (tipicamente 5-30 kV). Os analitos são separados de acordo com a diferença em suas mobilidades na solução de eletrólitos de análise. O equipamento de CE é composto de um par de eletrodos, um capilar, uma fonte de alta tensão, um sistema para introdução da amostra e um detector. A detecção pode ser on-line (UV/DAD, espectrofotômetro, espectrofluorímetro e eletroquímico) ou off-line (espectrometria de massas) (ESPADA; MOLINA-MARTIN, 2012). Em CE, a migração dos analitos depende de duas forças: a mobilidade eletroforética do analito e o fluxo eletrosmótico da solução.

A mobilidade eletroforética (μ_{ef}) é o movimento dos íons sob a influência de um campo elétrico. É dependente do tamanho do íon e do número de cargas. Quando considerada apenas a ação da mobilidade eletroforética, a migração dos íons ocorre de acordo com suas cargas, os cátions migram em direção ao cátodo

(eletrodo negativo), os ânions migram em direção ao ânodo (eletrodo positivo) e analitos neutros não apresentam mobilidade, portanto, não migram. Para íons de mesmo tamanho, os que apresentarem maior número de cargas terão maior mobilidade eletroforética, enquanto que para íons de mesmo número de cargas, os íons menores (maior densidade de carga) terão maior mobilidade eletroforética (ALTRIA, 1996; WEINBERGER, 2000). Dessa forma, a mobilidade eletroforética pode ser definida de acordo com a Equação 2:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta.r} \quad [2]$$

Onde: μ_{ef} é mobilidade eletroforética, q é o número de cargas, η é viscosidade da solução e r é o raio do íon.

A velocidade eletroforética, ou velocidade dos íons, é dependente de sua mobilidade eletroforética e do campo elétrico a que está submetido, de acordo com a Equação 3:

$$V = \mu_{ef} . E \quad [3]$$

Onde: V é a velocidade do íon e E é o campo elétrico aplicado (V/cm).

O fluxo eletrosmótico (EOF) é o movimento da solução no capilar sob a influência de um campo elétrico. O fluxo eletrosmótico ocorre devido a ionização dos grupos silanóis no interior do capilar de sílica quando em contato com o eletrólito de análise. Os silanóis (SiOH) apresentam hidrogênio ácido, com pKa de aproximadamente 5. Em valores de pH elevados ($\text{pH} > 5$), ocorre a desprotonação deste silanóis, resultando em cargas negativas na superfície do capilar (SiO^-). Para manter a neutralidade, os cátions presentes na solução migram em direção à parede do capilar, formando uma dupla camada de cátions, uma fixa e uma móvel. Estes cátions estão solvatados por moléculas de água, e quando uma diferença de potencial é aplicada, esses cátions migram em direção ao cátodo, causando um

fluxo da solução ao longo do capilar (ALTRIA, 1996). A magnitude do fluxo eletrosmótico pode ser expressa pela Equação 4:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad [4]$$

Onde: μ_{EOF} é a mobilidade eletrosmótica, ε é a constante dielétrica do meio, η é viscosidade da solução e ζ é o potencial Zeta.

O fluxo eletrosmótico é dependente do pH do meio e da concentração do eletrólito de análise. Quanto maior o pH, maior a densidade de cargas dos silanóis (medido pelo potencial Zeta) e maior o EOF. Com o aumento da concentração do eletrólito de análise, menor é o EOF, pois diminui o potencial Zeta (ALTRIA, 1996).

A existência do fluxo eletrosmótico permite, em uma mesma corrida eletroforética, realizar a separação de analitos com diferentes cargas (cátions e ânions). A separação pode ser entendida como uma soma das influencias da mobilidade eletroforética do analito e do fluxo eletrosmótico da solução, de acordo com a Equação 5, em que μ_A é a mobilidade aparente:

$$\mu_A = \mu_{ef} + \mu_{EOF} \quad [5]$$

A Figura 3 apresenta um esquema da influencia do fluxo eletrosmótico e da mobilidade eletroforética na análise de cátions, ânions e moléculas neutras. Para os cátions, o fluxo eletrosmótico e a mobilidade eletroforética apresentam o mesmo sentido (em direção ao cátodo). Desta forma, a mobilidade aparente de cátions é a somatória das duas mobilidades ($\mu_A = \mu_E + \mu_{EOF}$). Para moléculas neutras, não há mobilidade eletroforética, então há apenas a influência do fluxo eletrosmótico ($\mu_A = \mu_{EOF}$), dessa forma, não são separadas nessa modalidade. Para ânions, mobilidade eletroforética e fluxo eletrosmótico possuem sentidos opostos. A mobilidade eletroforética aponta em direção ao ânodo, e o fluxo eletrosmótico em direção ao cátodo. A mobilidade aparente deste íon será reduzida ($\mu_A = \mu_E - \mu_{EOF}$) e a direção em que irá migrar depende da magnitude das forças. Se a mobilidade eletroforética for maior, o ânion irá migrar em direção ao ânodo. Se o fluxo eletrosmótico for maior, o ânion será arrastado em direção ao cátodo.

Figura 3. Influência da mobilidade eletroforética e do fluxo eletrosmótico na análise de cátions, ânions e moléculas neutras

Em CE, a separação de enantiômeros pode ser feita pelo método direto ou indireto. No método indireto, os enantiômeros do analito são derivatizados com um reagente enantiomericamente puro, para formar diastereoisômeros, que podem ser separados por CE convencional. A separação direta refere-se ao uso de seletos quirais adicionados ao eletrólito de análise. Neste caso, formam-se diastereoisômeros transitórios entre o seletor quiral e o enantiômero do analito. Exemplos de seletos quirais são as ciclodextrinas (CDs), derivados de polissacarídeos, éteres de coroa, proteínas, antibióticos macrocíclicos entre outros (SCRIBA, 2012). Entre esses será dada maior ênfase as CDs, pois essas são empregadas com maior frequência.

As CDs são oligossacarídeos que consistem de unidades de D-glicose conectadas por ligações α (1 $\rightarrow$ 4). São produzidas pela digestão do amido por diversas bactérias, como a *Bacillus strains*. As CDs diferem no número de unidade de glicose: (i) α -CD é composta por seis moléculas de glicose, (ii) β -CD é composta por sete e a (iii) γ -CD é composta por oito moléculas. As CDs podem ser classificadas de acordo com sua origem ou os grupamentos químicos presentes em sua estrutura. Dessa forma existem as CDs: nativas, catiônicas, aniônicas, neutras e anfóteras (SCRIBA, 2012).

As CDs apresentam o formato semelhante a um cone truncado, com uma cavidade mais hidrofóbica em seu interior e regiões mais hidrofílicas em sua parte externa. A formação do complexo diastereoisomérico entre a CD e o enantiômero ocorre com a inserção dos grupos hidrofóbicos do analito dentro da cavidade da CD, deslocando as moléculas de solvente. Acredita-se que a inserção do enantiômero na cavidade da CD seja dirigida por interações hidrofóbicas além dos fatores estéricos. Em ciclodextrinas quimicamente modificadas podem ocorrer outras interações, como iônicas para o caso de CDs carregadas, ou interações π - π para as CD com substituintes aromáticos (SCRIBA, 2012). A resolução dos enantiômeros é baseada em um equilíbrio de complexação e pode ser descrito de acordo com a Equação 6 (De OLIVEIRA, 2011):

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S \frac{\mu_f + \mu_{cR}[C]}{1 + K_R[C]} - \frac{\mu_f + \mu_{cS}K_S[C]}{1 + K_S[C]} \quad [6]$$

Onde: μ_R e μ_S são as mobilidades observadas dos enantiômeros R- e S-, respectivamente; μ_f é a mobilidade dos enantiômeros não-complexados; K_R e K_S são as constantes de equilíbrio de complexação dos enantiômeros R- e S- com o seletor quiral, respectivamente; μ_{cR} e μ_{cS} são as mobilidades dos respectivos complexos diastereoisoméricos temporários entre o seletor quiral e os enantiômeros R- e S-; e $[C]$ é a concentração do seletor quiral.

Enquanto as mobilidades dos enantiômeros livres são iguais, a separação pode ocorrer devido a diferenças nas constantes de complexação ($K_R \neq K_S$) e/ou a mobilidade dos complexos formados podem ser diferentes. Considerando a separação baseada nas diferenças das constantes de complexação, as mobilidades dos analitos livres e complexados devem ser diferentes para que ocorra a separação dos enantiômeros (De OLIVEIRA, 2011).

Algumas das vantagens da CE em análises enantiosseletivas é a simplicidade da técnica, fácil automação, versatilidade, alto número de seletos quirais disponíveis, baixo custo operacional e ausência na geração de resíduo químico. Além disso, as análises apresentam alta eficiência com elevados número de pratos (PIÑERO et al.; 2011).

1.5. Análise enantiosseletiva da ZO e metabólitos em matrizes biológicas

Há diversos métodos descritos na literatura para análise da ZO e seus metabólitos *N*-Des e *N*-Ox em matrizes biológicas (LELIBOUX; FRYDMAN; GAILLOT, 1987; NIROGI; KANDIKERE; MUDIGONDA, 2006; MISTRI et al., 2008), no entanto, poucos métodos são enantiosseletivos (FERNANDEZ et al., 1993; HEMPEL; BLASCHKE, 1996; TONON; JABOR; BONATO, 2011).

O primeiro relato de análise enantiosseletiva da ZO e seus metabólitos foi feito por Fernandez et al., em 1993. Eles realizaram a análise da ZO, *N*-Des e *N*-Ox em urina por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma análise sequencial aquiral-quiral (uma coluna aquiral composta de cianopropil e uma coluna com fase estacionária quiral composta de derivado de carbamato de celulose) e empregando detecção por fluorescência. Os limites de quantificação foram de 10 ng mL⁻¹ para a zopiclona, 15 ng mL⁻¹ para *N*-Des e 10 ng mL⁻¹ para o *N*-Ox, e tempo total de análise de 56 minutos (FERNANDEZ et al., 1993).

Tonon, Jabor e Bonato descreveram um método enantiosseletivo para análise da ZO e seus metabólitos em plasma de rato utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). A análise quiral foi realizada empregando uma coluna Chiralpak AD-RH[®] e fase móvel composta etanol: metanol: acetonitrila (50: 45: 5, v/v/v) acrescido de 0,025% de dietilamina. O limite de quantificação atingido foi de 7,5 ng mL⁻¹ para cada enantiômero, e o tempo total de análise foi de 14 minutos (TONON; JABOR; BONATO, 2011).

Foi relatado por Hempel e Blaschke, em 1996, a primeira análise enantiosseletiva da zopiclona e seus principais metabólitos (*N*-Des e *N*-Ox) por eletroforese capilar, utilizando urina como matriz biológica. A separação foi realizada em capilar de sílica fundida de 50 µm de diâmetro interno e 40 cm de comprimento efetivo. Como eletrólito de análise foi empregado solução tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 2,75 acrescida de 16,3 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina como seletor quiral. O tempo total de análise foi de 17 minutos e o limite de detecção foi de 6 ng mL⁻¹ para cada enantiômero (HEMPEL; BLASCHKE, 1996).

Todos os métodos acima descritos utilizaram extração líquido-líquido como técnica de preparo de amostra, e não há relatos na literatura do uso de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra para a extração da ZO e seus metabólitos de

qualquer tipo de matriz. O presente trabalho é dedicado ao desenvolvimento de uma técnica de separação enantiosseletiva da ZO e seus metabólitos *N*-Des e *N*-Ox empregando eletroforese capilar e, como técnica de preparo de amostra, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) utilizando meio de cultura líquido como matriz.

Objetivos

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma nova metodologia analítica e avaliar a capacidade de fungos em biotransformar estereosseletivamente a zopiclona em seu metabólito quiral e ativo *N*-desmetilzopiclona. Para isso, foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- a) Desenvolvimento de um método analítico empregando a eletroforese capilar para análise enantiosseletiva da zopiclona e seus metabólitos *N*-desmetilzopiclona e zopiclona-*N*-óxido;
- b) Desenvolvimento de uma metodologia de preparo de amostra empregando a microextração líquido-líquido dispersiva para extração da zopiclona e *N*-desmetilzopiclona de meio de cultura líquido;
- c) Validação do método analítico para quantificação da zopiclona e *N*-desmetilzopiclona em meio de cultura líquido e posterior estudo de biotransformação.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Otimização da separação enantiomérica da ZO e seus metabólitos

3.1.1. Materiais

3.1.1.1. Equipamentos e acessórios

A separação enantiosseletiva do fármaco e seus metabólitos foi realizada em um equipamento de eletroforese capilar, marca Beckman Coulter, modelo P/ACE MDQ (Fullerton, CA, EUA), equipado com amostrador automático com controle de temperatura, detector por arranjo de diodos e software 32 Karat[®] para aquisição e processamento de dados.

Para o preparo das soluções tampão, os constituintes foram pesados em uma balança analítica Ohaus, modelo Adventurer (Pine Brook, NJ, EUA) e o pH foi aferido em um peagômetro da marca Thermo, Orion 420 A+ (Waltham, MA, EUA). Para dissolução e degaseificação de soluções foi utilizado um ultrassom da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, SP, Brasil). Para homogeneização das amostras, utilizou-se um agitador tipo “vórtex” da marca Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil). Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q plus da *Millipore Corporation* (Bedford, MA, EUA). Todas as soluções utilizadas nas análises por CE foram filtradas em filtro Millex-HA (0,45 µm) da *Millipore Corporation* (Bedford, MA, EUA).

3.1.1.2. Reagentes, solventes e capilar

O fármaco *rac*-zopiclona foi gentilmente cedido por Arrow Farmacêutica LTDA (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O metabólito *rac*-zopiclona-*N*-óxido foi obtido da U. S. Pharmacopeia (Rockville, Maryland, EUA) e o metabólito *rac*-*N*-desmetilzopiclona foi obtido da Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canadá). A mirtazapina, usada como padrão interno, foi gentilmente cedida pela Sanofi/Winthropi Pharmaceuticals (New York, NY, EUA). A solução-padrão de zopiclona foi preparada em acetonitrila na concentração de 1000 µg mL⁻¹, enquanto que as solução de *N*-desmetilzopiclona e zopiclona-*N*-óxido foram preparadas em

acetonitrila na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução de mirtazapina foi preparada em metanol na concentração $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C em tubo de vidro âmbar.

Para o preparo das soluções tampão foram utilizados fosfato monossódico anidro (Synth, Diadema, SP, Brasil) e ácido fosfórico (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil), todos grau analítico. Para o condicionamento do capilar foi utilizado hidróxido de sódio (Mallinckrodt Baker, Xalostoc, Edo. de Méx., México). A acetonitrila, grau HPLC, utilizada para na dissolução do fármaco e metabólitos foi obtida Panreac (Castellar Del Vallès, Barcelona, Espanha). Para o preparo da solução de mirtazapina foi utilizado metanol obtido da Panreac (Castellar Del Vallès, Barcelona, Espanha).

Um capilar de sílica fundida revestido externamente por poliimida (Polymicro, Phoenix, AZ, EUA), com dimensões de $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, 50 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo foi empregado nas análises.

Para a separação dos enantiômeros por eletroforese capilar foram avaliadas as seguintes ciclodextrinas:

- ❖ α -ciclodextrina (α -CD), obtida da Thermo Separation Products (Santa, FC, Novo México);
- ❖ β -ciclodextrina (β -CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD), α -ciclodextrina sulfatada (S- α -CD), β -ciclodextrina sulfatada (S- β -CD), todas obtidas da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
- ❖ β -ciclodextrina fosfata (PO_4 - β -CD), obtida da Cyclolab (Budapest, Pest, Hungria).

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Condicionamento do capilar

Antes do primeiro uso, os capilares novos foram condicionados por lavagem com NaOH 1 mol L^{-1} por 30 minutos e posteriormente com água ultrapura durante 30 minutos. Diariamente antes do uso, o capilar foi lavado com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 10 minutos e água ultrapura por 10 minutos. Antes de cada análise foi realizado um ciclo de pré-condicionamento no capilar, que consiste em lavar por 1 minuto com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 1 minuto com água ultrapura e 2 minutos com a solução tampão

de análise. Ao final do dia, o capilar foi lavado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 10 minutos e água ultrapura por 10 minutos. Durante a armazenagem, as pontas dos capilares foram mantidas imersas em água ultrapura.

3.1.2.2. Otimização da separação enantiomérica da ZO e seus metabólitos

Inicialmente reproduziu-se o método desenvolvido por Tonon e Bonato (2012), o qual descreve a separação enantiosseletiva por eletroforese capilar do fármaco ZO e seu metabólito *N*-Ox em amostras de comprimidos farmacêuticos. Com o objetivo de promover a separação também do metabólito *N*-Des, fez-se necessário o desenvolvimento de um novo método de análise.

Para a otimização da separação enantiosseletiva da ZO, *N*-Des e *N*-Ox por eletroforese capilar foram avaliados os seguintes parâmetros: tipo de seletor quiral (α -CD, β -CD, HP- β -CD, CM- β -CD, S- α -CD, S- β -CD e PO₄- β -CD), concentração do seletor quiral (0,5 a 1,5%), comprimento do capilar (40 e 50 cm), pH da solução tampão de análise (2,0 - 3,0), concentração da solução tampão de análise (40 - 100 mmol L⁻¹), tensão aplicada (15 - 25 kV), temperatura de análise (15 - 25°C) e tempo de injeção (5 a 13 s). Todos os experimentos foram realizados em polaridade normal. As amostras foram solubilizadas em 100 μ L de água:acetonitrila (9:1, v/v) e a introdução das mesmas foi realizada por injeção hidrodinâmica com pressão de 1 psi. O detector por arranjo de diodos foi operado em 310 nm. Os dados obtidos foram analisados empregando o programa GraphPrism versão 5.0.

3.2. Determinação da ordem de migração eletroforética dos enantiômeros

3.2.1. Materiais

Os enantiômeros dos analitos foram isolados empregando um equipamento de cromatografia líquida da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), constituído por duas bombas LC10AS, um sistema controlador SCL10A, um detector por absorção no UV-Vis SPD10A operando em 305 nm e um injetor Rheodyne modelo 7125 (Cotati, CA, EUA) com amostrador de 20 μ L. O software Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi utilizado para aquisição e processamento dos dados. A coluna utilizada foi a Chiralpak AD-RH[®] obtida da Chiral Technologies (Exton, PA, EUA).

3.2.2. Métodos

A ordem de migração dos enantiômeros da ZO, *N*-Des e *N*-Ox foi determinada pela análise dos enantiômeros puros obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições estabelecidas por Tonon, Jabor e Bonato (2011). Nesse trabalho, a separação dos enantiômeros é realizada empregando a coluna Chiralpak AD-RH[®] e fase móvel composta por etanol: metanol: acetonitrila (50: 45: 5, v/v/v) adicionado de 0,025% de dietilamina com vazão de 1,0 mL min⁻¹. Dessa forma, empregando essas condições cromatográficas, o eluato correspondente ao pico de cada enantiômero foi coletado no final da coluna analítica, a fase móvel foi evaporada e o resíduo foi solubilizado em acetonitrila. Após, cada enantiômero foi analisado isoladamente e em conjunto com a mistura racêmica nas condições descritas neste trabalho. Os tempos de migração e retenção foram comparados para determinação da ordem de migração.

3.3. Otimização do procedimento de preparação de amostra por DLLME

3.3.1. Materiais

3.3.1.1. Equipamentos e acessórios

Para o preparo das amostras por DLLME foi empregado um agitador tipo “vórtex” da marca Phoenix, modelo AP 56 (Araraquara, SP, Brasil); seringas de 1000 e 500 µL da marca Hamilton (Reno, EUA) e centrífuga da marca Hitachi, modelo CF 16RXII (Tóquio, Japão).

3.3.1.2. Reagentes e Solventes

Os solventes empregados para o desenvolvimento da DLLME foram: acetonitrila, etanol, metanol e clorofórmio, todos grau HPLC (Panreac, Castellar Del Vallès, Barcelona, Espanha), acetona grau HPLC (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), tetracloreto de carbono, grau analítico (Dinamica, Diadema, SP, Brasil), dicloro-1,2-etano, grau HPLC (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), diclorometano, grau

HPLC (Mallinckrodt Baker, Paris, KY, EUA) e isopropanol, grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Para o controle do pH da amostra utilizou-se uma solução tampão tris-HCl, constituída por tris(hidroximetil)aminometano (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) e ácido clorídrico (Synth, SP, Brasil).

3.3.2. Métodos

O procedimento de extração empregando a DLLME foi realizada em um tubo de vidro de 10 mL. Para a otimização da extração, utilizou-se 2 mL de meio de cultura líquido Czapek fortificado com 25 µL de ZO, *N*-Des e *N*-Ox todos na concentração de 100 µg mL⁻¹. Posteriormente o pH da amostra foi ajustado para 9,5 pela adição de 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹. A mistura de solvente extrator e dispersor foi rapidamente injetada na amostra com o auxílio de uma microseringa, seguido pela formação do ponto nuvem. Após, a solução foi centrifugada a 1800 x g por 5 minutos a 20°C. A fase sedimentada foi coletada com o auxílio de uma microseringa e transferida para outro tubo de vidro. Esta fase sedimentada foi evaporada sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi solubilizado em 100 µL de uma solução água: acetonitrila (9: 1, v/v) e injetado no equipamento de CE. Durante o desenvolvimento da DLLME, avaliou-se os seguintes parâmetros: tipo e volume de solvente extrator, tipo e volume de solvente extrator e agitação da amostra (DLLME assistida). Toda otimização foi realizada em triplicata e os dados foram analisados empregando o programa GraphPrism® versão 5.0.

Controles foram realizados empregando o mesmo procedimento, porém sem a adição das soluções padrão do analitos, a fim de verificar a existência de interferentes provenientes do meio de cultura Czapek.

3.4. Validação analítica

Para a validação bioanalítica foram avaliados os parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, recuperação, estabilidade e seletividade, conforme recomendado pelos guias oficiais (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

As soluções empregadas na validação foram preparadas em acetonitrila, nas concentrações de 9, 27, 150, 300, 450 e 600 µg mL⁻¹ para *rac*-ZO e nas

concentrações de 5, 15, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *rac-N-Des*. A solução de mirtazapina, padrão interno, foi preparada em metanol na concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C em tubo de vidro âmbar.

3.4.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de uma curva analítica, onde se verifica a existência de uma relação linear entre a concentração dos analitos na amostra e a resposta do equipamento. A linearidade foi realizada em triplicata e os resultados foram ponderados empregando o peso $1/x$. As curvas analíticas ($n = 3$) foram construídas fortificando 2 mL de meio de cultura líquido Czapek com ZO e *N-Des* nas concentrações de 90-6000 ng mL^{-1} e 50-1000 ng mL^{-1} para cada enantiômero, respectivamente. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação (r) e pelo teste F da Falta de Ajuste (*Lack-of-Fit*, F_{LOF}). O programa MINITAB Release versão 14.1 (State College, PA, EUA) foi utilizado para o tratamento estatístico dos resultados.

3.4.2. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas em um mesmo dia (intracorrída, $n = 5$) e em três dias diferentes (intercorrídas, $n = 3$). Cinco concentrações foram avaliadas: limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD). Dessa forma, foram empregadas amostras de meio de cultura líquido Czapek fortificadas com ZO nas concentrações de 90 (LIQ), 270 (CQB), 3000 (CQM), 4500 (CQA) e 10000 ng mL^{-1} (CQD) para cada enantiômero e *N-Des* nas concentrações de 50 (LIQ), 150 (CQB), 500 (CQM), 750 (CQA) e 1500 ng mL^{-1} (CQD) para cada enantiômero. As amostras na concentração de 10000 ng mL^{-1} para cada enantiômero da ZO e 1500 ng mL^{-1} para cada enantiômero da *N-Des* foram analisadas por procedimento de diluição (1 mL de amostra : 1 mL meio de cultura líquido Czapek). A precisão, expressa como coeficiente de variação (CV%), não admite valores superiores a 15%, e a exatidão, expressa como erro padrão relativo (E%), deve ser menor que $\pm 15\%$, exceto para os valores do limite de

quantificação, onde os valores obtidos de CV% e E% podem ser inferiores a 20% e $\pm 20\%$, respectivamente.

3.4.3. Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor concentração de cada analito na curva analítica. O LIQ foi determinado utilizando 2 mL de meio de cultura líquido Czapek fortificado com 90 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da ZO e 50 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da *N*-Des ($n = 5$). A precisão, expressa como coeficiente de variação (CV%), não admite valores superiores a 20%, e a exatidão, expressa como erro padrão relativo (E%), deve ser menor que $\pm 20\%$.

3.4.4. Recuperação

A recuperação absoluta da técnica de extração foi realizada empregando alíquotas de 2 mL de meio de cultura líquido Czapek fortificado com ZO nas concentrações de 270 (CQB), 3000 (CQM) e 4500 ng mL⁻¹ (CQA) de cada enantiômero e *N*-Des nas concentrações 150 (CQB), 500 (CQM) e 750 ng mL⁻¹ (CQA) de cada enantiômero ($n = 3$) e submetidas ao procedimento de extração por DLLME. A recuperação foi expressa em porcentagem e foi determinada pela comparação das áreas das amostras submetidas à extração com as áreas obtidas pela análise de soluções-padrão de mesma concentração sem sofrer o procedimento de extração. Além disso, o coeficiente de variação foi determinado, não admitindo-se valores superiores a 15%.

3.4.5. Estabilidade

Os estudos de estabilidade devem reproduzir as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras. O estudo de estabilidade deve ser realizado por quantificação das amostras com uma curva analítica recém-preparada. A estabilidade é comprovada quando o erro padrão relativo for inferior a 15% ($E\% \leq \pm 15\%$) comparado a concentração nominal. Para determinar a estabilidade dos analitos, alíquotas de 2 mL de meio de cultura líquido Czapek fortificadas com ZO nas concentrações de 270 (CQB) e 4500 ng mL⁻¹ (CQA) de cada enantiômero, e *N*-

Des nas concentrações 150 (CQB) e 750 ng mL⁻¹ (CQA) de cada enantiômero ($n = 3$) foram submetidas a determinadas condições descritas abaixo e avaliadas.

3.4.5.1. Ciclo de congelamento e descongelamento

Para determinar a estabilidade das amostras sob ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram congeladas a -20°C e mantidas por 12 horas, sendo então submetidas ao descongelamento a temperatura ambiente (22°C ± 2°C). Após completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas, e assim sucessivamente, e por três ciclos. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram processadas e analisadas.

3.4.5.2. Bancada por 12 horas

Para reproduzir o período de preparo de amostra, a estabilidade de bancada foi avaliada. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente (22°C ± 2°C) por 12 horas. Após este período, as amostras foram processadas e analisadas.

3.4.5.3. Condições de biotransformação

Para determinar a estabilidade nas condições do estudo de biotransformação, as amostras foram mantidas nas condições descritas no item 3.5.2.3, porém na ausência de fungos. Após o tempo previsto, as amostras foram quantificação e a estabilidade foi avaliada.

3.4.5.4. Autoinjeter por 24 horas

O estudo de estabilidade em autoinjeter por 24 horas avalia a estabilidade das amostras após serem processadas e mantidas nas condições de análise em tempo superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término do preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa. As amostras foram extraídas e armazenadas nos recipientes (*vial/s*) do autoinjeter do equipamento de eletroforese capilar a temperatura ambiente, e após 24 horas foram analisadas e a estabilidade avaliada.

3.4.6. Seletividade

A seletividade do método foi realizada comparando a análise do meio de cultura líquido estéril Czapek e o meio de cultura líquido Czapek incubado com os fungos estudados. A seletividade é comprovada quando não há interferentes que apresentem o mesmo tempo de migração dos analitos ou do padrão interno.

3.5. Estudo de biotransformação da ZO empregando fungos

3.5.1. Materiais

3.5.1.1. Equipamentos e acessórios

Para o estudo de biotransformação foi utilizada uma cabine de fluxo laminar vertical da marca Pachane, modelo PCR T2 Eco (Piracicaba, SP, Brasil), uma incubadora refrigerada de bancada do tipo “*shaker*” da marca Cientec, modelo CT-712RN (Piracicaba, SP, Brasil) e uma autoclave vertical da marca Phoenix, modelo AV 75 (Araraquara, SP, Brasil).

A fim de garantir que a quantidade de fármaco adicionada ao meio não fosse prejudicial aos fungos, um estudo de Concentração Inibitória Mínima (MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*) foi realizado. Nesse estudo utilizou-se uma placa de cultura de células de 96 poços esterilizada (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça).

3.5.1.2. Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados no estudo de biotransformação foram:

- ❖ batata dextrose ágar (BDA) (Acumedia, Lansing, MI, EUA);
- ❖ triptona de soja (Acumedia, Lansing, MI, EUA);
- ❖ extrato de malte (Acumedia, Lansing, MI, EUA);
- ❖ dextrose (Dinamica, Diadema, SP, Brasil);
- ❖ extrato de levedura (Fluka, Buch, Suíça);
- ❖ fosfato de potássio dibásico PA (Henrifarma, São Paulo, SP, Brasil);
- ❖ sacarose PA (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

- ❖ sulfato de magnésio heptaidratado PA (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- ❖ cloreto de potássio PA (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- ❖ sulfato ferroso heptaidratado PA (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- ❖ nitrato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- ❖ *N,N*-dimetilformamida (Mundial Química, SP, Brasil).

3.5.1.3. Fungos

O fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894 foi obtido como uma cortesia do Dr. C.W. Hesseltine (*Northern Utilization Research and Development Division*, ARS, USDA, Peoria, IL, EUA) e pertence à coleção de culturas de fungos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Este fungo foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Nieve A. J. C. Furtado, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Os fungos endofíticos *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason (SS67) e *Fusarium oxysporum* (SS50) foram previamente isolados da planta *Smallanthus sonchifolius*, enquanto os fungos *Penicillium crustosum* (VR4) e *Aspergillus fumigatus* (VR12) foram isolados da planta *Viguiera robusta*. Os fungos endofíticos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Mônica T. Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

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

Os fungos foram mantidos em discos de meio BDA, com 0,5 cm de diâmetro, imersos em solução estéril de glicerol 80% e armazenados a temperatura de -20 °C.

3.5.2. Métodos

3.5.2.1. Meio BDA

O meio BDA é empregado para o crescimento dos fungos em placa de Petri. A solução do meio BDA foi preparada na concentração de 39 g L⁻¹ e esterilizada em autoclave por 30 minutos. Dentro da capela de fluxo laminar, o meio foi distribuído em placas de Petri (aproximadamente 15 mL por placa) e aguardou o meio

solidificar-se. Após, os fungos em estudo foram repicados, em triplicata, e incubados a 30°C por cinco dias.

3.5.2.2. Meio Malte

O meio malte é constituído por triptona (5 g L⁻¹), dextrose (10 g L⁻¹), extrato de levedura (3 g L⁻¹) e extrato de malte (10 g L⁻¹). A solução foi preparada, esterilizada em autoclave por 30 minutos e transferida para tubos “falcon” de 50 mL (15 mL por tubo) e aguardou resfriar.

Após o crescimento dos fungos sobre a placa de Petri (etapa 3.4.2.1), três discos de 0,5 cm de diâmetro do meio de cultura com os fungos foram retirados com o auxílio de um “*Transfer Tube*” (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e inoculados assepticamente no tubo falcon de 50 mL contendo 15 mL de meio pré-fermentativo de malte e postos em um *shaker* de bancada sob agitação de 125 rpm e temperatura de 30°C por 7 dias para o crescimento dos fungos. Esta etapa foi realizada em triplicata para cada fungo.

3.5.2.3. Meio Czapek

O meio Czapek é constituído por sacarose (3%), nitrato de sódio (0,2%), fosfato de potássio (0,1%), sulfato de magnésio heptaidratado (0,05%), cloreto de potássio (0,05%) e sulfato ferroso heptaidratado (0,001%), com pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico. O meio foi esterilizado em autoclave por 30 minutos e transferido para um frasco do tipo Erlenmeyer de 250 mL (100 mL de meio por Erlenmeyer), e aguardou resfriar. Em seguida, a massa micelial formada no meio malte foi transferida assepticamente para o meio fermentativo de Czapek. Neste ponto, 3 mg de zopiclona foi dissolvida em 100 µL de *N,N*-dimetilformamida e adicionada ao meio de cultura líquido Czapek. A incubação (30°C, 120 rpm) foi realizada por 480 horas (20 dias) sendo que a cada 120 horas coletou-se uma alíquota de 5 mL do fluído da cultura assepticamente o qual foi posteriormente armazenado a -20°C até o momento da análise.

Paralelamente aos estudos de biotransformação foram realizados controles contendo: somente o meio de cultura e o fungo em análise e somente o meio de cultura e o fármaco sem a presença do fungo em análise.

Para avaliar a capacidade de metabolizar enantiosseletivamente o fármaco, foi calculado o excesso enantiomérico, de acordo com a Equação 7, abaixo:

$$ee = \frac{(A - B) \cdot 100}{A + B} \quad [7]$$

O excesso enantiomérico (ee) é definido como a diferença nas concentrações (ou áreas dos sinais) do enantiômero majoritário (A) e o enantiômero minoritário (B), dividido pela soma das duas concentrações (área do sinal), vezes cem.

A fim de avaliar a formação do metabólito *N*-Des de acordo com o tempo de biotransformação, foi construído um gráfico de concentração de cada enantiômero da *N*-Des *versus* o tempo de incubação.

3.5.2.4. Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima foi avaliada a fim de verificar se a concentração de zopiclona utilizada não apresenta efeito inibitório para os fungos estudados. Após o crescimento dos fungos em placa de Petri com o meio BDA, adicionou-se 5 mL de meio Czapek para a raspagem do micélio, a fim de se obter uma suspensão de células do fungo. Em um frasco tipo eppendorf preparou-se uma solução de zopiclona 800 µg mL⁻¹ em meio de cultura líquido Czapek.

Primeiramente adicionou-se 100 µL de meio de cultura Czapek em uma fileira de poços de uma placa de 96 poços, em seguida adicionou-se 100 µL da solução do fármaco no primeiro poço, e foram realizadas diluições seriadas 1:1 nos demais poços da fileira. Ao final, adicionou-se mais 80 µL de meio de cultura líquido Czapek e 20 µL da suspensão de células do fungo em todos os poços da fileira. Dessa forma, foram avaliadas concentrações de 200 µg mL⁻¹ até 97,7 ng mL⁻¹. Cada fileira representa a avaliação para uma espécie de fungo.

Paralelamente, foram realizados os controles de esterilidade do meio de cultura Czapek, o controle positivo de crescimento dos fungos e o controle de esterilidade da solução de zopiclona.

A placa foi incubada por 7 dias à 30°C e a avaliação dos resultados foi realizada visualmente, comparando o meio acrescido com o fármaco e o controle

positivo de crescimento do fungo. A concentração inibitória mínima é a menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Otimização da separação enantiomérica da ZO e seus metabólitos

A eletroforese capilar é uma técnica de separação de compostos que se baseia nas diferenças das velocidades de migração, ocasionada pela mobilidade eletroforética do analito e/ou pelo fluxo eletrosmótico da solução. Para a separação enantiosseletiva, faz-se necessário utilizar um seletor quiral capaz de formar complexos diastereoisoméricos, ocasionando diferenças nos tempos de migração dos enantiômeros.

A escolha do seletor quiral, bem como sua concentração, é de grande importância no desenvolvimento do método. Além disso, outros parâmetros devem ser avaliados, como: pH e concentração da solução tampão, tensão aplicada, temperatura e comprimento do capilar.

Para a otimização da separação enantiomérica da ZO e seus metabólitos *N*-Des e *N*-Ox foram adaptadas as condições do método desenvolvido por Tonon e Bonato (2012), que apresenta separação quiral da ZO e suas impurezas (*N*-Ox e 2-amino-5-cloropiridina) em comprimidos farmacêuticos. Baseado neste trabalho, a condição eletroforética inicial utilizada foi: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescido com 1% de carboximetil-β-CD; tensão de +20 kV, temperatura do capilar 25°C e 50 cm de comprimento total.

Todo processo de otimização foi realizada focando no desenvolvimento de um método mais rápido, capaz de separar os enantiômeros do metabólito *N*-Des, o qual não havia sido separado no trabalho de Tonon e Bonato (2012) e melhor resolução entre os analitos.

4.1.1. Avaliação dos seletores quirais

Para que um seletor quiral seja eficiente, este deve satisfazer alguns requisitos, como: ser estereosseletivo e formar um complexo diastereoisomérico transitório com cada enantiômero, possuir rápida cinética de complexação, ser solúvel e estável na solução tampão de análise e ter baixa absorção na região do UV-Vis (De SANTANA et al., 2009).

As ciclodextrinas são os seletores quirais mais utilizados em eletroforese capilar devido a um conjunto de vantagens como elevada enantiodiscriminação, baixa absorção na região do UV-Vis, além da existência de CDs substituídas apresentando diferentes polaridades e solubilidades (De OLIVEIRA, 2011).

Para avaliar a separação dos enantiômeros da ZO, *N*-Des e *N*-Ox, foram escolhidas ciclodextrinas nativas (α -CD e β -CD), neutras (hidroxipropil- β -CD) e aniônicas (carboximetil- β -CD, α -CD sulfatada, β -CD sulfatada e β -CD fosfatada), bem como algumas combinações (carboximetil- β -CD + β -CD, carboximetil- β -CD + hidroxipropil- β -CD e hidroxipropil- β -CD + β -CD).

As melhores separações entre os enantiômeros foram obtidas com a CM- β -CD, a mistura de CM- β -CD + β -CD e CM- β -CD + HP- β -CD (Figura 4). No entanto, como observado por Tonon e Bonato (2012), a CM- β -CD foi o seletor quiral de escolha (Figura 4A) devido a melhor simetria dos picos, menor tempo de análise e habilidade de separar todos os enantiômeros, incluindo o metabólito *N*-Des, que não havia sido separado no trabalho acima citado.

A CM- β -CD possui grupos carboxílicos e sua carga e comportamento dependem do pH da solução de análise. Em valores de pH baixo ($\approx 2,5$), essa CD encontra-se protonada e comporta-se como CD neutra. Em valores de pH maior que 5, essa CD encontra-se completamente ionizada agindo como CD aniônica (GAITANI; De OLIVEIRA; BONATO, 2012).

Figura 4. Influência do seletor quiral na separação quiral da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25°C e 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi. (A) CM-β-CD 1%, (B) CM-β-CD 1% + β-CD 10 mmol L⁻¹, (C) CM-β-CD 1% + HP-β-CD 10 mmol L⁻¹. (1) e (3) enantiômeros da *N*-Des; (2) e (4) enantiômeros da ZO; (5) e (6) enantiômeros da *N*-Ox

4.1.2. Avaliação do comprimento do capilar

O comprimento do capilar influencia diretamente o tempo de análise em CE. Separações em capilares menores reduz o tempo de análise, visto que há um menor caminho a ser percorrido até o detector, no entanto, pode haver prejuízo na resolução devido o efeito Joule causado pelo aumento da corrente gerada (ALTRIA, 1996). Foram comparados os resultados obtidos empregando capilares de 40 e 50 cm de comprimento total (Figura 5).

Figura 5. Influência do comprimento do capilar na separação quiral da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescida de 1% de CM-β-CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25°C, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi. (A) Capilar de 50 cm de comprimento total. (B) Capilar de 40 cm de comprimento total. (1) e (3) enantiômeros da *N*-Des; (2) e (4) enantiômeros da ZO; (5) e (6) enantiômeros da *N*-Ox

Utilizando um capilar de 40 cm, foi observado redução no tempo de análise e prejuízo na resolução entre os sinais, uma vez que há um menor caminho a ser

percorrido para a separação entre os enantiômeros; além disso ocorreu também o alargamento dos sinais devido ao aquecimento Joule. Como pode ser observado na Figura 5A, a separação obtida empregando capilar de 50 cm de comprimento total mostrou-se melhor e, desta forma, este comprimento foi mantido para os estudos posteriores.

4.1.3. Avaliação do pH e concentração da solução tampão

O pH da solução tampão é um importante parâmetro a ser definido, pois relaciona-se com a ionização e o fluxo eletroforético dos analitos e com o fluxo eletrosmótico da solução (ALTRIA, 1996; WEINBERGER, 2000). Para o caso de CD ionizáveis, como a CM- β -CD, o pH influencia na carga da CD, na força de ligação e na mobilidade do complexo formado (SERVAIS; CROMMEN; FILLET, 2010).

Para determinar a faixa de pH a ser avaliado de modo a garantir a ionização dos analitos, as propriedades físico-químicas destes devem ser consideradas. O fármaco ZO e seus metabólitos apresentam características básicas, conforme demonstrado nas estruturas da Figura 6.

Figura 6. Estrutura química e valores de pK_a e logP referentes a (A) Zopiclona, (B) N-desmetilzopiclona e (C) Zopiclona-N-óxido. *Centro quiral

Os valores de pK_a e logP foram obtidos pela base de dados Scifinder WEb® utilizando as palavras chaves: *Zopiclone*, *Zopiclone N-oxide*, *N-Desmethylozopiclone*

Para garantir a protonação de compostos básicos, o pH selecionado deve ser ao menos uma unidade menor que o pK_a. Observando os valores de pK_a dos analitos, optou-se por trabalhar em pH ácido. Os seguintes valores de pH foram

avaliados: 2,0; 2,5 e 3,0, utilizando para tanto solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹.

Figura 7. Influência do valor de pH na separação da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ acrescida de 1% de CM- β -CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi. (A) pH 2,0, (B) pH 2,5, (C) pH 3,0. (1) e (3) enantiômeros da *N*-Des; (2) e (4) enantiômeros da ZO; (5) e (6) enantiômeros da *N*-Ox

A Figura 7 apresenta os eletroferogramas obtidos em cada valor de pH avaliado. A melhor resolução e simetria dos picos foi obtida em pH 2,5. Com este valor de pH, o fluxo eletrosmótico é reduzido, a CM- β -CD comporta-se uma CD neutra, enquanto que os analitos estão protonados (carga positiva) e migram em direção ao cátodo.

A concentração da solução tampão de análise geralmente varia de 5 a 200 mmol L⁻¹. Altos valores de concentrações tendem a aumentar a eficiência da separação, uma vez que favorece o empilhamento da amostra (efeito *stacking*) (MORAES et. al., 2009), no entanto, pode ocorrer o alargamento dos sinais devido ao calor gerado pelo efeito Joule (TAVARES, 1997). Em baixas concentrações, aumenta a possibilidade de solutos ficarem adsorvidos no capilar, ocasionando alargamento e distorção dos picos (TAVARES, 1997).

A migração dos analitos ocorre de forma intercalada entre os enantiômeros da ZO e do metabólito *N*-Des e a resolução torna-se crítica entre os picos do primeiro enantiômero da *N*-Des e o primeiro enantiômero da ZO e os picos do segundo enantiômero da *N*-Des e o segundo enantiômero da ZO. A concentração da solução tampão fosfato pH 2,5 foi avaliada entre 40 a 100 mmol L⁻¹ (Figura 8). Utilizando a concentração de 40 mmol L⁻¹, ocorreu resolução insuficiente entre os enantiômeros da *N*-Des e da ZO e não ocorreu a separação dos enantiômeros do metabólito *N*-Ox. Comparando os resultados obtidos variando a concentração da solução tampão de 50 a 100 mmol L⁻¹, observa-se que há pouca diferença nos valores de resolução. Desta forma, optou-se por trabalhar com 50 mmol L⁻¹ uma vez que o tempo total de análise é menor (16,5 minutos) e a corrente gerada encontra-se inferior a 90 μ A.

Figura 8. Influência da concentração da solução tampão na separação da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio pH 2,5 acrescida de 1% de CM- β -CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura de capilar 25°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi

4.1.4. Avaliação da concentração de CD

A separação dos enantiômeros ocorre devido a diferenças na constante de complexação e/ou diferenças nas mobilidades dos complexos formados (De OLIVEIRA, 2011). Para ambos os casos, a concentração de ciclodextrina exerce forte influência, o que significa que existe uma concentração ótima de ciclodextrina em que a resolução entre enantiômeros é máxima.

A concentração da CM- β -CD foi avaliada no intervalo de 0,5 a 1,25% (*m/v*) em solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5. Como pode ser observado na Figura 9, a resolução entre os enantiômeros do metabólito *N*-Ox foi fortemente prejudicada pelo aumento na concentração da CM- β -CD, enquanto que a separação entre os enantiômeros da ZO e da *N*-Des foi pouco influenciada pelo aumento na concentração dessa CD. Desta forma, a concentração de 0,5% (*m/v*) de CM- β -CD foi escolhida para os experimentos futuros, obtendo-se valores de resolução superiores a 2 entre todos os analitos.

Figura 9. Influência da concentração de CD na separação da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescida de CM-β-CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi

4.1.5. Avaliação da tensão aplicada

A tensão aplicada no sistema exerce influência sobre a velocidade eletroforética dos analitos, bem como sobre a velocidade eletrosmótica da solução, de acordo com as Equações 8 e 9, abaixo (ALTRIA, 1996):

$$V_{ef} = \mu_{ef} E \quad [8]$$

$$V_{EOF} = \mu_{EOF} E \quad [9]$$

Onde, V_{ef} é a velocidade eletroforética do analito, V_{EOF} a velocidade do fluxo eletrosmótico, μ_{ef} mobilidade eletroforética, μ_{EOF} mobilidade eletrosmótica, E é o campo elétrico aplicado.

O aumento da tensão aplicada reduz o tempo de migração dos analitos, e consequentemente aumenta a eficiência eletroforética na separação dos analitos

(Equação 10), uma vez que o maior responsável pelo alargamento da banda dos analitos é a difusão.

$$N = \frac{(\mu_{ef} + \mu_{eof}) V}{2D} \quad [10]$$

Onde, μ_{ef} é a mobilidade eletroforética, μ_{EOF} é a mobilidade eletrosmótica, V é tensão aplicada e D o coeficiente de difusão do analito.

No entanto, a tensão não pode ser elevada indiscriminadamente, pois relaciona-se com o aquecimento Joule. Neste sentido, a tensão foi avaliada de +15 a +25 kV. Os resultados obtidos e expressos na Figura 10 e na Tabela 1 corroboram com a teoria, pois conforme pode ser observado na Figura 10, o aumento na tensão aplicada não reduz significativamente a resolução entre os sinais, embora haja redução significativa no tempo de migração (Tabela 1), indicando maior eficiência. Picos mais simétricos e com menores tempos de análise foram obtidos quando empregou-se tensão de +25 kV, obtendo-se resolução superior a 1,9 entre todos os picos e tempo total de análise inferior a 12 minutos.

Figura 10. Influência da tensão aplicada na separação da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescida de 0,5% de CM-β-CD, temperatura do capilar 25°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi

Tabela 1. Influência da tensão aplicada no tempo de migração do último analito

Tensão (kV)	Tempo de migração do último analito (min)
15	23,7
18	21,4
20	19,1
23	15,5
25	11,2

4.1.6. Avaliação da temperatura do capilar

O controle da temperatura é importante para garantir a reprodutibilidade dos tempos de migração em eletroforese capilar. A separação é fortemente influenciada pela temperatura, uma vez que altera a viscosidade do sistema, influenciando o fluxo eletrosmótico da solução e a mobilidade eletroforética do analito (ALTRIA, 1996). Quanto à complexação entre a CD e o analito, trata-se de um processo exotérmico. Em temperaturas mais elevadas, o equilíbrio é deslocado contra a complexação, e temperaturas inferiores favorecem a complexação. Em temperatura reduzida há um aumento na estabilidade da constante de complexação e também na seletividade da separação, devido ao aumento da diferença entre as mobilidades de cada enantiômero (VESPALEC, 2010).

O controle da temperatura foi avaliado de 15 a 25°C (Figura 11 e Tabela 2). Em concordância com a teoria, o aumento da temperatura provoca redução na resolução, e redução no tempo de migração dos analitos. A temperatura de análise que apresentou adequada resolução entre todos os analitos em reduzido tempo de análise foi 20°C. Nesta temperatura, todas as resoluções foram superiores a 1,8 e o tempo de migração do último analito inferior a 12 minutos.

Figura 11. Influência da temperatura na separação da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescida de 0,5% de CM-β-CD, tensão aplicada +25 kV, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 1 psi

Tabela 2. Influência da temperatura no tempo de migração do último analito

Temperatura (°C)	Tempo de migração do último analito (min)
15	14,1
20	11,7
23	11,6
25	11,1

4.1.7. Avaliação da detectabilidade

A eletroforese capilar é uma técnica de separação atrativa devido a sua alta eficiência de separação, reduzido tempo de análise e baixo ou livre consumo de solventes orgânicos. No entanto, devido ao reduzido caminho ótico e pequeno volume de amostra introduzida no capilar, a detectabilidade do método pode ser insuficiente para determinar baixas concentrações (YANG et al., 2014).

A fim de aumentar a detectabilidade, o volume de amostra introduzida no capilar foi avaliado. Nesse estudo optou-se por trabalhar com a injeção hidrodinâmica devido a maior reprodutibilidade comparada com a injeção eletrocínética. A injeção hidrodinâmica consiste em aplicar uma pressão por um

determinado tempo, e a quantidade de amostra injetada pode ser calculada através da Equação 11 (ALTRIA, 1996; TAVARES, 1996):

$$V = \frac{\Delta P D^4 \pi t}{128 \eta L} \quad [11]$$

Onde, V é o volume injetado, ΔP é a diferença de pressão, D é o diâmetro interno do capilar, η é a viscosidade da solução e L o comprimento do capilar.

A injeção hidrodinâmica foi avaliada fixando a pressão aplicada em 1 psi e variando o tempo de injeção entre 5, 8, 10 e 13 segundos (Figura 12). Como pode ser observado na Figura 12, o aumento no tempo de injeção leva a uma perda da resolução. Com o objetivo de injetar uma maior quantidade de amostra, e assim aumentar a detectabilidade do método, sem perda significativa de resolução foi empregado em estudos posteriores 8 segundos como tempo de injeção. Nesse tempo, os valores de resolução entre os analitos foram superiores a 2.

Figura 12. Influência do tempo de injeção na separação da ZO, N-Des e N-Ox. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescido de 0,5% de CM-β-CD, tensão aplicada de +25 kV, temperatura do capilar 20°C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica a 1 psi

4.1.8. Efeito Joule e gráfico de Ohm

O aquecimento causado pelo efeito Joule é uma das limitações das técnicas eletroforéticas, responsável pelo prejuízo na qualidade da separação e detecção (GEIGER; HOGERTON; BOWSER, 2011). Temperaturas mais elevadas causam alargamento do pico, variação no tempo de migração e pode causar decomposição dos analitos. Para controlar o aquecimento gerado, os instrumentos de eletroforese capilar são equipados com sistemas para resfriamento do capilar (MUSHEEV; FILIPTSEV; KRYLOV, 2010).

A primeira lei de Ohm ($U = R.i$) descreve a relação linear entre a tensão aplicada e a corrente gerada. Em casos normais, o capilar da eletroforese atua como um resistor ôhmico. Desvios da lei de Ohm podem ser observados devido ao calor não dissipado gerado pelo efeito Joule. Uma forma de verificar o efeito Joule é avaliar até que faixa de tensão a lei de Ohm é obedecida (SAEVELS et al., 1999; ERIKSSON et al., 2003). Como pode ser observado na Figura 13 a tensão foi variada de +5 até +28 kV e a corrente foi monitorada. É possível observar que até +25 kV não houve desvio da lei de Ohm; desta forma, não houve calor não dissipado devido ao efeito Joule.

Figura 13. Gráfico de Ohm. Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescido de 0,5% de CM-β-CD, temperatura do capilar 20°C, capilar de 50 cm de comprimento total

4.1.9. Condições finais para análise por CE

A condição ótima para separação quiral da ZO, *N*-Des e *N*-Ox foi estabelecida usando um capilar de sílica fundida revestido externamente por uma camada de poliimida (75 μm de diâmetro interno, 42 cm de comprimento efetivo e 50 cm de comprimento total). O eletrólito de análise usado foi uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 2,5 acrescido de 0,5% (*m/v*) de CM- β -CD. A tensão aplicada foi de +25 kV e a temperatura do capilar foi 20°C. A injeção hidrodinâmica foi empregada aplicando uma pressão de 1 psi por 8 segundos. A detecção foi realizada empregando um espectrofotômetro de arranjo de diodos com comprimento de onda ajustado em 310 nm. Desta forma, uma resolução aceitável entre todos os enantiômeros foi obtida em 12 minutos de análise. A Figura 14 mostra um eletroferograma da ZO e seus metabólitos nas condições acima descritas.

Figura 14. Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva da ZO, *N*-Des e *N*-Ox. Concentração dos analitos: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero. (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO; (5) (–)-(R)-*N*-Ox e (6) (+)-(S)-*N*-Ox. Resolução: $Rs_{1,2} = 2,06$; $Rs_{2,3} = 3,24$; $Rs_{3,4} = 2,06$; $Rs_{4,5} = 5,32$; $Rs_{5,6} = 8,11$

Para avaliar a reprodutibilidade do tempo de migração dos analitos, várias injeções foram realizadas sequencialmente usando o mesmo eletrólito de análise. Valores aceitáveis de coeficiente de variação ($CV < 2\%$) para o tempo de migração dos analitos foram obtidos até a sexta injeção. Após a sexta injeção, o reservatório da solução tampão foi substituído.

A ordem de migração dos enantiômeros da ZO, *N*-Des e *N*-Ox foi estabelecida pela análise dos enantiômeros puros obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições estabelecidas por Tonon, Jabor e Bonato (2011). Após coleta dos enantiômeros por HPLC, a fase móvel foi evaporada, o resíduo foi solubilizado em água: acetonitrila (9: 1, v/v) e os mesmos foram injetados nas condições eletroforéticas otimizadas nesse trabalho. Posteriormente, os tempos de retenção e migração foram comparados. Após comparação, foi possível concluir que o primeiro pico corresponde ao (–)-(R)-*N*-Des; o segundo ao (–)-(R)-ZO; o terceiro ao (+)-(S)-*N*-Des; o quarto ao (+)-(S)-ZO; o quinto ao (–)-(R)-*N*-Ox e o sexto pico ao (+)-(S)-*N*-Ox (Figura 14).

O método eletroforético descrito por Tonon e Bonato (2012) apresenta menor tempo de análise (8 minutos) comparado com o presente método, no entanto, não é capaz de separar os enantiômeros do metabólito *N*-Des. Outro trabalho descreve a análise enantiosseletiva da ZO, *N*-Des e *N*-Ox por eletroforese capilar em amostras de urina (HEMPEL; BLASCHKE, 1996). Neste trabalho, a separação quiral foi realizada utilizando β -CD como seletor quiral em solução tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 2,75. Entretanto, o tempo de análise é maior, 16 minutos. Portanto, o método descrito no presente trabalho é o mais rápido para análise enantiosseletiva da ZO e seus metabólitos, incluindo os métodos descritos por HPLC e LC-MS (FERNANDEZ et al., 1993; TONON; JABOR; BONATO, 2011).

4.2. Otimização do procedimento de preparo de amostra por DLLME

A microextração líquido-líquido dispersiva consiste em injetar rapidamente uma mistura de solvente extrator e solvente dispersor em uma amostra aquosa. Nesta etapa, o solvente extrator é disperso na amostra em microgotas com o auxílio do solvente dispersor, formando o chamado “ponto nuvem”, condição que facilita a partição dos analitos para a fase extratora (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). A eficiência da DLLME depende dos seguintes parâmetros: tipo e volume de solvente extrator, tipo e volume de solvente dispersor e agitação.

Até o momento, não há relatos na literatura sobre a extração da ZO e seus metabólitos *N*-Des e *N*-Ox por DLLME em qualquer tipo de matriz. As condições iniciais de extração foram: 2 mL de meio de cultura líquido Czapek fortificado com ZO, *N*-Des e *N*-Ox na concentração de 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2 mL de solução tampão tris-

HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5, formação do ponto nuvem com a mistura de 100 µL de solvente extrator e 500 µL de solvente dispersor. Todas as extrações em cada etapa de otimização foram realizadas em triplicata, juntamente com a extração do meio de cultura sem os analitos, para avaliar a existência de interferentes com o mesmo tempo de migração dos analitos.

O pH da fase doadora deve ser ajustado para manter os analitos em suas formas neutras e facilitar a partição destes para a fase extratora (HU; WU; FENG, 2010). O pH foi ajustado de acordo com as características físico-químicas dos analitos. A ZO, *N*-Des e *N*-Ox apresentam características básicas, com pK_a variando de 4,92 a 8,26 (Figura 6). Por esta razão, o pH foi fixado em 9,5 utilizando tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, o que garante que todos os analitos não estejam ionizados.

4.2.1. Avaliação dos solventes extrator e dispersor

A escolha do solvente extrator é o parâmetro mais importante no desenvolvimento da DLLME. Este deve ser preferencialmente mais denso que a água, ter capacidade de solubilizar o analito de interesse, apresentar baixa miscibilidade com a amostra aquosa e baixa pressão de vapor (MARTINS et al., 2012; YAN; WANG, 2013). A escolha do solvente dispersor deve ser feita com base em sua miscibilidade com a amostra aquosa e com o solvente extrator, e também deve apresentar baixa pressão de vapor (MARTINS et al., 2012; YAN; WANG, 2013). Foram avaliados os seguintes solventes extratores (clorofórmio, diclorometano, dicloro-1,2-etano e tetracloreto de carbono) e dispersores (acetona, acetonitrila, metanol, etanol e isopropanol).

Para a escolha do melhor par de solventes extrator/dispersor, foram avaliadas todas as combinações possíveis (20 combinações) entre os solventes avaliados. Na Figura 15 estão representados os valores de área dos analitos referentes às extrações realizadas. O par tetracloreto de carbono/acetona não formou fase sedimentada. As demais combinações que não estão representadas na Figura 15 não foram capazes de extrair os analitos.

Figura 15. Avaliação da combinação de solventes extrator/dispersor na extração da ZO e *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek. A: Dicloroetano / Etanol; B: Dicloroetano / Metanol; C: Clorofórmio / Metanol; D: Dicloroetano / Acetonitrila; E: Diclorometano / Acetonitrila; F: Dicloroetano / Acetona; G: Diclorometano / Acetona; H: Clorofórmio / Acetona. Condições de extração: 2 mL de amostra, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5, 200 µL de solvente extrator, 500 µL de solvente dispersor e 5 minutos de centrifugação a 1800xg a 20°C

O metabólito *N*-Ox apresenta maior polaridade devido a oxidação ocorrida no nitrogênio da piperazina ($\log P = 1,241$) (Figura 6), por esta razão, apresenta menor miscibilidade em solventes orgânicos. Como pode ser observado na Figura 15, não houve combinação de solvente extrator e dispersor capaz de extrair o metabólito *N*-Ox. De acordo com os resultados expressos na Figura 15, a melhor extração para a ZO e *N*-Des foi obtida com a combinação de metanol como solvente dispersor e clorofórmio como solvente extrator. Desta forma, o par clorofórmio/metanol foi selecionado para os experimentos futuros.

Esforços maiores não foram realizados para extração desse metabólito pois o objetivo desse trabalho é avaliar o potencial de fungos em metabolizar a ZO em seu metabólito ativo *N*-Des.

4.2.2. Avaliação do volume de solvente dispersor

O volume de solvente dispersor relaciona-se com a formação do ponto nuvem, pois ajuda na dispersão do solvente extrator, mas também influencia no volume de fase sedimentada (KIAROSTAM et al., 2014). Para avaliar este efeito,

variou-se o volume de metanol de 200 a 700 μL , mantendo fixo o volume de 200 μL de clorofórmio.

Com reduzido volume de solvente dispersor (200 μL) houve dificuldade na formação do ponto nuvem, e uma dispersão ineficiente do solvente extrator prejudicou a extração. Com maiores volumes (600 e 700 μL) houve um excesso de solvente dispersor, e este favoreceu a solubilização do solvente extrator e dos analitos na amostra, reduzindo a eficiência de extração. A melhor recuperação ocorreu com 300 μL de metanol, pois este foi o menor volume que resultou em elevados valores de área dos analitos com menores desvios (Figura 16).

Figura 16. Avaliação do volume de solvente dispersor (metanol) na extração da ZO e N-Des de meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: 2 mL de meio de cultura líquido Czapek, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L^{-1} pH 9,5; 200 μL de solvente extrator (clorofórmio) e 5 minutos de centrifugação a 1800xg a 20°C

4.2.3. Avaliação do volume de solvente extrator

O volume de solvente extrator deve ser o menor possível capaz de assegurar a extração dos analitos, obtendo-se um alto fator de enriquecimento (KIAROSTAM et al., 2014). Com 300 μL de solvente dispersor (metanol), avaliou-se o volume de solvente extrator (clorofórmio) de 50 a 300 μL .

A extração realizada utilizando apenas 50 μL de clorofórmio apresentou baixa eficiência, devido ao reduzido volume de fase sedimentada, o que dificultou sua coleta. A extração realizada com maior volume de solvente extrator (300 μL) demonstrou uma pequena redução nos valores de área dos analitos comparado com os resultados obtidos com 100 e 200 μL , pois o volume de solvente dispersor empregado (300 μL) não foi suficiente para formar um ponto nuvem eficaz, perdendo a eficiência de extração (MARTINS et al., 2012). Com base nos resultados apresentados na Figura 17, optou-se por empregar 100 μL de clorofórmio, uma vez que foi o menor volume capaz de realizar a extração eficiente dos analitos.

Figura 17. Avaliação do volume de solvente extrator (clorofórmio) na extração da ZO e N-Des de meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: 2 mL de meio de cultura líquido Czapek, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5; 300 μL de solvente dispersor (metanol) e 5 minutos de centrifugação a 1800 $\times$ g a 20°C

4.2.4. Avaliação da agitação (DLLME assistida)

Após a injeção da mistura de solventes extrator/dispersor na amostra aquosa, as microgotas de solvente extrator são formadas com a ajuda do solvente dispersor para favorecer um extensivo contato entre a fase doadora e a fase aceptora

(REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). Para favorecer a partição dos analitos para a fase aceptora e então aumentar a eficiência do processo de extração, foi desenvolvido a DLLME assistida. Este modelo de DLLME é baseado na agitação mecânica da amostra, com vórtex ou equipamento de ultrassom, após a formação do ponto nuvem (MARTINS et al., 2012; ANDRUCH et al., 2013).

Baseado no exposto foi comparado a eficiência de extração nas seguintes condições: (i) apenas com a formação do ponto nuvem, (ii) formação do ponto nuvem seguido por agitação em vórtex por 10, 20 e 30 segundos, e (iii) formação do ponto nuvem seguido por exposição ao ultrassom por 10, 20 e 30 segundos.

Figura 18. Avaliação da agitação da amostra na extração da ZO e N-Des de meio de cultura líquido Czapek. Condições de extração: 2 mL de meio de cultura líquido Czapek, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5; 200 µL de solvente extrator (clorofórmio), 500 µL de solvente dispersor (metanol) e 5 minutos de centrifugação a 1800xg a 20°C. PN: Ponto nuvem; Vx: Vórtex; US: Ultrassom

Como observado na Figura 18, o uso do ultrassom não apresentou bons resultados, uma vez que a formação do ponto nuvem foi prejudicada. O uso do agitador vórtex tende a favorecer a extração pois promove maior dispersão do solvente extrator na amostra aquosa, no entanto, os resultados demonstraram que não houve melhora significativa na eficiência de extração em comparação com os valores de área obtidos somente com o emprego do ponto nuvem. Desta forma,

apenas a formação do ponto nuvem foi suficiente para garantir a eficiência do procedimento de extração.

4.2.5. Condições finais para extração por DLLME

Após a avaliação de todos os parâmetros que afetam a eficiência em DLLME, as condições finais para extração da ZO e seu metabólito *N*-Des foram: 2 mL de meio de cultura líquido Czapek, 2 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 2,5. Os solventes, extrator e dispersor foram, respectivamente, clorofórmio (100 µL) e metanol (300 µL). A extração foi realizada apenas com a formação do ponto nuvem sem necessidade de agitação mecânica. Após esta etapa, a solução foi centrifugada a 1800×g por 5 minutos a 20°C, e a fase sedimentada foi coletada, evaporada sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi solubilizado em 100 µL de uma solução de água: acetonitrila (9: 1, v/v) para posterior análise por eletroforese capilar. A Figura 19 representa uma amostra submetida à extração por DLLME nas condições otimizadas.

Figura 19. Eletroferograma representativo da análise dos enantiômeros da ZO e seu metabólito *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek após extração por DLLME. (A) Meio de cultura sem adição dos analitos (branco de matrix) (B) Meio de cultura fortificado com (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO. Condições de análise descritas no item 1.1.9

4.3. Validação analítica

Para a validação bioanalítica foram avaliados os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, recuperação, estabilidade e seletividade, conforme recomendado pelos guias oficiais (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

A validação foi realizada empregando o método de padronização interna. Nesta etapa, diversos fármacos foram avaliados para a seleção de um padrão interno, e a mirtazapina foi escolhida. A mirtazapina apresenta características físico-químicas semelhantes aos analitos, o que a torna viável para ser o padrão interno do método desenvolvido (Figura 20).

Figura 20. Estrutura química e valores de pK_a e $\log P$ da mirtazapina *Centro quiral

Os valores de pK_a e $\log P$ foram obtidos pela base de dados Scifinder WEb® utilizando a palavra chave *mirtazapine*.

Figura 21. Eletroferograma referente à análise do PI, ZO, *N*-Des e *N*-Ox. (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (–)-(R)-*N*-Des; (2) (–)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO; (5) (–)-(R)-*N*-Ox e (6) (+)-(S)-*N*-Ox

4.3.1. Linearidade

A linearidade do método foi realizada pela construção de três curvas analíticas de seis diferentes concentrações da ZO e da *N*-Des adicionadas do padrão interno. A linearidade foi estabelecida por regressão linear empregando o método dos mínimos quadrados. A linearidade foi realizada relacionando a razão das áreas dos analitos e do padrão interno (Área do analito / Área do PI) com as concentrações nominais dos analitos. A análise da regressão linear das curvas analíticas (peso 1/X) apresentou as equações lineares demonstradas na Tabela 3. As curvas analíticas foram submetidas a análise estatística (ANOVA-Lack of fit) que comprovou sua validade.

Tabela 3. Linearidade do método para análise da ZO e *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek

Analitos	Concentração (ng mL ⁻¹)	Equação linear ^a	r ^b	ANOVA	
				Lack-of-fit	
				F-valor*	p-valor
(-)-(R)-ZO	90 - 6000	$y = 0,000428x - 0,000320$	0,999	1,11	0,398
(+)-(S)-ZO	90 - 6000	$y = 0,000459x - 0,000648$	0,999	2,48	0,100
(-)-(R)- <i>N</i> -Des	50 - 1000	$y = 0,000283x - 0,007696$	0,999	0,42	0,794
(+)-(S)- <i>N</i> -Des	50 - 1000	$y = 0,000308x - 0,009262$	0,998	1,73	0,207

^{a)} Três replicatas para cada concentração.

^{b)} Coeficiente de correlação.

* F_{crítico} = 3,11.

4.3.2. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram determinadas em três corridas diferentes (intercorridas) e em uma mesma corrida (intracorrída) com cinco replicatas. Cinco concentrações foram avaliadas: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%) e a exatidão como erro padrão relativo (E%). Conforme expresso na Tabela 4, os resultados obtidos na determinação da precisão e exatidão intracorrída e intercorridas do método atenderam aos limites dispostos no guia de validação (CV% ≤ 15% e E% ≤ ±15%).

Tabela 4. Precisão e exatidão do método para análise da ZO e *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek

Analitos	Intracorrida ($n = 5$) ^a			Intercorrida ($n = 3$) ^b		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV ^c (%)	E ^d (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV ^c (%)	E ^d (%)
(-)-(R)-ZO	92,0	8	2,2	88,9	7	-8,9
	277,2	4	2,7	280,5	4	0,6
	3039,4	4	1,3	2962,4	2	-2,5
	4537,9	5	0,8	4435,9	2	-2,5
	10018,4	10	0,2	9914,3	6	0,2
(+)-(S)-ZO	93,5	12	3,9	88,9	10	-12,2
	277,3	5	2,7	283,5	3,	3,1
	3028,6	3	1,0	2929,6	3,	-4,6
	4533,3	5	0,7	4435,0	2	-2,7
	10079,5	10	0,8	9719,4	4	0,8
(-)-(R)- <i>N</i> -Des	56,9	9	13,8	53,7	5	3,6
	153,3	13	2,2	147,6	10	2,2
	517,5	13	3,5	480,8	7	-7,0
	762,6	9	1,7	750,4	6	-6,9
	1481,6	10	-1,2	1409,6	6	-4,1
(+)-(S)- <i>N</i> -Des	54,9	10	9,7	53,3	3	4,0
	158,5	14	5,7	149,2	11	5,7
	507,0	13	1,4	473,4	7	-6,2
	785,9	13	4,8	755,1	7	-7,2
	1541,7	10	2,8	1433,3	9	-2,4

^{a)} Número de replicatas para cada concentração.

^{b)} Número de dias.

^{c)} Coeficiente de variação expresso em porcentagem.

^{d)} Erro padrão relativo expresso em porcentagem.

4.3.3. Limite inferior de quantificação

Limite inferior de quantificação foi determinado como sendo a menor concentração do analito na curva analítica. Nas condições do método descrito, o limite inferior de quantificação foi de 90 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da ZO e 50

ng mL⁻¹ para cada enantiômero da *N*-Des. Os valores de precisão e exatidão obedeceram aos estabelecidos no guia de validação (CV% ≤ 20% e E% ≤ ±20%), conforme expresso na Tabela 5.

Tabela 5. Limite de quantificação do método para análise da ZO e *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek

Analitos	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração analisada (ng mL ⁻¹) ^a	CV ^b (%)	E ^c (%)
(-)-(R)-ZO	90	92,8	7	3,1
(+)-(S)-ZO	90	94,3	10	4,7
(-)-(R)- <i>N</i> -Des	50	52,3	4	4,6
(+)-(S)- <i>N</i> -Des	50	53,2	6	6,3

^{a)} Cinco replicatas.

^{b)} Coeficiente de variação expresso em porcentagem.

^{c)} Erro padrão relativo expresso em porcentagem.

4.3.4. Recuperação

A recuperação foi determinada para a ZO nas concentrações 270 (CQB), 3000 (CQM) e 4500 ng mL⁻¹ (CQA) de cada enantiômero, e *N*-Des nas concentrações 150 (CQB), 500 (CQM) e 750 ng mL⁻¹ (CQA) de cada enantiômero, em triplicata. Os valores médios de recuperação para ZO e seu metabólito *N*-Des, foi, respectivamente, 82% e 51% (Tabela 6).

Tabela 6. Recuperação do método para análise da ZO e *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek

Concentração (ng mL ⁻¹)	(-)-(R)-ZO		(+)-(S)-ZO	
	Recuperação ^a	CV ^b	Recuperação ^a	CV ^b
	(%)	(%)	(%)	(%)
270	81	4	82	2
3000	83	3	83	2
4500	84	4	84	4

Concentração (ng mL ⁻¹)	(-)-(R)- <i>N</i> -Des		(+)-(S)- <i>N</i> -Des	
	Recuperação ^a	CV ^b	Recuperação ^a	CV ^b
	(%)	(%)	(%)	(%)
150	51	7	51	5
500	52	7	51	6
750	53	7	52	9

^{a)} Três replicatas.

^{b)} Coeficiente de variação expresso em porcentagem.

4.3.5. Estabilidade

A estabilidade dos enantiômeros da ZO e da *N*-Des foi avaliada em ciclos de congelamento e descongelamento, em temperatura ambiente por 12 horas, em autoinjeter por 24 horas e nas condições de biotransformação por 20 dias. As concentrações avaliadas foram 270 (CQB) e 4500 ng mL⁻¹ (CQA) de cada enantiômero da ZO e 150 (CQB) e 750 ng mL⁻¹ (CQA) de cada enantiômero da *N*-Des. A estabilidade é comprovada quando o erro padrão relativo for inferior a 15% ($E\% \leq 15\%$) comparado com a concentração nominal. Os resultados expressos na Tabela 7 mostram que os analitos foram estáveis nas condições avaliadas.

Tabela 7. Estabilidade da ZO e *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek

Analitos	(-)-(R)-ZO		(+)-(S)-ZO		(-)-(R)-N-Des		(+)-(S)-N-Des	
Ciclos congelamento e descongelamento								
Concentração (ng mL ⁻¹)	253,6	4164,2	253,7	4161,0	150,6	854,3	155,1	821,8
Precisão (CV,%) ^a	14	8	10	9	14	2	14	7
Exatidão (E,%) ^b	-6,1	-7,5	-6,0	-7,5	0,4	13,9	3,4	9,6
Bancada por 12h								
Concentração (ng mL ⁻¹)	281,3	4376,2	282,4	4362,4	156,8	842,1	158,2	816,8
Precisão (CV,%) ^a	5	5	5	4	10	8	8	7
Exatidão (E,%) ^b	4,2	-2,8	4,6	-3,1	4,5	12,3	5,4	8,9
Shaker de bancada por 20 dias								
Concentração (ng mL ⁻¹)	234,9	3864,0	236,3	4016,1	128,1	696,6	129,5	740,2
Precisão (CV,%) ^a	10	11	7	11	5	9	4	12
Exatidão (E,%) ^b	-13,0	-14,1	-12,5	-10,8	-14,6	-7,1	-13,7	-1,3
Autoinjeter por 24h								
Concentração (ng mL ⁻¹)	272,0	4252,4	277,5	4299,9	139,2	653,4	140,1	667,2
Precisão (CV,%) ^a	2	3	1	2	9	9	10	7
Exatidão (E,%) ^b	0,7	-5,5	2,8	-4,4	-7,2	-12,9	-6,6	-11,0

^{a)} Coeficiente de variação expresso em porcentagem.

^{b)} Erro padrão relativo expresso em porcentagem.

4.3.6. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada verificando a ausência de interferentes nos tempos de migração dos analitos provenientes de amostras do meio de cultura líquido estéril Czapek sem adição dos analitos (Figura 22) e de amostras de meio de cultura Czapek incubado com os fungos empregados nos estudos de biotransformação na ausência de ZO (Figura 23).

Figura 22. Eletroferogramas representativos da análise da ZO e seu metabólito *N*-Des em meio de cultura líquido Czapek após extração por DLLME. (A) Meio de cultura Czapek sem adição dos analitos (B) Meio de cultura fortificado com (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (-)-(R)-*N*-Des; (2) (-)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO

Figura 23. Eletroferogramas representativos das amostras de meio de cultura líquido Czapek incubado com os fungos (A) *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688A, (B) *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e (C) Meio de cultura fortificado com (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (-)-(R)-*N*-Des; (2) (-)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-*N*-Des; (4) (+)-(S)-ZO

4.4. Estudo de biotransformação da ZO empregando fungos

Neste estudo foram avaliados os fungos endofíticos *Penicillium crustosum* (VR4), *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Papulaspora immersa* Hotson (SS13), *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason (SS67) e *Fusarium oxysporum* (SS50); o fungo de solo *Mucor rouxii* e fungos obtidos da ATCC® *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B, todos sob as mesmas condições de biotransformação. Previamente ao estudo de biotransformação, foi avaliado o efeito da ZO no crescimento dos fungos através do estudo da concentração inibitória mínima (MIC). Foi observado que o fármaco não exerce efeito inibitório para os fungos avaliados na concentração utilizada no estudo de biotransformação ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Os fungos foram incubados por 480 horas (20 dias), e a cada 120 horas, alíquotas de aproximadamente 5 mL do fluido do meio de cultura foram coletadas e armazenadas para posterior análise. Os resultados foram expressos em gráficos de concentração *versus* tempo de incubação.

Para a formação do metabólito *N*-Des, deve ocorrer uma reação de demetilação no nitrogênio da piperazina da ZO. Entre os fungos avaliados, o VR4, VR12, SS67, SS50 e *Mucor rouxii* não foram capazes de biotransformar a ZO nas condições avaliadas, somente os fungos do gênero *Cunninghamella* foram capaz de metabolizar a zopiclona em seu metabólito *N*-Des.

4.4.1. Fungos no gênero *Cunninghamella*

Os fungos do gênero *Cunninghamella* são capazes de metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos através de reações similares as de fase I e fase II dos mamíferos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009). Há muitos estudos que demonstram que os fungos do gênero *Cunninghamella* são capazes de realizar reações de *N*-demetilação (ZHANG et al., 1996; CHA; DOERGE; CERNIGLIA, 2001), no entanto, este é o primeiro estudo que relata uma reação de *N*-demetilação enantiosseletiva.

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

O fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A foi capaz de biotransformar a ZO para *N*-Des (Figura 24). A Figura 25 apresenta os resultados da biotransformação da ZO pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A por 480 horas.

Após 360 horas de incubação, a máxima concentração dos metabólitos foi alcançada. Foram formados 508 ng mL^{-1} de $(-)-(R)-N\text{-Des}$ e 221 ng mL^{-1} de $(+)-(S)-N\text{-Des}$. Estas concentrações representam um excesso enantiomérico de 39% de $(-)-(R)-N\text{-Des}$.

Figura 24. Eletroferograma representativo da biotransformação da ZO pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A após 360 horas de incubação. (A) Extração do meio de cultura com o fungo na ausência do fármaco (controle do fungo); (B) Análise após 360 horas de incubação. (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) $(-)-(R)-N\text{-Des}$; (2) $(-)-(R)-ZO$; (3) $(+)-(S)-N\text{-Des}$; (4) $(+)-(S)-ZO$

Figura 25. Gráfico de concentração versus tempo de incubação na formação de *N*-Des pelo fungo *Cunninghamhamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A

4.4.1.2. *Cunninghamhamella elegans* ATCC 10028B

O fungo *Cunninghamhamella elegans* ATCC 10028B demonstrou-se capaz de biotransformar a ZO em *N*-Des, e formou preferencialmente o enantiômero (+)-(S)-*N*-Des, metabólito com atividade ansiolítica (Figura 26). A Figura 27 apresenta os resultados da biotransformação da ZO pelo fungo *Cunninghamhamella elegans* ATCC 10028B por 480 horas.

A máxima concentração do enantiômero (-)-(R)-*N*-Des foi 120 ng mL⁻¹ enquanto que para o enantiômero (+)-(S)-*N*-Des foi 228 ng mL⁻¹, em 240 horas de incubação. Estas concentrações representam um excesso enantiomérico de 35% de (+)-(S)-*N*-Des.

Figura 26. Eletroferograma representativo da biotransformação da ZO pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B após 240 horas de incubação. (A) Extração do meio de cultura com o fungo na ausência do fármaco (controle do fungo); (B) Análise após 240 horas de incubação. (PI) Padrão interno (rac-mirtazapina); (1) (-)-(R)-N-Des; (2) (-)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-N-Des; (4) (+)-(S)-ZO

Figura 27. Gráfico de concentração versus tempo de incubação na formação da N-Des pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B

Conclusões

5. Conclusões

Este trabalho apresentou, pela primeira vez, o uso da DLLME-CE para análise enantiosseletiva da ZO e seu metabólito *N*-Des após biotransformação empregando fungos. A separação quiral por CE foi capaz de analisar simultaneamente o fármaco (ZO) e seus principais metabólitos (*N*-Des e *N*-Ox) com resolução aceitável entre todos os enantiômeros ($R_s > 2$) em tempo inferior a 12 minutos. O método descrito neste trabalho apresenta o menor tempo de análise para ZO e seus metabólitos *N*-Des e *N*-Ox já relatado na literatura, seja por CE (HEMPEL; BLASCHKE, 1996), ou por HPLC e LC-MS (FERNANDEZ et al., 1993; TONON; JABOR; BONATO, 2011).

Como técnica de preparo de amostra foi empregada a DLLME, que apresentou elevada eficiência na extração da ZO e *N*-Des. Contudo, devido às características físico-químicas do metabólito *N*-Ox, sua extração não foi possível nas condições estabelecidas. Contudo, tal fato não inviabilizou o desenvolvimento do método, pois este não é o metabólito de interesse neste estudo. Os valores de recuperação obtidos empregando a DLLME foram comparáveis aos valores obtidos empregando técnicas convencionais de preparo de amostra. Tonon, Jabor e Bonato (2011) descreveram um método empregando a extração líquido-líquido em amostras de plasma de rato, atingindo 75% de recuperação para ZO e 57% para *N*-Des. Karlonas, Ramanavicius e Ramanaviciene (2014) desenvolveram um método por extração em fase sólida da ZO em amostras de sangue hemolisado, obtendo 83% de recuperação. De acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que a DLLME apresentou eficiência similar às técnicas convencionais de preparo de amostra, no entanto, com a vantagem de consumir menor quantidade de solventes orgânicos, reduzido tempo de extração e simplicidade.

Entre as espécies de fungos avaliadas, os fungos do gênero *Cunninghamella* foram capazes de biotransformar a ZO para seu metabólito ativo *N*-Des. O fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A formou preferencialmente o metabólito (–)-(R)-*N*-Des (ee = 39%), enquanto que o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B formou preferencialmente o metabólito (+)-(S)-*N*-Des (ee = 35%).

Referências

Referências

ALBUQUERQUE, N. C. P.; BORTOLETO, M. A.; de OLIVEIRA, A. R. M. Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas empregando técnicas miniaturizadas de preparação de amostras. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v.5, p.1-16, 2013.

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

ANDRUCH, V.; BURDEL, M.; KOCÚROVÁ, L.; ŠANDREJOVÁ, J.; BALOGH, I. S. Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Oxford , v.49, p.1-19, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. . Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em 25 de junho 2014.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Cunninghamella - A microbial model for drug metabolism studies - A review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.27, n.1, p.16-29, 2009.

BAGLIONI, C.; SPIEGELHALDER, K.; LOMBARDO, C; RIEMANN, D. Sleep and emotions: A focus on insomnia. **Sleep Medicine Reviews**, London, v.14, n.4, p.227-238, 2010.

BECQUEMONT, L.; MOUAJJAH, S.; ESCAFFRE, O.; BEAUNE, P.; FUNCK-BRENTANO, C.; JAILLON, P. Cytochrome P-450 3A4 and 2C8 are involved in Zopiclone metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v.27, n.9, p.1068-1073, 1999.

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

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRÓN, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v.20, n.4, p.385-397, 2009.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v.34, n.9, p.1604-1617, 2011.

CARLSON, J. N.; HASKEW, R.; WACKER, J.; MAISONNEUVE, I. M.; GLICK, S. D.; JERUSSI, T. P. Sedative and anxiolytic effects of zopiclone's enantiomers and metabolite. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.415, n.2-3, p.181-189, 2001.

CARRÃO, D. B.; BORGES, K. B.; BARTH, T.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; OLIVEIRA, A. R. M. Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis**, Hoboken, v.32, n.19, p.2746-2756, 2011.

CHA, C.J.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.9, p.4358-4360, 2001.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.95, n.1, p.47-59, 2012.

DE JESUS, L. I.; ALBUQUERQUE, N. C. P.; BORGES, K. B.; SIMÕES, R. A.; CALIXTO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; GAITANI, C. M.; PUPO, M. T.; OLIVEIRA, A. R. M. Enantioselective fungal biotransformation of risperidone in liquid culture medium by capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction. **Electrophoresis**, Hoboken, v.32, n.19, p.2765-2775, 2011.

DE OLIVEIRA, A. R. M. Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos empregando eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v.3, p.231-247, 2011.

DE SANTANA, F. J. M.; MAGALHÃES, I.R.S.; DA FONSECA, P.; BARTH, T.; DE OLIVEIRA, A.R.M. Analytical tools for the enantioselective analysis of drugs and metabolites. In: Norberto Peporine Lopes; Thais Guaratini. (Org.). **Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences**. 1ed. Kerala: Transworld Research Network, v.1, 2009, cap.2, p.19-48.

EMA. Europe Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acessado em: 25 de junho de 2014.

ERIKSSON, B.O.; ANDERSSON, M. B. O.; BLOMBERG, LG. Deviation from Ohm's law in electric field assisted capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1010, n.1, p.17-24, 2003.

ESPADA, A.; MOLINA-MARTIN, M. Capillary electrophoresis and small molecule drug discovery: a perfect match? **Drug Discovery Today**, Oxford , v.17, n.7-8, 396-404, 2012.

FARACH, F. J.; PRUITT, L. D.; JUN, J. J.; JERUD, A. B.; ZOELLNER, L. A.; ROY-BYRNE, P. P. Pharmacological treatment of anxiety disorders: Current treatments and future directions. **Journal of Anxiety Disorders**, Elmsford, v.26, n.8, p.833-843, 2012.

FERNANDEZ, C.; GIMENEZ, F.; BAUNE, B.; MARADEIX, V.;THUILLIER, A.; FARINOTTI, R. Determination of the enantiomers of zopiclone and its 2 chiral metabolites in urine using an automated coupled achiral chiral chromatographic system. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, Amsterdam, v.617, n.2, p.271-278, 1993.

FERNANDEZ, C.; MARTIN, C.; GIMENEZ, F.; FARINOTTI, R. Clinical pharmacokinetics of zopiclone. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v.29, n.6, p.431-441, 1995.

FLECK, M. W. Molecular Actions of (S)-Desmethylzopiclone (SEP-174559), an Anxiolytic Metabolite of Zopiclone. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v.302, n.2, p.612-618, 2002.

FORTES, S. S.; BARTH, T.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; GAITANI, C. M.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Evaluation of dispersive liquid–liquid microextraction in the stereoselective determination of cetirizine following the fungal biotransformation of hydroxyzine and analysis by capillary electrophoresis. **Talanta**, Amsterdam, v.116, p.743-752, 2013.

FORTIER-BROCHU, E.; BEAULIEU-BONNEAU, S.; IVERS, H.; MORIN, C. M. Insomnia and daytime cognitive performance: A meta-analysis. **Sleep Medicine Reviews**, London, v.16, n.1, p.83-94, 2012.

GAITANI C. M.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO P. S. Capillary electromigration techniques for the analysis of drugs and metabolites in biological matrices: a critical appraisal. In: Garcia, C. D.; Torres, K. C.; Carrilho, E. (Org.). **Fundamental Concepts, Practical Applications, and Limitations of Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis**. 1ed. John Wiley & Sons, Inc, 2012, v. 1, cap.12, p. 229-246.

GEIGER, M.; HOGERTON, A. L.; BOWSER, M. T. Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v.84, n.2, p.577-596, 2012.

GOMIS, D. B.; VELASCO, C. B.; SANCHEZ, I. H.; ALVAREZ, M. D. G. Optimization by Factorial Design of a Capillary Electrophoresis Method for the Chiral Resolution and Determination of Zopiclone and Its Synthesis Precursor. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Philadelphia, v.32, n.18, p.2654-2668, 2009.

HEMPEL, G.; BLASCHKE, G. Enantioselective determination of zopiclone and its metabolites in urine by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.675, n.1, p.139-146, 1996.

HILÁRIO, V. C., CARRÃO, D. B., BARTH, T., BORGES, K. B., FURTADO, N. A. J. C., PUPO, M. T., DE OLIVEIRA, A. R. M. Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.61, p.100-107, 2012.

HU, X.-Z.; WU, J.-H.; FENG, Y.-Q. Molecular complex-based dispersive liquid–liquid microextraction: Analysis of polar compounds in aqueous solution. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1217, n.45, p.7010-7016, 2010.

JERUSSI, T.P.; SENANAYAKE, C.H.; RUBIN, P.D.; HONG, Y.; BAKALE, R.A.; XIANG, T.; MCCONVILLE, F.A.; BAKALE, R.P. (SEPRACOR INC). Methods of Making and Using N-desmethylzopiclone. World patent WO 200069442-A. 2000 Nov 23.

JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D.; Zone electrophoresis in open-tubular glasscapillaries; **Analytical Chemistry**, Washington, v.53, n.8, p.1298-1302, 1981.

KARLONAS, N.; RAMANAVICIUS, A.; RAMANAVICIENE, A. Development of an SPE method for the determination of zaleplon and zopiclone in hemolyzed blood using fast GC with negative-ion chemical ionization MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v.37, n.5, p.551-557.

KIAROSTAMI, V.; ROUINI, M.-R.; MOHAMMADIAN, R.; LAVASANI, H.; GHAZAGHI, M. Binary Solvents Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (BS-DLLME) Method for Determination of Tramadol in Urine Using High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v.22, p.1-8, 2014.

LELIBOUX, A.L.; FRYDMAN, A.; GAILLOT, J. Simultaneous determination of zopiclone and its two major metabolites (N-oxide and N-desmethyl) in human biological fluids by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, Amsterdam, v.417, n.1, 151-158, 1987.

LEONG, M.I.; FUH, M. R.; HUANG, S.D. Beyond dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1335, p.2-14, 2014.

LEUFKENS, T. R.M.; VERMEEREN, A. Zopiclone's Residual Effects on Actual Driving Performance in a Standardized Test: A Pooled Analysis of Age and Sex Effects in 4 Placebo-Controlled Studies. **Clinical Therapeutics**, Bridgewater, v.36, n.1, p.141-150, 2014.

LEUNER, B.; SHORS, T. J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? **Neuroscience**, Oxford, v.251, p.108-119, 2013.

LOPES, A. A.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Quando os micro-organismos salvam vidas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.286, p.36-41, 2011.

MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações. In: Biotransformação Utilizando Micro-Organismos Endofíticos: Uma Abordagem Químio-Ecológica**. Salto: Schoba editora, 2010, cap.6, p.195-249.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v.4, p.35-51, 2012.

MISTRI, H. N.; JANGID, A. G.; PUDAGE, A.; SHRIVASTAV, P. HPLC–ESI-MS/MS validated method for simultaneous quantification of zopiclone and its metabolites, N-desmethyl zopiclone and zopiclone-N-oxide in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.864, n.1-2, p.137–148, 2008.

MORAES, M. L. L.; MORAES, S. L.; PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.4, p.1041-1046, 2009.

MUSHEEV, M. U.; FILIPTSEV, Y.; KRYLOV, S. N. Temperature Difference between the Cooled and the Noncooled Parts of an Electrolyte in Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v.82, n.20, p.8692-8695, 2010.

NAJIB, J. Eszopiclone, a Nonbenzodiazepine Sedative-Hypnotic agent for the treatment of transient and chronic insomnia. **Clinical Therapeutics**, Bridgewater, v.28, n.4, p.491-516, 2006.

NANDHRA, H. S.; MURPHY, C. L.; SULE, A. Novel pharmacological agents targeting memory and cognition in the treatment of anxiety disorders. **Human Psychopharmacology-Clinical and Experimental**, Hoboken, v.28, n.6, p.538-543, 2013.

NICE. Guidance on the use of zaleplon, zolpidem and zopiclone for the short term management of insomnia. NICE, 2004 (Technology Appraisal Guidance 77). Disponível em: <www.nice.org.uk/TA077guidance>. Acessado em: 25 de junho de 2014.

NIROGI, R. V. S.; KANDIKERE, V. N.; MUDIGONDA, K. Quantitation of zopiclone and desmethylzopiclone in human plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, Hoboken, v.20, n.8, p.794-799, 2006.

NUTT, D. J.; STAHL, S. M. Searching for perfect sleep: the continuing evolution of GABAA receptor modulators as hypnotics. **Journal of Psychopharmacology**, London, v.24, n.11, p.1601-1612, 2010.

PERVAIZ, I.; AHMAD, S.; MADNI, M. A.; AHMAD, H.; KHALIQ, F. H. Microbial Biotransformation: a Tool for Drug Designing. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.49, n.5, p.437-450, 2013.

PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and their Application in Biotransformation Process. **Biotechnology Research International**, New York, v.2011, p.1-11, 2011.

PIÑERO, M. -Y.; BAUZA, R.; ARCE, L.; Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications. **Electrophoresis**, Hoboken, v.32, n.11, p.1379–1393, 2011.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1116, n.1-2, p.1-9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1217, n.16, p.2342-2357, 2010.

SAEVELS, J.; WUYTS, M.; SCHEPDAEL, A. V.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. In-house packing and testing of capillaries for capillary electrochromatography using simple equipment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.20, n.3, p.513-520, 1999.

SCIFINDER WEB. Disponível em: <<http://scifinder.cas.org>>. Acessado em: 10 de junho de 2014.

SCRIBA, G. K. E. Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences. **Chromatographia**, Heidelberg, v.75, n.15-16, p.815-838, 2012.

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

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n.2, p.173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n.5, p. 493-511, 1997.

Thomson Reuters IntegritySM. Disponível em: <<http://integrity.thomsonreuters.com/capes/home.htm>>. Acessado em: 25 de junho de 2014.

TONON, M. A.; JABOR, V. A. P.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of zopiclone and its metabolites in plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.400, n.10, p.3517-3525, 2011.

TONON, M. A.; BONATO, P. S. Capillary electrophoretic enantioselective determination of zopiclone and its impurities. **Electrophoresis**, Hoboken, v.33, n.11, p.1606-1612, 2012.

TORNIO, A.; NEUVONEN, P. J.; BACKMAN, J. T. The CYP2C8 inhibitor gemfibrozil does not increase the plasma concentrations of zopiclona. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Heidelberg, v.62, n.8, p.645-651, 2006.

VERSTER, J. C.; VELDHUIJZEN, D. S.; VOLKERTS, E. R.. Residual effects of sleep medication on driving ability. **Sleep Medicine Reviews**, London, v.8, n.4, p.309-325, 2004.

VESPALEC, R. Principles of Chiral Separations by Free Solution Electrophoresis. In: EECKHAUT, A. V.; MICHOTTE, Y. **Chiral separations capillary electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap.2, p.23-46.

WANG, Y.; DAÍ, C. C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*, New York, v.61, n.2, p.207-215, 2011.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis: Basic Concepts. In: **Practical Capillary Electrophoresis**. 2.Ed. San Diego: Academic Press, 2000, cap.2, p.25-72.

WIEGAND, M. H. Antidepressants for the Treatment of Insomnia A Suitable Approach? **Drugs**, Auckland, v.68, n.17, p.2411-2417, 2008.

YAN, H.; WANG, H. Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1295, p.1-15, 2013.

YANG, X.; ZHANG, S.; WANG, J.; WANG, C.; WANG, Z. On-line two-step stacking in capillary zone electrophoresis for the preconcentration of strychnine and brucine. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.814, p.63-68, 2014.

ZGOLA-GRZESKOWIAK, A.; GRZESKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v.30, n.9, p.1382-1399, 2011.

ZHANG, D.; EVANS, F.E.; FREEMAN, J.P.; YANG, Y.; DECK, J.; CERNIGLIA, C.E. Formation of mammalian metabolites of cyclobenzaprine by the fungus, *Cunninghamella elegans*. **Chemico-Biological Interactions**, Clare, v.102, n.2, 79-92, 1996.