

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



DE RIBEIRÃO PRETO

# **Keyller Bastos Borges**

Análise estereosseletiva da tioridazina e seus principais metabólitos: um estudo cinético de biotransformação empregando fungos

Ribeirão Preto

## **KEYLLER BASTOS BORGES**

# Análise estereosseletiva da tioridazina e seus principais metabólitos: um estudo cinético de biotransformação empregando fungos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Ribeirão Preto

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

Preparada pela Biblioteca Central do Campus

Administrativo de Ribeirão Preto - USP

#### Borges, Keyller Bastos

*Análise estereosseletiva da tioridazina e seus principais metabólitos: um estudo cinético de biotransformação empregando fungos.* Ribeirão Preto, 2006

124 p.: il.; 30 cm

Referências p.: 86 - 100

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Programa de Pós graduação em Toxicologia.

Orientadora: Bonato, Pierina Sueli.

Análise estereosseletiva.
 Tioridazina.
 Biotransformação.
 Fungos

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Keyller Bastos Borges

**Título:** Análise estereosseletiva da tioridazina e seus principais metabólitos: um estudo cinético de biotransformação empregando fungos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Toxicologia.

Aprovado em: 09 / 11 / 2006

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). : <u>Jairo Kenupp Bastos</u> Instituição: <u>FCFRP/USP</u> Assinatura:\_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). : <u>Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira</u>

Instituição: UNIFAL Assinatura:

Prof(a). Dr(a). : <u>Pierina Sueli Bonato</u> Instituição: <u>FCFRP/USP</u> Assinatura:\_\_\_\_\_

#### DEDICATÓRIAS

É com muito amor, respeito e admiração que dedico este trabalho aos meus **PAIS**,

**Pai** (pessoa de grande simplicidade e humildade) graças a você meus sonhos estão se tornando realidades. Seu constante apoio me faz mais forte para superar as dificuldades que tenho encontrado. Minha admiração por você tende ao infinito. Obrigado por ser tão dedicado à nossa família.

**Mãe** (pessoa de grande sabedoria) agradeço a você toda formação e caráter. Nas horas difíceis é meu norte e meu arrimo. Sua presença me conforta e anima, sua voz me acalma, você é uma benção. Obrigado por se dedicar tanto a mim.

#### À minha querida namorada **Ellen**,

Pelo amor, companheirismo, amizade, tranqüilidade e incentivo para que futuramente possamos juntos construir uma família.

#### Ofereço ainda, minha eterna gratidão à **Profa. Dra. Pierina**:

Pela compreensão, dedicação e ensinamentos. O reconhecimento de seu trabalho é fruto de elevada competência profissional e, também, de uma bondade infinita que somente aqueles que compartilham de sua vida conseguem encontrar. MUITO OBRIGADO por tudo...

Por último, ofereço à minha tia Aramita (in memorian),

Embora já tenha sido chamada por DEUS, foi uma pessoa que sempre me ensinou muito o significado da vida e, acima de tudo, respeitar as diferenças e buscar incansavelmente nossos sonhos.

#### AGRADECIMENTOS

- À **DEUS** todo poderoso que nos faz acreditar nos momentos difíceis e nos dá saúde e força para seguir em frente.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa concedida durante a realização deste projeto.
- À Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo pela enorme contribuição para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Lopes Guimarães pela amizade e ensinamentos.

Aos amigos pós-graduandos do CROEC,

Analu, Anderson, Carmen, Fernando, Igor, Patrícia e Naíssa pelas contribuições, seja no momento de desligar algum aparelho ou na discussão de resultados. A amizade de vocês é muito valiosa para mim. Obrigado...

- Ao amigo **Warley** pelo companheirismo e contribuição nos experimentos com fungos.
- À amiga **Denise** pela amizade e esclarecimentos de dúvidas nos experimentos com fungos.
- Aos amigos Valquíria, Roberto de Carvalho, Perpétua, Solange, Luís e Ana Paula pela amizade, disponibilidade e importante ajuda na rotina do laboratório.
- À minha família, com muito carinho e gratidão: tio **Zumar**, tio **Tião**, tia **Lola** e tio **Onezílio**. Aos primos **Ricardo** e **Rildo**: *vocês são como irmãos para mim*.

#### A Ciência

A CIÊNCIA, a ciência, a ciência... Ah, como tudo é nulo e vão! A pobreza da inteligência Ante a riqueza da emoção! Aquela mulher que trabalha Como uma santa em sacrifício, Com tanto esforço dado a ralha! Contra o pensar, que é o meu vício! A ciência! Como é pobre e nada! Rico é o que alma dá e tem

Fernando Pessoa

#### Mensagem

Não estrague o seu dia.

A sua irritação não solucionará problema algum...

As suas contrariedades não alteram a natureza das coisas....

Os seus desapontamentos não fazem o trabalho que só o tempo conseguirá realizar...

O seu mau humor não modifica a vida...

A sua dor não impedirá que o sol brilhe amanhã sobre os bons e os maus...

A sua tristeza não iluminará os caminhos... O seu desânimo não edificará a ninguém...

As suas lágrimas não substituem o suor que você deve verter em benefício da sua própria felicidade...

As suas reclamações, ainda mesmo afetivas, jamais acrescentarão nos outros um só grama de simpatia por você...

Não estrague o seu dia...

Aprenda, com a Sabedoria Divina, a desculpar infinitamente, construindo e reconstruindo sempre para o Infinito Bem.

Chico Xavier

#### Desejo

Desejo a você... Fruto do mato Cheiro de jardim Namoro no portão Domingo sem chuva Segunda sem mau humor Sábado com seu amor Filme do Carlitos Chope com amigos Crônica de Rubem Braga Viver sem inimigos Filme antigo na TV Ter uma pessoa especial E que ela goste de você Música de Tom com letra de Chico Frango caipira em pensão do interior Ouvir uma palavra amável Ter uma surpresa agradável Ver a Banda passar Noite de lua Cheia Rever uma velha amizade Ter fé em Deus Não ter que ouvir a palavra não Nem nunca, nem jamais e adeus. Rir como crianca Ouvir canto de passarinho Sarar de resfriado Escrever um poema de Amor Que nunca será rasgado Formar um par ideal Tomar banho de cachoeira Pegar um bronzeado legal Aprender uma nova canção Esperar alguém na estação Queijo com goiabada Pôr-do-Sol na roça Uma festa Um violão Uma seresta Recordar um amor antigo Ter um ombro sempre amigo Bater palmas de alegria Uma tarde amena Calçar um velho chinelo Sentar numa velha poltrona Tocar violão para alquém Ouvir a chuva no telhado Vinho branco Bolero de Ravel... E muito carinho meu

Carlos Drumond de Andrade

#### RESUMO

BORGES, K. B. Análise estereosseletiva da tioridazina e seus principais metabólitos: um estudo cinético de biotransformação empregando fungos.
2006. 124f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Atualmente, existe um grande interesse em estudar a biotransformação estereosseletiva de fármacos, incluindo os processos que reproduzem as vias de metabolização in vivo. Alguns desses estudos estão sendo realizados empregando microrganismos como, por exemplo, fungos. A cromatografia líquida de alta eficiência é umas das técnicas que pode ser empregada para a resolução, identificação e quantificação das espécies quirais formadas. A tioridazina (THD) é um fármaco quiral, com atividade antipsicótica utilizado para o tratamento da esquizofrenia. Possui como principais metabólitos a tioridazina-2-sulfóxido (THD-2-SO) е tioridazina-2-sulfona (THD-2-SO<sub>2</sub>), ambos com atividade antipsicótica, e a tioridazina-5-sulfóxido (THD-5-SO), que contribui para o efeito cardiotóxico do fármaco. Portanto, o presente trabalho tem por finalidade o desenvolvimento de um método de análise estereosseletiva da THD-2-SO e THD-5-SO em meio de cultura para avaliação do potencial de biotransformação da THD por alguns fungos. A melhor resolução dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO foi obtida utilizando a coluna CHIRALPAK<sup>®</sup> AS e fase móvel hexano : etanol : metanol (92:6:2, v/v/v) + 0,5% de dietilamina. A extração líquido – líquido foi utilizada na preparação das amostras, tendo como solvente extrator o éter etílico. O método desenvolvido apresentou recuperação em torno de 100% para todos os compostos avaliados. Os coeficientes de variação e erros obtidos nos estudos de precisão e exatidão, intra e interensaios, foram inferiores a 10%. O método desenvolvido e validado foi empregado para avaliar o potencial de biotransformação da THD por 12 fungos endofíticos isolados de Tithonia diversifolia, Viguiera arenaria e Viguiera robusta e 1 fungo de solo (Penicillium waksmanii). Dentre os 13 fungos avaliados, quatro merecem destaque por apresentarem um potencial de biotransformação estereosseletivo mais evidenciado: Phomopsis sp. (TD2) apresentou maior mono-5-sulfoxidação para as formas (S)-(SE) e (R)-(FE) (9,3% e 5,8%, respectivamente); Glomerella cingulata (VA1) apresentou maior mono-5-sulfoxidação para as formas (S)-(SE) + (R)-(FE)(39,7%); Diaporthe phaseolorum (VR4) apresentou maior mono-2-sulfoxidação para as formas (S)-(SE) e (R)-(FE) (84,4% e 82,5%, respectivamente) e Aspergillus fumigatus (VR12) apresentou maior mono-2-sulfoxidação das formas (S)-(FE) (20,7%) e (R)-(SE) (34,4%).

Palavras chave: Análise estereosseletiva, Tioridazina, Biotransformação, Fungos

#### ABSTRACT

BORGES, K. B. **Stereoselective analysis of thioridazine and its major metabolites: a kinetic study of biotransformation by fungi.** 2006. 124p. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

The interest in stereoselective biotransformation of drugs including the processes that reproduce the in vivo metabolism has been increased. To study drug metabolism several models have been used. Among them, studies carried out using microorganisms, mainly fungi have been standing out. High-Performance Liquid Chromatography can be used for the resolution, identification and quantification of the chiral species formed. The thioridazine (THD) is a chiral drug used as antipsychotic for the treatment of schizophrenia. The main metabolites of THD are thioridazine-2-sulfoxide (THD-2-SO), thioridazine-2-sulfone (THD-2-SO<sub>2</sub>) and thioridazine-5-sulfoxide (THD-5-SO). The THD-2-SO and THD-2-SO<sub>2</sub> possesss antipsychotic activity and THD-5-SO contributes to the cardiotoxicity of drug more than the parent compound. Therefore, the aim of the present work was to develop a method for the stereoselective analysis of THD-2-SO and THD-5-SO in culture medium to study biotransformation of THD by some fungi. The simultaneous determination of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide was performed on a CHIRALPAK<sup>®</sup> AS column using a mobile phase constituted of hexane: ethanol: methanol (92:6:2, v/v/v) + 0.5% diethylamine. Diethyl ether was used as extraction solvent. Recoveries around 100% were obtained for all the evaluated species. The coefficients of variation and relative errors in precision and accuracy studies (within-day and between-day) were below 10%. The validated method was used to evaluate the biotransformation of THD by 12 endophytic fungi isolated from Tithonia diversifolia, Viguiera arenaria and Viguiera robusta and 1 fungus isolated from soil (Penicillium waksmanii). Among the 13 fungi evaluated, four of them deserve prominence for presenting an evidenced stereoselective biotransformation potential: Phomopsis sp. (TD2) presented greater mono-5sulfoxidation to the forms (S)-(SE) e (R)-(FE) (9.3% and 5.8%, respectively); Glomerella cingulata (VA1) presented greater mono-5-sulfoxidation to the forms (S)-(SE) + (R)-(FE) (39.7%); Diaporthe phaseolorum (VR4) presented greater mono-2-sulfoxidation to the forms (S)-(SE) and (R)-(FE) (84.4% and 82.5%, respectively) and Aspergillus fumigatus (VR12) presented greater mono-2sulfoxidation to the forms (S)-(FE) (20.7%) and (R)-(SE) (34.4%).

Keywords: Stereoselective analysis, Thioridazine, Biotransformation, Fungi

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

α	fator de separação	
CE	eletroforese capilar	
CV	<b>CV</b> coeficiente de variação	
CSP fase estacionária quiral		
FDA	Food and Drug Administration	
DEA	dietilamina	
DMF	dimetilformamida	
E(%)	exatidão	
EOF	fluxo eletrosmótico	
FE	Fast Eluted	
GC	cromatografia gasosa	
HPLC (CLAE)	cromatografia líquida de alta eficiência	
k	fator de retenção	
LLE	extração líquido-líquido	
MEA	extrato de malte e levedura	
Ν	número de pratos teóricos	
n	número de amostras	
p.a.	padrão analítico	
BDA	batata dextrose ágar	
r <sup>2</sup>	coeficiente de determinação	
r	coeficiente de correlação	
R(%)	recuperação	
Rs	resolução	
rpm	rotações por minuto	
SD	desvio padrão	
SE	Slow Eluted	
THD	tioridazina	
THD-2-SO	tioridazina 2-sulfóxido	
THD-2-SO <sub>2</sub>	tioridazina 2-sulfona	
THD-5-SO	tioridazina 5-sulfóxido	
UV	luz ultra violeta	

### Lista de Figuras

2

9

robusta. Plantas utilizadas para isolamento dos fungos endofíticos em estudo. Estruturas dos polissacarídeos de amilose e celulose. 14 **FIGURA 3 FIGURA 4** Fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos de 15 celulose e amilose mais comumente utilizadas. \* Estas fases também podem ser utilizadas no modo polar orgânico. Estrutura da fase estacionária CHIRALPAK<sup>®</sup> AS e as interações FIGURA 5 16 que ocorrem com os grupamentos da molécula. Estrutura molecular da THD e de seus metabólitos onde: **FIGURA 6** 21 1) N-desmetiltioridazina; 2) N-desmetiltioridazina-2-sulfóxido; 3) *N*-desmetiltioridazina-2-sulfona; 4) tioridazina (THD); 5) mesoridazina ou tioridazina-2-sulfóxido (THD-2-SO); sulforidazina tioridazina-2-sulfona  $(THD-2-SO_2);$ 6) ou 7) tioridazina-5-sulfóxido (THD-5-SO); 8) tioridazina-2,5disulfóxido (THD-2,5-diSO); 9) tioridazina-5-sulfona (THD-5-SO<sub>2</sub>). \* Centros quirais (Adaptado de BAUMANN et al., 2002). Fluxograma de obtenção dos inóculos do fungo Penicillium **FIGURA 7** 37 waksmanii (PW). Fluxograma das condições de biotransformação do fungo **FIGURA 8** 37 Penicillium waksmanii (PW). FIGURA 9 Fluxograma de obtenção dos inóculos dos fungos endofíticos. 38 **FIGURA 10** Fluxograma das condições de biotransformação da THD pelos 38 fungos endofíticos. Fluxograma do procedimento de extração líquido - líquido FIGURA 11 39 empregado na preparação das amostras. **FIGURA 12** Esquema do procedimento empregado para a realização do teste 43 de recuperação: adição das soluções-padrão depois da partição (concentrações reais). **FIGURA 13** Esquema do procedimento empregado para a realização do teste 44 de recuperação: adição das soluções-padrão antes da partição (concentrações obtidas).

Distribuição anual de fármacos aprovados de acordo com o

A) Thitonia diversifolia; B) Viguiera arenaria; C) Viguiera

caráter de quiralidade (1989-2000) (AGRANAT et al., 2002).

FIGURA 1

FIGURA 2

- **FIGURA 14** Espectro de absorção na região do UV-visível da mistura **48** racêmica da THD-2-SO e THD-5-SO em metanol, na concentração de 0,5 μg mL<sup>-1</sup>.
- FIGURA 15 Estruturas da THD-2-SO e THD-5-SO mostrando os centros 49 quirais relativos à nomenclatura da IUPAC e a nomenclatura devido ao comportamento cromatográfico. Centro quiral 1 denominação R e S e centro quiral 2 denominação FE e SE.
- FIGURA 16 A) Separação cromatográfica dos padrões da THD-2-SO e da THD-5-SO: (1) (*S*)-THD-2-SO (*FE*), (4) (*R*)-THD-2-SO (*FE*), (5) (*R*)-THD-5-SO (*SE*) e (6) (*S*)-THD-5-SO (*SE*). B) Separação cromatográfica dos padrões da THD-2-SO e da THD-5-SO expostos à luz UV: (1) (*S*)-THD-2-SO (*FE*), (2) (*R*)-THD-2-SO (*SE*), (3) (*S*)-THD-2-SO (*SE*), (4) (*R*)-THD-2-SO (*FE*), (5) (*R*)-THD-5-SO (*SE*) + (*S*)-THD-5-SO (*FE*), (6) (*S*)-THD-5-SO (*SE*) e (*R*)-THD-5-SO (*FE*). Condições cromatográficas: coluna CHIRALPAK<sup>®</sup> AS; fase móvel: hexano : etanol : metanol (92:6:2, v/v/v) + 0,5% de dietilamina; vazão de 1,4 mL min <sup>-1</sup>; detecção em 262 nm.
- **FIGURA 17** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida. **56**
- FIGURA 18 Cromatograma obtido do meio de cultura com dimetilformamida 56 e o fármaco (THD).
- **FIGURA 19** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **57** *Phomopsis* sp. (TD2).
- **FIGURA 20** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **57** *Cercospora kikuchii* (TD4).
- **FIGURA 21** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **57** *Glomerella cingulata* (VA1).
- **FIGURA 22** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **57** *Colletotrichum gloeosporioides* (VA2)
- **FIGURA 23** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **58** *Phomopsis amygdali* (VA14).
- **FIGURA 24** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **58** *Guignardia mangiferae* (VA15).
- **FIGURA 25** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **58** *Phomopsis longicolla* (VA19).
- **FIGURA 26** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **58** *Penicillium ochrochloron* (VA20).
- **FIGURA 27** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **59** *Diaporthe phaseolorum* (VR4).

FIGURA 28	Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida +	59
	Aspergillus fumigatus (VR12).	
FIGURA 29	Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida +	59
	Penicillium waksmanii (PW).	
FIGURA 30	Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida +	60
	Penicillium brevicompactum (VR5).	
FIGURA 31	Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida +	60
	Pestalotiopsis foedans (VR8).	
FIGURA 32	Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida +	60
	<i>Penicillium brevicompactum</i> (VR5) + THD-2-SO e THD-5-SO	
	(padrões).	
FIGURA 33	Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida +	60
	Pestalotiopsis foedans (VR8) + THD-2-SO e THD-5-SO (padrões).	
FIGURA 34	Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida +	61
	Penicillium brevicompactum (VR5) + biotransformação. Onde X é	
	um metabólito secundário do fungo.	
FIGURA 35	Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida +	61
	<i>Pestalotiopsis foedans</i> (VR8) + biotransformação. Onde Y é um	
	metabólito secundário do fungo.	
FIGURA 36	Gráfico demonstrando a linearidade do método de análise para a	62
	(S)-THD-2-SO (FE) no intervalo de 25 a 5000 ng mL <sup>-1</sup> . Observa-	
	se que o primerio ponto, 12,5 ng mL⁻¹, extrapola a linha de 95%	
	da faixa linear.	
FIGURA 37	Gráfico demonstrando a linearidade do método de análise para a	63
	( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> ) no intervalo de 25 a 5000 ng mL <sup>-1</sup> . Observa-	
	se que o primerio ponto, 12,5 ng mL <sup>-1</sup> , extrapola a linha de 95%	
	da faixa linear.	
FIGURA 38	Gráfico demonstrando a linearidade do método de análise para a	63
	( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) no intervalo de 25 a 5000 ng mL <sup>-1</sup> . Observa-	
	se que o primerio ponto, 12,5 ng mL <sup>-1</sup> , extrapola a linha de 95%	
	da faixa linear.	
FIGURA 39	Gráfico demonstrando a linearidade do método de análise para a	63
	(S)-THD-5-SO (SE) no intervalo de 25 a 5000 ng mL <sup>-1</sup> . Observa-	
	se que o primerio ponto, 12,5 ng mL <sup>-1</sup> , extrapola a linha de 95%	
	da faixa linear.	
FIGURA 40	Curvas analíticas demonstrando os coeficientes de determinação	64
	e de correlação para os enantiômeros da THD-2-SO no intervalo	
	de 25 a 5000 ng mL <sup>-1</sup> .	

Curvas analíticas demonstrando os coeficientes de determinação FIGURA 41 65 e de correlação para os enantiômeros da THD-5-SO no intervalo de 25 a 5000 ng mL $^{-1}$ . **FIGURA 42** Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + 70 THD tomando os cuidados quanto a exposição à luz (1º dia). Cromatograma obtido do meio de cultura + dimetilformamida + **FIGURA 43** 70 THD tomando os cuidados quanto a exposição à luz (6º dia). Cinética de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE), FIGURA 44 101 (R)-THD-2-SO (SE), (S)-THD-2-SO (SE) e (R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Phomopsis sp. (TD2). Cinética de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) **FIGURA 45** 101 + (S)-THD-5-SO (FE), (S)-THD-5-SO (SE) e (R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Phomopsis sp. (TD2). Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e **FIGURA 46** 101 (S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Phomopsis sp. (TD2). Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e **FIGURA 47** 102 (R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Phomopsis sp. (TD2). Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) + FIGURA 48 102 (S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Phomopsis sp. (TD2). Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e **FIGURA 49** 102 (R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Phomopsis sp. (TD2). **FIGURA 50** Cinética de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (SE) e 103 (R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Cercospora kikuchii (TD4). Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (SE) e FIGURA 51 103 (R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Cercospora kikuchii (TD4). Cinética de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE), FIGURA 52 103 (R)-THD-2-SO (SE), (S)-THD-2-SO (SE) e (R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Glomerella cingulata (VA1). **FIGURA 53** Cinética de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) + 104 (S)-THD-5-SO (FE), (S)-THD-5-SO (SE) e (R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Glomerella cingulata (VA1). Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e FIGURA 54 104 (S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Glomerella cingulata (VA1). Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e **FIGURA 55** 104 (R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Glomerella cingulata (VA1). Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) + FIGURA 56 105 (S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Glomerella cingulata (VA1). FIGURA 57 Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e 105 (R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Glomerella cingulata (VA1).

FIGURA 58	Cinética de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE),	105
	(R)-THD-2-SO (SE), (S)-THD-2-SO (SE) e (R)-THD-2-SO (FE)	
	pelo fungo Colletotrichum gloeosporioides (VA2).	
FIGURA 59	Cinética de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	106
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Colletotrichum gloeosporioides	
	(VA2).	
FIGURA 60	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	106
	(S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Colletotrichum gloeosporioides	
	(VA2).	
FIGURA 61	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	106
	(R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Colletotrichum gloeosporioides	
	(VA2).	
FIGURA 62	Cinética de formação dos metabólitos ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> ),	107
	( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo <i>Phomopsis amygdali</i> (VA14).	
FIGURA 63	Cinética de formação dos metabólitos ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) +	107
	( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo <i>Phomopsis amygdali</i> (VA14).	
FIGURA 64	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	107
	(S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Phomopsis amygdali (VA14).	
FIGURA 65	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	108
	(R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Phomopsis amygdali (VA14).	
FIGURA 66	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	108
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Phomopsis amygdali (VA14).	
FIGURA 67	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e	108
	(R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Phomopsis amygdali (VA14).	
FIGURA 68	Cinética de formação dos metabólitos ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> ),	109
	( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo <i>Phomopsis longicolla</i> (VA19).	
FIGURA 69	Cinética de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	109
	( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo <i>Phomopsis longicolla</i> (VA19).	
FIGURA 70	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	109
	(S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Phomopsis longicolla (VA19).	
FIGURA 71	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	110
	(R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Phomopsis longicolla (VA19).	
FIGURA 72	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	110
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Phomopsis longicolla (VA19).	
FIGURA 73	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e	110
	(R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Phomopsis longicolla (VA19).	

FIGURA 74	Cinética de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE),	111
	( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo Penicillium ochrochloron (VA20).	
FIGURA 75	Cinética de formação dos metabólitos ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) +	111
	( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo Penicillium ochrochloron (VA20).	
FIGURA 76	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	111
	(S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Penicillium ochrochloron (VA20).	
FIGURA 77	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	112
	(R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Penicillium ochrochloron (VA20).	
FIGURA 78	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	112
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Penicillium ochrochloron (VA20).	
FIGURA 79	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e	112
	(R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Penicillium ochrochloron (VA20).	
FIGURA 80	Cinética de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE),	113
	( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo <i>Diaporthe phaseolorum</i> (VR4).	
FIGURA 81	Cinética de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	113
	( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo <i>Diaporthe phaseolorum</i> (VR4).	
FIGURA 82	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	113
	(S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Diaporthe phaseolorum (VR4).	
FIGURA 83	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	114
	(R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Diaporthe phaseolorum (VR4).	
FIGURA 84	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	114
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Diaporthe phaseolorum (VR4).	
FIGURA 85	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e	114
	(R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Diaporthe phaseolorum (VR4).	
FIGURA 86	Cinética de formação dos metabólitos ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> ),	115
	( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo Penicillium brevicompactum (VR5).	
FIGURA 87	Cinética de formação dos metabólitos ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) +	115
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Penicillium brevicompactum	
	(VR5).	
FIGURA 88	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	115
	(S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Penicillium brevicompactum	
	(VR5).	

FIGURA 89	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	116
	(R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Penicillium brevicompactum	
	(VR5).	
FIGURA 90	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	116
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Penicillium brevicompactum	
	(VR5).	
FIGURA 91	Cinética de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE),	116
	( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo Pestalotiopsis foedans (VR8).	
FIGURA 92	Cinética de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	117
	( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> )	
	pelo fungo Pestalotiopsis foedans (VR8).	
FIGURA 93	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	117
	(S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Pestalotiopsis foedans (VR8).	
FIGURA 94	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	117
	(R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Pestalotiopsis foedans (VR8).	
FIGURA 95	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	118
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Pestalotiopsis foedans (VR8).	
FIGURA 96	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e	118
	(R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Pestalotiopsis foedans (VR8).	
FIGURA 97	Cinética de formação dos metabólitos ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> ),	118
	(R)-THD-2-SO (SE), (S)-THD-2-SO (SE) e (R)-THD-2-SO (FE)	
	pelo fungo Aspergillus fumigatus (VR12).	
FIGURA 98	Cinética de formação dos metabólitos ( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>SE</i> ) +	119
	(S)-THD-5-SO (FE), (S)-THD-5-SO (SE) e (R)-THD-5-SO (FE)	
	pelo fungo Aspergillus fumigatus (VR12).	
FIGURA 99	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	119
	( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ) pelo fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> (VR12).	
FIGURA 100	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	119
	( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> ) pelo fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> (VR12).	
FIGURA 101	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	120
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> (VR12).	
FIGURA 102	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e	120
	( <i>R</i> )-THD-5-SO ( <i>FE</i> ) pelo fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> (VR12).	
FIGURA 103	Cinética de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE),	120
	( <i>R</i> )-1HD-2-SO ( <i>SE</i> ), ( <i>S</i> )-THD-2-SO ( <i>SE</i> ) e ( <i>R</i> )-THD-2-SO ( <i>FE</i> )	
	peio rungo <i>Penicillium waksmanii</i> (PW).	
FIGURA 104	Cinetica de formação dos metabólitos ( $R$ )-THD-5-SO ( $SE$ ) +	121
	(S)-IHD-5-SO (FE) pelo fungo Penicillium waksmanii (PW).	

FIGURA 105	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-2-SO (FE) e	
	(S)-THD-2-SO (SE) pelo fungo Penicillium waksmanii (PW).	
FIGURA 106	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-2-SO (SE) e	121
	(R)-THD-2-SO (FE) pelo fungo Penicillium waksmanii (PW).	
FIGURA 107	Porcentagem de formação dos metabólitos (R)-THD-5-SO (SE) +	122
	(S)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Penicillium waksmanii (PW).	
FIGURA 108	Porcentagem de formação dos metabólitos (S)-THD-5-SO (SE) e	122
	(R)-THD-5-SO (FE) pelo fungo Penicillium waksmanii (PW).	
FIGURA 109	Fungos isolados de Tithonia diversifolia (meio BDA, Batata	123
	Dextrose Ágar).	
FIGURA 110	Fungos isolados de Viguiera robusta (meio BDA, Batata Dextrose	123
	Ágar).	

- FIGURA 111Fungos isolados de Viguiera arenaria (meio BDA, Batata 124<br/>Dextrose Ágar).
- FIGURA 112 Fungo isolado de solo (meio MEA, Extrato de malte e levedura). 124

## Lista de Tabelas

TABELA 1	Utilização de microrganismos em processos de biotransformação.		
TABELA 2	Espécies de plantas e fungos isolados.		
TABELA 3	Fungos utilizados nos estudos de biotransformação.		
TABELA 4	Constituintes do meio MEA (Extrato de malte e levedura).	35	
TABELA 5	Constituinte do meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar).	35	
TABELA 6	Constituintes do meio pré-fermentativo (JACKSON et al., 1993).	35	
TABELA 7	Constituintes da solução de traços (JACKSON et al., 1993).	36	
TABELA 8	Constituintes do meio fermentativo de Czapek (ALVIANO et al.,	36	
	1992).		
TABELA 9	Avaliação da seletividade do método.	41	
TABELA 10	Concentração final dos enantiômeros nos meios de cultura.	42	
TABELA 11	Diferentes fases móveis utilizadas para avaliar a separação dos	50	
	estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO.		
TABELA 12	Parâmetros cromatográficos para a separação dos enantiômeros	52	
	da THD-2-SO e THD-5-SO na coluna CHIRALPAK <sup>®</sup> AS; fase móvel:		
	hexano : etanol : metanol (92:6:2, v/v/v) + 0,5% de DEA; vazão		
	de 1,4 mL min ⁻¹; detecção em 262 nm.		
TABELA 13	Recuperação (R%) do método de análise dos enantiômeros da	65	
	THD-2-SO.		
TABELA 14	Recuperação (R%) do método de análise dos enantiômeros da	66	
	THD-5-SO.		
TABELA 15	Precisão do método de análise dos enantiômeros da THD-2-SO.	67	
TABELA 16	Precisão do método de análise dos enantiômeros da THD-5-SO.	67	
TABELA 17	Exatidão do método de análise dos enantiômeros da THD-2-SO.	68	
TABELA 18	Exatidão do método de análise dos enantiômeros da THD-5-SO.	68	
TABELA 19	Valores dos coeficientes de variação e erros para o limite de <b>6</b>		
	quantificação da THD-2-SO e THD-5-SO.		
TABELA 20	Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo	72	
	Phomopsis sp. (TD2).		
TABELA 21	Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo	73	
	Cercospora kikuchii (TD4).		
TABELA 22	Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo	74	
	Glomerella cinqulata (VA1).	- •	
τΔβεί Δ 23	Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo	74	
. AULLA 2J	Colletotrichum aloeosporioides (VA2)	77	

- TABELA 24 Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo 75 Phomopsis amygdali (VA14). TABELA 25 Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo 76 Phomopsis longicolla (VA19). TABELA 26 Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo 77 Penicillium ochrochloron (VA20). TABELA 27 Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo 78 Diaporthe phaseolorum (VR4). TABELA 28 Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo 78 Penicillium brevicompactum (VR5). TABELA 29 Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo 79 Pestalotiopsis foedans (VR8). TABELA 30 Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo 80 Aspergillus fumigatus (VR12). TABELA 31 Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo 81 Penicillium waksmanii (PW). **TABELA 32** Fungos que apresentaram formação da THD-2-SO<sub>2</sub>. 81
- **TABELA 33** Porcentagem de formação máxima dos metabólitos da tioridazina**82**pelos fungos em estudo.

## Sumário

1 Introdução	1
1.1 Fármacos quirais	1
1.2 Biotransformação de fármacos empregando fungos	3
1.2.1 Fungos de solo e gênero Penicillium	7
1.2.2 Fungos endofíticos e espécies da família Asteraceae	7
1.3 Resolução quiral	12
1.3.1 A utilização de fases estacionárias quirais em HPLC	12
1.3.1.1 Fases estacionárias quirais derivadas de polímeros helicoidais	14
1.3.2 Modo de eluição normal, reverso e polar orgânico	17
1.4 Tioridazina	18
1.4.1 Propriedades estereosseletivas da tioridazina	19
1.4.2 Análise enantiosseletiva da tioridazina	23
2 Objetivos	25
3 Materiais e Métodos	26
3.1 Materiais	26
3.1.1 Reagentes e solventes	26
3.1.1.1 Reagentes e solventes empregados no procedimento analítico	26
3.1.1.2 Reagentes empregados na preparação dos meios de cultura	26
3.1.2 Soluções-padrão	27
3.1.3 Equipamentos	28
3.1.3.1 Balanças utilizadas	28
3.1.3.2 Equipamentos utilizados na preparação das amostras	28

3.1.3.3 Equipamentos utilizados no cultivo dos fungos e re	eação <b>28</b>
de biotransformação	
3.1.3.4 Equipamento de espectroscopia na região do ultra	violeta- 29
visível	
3.1.3.5 Equipamentos utilizados na exposição à luz	29
3.1.3.6 Sistema cromatográfico	29
3.1.4 Coluna quiral	29
3.2 Métodos	30
3.2.1 Avaliação das condições cromatográficas quirais	30
3.2.2 Biotransformação da THD empregando fungos	31
3.2.2.1 Isolamento e seleção dos fungos endofíticos	31
3.2.2.2 Isolamento do fungo Penicillium waksmanii	32
3.2.2.3 Manutenção dos microrganismos	32
3.2.3.4 Identificação dos microrganismos	32
3.2.3.5 Condições de cultivo e reações de biotransformaçã	io <b>33</b>
3.2.3 Procedimento de preparação da amostra	39
3.2.4 Ordem de eluição	40
3.2.5 Validação do método	40
3.2.5.1 Estudo de seletividade	40
3.2.5.2 Linearidade e curva analítica	41
3.2.5.3 Recuperação	43
3.2.5.4 Precisão e exatidão	44
3.2.5.5 Limite de quantificação	46
3.2.6 Estudo de estabilidade da THD nas condiçõ	ões de <b>46</b>
biotransformação	
3.2.7 Estudo cinético de metabolismo in vitro	47

4 Resultados e Discussão	48
4.1 Determinação do comprimento de onda para detecção	48
4.2 Otimização da análise estereosseletiva da THD-2-SO e THD-5-SO	48
4.3 Desenvolvimento dos métodos para a análise estereosseletiva da	53
THD-2-SO e THD-5-SO em meio de cultura	
4.3.1 Procedimento de preparação da amostra	53
4.3.1.1 Solvente extrator	53
4.3.1.2 Estudo do pH do meio	54
4.3.1.3 Tempo de agitação	54
4.3.2 Lavagem do injetor	55
4.4 Validação do método de análise estereosseletiva da THD-2-SO e	55
THD-5-SO	
4.4.1 Estudo de seletividade	56
4.4.2 Linearidade e curva analítica	62
4.4.3 Recuperação	65
4.4.4 Precisão e exatidão	66
4.4.4.1 Precisão intra e interensaios	66
4.4.4.2 Exatidão intra e interensaios	67
4.4.5 Limite de quantificação	68
4.5 Estudo de estabilidade da THD	69
4.6 Biotransformação da THD empregando fungos	70
4.6.1 Phomopsis sp. (TD2)	72
4.6.2 Cercospora kikuchii (TD4)	72
4.6.3 <i>Glomerella cingulata</i> (VA1)	73
4.6.4 Colletotrichum gloeosporioides (VA2)	74
4.6.5 Phomopsis amygdali (VA14)	74

4.6.6 Guignardia mangiferae (VA15)	75
4.6.7 Phomopsis longicolla (VA19)	75
4.6.8 Penicillium ochrochloron (VA20)	76
4.6.9 Diaporthe phaseolorum (VR4)	77
4.6.10 Penicillium brevicompactum (VR5)	78
4.6.11 Pestalotiopsis foedans (VR8)	79
4.6.12 Aspergillus fumigatus (VR12)	80
4.6.13 Penicillium waksmanii (PW)	80
5 CONCLUSÕES	84
6 REFERÊNCIAS	86
7 APÊNDICES	101

# Introdução

#### 1 INTRODUÇÃO

#### **1.1** Fármacos quirais

A quiralidade é uma característica das substâncias presentes em nosso organismo, já que as macromoléculas biológicas são guirais (SOLOMONS; FRYHLE, 2000). Por exemplo, os nucleotídeos do DNA e RNA são dextrógiros (série D) e os aminoácidos, com exceção da glicina que não é guiral, são levógiros (série L). Com isso, as substâncias exógenas quirais, como certos fármacos, podem ser discriminadas no organismo, ocorrendo assim uma estereoespecífica interação com receptores, proporciona os 0 que farmacodinânica estereosseletiva. Da mesma forma, a farmacocinética poderá ser diferente devido à influência do arranjo espacial das moléculas, levando os enantiômeros a serem absorvidos, distribuídos, metabolizados e excretados de forma diferente (HYNECK et al., 1990; MORRISON, 1990; TUCKER; LENNARD, 1990).

As diferenças na farmacodinâmica de dois enantiômeros podem ser qualitativas, quando os enantiômeros possuem atividades biológicas distintas, e quantitativas, sendo o enantiômero mais ativo ou com maior afinidade chamado de eutômero. Já o enantiômero com menor afinidade ou menos ativo é denominado distômero (ARIENS, 1984; REIST et al., 1995; BONATO et al., 2005).

A importância da estereoquímica de fármacos quirais nas suas propriedades farmacocinéticas depende do mecanismo do processo em consideração: processos passivos como a difusão através de membranas não envolvem interações com macromoléculas e a estereoquímica tem pouca influência, mas quando o fármaco interage com uma enzima (metabolismo enzimático) ou com o sistema de transporte, ocorre uma discriminação que pode

ser evidenciada. A avaliação da farmacocinética dos isômeros individuais permite a determinação dos verdadeiros parâmetros farmacocinéticos do agente ativo e proporciona a base para a determinação da razão potencial enantiomérica e, se necessário, um monitoramento racional da terapêutica do fármaco (CALDWELL, 1996).

Os estudos que aumentam os conhecimentos relacionados às ações e efeitos adversos estereosseletivos de fármacos quirais e também os avanços tecnológicos na obtenção de enantiômeros puros em escala industrial, por métodos sintéticos ou biotecnológicos, têm levado as autoridades governamentais responsáveis pelo registro de medicamentos a sugerirem que os novos fármacos sejam produzidos enantiomericamente puros (FRANCOTTE, 2001). Essa situação é claramente demonstrada na FIGURA 1, onde verifica-se o aumento substancial na produção de fármacos como enantiômeros puros e diminuição na produção de racematos.



Um outro fato que tem servido para aumentar o número de fármacos enantiomericamente puros no mercado é o chamado *Chiral Switch,* no qual fármacos quirais que são comercializados como racematos ou como misturas de diastereoisômeros estão sendo desenvolvidos na forma de um enantiômero simples (AGRANAT et al., 2002; CANER et al., 2004).

Devido a essa revolução no desenvolvimento de novos fármacos, os órgãos regulatórios, como FDA (*Food and Drug Administration*) e outros órgãos semelhantes da comunidade européia e do Japão introduziram regulamentos em relação à pureza enantiomérica de fármacos além de exigir informações sobre as propriedades cinéticas e dinâmicas estereosseletivas de novos fármacos (De CAMP, 1989; MARZO, 1993; US-FDA, 1997; FDA, 2006a,b).

Considerando os fatos expostos acima, é prudente e necessário realizar estudos de metabolismo estereosseletivo para se obter informações que possam trazer conhecimentos sobre os aspectos estereoquímicos da dinâmica e cinética desses fármacos para entender os mecanismos de ação e, assim, otimizar o esquema terapêutico bem como decidir se há vantagens na utilização do racemato ou do enantiômero puro (TUCKER; LENNARD, 1990; ALLENMARK, 1991; CALDWELL, 1995; RENTSCH, 2002).

#### 1.2 Biotransformação de fármacos empregando fungos

O estudo do metabolismo de fármacos pode ser feito empregando modelos *in vivo*, através da administração de doses terapêuticas de fármacos em animais, indivíduos sadios ou pacientes e avaliação das concentrações plasmáticas ou urinárias do fármaco e de seus metabólitos (SAÚDE PÚBLICA, 2003). Uma outra alternativa comumente usada para a estimação do metabolismo *in vivo* tem sido a utilização de fármacos marcadores da atividade enzimática. A antipirina foi largamente utilizada como um substrato para todas as enzimas pois é extensivamente metabolizada. Entretanto, devido à multiplicidade das enzimas do citocromo P450 e à seletividade de seus substratos, a utilização de apenas um marcador enzimático não possibilita a avaliação de todas as enzimas responsáveis pelo metabolismo. Sendo assim, fazse necessária a utilização de um marcador enzimático específico cujo metabolismo seja mediado predominantemente ou exclusivamente por uma isoforma do citocromo P450 (FRYE et al., 1997).

O metabolismo de fármacos mediado por enzimas do citocromo P450 pode ainda ser estudado usando modelos in vitro. A procura e o desenvolvimento de métodos in vitro para o estudo das biotransformações teve como origem razões éticas, científicas e econômicas. As reações de biotransformação em animais vivos ou humanos são processos complexos e a utilização de modelos mais simples, como modelos in vitro, tem suas vantagens (SAÚDE PÚBLICA, 2003). Métodos in vitro são particularmente úteis para seleção racional de espécies de animais, para estudos toxicológicos, para comparação de perfil metabólico, para avaliação da influência de diferentes espécies no metabolismo e para a produção de metabólitos usados no desenvolvimento de métodos bioanalíticos (EKINS et al., 2000). Os modelos in vitro permitem ainda, estudar uma reação de biotransformação específica sob condições estritamente controladas e a utilização de concentrações elevadas de xenobióticos, o que, em combinação com uma matriz relativamente limpa, facilita a análise dos metabólitos formados. Os modelos de metabolismo in vitro atualmente existentes são aqueles baseados em preparações de frações sub-celulares de humano e animal (microssomas), tecidos de animais, fígado enzimas comercialmente disponíveis, hepatócitos e fatias de fígado (TINGLE; HELSBY, 2006).

As biotransformações podem ainda ser realizadas empregando microrganismos, ou seja, células integras, como bactérias, leveduras e fungos. Sua utilização é vantajosa pois os microrganismos apresentam rápido crescimento e fácil formação do sistema multienzimático. O sistema de biotransformação de microrganimos é muito semelhante ao que acontece nas

reações de fase I em mamíferos. Portanto, estes modelos *in vitro* podem ser uma alternativa atraente para os testes de novos fármacos, possibilitando a produção de metabólitos em quantidades elevadas, facilitando a elucidação de suas estruturas e testes toxicológicos (AZERAD, 1998). Além disso, estes estudos podem resultar na descoberta de novos compostos ativos ou que sirvam como intermediários para a síntese química (biocatálise) (VÉZNIA, 1991; DEMIRJIAN et al., 1999).

Os fungos, pertencentes ao Reino Fungi, são organismos heterotróficos e podem ser encontrados em qualquer ambiente, participando de maneira importante na degradação de matéria orgânica animal e vegetal ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos (ROITMAN et al., 1991). Os fungos produzem enzimas que normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (VULFSON et al., 1994).

O uso de fungos nos processos de biotransformação é um campo promissor pois pode gerar os metabólitos de fármacos já existentes e de novas entidades químicas em escala industrial. Normalmente, a formação dessas espécies ocorre de forma estereosseletiva.

As técnicas tradicionais de obtenção de compostos enantiomericamente puros, como a resolução de racematos, uso de blocos de construção quiral (chiral building blocks) e a síntese assimétrica convencional necessitam de equipamentos e reagentes caros, pessoal altamente qualificado e, em alguns casos, a substância produzida pode apresentar baixo teor de pureza enantiomérica. Por isso, informações sobre introdução ou retirada de grupos de moléculas por microrganismos (fungos) são extremamente importantes para a biocatálise. Estudos com este direcionamento é um meio muito promissor e que pode, futuramente, ser a principal fonte de fornecimento de substâncias enantiomericamente puras (PINHEIRO; FERREIRA, 1998; MAIER et al., 2001).

Os estudos realizados com fungos baseiam-se em sua obtenção (por isolamento ou aquisição), posterior incubação em meio apropriado para crescimento e transferência do micélio para um meio apropriado onde se possa promover a biotransformação do fármaco em estudo. A **TABELA 1** relaciona alguns dos poucos trabalhos descritos na literatura que utilizam fungos em pocessos de biotransformação.

Referências	Microrganismos	Fármacos	
Biotransformação não estereosseletiva			
REDDY et al., 1990	Cunninghamella sp.	fenacetina	
HEZARI et al., 1992	Cunninghamella elegans	furosemida	
FOSTER et al., 1992	Cunninghamella echinulata	propranolol	
ZHANG et al., 1995	Cunninghamella elegans	amitriptilina	
ZHANG et al., 1996a	Cunninghamella elegans	ciclobenzaprina	
ZHANG et al., 1996b	Cunninghamella elegans	azatadina	
CANNELL et al., 1997	Beauveria bassiana	warfarina	
	Aspergillus niger		
PARSHIKOV et al., 1999	Penicillium simplicissimum	N-acetilfenotiazinas	
	Cunninghamella verticillata		
		ciprofloxacino	
PARSHIKOV et al., 2001	Pestalotiopsis guepinii	norfloxacino	
XIE et al., 2005	Cunninghamella blakesleeana	pantoprazol	
Biotransformação estereosseletiv	/a		
		(-)- e (+)- mentol,	
ASAKAWA et al., 1991	Aspergillus sp.	terpinoleno e	
		carvotanacetona	
FREITAG et al., 1993	Cuppinghamalla achinulata	movilating	
FREITAG et al., 1997	Cuminghamena ecimulata	пехнесна	
MIYAZAWA et al., 1995	Glomerella cingulata	(-)-α-bisabolol	
DAMLE at al. 2000	Rhizopus arrhizus	(S)-atenolol	
DAMLE et al., 2000	Geotrichum candidum	(R)-propranolol	
SCHMITZ et al., 2000	Cunninghamella blakesleeana	terfenadina	
MIYAZAWA; HASHIMOTO, 2001	Glomerella cingulata	2-endo-acetoxi-1,8-cineol	
MODDY et al., 2002	Cunninghamella elegans	mirtazapina	
ADAME at al. 2002	Ponicillium digitatum	(R)-(+)- e (S)-(-)-	
ADAMS et al., 2005	Penicinium digitatum	limoneno	
	Aspergillus sp.	(R)-(+)- e (S)-(-)-	
DEMITTENAERE et al., 2004	Penicillium sp.	citronelol	
AGUSTA et al., 2005	Diaporthe sp.	flavonas	

TABELA 1 – Utilização de microrganismos em processos de biotransformação.

#### **1.2.1** Fungos de solo e gênero *Penicillium*

A presença de fungos em solo é muito comum e inúmeras espécies ainda não foram identificadas. O fungo do gênero *Penicillium* é comumente encontrado em solo e até mesmo em vegetais podres, sementes e grãos (PITT, 1994). Fungos deste gênero, pertencentes à família Trichocomaceae e ao filo Ascomicota, são caracterizados morfologicamente por hifas septadas e reprodução assexuada através de propágulos denominados conídios (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Alguns trabalhos são relatados na literatura utilizando fungos do gênero *Penicillium* em processos de biotransformação (**TABELA 1**). Parshicov et al. (1999) realizaram um estudo de biotransformação de *N*-acetilfenotiazinas por fungos dentre eles, o *Penicillium simplicissimum*. Segundo Adams et al. (2003), o fungo *Penicillium digitatum* biotransforma de forma enantiosseletiva o (S,R)-limoneno em  $\alpha$ -terpineol. Demyttenaere et al. (2004) relataram a biotransformação enantiosseletiva de (R,S)-citronelol por *Penicillium* sp.

#### **1.2.2** Fungos endofíticos e espécies da família Asteraceae

Segundo Schulz e Boyle (2005), fungos endofíticos são aqueles que podem ser encontrados em um momento particular associados a tecidos da planta hospedeira aparentemente saudável. Os fungos endofíticos podem se apresentar em todos os órgãos de uma planta hospedeira sendo que a colonização promovida pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (PETRINI et al., 1992). Algumas associações podem ser benéficas para ambos organismos, por isso o termo endofítico tem sido utilizado como sinônimo de mutualismo (FAETH; HAMONN, 1997). Por exemplo, quando o fungo é isolado de uma planta saudável, uma relação harmoniosa é observada pois a planta proporciona proteção, alimentação e transmissão do fungo que, em

contrapartida, produz substâncias que aumentam o crescimento, reprodução e resistência de seu hospedeiro no ambiente (LU et al., 2000; SAIKKONEN et al., 2004). A relação existente entre a planta e o fungo pode ser caracterizada por um equilíbrio do poder de virulência do fungo e a defesa da planta (SHULZ, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Muitas das pesquisas com fungos endofíticos têm sido realizadas utilizando hospedeiros de países temperados. Os dados disponíveis de regiões tropicais são raros, mas mostram que hospedeiros de plantas tropicais possuem uma grande diversidade de microrganismos, muitos deles ainda não identificados (AZEVEDO et al., 2000). O isolamento de fungos endofíticos de plantas deve-se basear em sua biologia, idade, endemismo, história etnobotânica e meio ambiente (STROBEL, 2002).

Asteraceae é uma das maiores famílias entre as angiospermas. É composta por 1535 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, agrupadas em três subfamílias e 17 tribos (BREMER, 1994). É predominante em regiões de cerrado, área de elevada biodiversidade vegetal (GOTTLIEB et al., 1996). Muitas espécies são usadas na medicina tradicional e possuem importância econômica, sendo vendidas como agentes fitoterápicos, plantas ornamentais ou empregadas como alimento.

Os fungos endofíticos utilizados neste projeto (**TABELA 2**) foram isolados de três espécies da família Asteraceae: *Tithonia diversifolia*, *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta*. A *Tithonia diversifolia* é uma planta perene encontrada em certas partes do México e América Central. O gênero *Viguiera* é um grupo americano constituído de aproximadamente 200 espécies e algumas delas ocorrem em áreas do cerrado brasileiro. Na **FIGURA 2** encontram-se as fotos ilustrativas das três espécies em estudo.



**FIGURA 2 – A)** Thitonia diversifolia; **B)** Viguiera arenaria; **C)** Viguiera robusta. Plantas utilizadas para isolamento dos fungos endofíticos em estudo.

Espécie identificada	Espécie de planta	Código
Phomopsis sp.	Tithonia diversifolia	TD2
Cercospora kikuchii	Tithonia diversifolia	TD4
Glomerella cingulata	Viguiera arenaria	VA1
Colletotrichum gloeosporioides	Viguiera arenaria	VA2
Phomopsis amygdali	Viguiera arenaria	VA 14
Guignardia mangiferae	Viguiera arenaria	VA15
Phomopsis longicolla	Viguiera arenaria	VA19
Penicillium ochrochloron	Viguiera arenaria	VA20
Diaporthe phaseolorum	Viguiera robusta	VR4
Penicillium brevicompactum	Viguiera robusta	VR5
Pestalotiopsis foedans	Viguiera robusta	VR8
Aspergillus fumigatus	Viguiera robusta	VR12

TABELA 2 – Espécies de plantas e fungos isolados.

O emprego de fungos endofíticos em processos de biotransformação de fármacos ainda é um campo que pode ser muito explorado. No trabalho de Agusta et al. (2005), os autores descreveram a utilização de fungos endofíticos (*Diaporthe* sp.) isolados de *Camellia sinensis* na oxidação estereosseletiva do C-4 de flavonas. A (+)-catequina e (-)-epicatequina foram convertidas em derivados 3,4-*cis*-diidroxiflavonas. A (-)-epicatequina 3-*O*-galato e a (-)-epigalocatequina 3-*O*- galato foram oxidadas pelos fungos em derivados 3,4-diidroxiflavonas via (-)-epicatequinas, respectivamente. Ocorrem porcentagens de formação de 2,4% a 75% das flavonas em estudo. Entretato, a

(-)-galocatequina 3-*O*-galato, (-)-catequina (*ent*-1) e (+)-epicatequina (*ent*-2), que possuem um substituinte 2-*S*-fenil, resistiram ao processo de biotransformação.

Os demais estudos relatados na **TABELA 1** foram realizados com fungos das mesmas espécies empregadas no presente estudo, embora obtidos de formas distintas. Segundo Asakawa et al. (1991), vários fungos *Aspergillus* sp., especialmente *Aspergillus niger*, biotransformaram quatro monoterpenóides, (-)- e (+)- mentol, terpinolenos e carvotanacetona. Houve a conversão de (-)-mentol a 1-, 2-, 6-, 7- e 9-hidroximentol, bem como a 8-hidroximentol, ativo de repelente de mosquitos. Por outro lado, (+)-mentol foi fracamente convertido em 7-hidroximentol. O *Aspergillus cellulosae* biotransformou o (-)-mentol predominantemente a 4-hidroximentol. Já *Aspergillus niger* converteu o terpinoleno e o (-)-carvotanacetona em duas  $\alpha$ ,  $\beta$ -cetonas insaturadas, *p*-mentano-2,9-diol e 8-hidroxicarvomentol, respectivamente.

Parshikov et al. (1999) relataram que *Aspergillus niger*, *Cunninghamella verticillata, Penicillium simplicissimum* biotransformaram *N*-acetilfenotiazina em *N*-acetilfenotiazina sulfóxido (13%, 17% e 28%, respectivamente) e fenotiazina sulfóxido (24%, 5% e 27%, respectivamente). A fenotiazin-3-ona (4%) e a fenotiazina *N*-glucosídeo (4%) foram produzidos pelo fungo *Cunninghamella verticillata*. Além disso, estes autores relataram que um provável intermediário, a fenotiazina, foi detectado apenas em culturas de *Penicillium simplicissimum* (6%).

Parshikov et al. (2001) relataram que o fungo *Pestalotiopsis guepinii* biotransformou o ciprofloxacino e norfloxacino em 4 dos maiores metabólitos destes fármacos. Os metabólitos formados do ciprofloxacino incluem *N*-acetilciprofloxacino (52%), desetileno-*N*-acetilciprofloxacino (9,2%), *N*-formilciprofloxacino (4,2%) e ácido 7-amino-1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-1,4diidroquinolina-3-carboxílico (2,3%). O norfloxacino foi biotransformado em *N*-acetilnorfloxaxino (55,4%), desetileno-*N*-acetilnorfloxacino (8,8%), *N*-formilnorfloxacino (3,6%) e ácido 7-amino-1-etil-6-fluoro-4-oxo-1,4diidroquinolina-3-carboxílico (2,1%). Sabe-se que o *N*-formilciprofloxacino e os 4 metabólitos formados a partir do norfloxacino são produzidos pelo metabolismo humano.

Miyazawa, Hashimoto e Kameoka (2001) relataram a biotransformação de (-)- $\alpha$ -bisabolol pelo fungo *Glomerella cingulata* em vários metabólitos intermediários até a formação do óxido de (1*S*, 3*R*,4*R*, 7*S*, 10*S*)-3,4-diidroxi-bisabolol, que apresentou a maior porcentagem de formação (80%).

Miyazawa e Hashimoto (2001) relataram a utilização do fungo *Glomerella cingulata* na hidrólise enantiosseletiva da mistura racêmica 2-endo-acetoxi-1,8-cineol. O enantiômero (-)-2-endo-acetoxi-1,8-cineol foi totalmente biotransformado no álcool (-)-2-endo-hidroxi-1,8-cineol. O enantiômero (+)-2-endo-acetoxi-1,8-cineol foi recuperado sem ter sido biotransformado. Além disso, as diferenças de odores dos enantiômeros foram avaliadas.

Demyttenaere et al. (2001) relataram que o fungo *Aspergillus niger* converteu (*S*)-(+)-linalool em óxido *cis*- e *trans*-furanóide de linalool (rendimento de 30% e 5%, respectivamente) e em óxido *cis*- e *trans*-piranóide de linalool (rendimento de 14% e 1,5%, respectivamente).

Adams et al. (2003) investigaram a biotransformação do (R)-(+)- e (S)-(-)–limoneno pelo fungo *Penicillium digitatum*. Houve a formação de (R)-(+)- $\alpha$ -terpineol em 8 horas com redimento em torno de 93%. A forma (R)-(+)- foi mais convertida que a forma (S)-(-)– em  $\alpha$ -terpineol.

Demyttenaere, Vanoverschelde e De Kimpe (2004) descreveram a biotransformação do (R)-(+)-citronelol e (S)-(-)-citronelol pelos fungos
Aspergillus sp. e Penicillium sp. em cis-óxido rosa, trans-óxido rosa e óxido nerol (rendimento de 54%, 21% e 12%, respectivamente).

#### 1.3 Resolução quiral

A separação de enantiômeros tem despertado o interesse de muitos profissionais da área, sendo que várias técnicas têm sido empregadas para esse fim, como por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography*), a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês, *Gas Chromatography*), a Cromatografia com Fluido Super Crítico (SFC, do inglês, *Supercritical Fluid Chromatography*) e, mais recentemente, a Eletroforese Capilar (CE, do inglês, *Capillary Electrophoresis*). Nesse estudo foi empregada a HPLC que será discutida em maiores detalhes.

#### 1.3.1 A utilização de fases estacionárias quirais em HPLC

Existem dois processos diferentes para se analisar compostos quirais por HPLC: (1) procedimento indireto e (2) procedimento direto (MARTINS et al., 1991).

Entre a década de 70 e 80, o procedimento indireto foi bastante utilizado; esse procedimento baseia-se na formação de diastereoisômeros com reagentes quirais opticamente puros, os quais, podem ser separados empregando fases estacionárias não quirais. Os procedimentos indiretos apresentam algumas desvantagens, por exemplo: demanda tempo já que necessita de uma etapa adicional de preparação da amostra; requer reagentes opticamente puros havendo a necessidade de avaliar a pureza enantiomérica do reagente, bem como a possibilidade de racemização durante a sua estocagem ou a reação de derivação; pode ocorrer a formação desproporcional de cada membro do par de diastereoisômeros (resolução cinética) e faz-se necessário um posterior tratamento químico para a recuperação dos enantiômeros (SRINIVAS; IGWEMEZIE, 1992; SANTORO, 1992). Segundo Srinivas e Igwemezie (1992), as vantagens dos procedimentos indiretos são a disponibilidade comercial de reagentes para a derivação de vários grupos funcionais e a alta flexibilidade com respeito às condições cromatográficas.

A resolução dos enantiômeros também pode ser feita pelo método direto empregando aditivos quirais na fase móvel. Nesse caso, a separação depende do tipo e concentração do aditivo quiral, do pH e da presença de modificadores orgânicos (CAMILLERI, 1991). Apesar deste procedimento possibilitar o uso de vários aditivos para uma mesma coluna e o uso de colunas convencionais (maior robustez, altas eficiência e capacidade), esta técnica necessita de grandes quantidades de seletores quirais, tornado-a menos atrativa em razão do elevado custo (MARTINS et al., 1991).

Atualmente, utiliza-se com muito mais frequência o método direto envolvendo o uso de fases estacionárias quirais (CSP, do inglês, *Chiral Stationary Phase*), que formam complexos diastereoisoméricos transitórios com os enantiômeros. A separação, ou seja, diferentes tempos de retenção, ocorre devido à diferença de estabilidade dos complexos formados (MARTINS et al., 1991). Apesar de ser um procedimento de custo elevado, devido ao alto preço das colunas, e com mecanismo de separação quiral de difícil entendimento, é bastante utilizado pois possui várias vantagens, tais como: vasto número e tipos de colunas quirais disponíveis comercialmente, rapidez na análise cromatográfica e os enantiômeros podem ser recuperados com relativa facilidade.

Muitos pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de fases estacionárias quirais que podem ser constituídas de vários materiais, tais como: seletores quirais naturais como proteínas, enzimas, oligossacarídeos, antibióticos macrocíclicos; seletores semisintéticos como oligossacarídeos e polissacarídeos modificados; e seletores quirais sintéticos como os seletores tipo Pirkle, éter de coroa, derivados de prolina e polímeros helicoidais sintéticos (ELIEL; WILEN, 1994a,b; OKAMOTO; KAIDA, 1994; OGUNI et al., 1995; OKAMOTO; YASHIMA, 1998;). Neste tópico serão discutidas apenas as fases quirais derivadas de polímeros helicoidais que foram utilizadas neste trabalho.

### 1.3.1.1 Fases estacionárias quirais derivadas de polímeros helicoidais

A amilose e a celulose são polissacarídeos helicoidais encontrados em grande abundância na natureza. Estes polímeros *in natura* possuem limitada capacidade de resolução quiral mas podem ser convertidos em vários derivados como fenilcarbamatos e triésteres, criando novos sítios de reconhecimento quiral. A derivação dos grupos hidroxila da celulose e amilose mantém a estrutura helicoidal e forma uma estrutura terciária criando cavidades que podem reter moléculas estereosseletivamente (DÄPPEN et al., 1986; SHIBATA et al., 1989; GÜBITZ, 1990).

Colunas preparadas com fases estacionárias quirais baseadas nesses polissacarídeos são muito usadas para separações quirais em escala analítica e preparativa por apresentarem durabilidade, eficiência, estabilidade, versatilidade e alto poder de resolução (OKAMOTO; KAIDA, 1994).

Segundo Bargmann-Leyder et al. (1995), as diferenças cromatográficas entre as fases estacionárias quirais derivadas de amilose e celulose são atribuídas à conformação helicoidal 3/2 da cadeia da celulose e conformação 4/1 da cadeia da amilose, conforme apresenta a **FIGURA 3**.



As colunas quirais derivadas de polissacarídeos (amilose e celulose)

mais utilizadas na resolução de racematos encontram-se na FIGURA 4.



Os solutos quirais podem interagir com os grupamentos C=O e NH através de ligações de hidrogênio; através de interações dipolo-dipolo, também podem interagir com os grupos C=O (**FIGURA 5**). Apesar das interações  $\pi$ - $\pi$  do grupo fenila da fase estacionária com os grupos aromáticos do soluto serem menos importantes que as interações polares, essas interações mantêm a estrutura estérea da molécula e provavelmente também influenciam no reconhecimento quiral do soluto (OKAMOTO; YASHIMA, 1998; WANG; CHEN, 1999; YASHIMA, 2001).



Além disso, o reconhecimento quiral é influenciado pelos substituintes do grupo fenila, como por exemplo, grupo metila, etila, halogênios ou NO<sub>2</sub>. Segundo Chankvetadze et al. (1995), em um estudo feito sobre a influência de grupos doadores (metila) e aceptores (halogênios) de elétrons na resolução de vários compostos quirais, os derivados 3,4-dissubstituídos (3,4-dimetila, 3,4-dicloro, 3,4-clorometila e 3,4-metilcloro) de derivados de fenilcarbamatos de amilose apresentaram mesma habilidade de а reconhecimento quiral. Ao contrário, os derivados 2,5-dissubstituídos (2,5-dimetila, 2,5-dicloro, 2,5-clorometila e 2,5-metilcloro) apresentaram diferentes habilidades de reconhecimento quiral quando se mudava os substituintes. A fase estacionária baseada no derivado 2,5-clorometilsubstituído conseguiu separar 14 compostos quirais e apresentou alto fator de separação ( $\alpha$ ), pequenos tempos de retenção ( $t_R$ ) e melhores resoluções ( $R_s$ ).

#### **1.3.2** Modo de eluição normal, reverso e polar orgânico

As fases estacionárias quirais podem ser empregadas nos modos de eluição normal, reverso e polar-orgânico, permitindo a separação de compostos quirais com as mais diversas características, tanto em escala analítica como preparativa (OKAMOTO; KAIDA, 1994; OKAMOTO; YASHIMA, 1998; TACHIBANA; OHNISHI, 2001).

O modo normal, que geralmente emprega uma mistura de alcano (hexano) e álcool (2-propanol ou etanol), é freqüentemente utilizado. A escolha do álcool pode influenciar na enantiosseletividade do método (OKAMOTO; YASHIMA, 1998). A separação de fármacos que possuem grupamentos ácidos ou básicos pode ser otimizada com a adição de pequenas quantidades de um ácido (ácido trifluoracético, TFA) ou de uma base (dietilamina, DEA) (OKAMOTO; YASHIMA, 1998), respectivamente. Porém, nem sempre essa relação é verdadeira e a separação de moléculas com caráter básico também tem sido realizada com a adição de TFA na fase móvel. O ácido presente na fase móvel pode formar um par iônico com o analito básico e assim melhorar a separação. Também é possível que o ácido possa mascarar os grupos silanóis presentes na fase estacionária e diminuir as interações não-quirais com o analito (BARTOLINIC et al, 2005).

No modo reverso, são utilizados principalmente soluções aquosas e modificadores orgânicos miscíveis. Os modificadores orgânicos mais empregados são a acetonitrila ou metanol pois apresentam baixa viscosidade e baixa absorção no UV (TACHIBANA; OHNISHI, 2001). Quando se deseja controlar o pH da fase móvel faz-se uso de soluções tampão.

Já o modo polar-orgânico emprega fases móveis compostas por solventes orgânicos polares puros, tais como: acetonitrila, metanol, etanol, propanol ou suas misturas (TACHIBANA; OHNISHI, 2001). Esse modo pode ser atraente para separações em escalas preparativas pois torna possível a reciclagem do solvente, quando usado puro.

#### 1.4 Tioridazina

Os antipsicóticos ou neurolépticos inibem funções psicomotoras como excitação e agitação, além de diminuírem os distúrbios neuropsíguicos responsáveis por delírios e alucinações (BALLONE, 2003). A tioridazina, 10-[2-(1metil-2-piperidinil)etil]-2-(metiltio)-10*H*-fenotiazina, conhecida comercialmente no Brasil como MELLERIL<sup>®</sup>, é um fármaco pertencente a classe das fenotiazinas. É muito utilizada como antipsicótico, neuroléptico, ansiolítico e anti-histamínico apresentar potente bloqueio muscarínico não-seletivo, bloqueio por dopaminérgico D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, acentuado bloqueio  $\alpha_1$ -adrenérgico e  $H_1$ -histaminérgico e potente bloqueio serotominérgico  $(5H_{12A})$  (HILL, 1976; BOLDEN et al., 1992; LIN et al., 1996; LIN et al., 2002). Embora aprovada e com ampla aceitação no Estados Unidos desde o ano de 1959, em julho de 2000, a Food and Drug Administration requereu que a NOVARTIS® Pharmaceuticals incluissse no rótulo, uma advertência aos médicos de que o produto só deveria ser usado em caso de refratariedade ou efeitos adversos intoleráveis aos antipsicóticos de primeira linha, por apresentar efeito cardiotóxico evidenciado (FDA, 2006c). É comercializada na forma de racemato, 50% do enantiômero (-)-(R) e 50% do enantiômero (+)-(S) (SVENDSEN et al., 1988). A THD foi escolhida para a realização deste estudo por ser bastante utilizada no Brasil e apresentar um metabolismo bastante interessante com a formação de inúmeros metabólitos, havendo inclusive a criação de novos centros quirais durante o processo de biotransformação. Os metabólitos formados apresentam efeito terapêutico e/ou tóxico mas essas atividades ainda não foram totalmente discriminadas, principalmente no que se refere à contribuição de cada estereoisômero.

#### 1.4.1 Propriedades estereosseletivas da tioridazina

O efeito terapêutico da THD deve-se a uma inibição na atividade da enzima adenilato ciclase. A ativação dos receptores  $D_2$  e  $D_1$  no sistema nervoso central leva à inibição e estimulação desta enzima, respectivamente. Portanto, a elucidação da estereoquímica da THD é muito importante pois o enantiômero (+)-(*R*) apresenta 2,7 vezes maior afinidade pelos receptores  $D_2$  isolados do cérebro de ratos, enquanto seu antípoda apresenta afinidade 10 vezes maior pelos receptores  $D_1$ . Com isso, conclui-se que o efeito terapêutico da THD ocorre devido ao enantiômero (+)-(*R*) (EAP et al., 1995). Segundo Svendsen et al. (1988), a (-)-(*S*)-THD aparentemente é mais tóxica que a (+)-(*R*)-THD em doses elevadas. Isso sugere que a administração do enantiômero (+)-(*R*)-THD em vez do racemato pode ser vantajosa.

A THD quando biotransformada sofre oxidação do átomo de enxofre na posição 2, catalisada pela enzima CYP 2D6, levando a formação de dois metabólitos: a tioridazina-2-sulfóxido (THD-2-SO ou mesoridazina) e tioridazina-2-sulfona (THD-2-SO<sub>2</sub> ou sulforidazina), ambos possuindo atividade antipsicótica. A THD-2-SO foi introduzida nos anos 60, com os nomes comerciais de LIDANAR<sup>®</sup> e LIDANOR<sup>®</sup> (países escandinávos), LIDANIL<sup>®</sup> (Holanda) ou SERENTIL<sup>®</sup> (EUA e Canadá), como antipsicótico de intermediária a baixa potência. Possui perfil semelhante mas com maior efeito cardiotóxico que a THD. Segundo Bylund (1981), a THD-2-SO e a THD-2-SO<sub>2</sub>, *in vitro*, exerceriam ações muito mais poderosas nos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e dopaminérgicos que a THD, tendo apenas apresentado menor ação nos receptores muscarínicos. A THD-2-SO<sub>2</sub> chegou a ser avaliada em ensaios clínicos europeus nos anos 70 como antipsicótico mas não alcançou o pleno desenvolvimento por apresentar menor ação extrapiramidal que a THD. Da mesma forma que a THD-2-SO, estudos *in vitro* mostraram maior potência sobre os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e dopaminérgicos que a THD mas menor afinidade pelos receptores muscarínicos (NIEDZWIECKI et al., 1984; NIEDZWIECKI et al., 1989).

A oxidação na posição 5 do anel fenotiazina leva a formação de outro metabólito, a tioridazina-5-sulfóxido (THD-5-SO) que é desprovida de atividade neuroléptica mas contribui para o efeito cardiotóxico do fármaco (HALE et al., 1986; EAP et al., 1991; LIN et al., 1993; BLAKE et al., 1995; DANIEL et al., 1997).

Estudos realizados indicam que a principal rota metabólica da THD, em humanos e animais é a oxidação na posição 2 do grupo tiometila; as hidroxilações aromáticas, *N*-desmetilações e *N*-oxidações são rotas menos importantes no metabolismo em humanos. Já em ratos e cães, a desmetilação e hidroxilação são rotas com apreciáveis intensidades. Estudos *in vitro* sugerem que camundongos desmetilam a THD com menor intensidade que ratos e cães e praticamente não há formação da THD-2-SO<sub>2</sub> (BLAKE et al., 1995; DANIEL et al., 2000). Daniel et al. (1999), em estudo realizado com microssomos de fígado de ratos, sugeriram que a *N*-desmetilação e 2-sulfoxidação da THD são catalizadas pelas CYPs 2D1, 2B e 2A1 enquanto que a 5-sulfoxidação é catalizada somente pela CYP 1A2. Enzimas da sub-família CYP 2C e CYP 3A não estão envolvidas no metabolismo da THD. Na **FIGURA 6** encontram-se as rotas metabólicas da THD.



\* Centros quirais (Adapatado de BAUMANN et al., 2002).

A metabolização da THD leva a formação de novos centros quirais. A THD-2-SO possui 4 estereoisômeros pois a THD sofreu oxidação do enxofre da cadeia lateral formando mais um centro quiral. O mesmo ocorre com a THD-5-SO, devido à oxidação do anel fenotiazina, também existindo na forma de quatro estereoisômeros. A sulfonação da THD-2-SO resulta na formação da THD-2-SO<sub>2</sub> que perde, assim, um de seus centros quirais, existindo na forma de um único par de enantiômeros.

Os estudos farmacocinéticos descritos na literatura indicam que a disposição cinética da THD é estereosseletiva, havendo predominância do enantiômero (+)-(*R*) no plasma de humanos (EAP et al., 1995). Ocorre, também, diferenças estereosseletivas no metabolismo *in vitro* da THD. Em estudo preliminar apresentado em congresso, Siccardi e Kamali (2002) indicaram que os principais metabólitos formados pela incubação com microssomos de fígado de ratos são: nortioridazina, THD-2-SO, THD-5-SO, nortioridazina-2-sulfóxido e THD-2-SO<sub>2</sub>. Além disso, existem diferenças significativas na formação destes metabólitos quando os enantiômeros ou a mistura racêmica são incubados com microssomos hepáticos de ratos.

Mais recentemente, Wójcikowski et al. (2005) concluiram que as diferentes estruturas dos neurolépticos fenotiazínicos influenciam suas interações com os sítios catalíticos do citocromo P-450. A CYP 1A2 e CYP 3A4 são as principais enzimas responsáveis pela 5-sulfoxidação e N-desmetilação enquanto a CYP 2D6 cataliza a mono-2 e di-2-sulfoxidação da THD em fígados humanos. Além disso, estes pesquisadores sugerem que a CYP 3A4 também contribui significativamente mono-2-sulfoxidação para а que а razão е THD-2-SO<sub>2</sub> / THD-2-SO pode ser um marcador mais específico da atividade da CYP 2D6 que a razão THD-2-SO / THD.

#### 1.5 Análise enantiosseletiva da tioridazina

Jortani e Poklis (1993) relatam um método para a separação dos enantiômeros da THD em soro utilizando acoplamento sequencial de uma coluna aquiral de fase reversa e uma coluna quiral constituída por fenilmetiluréia ligada à sílica. Eap et al. (1995) analisaram os enantiômeros da THD e de seus metabólitos utilizando uma coluna aquiral e várias colunas quirais. Ambos métodos foram desenvolvidos empregando HPLC.

Wang e Khaledi (1996) descreveram a separação quiral de aminas racêmicas (trimipramina, mianserin e tioridazina) por eletrofore capilar em meio aquoso, usando  $\beta$  e  $\gamma$  ciclodextrinas como seletores quirais. Chen e Lin (2001) conseguiram a resolução dos enantiômeros da prometazina, etopropazina, trimeprazina e tioridazina utilizando a eletroforese capilar. Chen et al. (2002) relataram a separação dos enantiômeros da THD e de mais 12 fenotiazinas por eletroforese capilar utilizando  $\beta$ -ciclodextrinas. Entretanto, todos esses métodos não contemplam a análise dos metabólitos nem a análise dos fármacos em fluidos biológicos.

Em nosso laboratório, De Gaitani et al. (2003a, 2004) fizeram a análise enantiosseletiva da THD, THD-2-SO<sub>2</sub> e THD-2-SO em plasma empregando HPLC e dos isômeros da THD-5-SO empregando CE (De GAITANI et al., 2003b). Além disso, fizeram um estudo cinético de estabilidade e de mudança de configuração induzida pela luz.

Mais recentemente, Bhushan e Gupta (2006) relataram a separação dos enantiômeros da THD presente em formulação farmacêutica por HPLC empregando fase estacionária quiral de  $\beta$ -ciclodextrinas.

Portanto, existe nove métodos descritos na literatura para a análise da THD e/ou seus metabólitos empregando HPLC ou CE, que, entretanto, apresentam as desvantagens de empregar várias colunas quirais e aquirais

23

realizando duas etapas cromatográficas ou então separar apenas os estereoisômeros de um dos compostos. A resolução dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO numa única corrida cromatográfica, requerida para análise dos meios de cultura de estudo cinético de biotransformação empregando

fungos, ainda não foi descrita até o momento.

## Objetivos

25

O objetivo deste trabalho é estudar a biotransformação estereosseletiva da THD empregando algumas espécies de fungos. Para isto fezse necessário o desenvolvimento das seguintes etapas:

- 1 Desenvolvimento e validação de um método para análise estereosseletiva da THD-2-SO e THD-5-SO em meios de cultura empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral;
- 2 Obtenção dos extratos em éter etílico e da massa micelial dos fungos endofíticos isolados de *Tithonia diversifolia*, *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta* e do fungo *Penicillium waksmanii* isolado de solo;
- 3 Realização do estudo cinético de biotransformação da THD para avaliação do potencial de biotransformação estereosseletiva de vários fungos

# Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Reagentes e solventes

### 3.1.1.1 Reagentes e solventes empregados no procedimento analítico

Foram utilizados os seguintes solventes grau cromatografia (HPLC) para a preparação de fases móveis e de soluções-padrão: hexano e metanol obtidos da MALLINCKRODT<sup>®</sup> Baker Inc. (Paris, França) e etanol proveniente da MERCK<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha). A dietilamina grau p. a., obtida da J. T. BAKER<sup>®</sup> Inc (Phillipsburg, EUA), foi utilizada na composição da fase móvel. O éter etílico MALLINCKRODT<sup>®</sup> Baker Inc. (Paris, França) grau p. a., foi empregado para extração do fármaco e metabólitos. Utilizou-se *N*,*N*-dimetilformamida grau p. a., obtida da VETEC<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil), para dissolução do fármaco na etapa de biotransformação. O hidróxido de sódio grau p. a., obtido da NUCLEAR<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil), foi utilizado na preparação de uma solução 4 mol L<sup>-1</sup>, empregada na etapa de extração líquido-líquido do analitos. Água destilada foi utilizada para a preparação dos meios de cultura. Nas demais etapas utilizou-se água purificada no sistema MILLI-Q PLUS<sup>®</sup> – Millipore / Millipore Corporation (Bedford, EUA).

#### 3.1.1.2 Reagentes empregados na preparação dos meios de cultura

Os reagentes utilizados na preparação dos meios de cultura foram: extrato de malte (MERCK<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha), peptona (OXOID<sup>®</sup>, Basingstoke, Reino Unido), glicose (SYNTH<sup>®</sup>, Diadema, Brasil) ágar (OXOID<sup>®</sup>, Basingstoke, Reino Unido), batata dextrose ágar (OXOID<sup>®</sup>, Basingstoke, Reino Unido), fubá (TRIVIAL<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, Brasil), glicose (SYNTH<sup>®</sup>, Diadema, Brasil), farinha de aveia (NESTLE<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), pasta de tomate (CICA<sup>®</sup>, Valinhos, Brasil), cloreto de cálcio diidratado (MERCK<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha), cloreto de potássio (REAGEN<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), cloreto de manganês (CARLO ERBA REAGENTI<sup>®</sup>, Milão, Itália), cloreto de cobre tetrahidratado (REAGEN<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de ferro (II) heptahidratado (REAGEN<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de magnésio heptahidratado (REAGEN<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de magnésio heptahidratado (REAGEN<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), ácido bórico (REAGEN<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), molibdato de amônio tetrahidratado (MALLINCKRODT<sup>®</sup>, Paris, França), sulfato de zinco heptahidratado (MALLINCKRODT<sup>®</sup>, Paris, França), sacarose (VETEC<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), nitrato de sódio (VETEC<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), hidrogenofosfato de potássio (HENRIFARMA<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil).

#### 3.1.2 Soluções-padrão

O Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar (CROEC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto possui a THD e seus metabólitos THD-2-SO, THD-5-SO e THD-2-SO<sub>2</sub> como uma mistura racêmica de seus enantiômeros que foram gentilmente cedidos pela NOVARTIS<sup>®</sup> Pharma AG., Basle, Swizerland. A THD-2-SO e THD-5-SO possuem 2 centros quirais e podem existir na forma de 4 isômeros. As substâncias disponíveis no laboratório são constituídas pelos isômeros (*S*)-THD-2-SO (*FE*) / (*R*)-THD-2-SO (*FE*) e (*S*)-THD-5-SO (*SE*) / (*R*)-THD-5-SO (*SE*). Os demais isômeros, (*S*)-THD-2-SO (*SE*) / (*R*)-THD-2-SO (*SE*) e (*S*)-THD-5-SO (*FE*) / (*R*)-THD-5-SO (*FE*) foram obtidos através da exposição das soluções de THD-2-SO e THD-5-SO à luz, de acordo com o procedimento discutido por De Gaitani et al. (2003a,b).

As soluções - padrão de THD e de seus metabólitos foram preparadas em metanol nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 10,0; 20,0; 40,0;

80,0; 200,0; e 400,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, à partir de uma solução estoque de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. As soluções preparadas foram estocadas a - 20° C e na ausência de luz.

#### 3.1.3 Equipamentos

#### 3.1.3.1 Balanças utilizadas

- Adventurer OHAUS<sup>®</sup> Corp. (Pine Brooke, EUA): carga máxima: 210g
  e carga mínima: 0,001g;
- ➡ MARTE<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil) Modelo Al 200C: carga máxima: 200g e carga mínima: 0,02g.

#### 3.1.3.2 Equipamentos utilizados na preparação das amostras

Um agitador de tubos PHOENIX<sup>®</sup> modelo AP56 (Araraquara, Brasil) foi utilizado para agitar as amostras e assim promover a extração dos analitos. Além disso, uma centrífuga FANEM<sup>®</sup> Excelsa Baby I modelo 206 (São Paulo, Brasil) foi utilizada para separação das fases orgânica e aquosa.

### 3.1.3.3 Equipamentos utilizados no cultivo dos fungos e reação de biotransformação

Uma autoclave vertical PHOENIX<sup>®</sup> modelo AV 75 (Araraquara, Brasil) foi utilizada para a esterilização de materiais e meios. Empregou-se também estufa de incubação FANEM<sup>®</sup>, modelo 347 CD (São Paulo, Brasil), estufa de secagem e esterilização FANEM<sup>®</sup>, modelo 315 BE (São Paulo, Brasil), pHmetro CORNING<sup>®</sup>, modelo 430 (Nova Iorque, EUA), capelas de fluxo laminar VECO<sup>®</sup>, modelo VL FS – 09 M (Campinas, Brasil) e PACHANE<sup>®</sup>, modelo PA 320 (Piracicaba, Brasil), microscópio OLYMPUS<sup>®</sup>, modelo CH-2 (Tokyo, Japão), bomba à vácuo CIENTEC<sup>®</sup> modelo 613 (Piracicaba, São Paulo) e mesas agitadoras com controle de temperatura (New Brunswick Scientific modelo INNOVA <sup>™</sup> 4300 – New Jersey, EUA e TECNAL<sup>®</sup> modelo 410 – Piracicaba, São Paulo).

## 3.1.3.4 Equipamento de espectrofotometria na região do ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta e do visível das soluções de THD-2-SO e de THD-5-SO, preparadas na concentração de  $0,5 \ \mu g \ mL^{-1}$  em metanol, foram obtidos usando um espectrofotômetro UV-visível – NIR HITACHI<sup>®</sup> modelo U-3501 (Tokyo, Japão), utilizando celas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

#### 3.1.3.5 Equipamentos utilizados na exposição à luz

Foi utilizada uma fonte de radiação de luz UV-visível DESAGA<sup>®</sup> (Heidelberg, Alemanha) no comprimento de onda de 254 nm.

#### 3.1.3.6 Sistema cromatográfico

A análise dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO foi realizada em cromatógrafo SHIMADZU<sup>®</sup> (Kyoto, Japão), composto por uma bomba modelo LC-10AS, um detector por absorção no UV-visível modelo SPD-10A operando em 262 nm. As injeções foram feitas manualmente em injetor RHEODYNE<sup>®</sup> modelo 7125 (Cotati, USA) com amostrador de 50 μL. Os dados foram coletados e analisados por um integrador Chromatopac modelo CR6-A SHIMADZU<sup>®</sup> (Kyoto, Japão).

#### 3.1.4 Coluna quiral

Foi utilizada a coluna CHIRALPAK<sup>®</sup> AS (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, EUA) constituída do derivado de amilose tris ((S) -  $\alpha$  - metilbenzilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10  $\mu$ m, empregada em condições de fase normal.

29

#### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Avaliação das condições cromatográficas quirais

As análises por HPLC foram realizadas a uma temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}$ C; alíquotas de 25 µL de soluções – padrão nas concentrações de 80 ou 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> da mistura racêmica de THD-2-SO e THD-5-SO foram colocadas em tubos de ensaio, adicionadas de metanol (200  $\mu$ L) e expostas à luz UV (254 nm) para a formação dos 4 estereoisômeros de ambos os fármacos, visto que os padrões utilizados são constituídos apenas pela mistura racêmica de seus principais enantiômeros. Depois disso, as amostras foram evaporadas até a secura sob fluxo de nitrogênio. O nitrogênio foi utilizado por ser um gás inerte não provocando a oxidação dos analitos. Os resíduos secos foram dissolvidos em 100 µL de fase móvel e 50 µL foram analisados. A coluna CHIRALPAK<sup>®</sup> AS foi empregada em condições de fase normal utilizando-se várias fases móveis, constituídas por misturas de hexano, etanol e metanol em diferentes proporções e respeitando as limitações impostas pelos fabricantes. A dietilamina (DEA), uma base orgânica, também foi utilizada visando diminuir a interação do analito com os grupos silanóis residuais da fase estacionária, o que propicia melhor resolução pois ocorre a eliminação das caudas nos picos dos compostos básicos.

A separação cromatográfica foi avaliada pelo cálculo dos seguintes parâmetros: resolução ( $R_s$ ), fator de retenção (k), fator de separação ( $\alpha$ ) e número de pratos (N).

A resolução (R<sub>s</sub>) foi calculada pela Fórmula 1:

(1) 
$$R_s = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right)$$

onde:  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  correspondem aos tempos de retenção do composto menos retido e do mais retido, respectivamente. Já  $w_{b1}$  e  $w_{b2}$  correspondem a largura dos picos menos retido e mais retido.

O fator de retenção (k) foi calculado pela Fórmula 2:

(2) 
$$\mathbf{k} = \frac{\mathbf{t}_{\mathsf{R}} - \mathbf{t}_{\mathsf{M}}}{\mathbf{t}_{\mathsf{M}}}$$

onde:  $t_R$  corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e  $t_M$  ao tempo de retenção de um composto não retido na coluna. O  $t_M$  foi obtido pela média do tempo (n = 10) que a fase móvel levou para ser analisada. A separação é considerada satisfatória para valores de k entre 2 e 10.

O fator de separação (α) foi calculado pela **Fórmula 3**:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

onde:  $k_1$  corresponde ao fator de retenção do composto menos retido e  $k_2$  ao fator de retenção do composto mais retido na coluna.

O número de pratos (N) foi calculado pela Fórmula 4:

$$\mathbf{N} = \mathbf{16} \left( \frac{\mathbf{t}_{\mathsf{R}}}{\mathbf{w}_{\mathsf{b}}} \right)^{2}$$

onde:  $t_R$  corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e  $w_b$  a largura da base do pico do composto de interesse.

#### 3.2.2 Biotransformação da THD empregando fungos

#### 3.2.2.1 Isolamento e seleção dos fungos endofíticos

A coleta do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos foram realizados pelo Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob supervisão da Profa Dra Mônica Tallarico Pupo.

Os fungos foram isolados de folhas e raízes de *Tithonia diversifolia*, *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta* recém coletadas na rodovia SP 330 – W. Luis, Km 240-245 (região de Ribeirão Preto), dia 01/03/04, no período da manhã. Os fungos endofíticos foram coletados com procedimento adequado, afim de garantir a inexistência de qualquer outro microrganismo (adaptado de BACON, 1990).

#### 3.2.2.2 Isolamento do fungo de solo *Penicillium waksmanii*

As amostras de solo foram coletadas na região de São Carlos pelo Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e armazenadas a 4º C antes do uso. Foi utilizado o método de diluição de solo em placas para isolamento do fungo (STAINER et al., 1969).

#### 3.2.2.3 Manutenção dos microrganismos

Os fungos isolados foram mantidos em tubo *slant* contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar), sob refrigeração. A cada seis meses eram repicados, para o mesmo meio, em capela de fluxo laminar, com auxílio de alça de platina; desta forma havia garantia de meio para sua sobrevivência.

#### 3.2.2.4 Identificação dos microrganismos

Os fungos foram identificados através de técnicas de biologia molecular por colaboração estabelecida entre a Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo, Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman e Dra. Cristina Kawano. Os dados encontrados foram comparados com os dados do GenBank pelo programa BLASTn, sendo importante ressaltar que apenas homologia do sequenciamento acima de 96% deve ser considerada para uma real afirmação da espécie em

análise. A TABELA 3 mostra os fungos em estudo.

Código	Espécies identificadas	Homologia (%)
TD2	Phomopsis sp.	93
TD4	Cercospora kikuchii	99
VA1	Glomerella cingulata	100
VA2	Colletotrichum gloeosporioides	100
VA 14	Phomopsis amygdali	93
VA15	Guignardia mangiferae	100
VA19	Phomopsis longicolla	97
VA20	Penicillium ochrochloron	96
VR4	Diaporthe phaseolorum	97
VR5	Penicillium brevicompactum	99
VR8	Pestalotiopsis foedans	98
VR12	Aspergillus fumigatus	99
PW	Penicillium waksmanii	*

**TABELA 3** – Fungos utilizados nos estudos de biotransformação e identificação por biologia molecular.

\*o fungo *Penicillium waksmanii* (PW) foi identificado por taxonomia convencional pela Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil).
 **Obs.:** o fungo *Phomopsis* sp. (TD2) não possui homologia suficiente para confirmação da espécie.

#### 3.2.2.5 Condições de cultivo e reações de biotransformação

Os estudos realizados com fungos baseiam-se em seu isolamento e posterior incubação em meio apropriado para seu crescimento. Todas as condições de crescimento dos fungos haviam sido determinadas em estudos anteriores realizados no laboratório da Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo. Feito isso, o fungo é colocado em outro meio juntamente com o fármaco a ser estudado, para, se possível, promover sua biotransformação.

Os fungos foram repicados, em duplicata, em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura solidificado com inclinação semelhante para garantir a mesma superfície de contato e incubados a 30° C, por 10 dias para *Penicillium waksmanii* (PW) em meio MEA (**TABELA 4**) e 7 dias para os demais fungos em meio BDA (**TABELA 5**).

Em seguida, os conídios produzidos pelo fungo *Penicillium waksmanii* (PW), foram coletados acrescentando-se 5 mL de água destilada estéril à superfície da cultura e raspando-se levemente, formando uma suspensão de conídios que foram contados em câmara de Neübauer. Para os demais fungos, adicionaram-se 5 mL de água estéril na superfície da cultura e fez-se a raspagem, formando uma suspensão de fungos.

Cerca de 5 × 10<sup>6</sup> a 1 × 10<sup>7</sup> conídios por mL da suspensão *Penicillium waksmanii* (PW) e 5 mL da suspensão dos demais fungos foram inoculados assepticamente em 25 mL de meio pré – fermentativo de Jackson (**TABELAS 6 e 7**) separadamente e incubados por 2 dias (48 horas), sob agitação constante (120 rpm) a 30° C, para crescimento dos fungos. Em seguida, a massa micelial foi coletada assepticamente por filtração a vácuo e reinoculada em 50 mL do meio fermentativo de Czapek (**TABELA 8**) junto com a THD (1 mg – 100  $\mu$ L DMF). A mistura foi incubada por 6 dias sob agitação de 120 rpm a 30° C. A cada dia, uma alíquota de 3 mL, foi coletada assepticamente e armazenada a –20° C até o momento da análise de cada fungo. Esta alíquota foi filtrada em filtro MILLIPORE<sup>®</sup> (0,45  $\mu$ m). Após o período de 6 dias, o restante do fluido foi separado da massa micelial por filtração a vácuo e armazenado a –20° C para eventual necessidade. As alíquotas foram submetidas a extração e posteriormente analisadas por HPLC. Durante todo procedimento, as amostras foram protegidas da ação da luz.

,	
Reagente	Quantidade
Extrato de malte	20 g L <sup>-1</sup>
Peptona	1 g L <sup>-1</sup>
Glicose	20 g L <sup>-1</sup>
Ágar	20 g L <sup>-1</sup>

**TABELA 4 –** Constituintes do meio MEA (Extrato de malte e levedura).

TABELA 5 – Constituinte do meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar).

Reagente	Quantidade
Batata Dextrose Ágar	39 g L <sup>-1</sup>

**TABELA 6 -** Constituintes do meio pré-fermentativo (JACKSON et al., 1993).

Reagente	%
Fubá	0,25
Glicose	1,00
Farinha de aveia	1,00
Pasta de tomate	4,00
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	1,00
Solução de traços 10,00 mg L $^{-1}$	1,00
Água destilada	25 mL

**Obs.:** Cada componente foi pesado e adicionado a Erlenmayer de 125 mL, seguido da adição de 25 mL de água (cada alíquota de meio deve ser feita individualmente pois a mistura não é homogênea).

2000).	
Reagente	%
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,1000
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0,1000
CuCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0,0025
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,0100
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0560
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0,0019
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,0200
Água destilada	100 mL

**TABELA 7** - Constituintes da solução de traços (JACKSON et al., 1993).

**Obs.:** Em balão volumétrico de 100 mL, colocou-se 50 mL de água e cada componente foi pesado e adicionado conforme ordem da tabela. Feito isso, o volume foi completado com água destilada para 100 mL.

TABELA 8 - Constituintes	do	meio	fermentativo	de	Czapek
(ALVIANO et al., 1992).					

Reagente	%
Sacarose	3,000
NaNO <sub>3</sub>	0,200
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,100
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,050
KCI	0,050
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,001
Água destilada	400 g

**Obs.:** Cada componente foi pesado, adicionado e solubilizado, conforme ordem da tabela, a um béquer de 500 mL contendo 350 mL de água destilada. Feito isso, adicionou-se água até a massa de 400 g e o pH foi corrigido para 5 com HCl.

Nas **FIGURAS 7-10** encontram-se os fluxogramas empregados para a obtenção dos inóculos e as condições de biotransformação com o fungo

Penicillium waksmanii (PW) e demais fungos endofíticos.









#### 3.2.3 Procedimento de preparação da amostra

A técnica de extração líquido-líquido foi empregada na preparação das amostras. Esta técnica consiste na partição do analito entre líquidos imiscíveis, geralmente, água e solventes orgânicos (McDOWALL, 1989). A fase aquosa normalmente é a matriz de onde será extraído o analito por um solvente orgânico extrator.

Para otimizar as condições de preparação da amostra foi necessário um meio de cultura (Czapek) sem a presença dos analitos (branco – controle negativo), ou seja, sem a THD-2-SO e THD-5-SO. Ao mesmo tempo, necessitava-se de uma matriz mais parecida com a amostra real e por isso a matriz escolhida para os estudos foi um *pool* dos meios de cultura que foram incubados com os fungos sem a presença do fármaco. Desta forma, obteve-se uma matriz com todos os constituintes, ou seja, meio Czapek, metabólitos produzidos pelos fungos e sem a presença dos analitos em estudo. Os experimentos de otimização das condições também foram realizados com 1 mL de meio de cultura branco fortificado com 25 µL das soluções de THD-2-SO e THD-5-SO na concentração de 80 µg mL<sup>-1</sup>. Na **FIGURA 11** encontra-se o esquema básico da técnica de extração líquido-líquido empregada.



39

#### 3.2.4 Ordem de eluição

A ordem de eluição dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO nas condições de análise deste estudo foi avaliada utilizando as mesmas colunas quirais empregadas nos estudos realizados em nosso laboratório por De Gaitani et al. (2003a,b; 2004) e no trabalho descrito por Eap et al. (1995).

#### 3.2.5 Validação do método

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação, exatidão e recuperação adequados à análise (ANVISA, 2003).

Deve-se ressaltar que toda a validação do método foi realizada apenas para o par de enantiômeros (*R*)-THD-2-SO (*FE*) / (*S*)-THD-2-SO (*FE*) e (*R*)-THD-5-SO (*SE*) / (*S*)-THD-5-SO (*SE*) para os quais se dispunha dos padrões.

#### 3.2.5.1 Estudo de seletividade

O meio de cultura Czapek, antes e depois do processo de incubação dos fungos, foi analisado para verificação de possíveis interferentes presentes em seus constituintes e/ou seus produtos de degradação, assim como, a presença de metabólitos secundários produzidos pelos fungos (**TABELA 9**).

	Possíveis interferentes			
F	Estudo Meio de cultura Czape		DMF*	THD**
rungos	1	x		
	2	x	x	
	3	x	x	x
Phomopsis sp. (TD2)	4	x	x	
Cercospora kikuchii (TD4)	5	x	x	
Glomerella cingulata (VA1)	6	x	x	
Colletotrichum gloeosporioides (VA2)	7	x	x	
Phomopsis amygdali (VA14)	8	x	x	
Guignardia mangiferae (VA15)	9	x	x	
Phomopsis longicolla (VA19)	10	x	x	
Penicillium ochrochloron (VA20)	11	x	x	
Diaporthe phaseolorum (VR4)	12	x	x	
Penicillium brevicompactum (VR5)	13	x	x	
Pestalotiopsis foedans (VR8)	14	x	x	
Aspergillus fumigatus (VR12)	15	x	x	
Penicillium waksmanii (PW)	16	x	x	

#### TABELA 9 - Avaliação da seletividade do método.

\*100  $\mu$ L, \*\* 1 mg de THD dissolvida em 100  $\mu$ L de DMF.

#### 3.2.5.2 Linearidade e curva analítica

A linearidade é determinada pela análise de soluções-padrão de diferentes concentrações, abrangendo a faixa de concentração de interesse no trabalho, ou seja, varia em função da finalidade da análise e do tipo de instrumento usado.

A linearidade foi avaliada construindo-se uma curva analítica com adição do analito à matriz em duplicata. Em 1 mL de meio de cultura foram adicionadas soluções-padrão com concentrações crescentes obtendo-se 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 2500 e 5000 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero da THD-2-SO e THD-5-SO (**TABELA 10**). Após a fortificação das amostras, estas foram submetidas ao procedimento de extração.

Concentração dos Padrões (µg mL <sup>-1</sup> )	Volume de solução padrão adicionado em 1mL de meio de cultura (µL)	Concentração da mistura racêmica (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentração final de cada enantiômero (ng mL <sup>-1</sup> )
1,0	25,0	25,0	12,5
2,0	25,0	50,0	25,0
4,0	25,0	100,0	50,0
10,0	25,0	250,0	125,0
20,0	25,0	500,0	250,0
40,0	25,0	1000,0	500,0
80,0	25,0	2000,0	1000,0
200,0	25,0	5000,0	2500,0
400,0	25,0	10000,0	5000,0

TABELA 10 - Concentração final dos enantiômeros nos meios de cultura.

As áreas dos picos foram registradas e colocadas no eixo das ordenadas e as concentrações de cada enantiômero foram colocadas no eixo das abscissas. A análise de regressão utilizada foi a dos mínimos quadrados onde a variável independente refere-se à concentração teórica das substâncias na matriz. A regressão foi representada graficamente pela equação da reta e a correlação pelos coeficiente de correlação (*r* de Pearson) e de determinação ( $r^2$ ).

Adicionalmente, os dados do sinal (áreas) foram divididos pelas suas respectivas concentrações, fornecendo as respostas relativas. Sendo assim, um gráfico foi plotado com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. São plotadas outras linhas horizontais paralelas no gráfico, para 95% e 105% da faixa linear (intervalo de confiança – 5%) e conclui-se que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 95 ou 105% (BURKE, 2002).

#### 3.2.5.3 Recuperação

O teste de recuperação foi realizado para avaliar a eficiência do método de extração da amostra. A recuperação é calculada pela **Fórmula 5:** 

## (5) Recuperação<sub>Absoluta</sub> = $\frac{Média \text{ dos valores obtidos}}{Média \text{ dos valores reais}} \times 100$

A recuperação do método ELL foi avaliada empregando os esquemas das **FIGURAS 12** e **13**, ou seja, as soluções-padrão foram adicionadas antes e depois de realizar a partição das fases aquosa e orgânica. Este procedimento foi adotado para mimetizar as análises das amostras fortificadas antes do procedimento de extração, evitando assim possíveis erros causados pela injeção puramente dos padrões.





A adição das concentrações de 10, 40 e 200 μg mL<sup>-1</sup> da THD-2-SO e THD-5-SO resulta em concentrações finais de 125, 500 e 2500 ng mL<sup>-1</sup> (**TABELA 10**) de cada enantiômero. Os valores obtidos foram considerados como os sinais (área dos picos) das concentrações reais (**FIGURA 12**) e obtidas (**FIGURA 13**) dos analitos em questão. Ambas as análises foram feitas em triplicata para cada concentração.

#### 3.2.5.4 Precisão e exatidão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. As medidas podem ser simultâneas (precisão intra-ensaios) e podem ser intercaladas (precisão interensaios). Esse parâmetro é avaliado pelo coeficiente de variação (CV%) de acordo com a **Fórmula 6**:

(6) 
$$CV(\%) = \frac{SD}{M} \times 100$$

Onde *SD* representa a estimativa do desvio padrão e M a média dos valores de concentrações obtidos das amostras analisadas em replicata.

A exatidão é a diferença entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise. É avaliada pelo afastamento entre os valores esperado e obtido e pode ser representada pela **Fórmula 7**:

## (7) $E_{(\% erro)} = \frac{valor obtido - valor real}{valor real} \times 100$

Para a avaliação da precisão e exatidão, foram preparadas amostras de 20 mL de meio de cultura fortificados nas concentrações de 125, 500 e 2500 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero da THD-2-SO e da THD-5-SO. Para tanto, 500  $\mu$ L das soluções-padrão de 10, 40 e 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> foram transferidos para tubos com tampa esmerilhada. O solvente foi quase totalmente evaporado sob fluxo de nitrogênio, restando apenas uma pequena fração do solvente pois os analitos são praticamente insolúveis em fase aquosa. Após a adição de 20 mL de meio de cultura, cada tubo foi agitado por 15 minutos e três alíquotas de 6 mL foram distribuídas em tubos cônicos âmbares. Destes, um tubo de cada concentração foi analisado no primeiro dia e os outros tubos foram congelados a  $-20^{\circ}$  C e sob abrigo da luz e, um a um, foram descongelados nos dois dias seguintes para análise. Portanto, a precisão e exatidão interensaios foram avaliadas em três dias consecutivos e a precisão e exatidão intra-ensaios foram avaliadas em quintuplicata (n = 5).
Os cálculos para avaliar a precisão e exatidão intra e interensaios foram baseados em curvas analíticas, processadas diariamente da mesma forma que as amostras.

#### 3.2.5.5 Limite de quantificação

No método proposto, o limite de quantificação foi determinado fortificando-se amostras de 1 mL de meio de cultura (n = 5) com 25  $\mu$ L de uma solução-padrão de 2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de THD-2-SO e THD-5-SO resultando numa concentração final de 25 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero. Essas amostras foram analisadas com base em uma curva analítica preparada com amostras de meio de cultura fortificado com concentrações de 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 2500 e 5000 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero, em duplicata para cada concentração.

# 3.2.6 Estudo de estabilidade da THD nas condições de biotransformação

Em estudo realizado em nosso laboratório por De Gaitani et al. (2003a,b; 2004), observou-se que a THD sofria degradação na presença de luz (fotosensível) e oxidação pela presença de oxigênio. Portanto, se fez necessário avaliar a estabilidade da THD no meio de cultura durante os 6 dias do processo de biotransformação.

A THD dissolvida em dimetilformamida (1 mg em 100  $\mu$ L) foi incubada em meio de cultura Czapek por 6 dias. A cada 24 horas de incubação a 120 rpm, 30° C, foi coletada uma alíquota de 3 mL nas mesmas condições do estudo cinético de metabolismo *in vitro*. Após o período de 6 dias, o restante do fluido foi separado por filtração a vácuo e armazenado a  $-20^{\circ}$  C. As alíquotas foram submetidas a extração e posteriormente analisadas por HPLC para verificação de possíveis produtos de degradação. O estudo de estabilidade da THD no meio de cultura durante os 6 dias de processo de biotransformação foi realizado com:

- ⇒ frascos descobertos e sem cuidados quanto à exposição a luz na retirada das alíquotas;
- ⇒ frascos cobertos (papel alumínio + jornal) e com todo cuidado na retirada das alíquotas quanto à exposição a luz.

#### 3.2.7 Estudo cinético de metabolismo *in vitro*

As alíquotas obtidas nos 6 dias de incubação dos fungos foram submetidas ao procedimento de extração e análise cromatográfica. A concentração dessas amostras foi obtida com base em curvas analíticas submetidas ao mesmo procedimento. Um gráfico concentração x tempo de incubação foi plotado para avaliação da formação dos metabólitos.

O potencial de formação dos metabólitos da THD pelos fungos também foi avaliado pela porcentagem de formação de cada metabólito. A (*R*)-THD pode dar origem as formas (*R*)-(*FE*) e/ou (*R*)-(*SE*) e a (*S*)-THD as formas (*S*)-(*FE*) e/ou (*S*)-(*SE*). Desta forma, foram plotados gráficos para as formas (*R*)-(*FE*) / (*R*)-(*SE*) e (*S*)-(*FE*) / (*S*)-(*SE*) para se obter melhor visualização dos resultados.

Além disso, uma tabela foi construída com os valores máximos de concentração de cada metabólito. Com a utilização do padrão da THD-2-SO<sub>2</sub> obteve-se seu tempo de retenção para a análise qualitativa da formação deste metabólito pelos fungos, uma vez que a coluna utilizada não separa seus dois enantiômeros.

## Resultados e

Discussão

#### 4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1 Determinação do comprimento de onda para detecção

Através da avaliação dos espectros de absorção obtidos na região do ultravioleta e visível no intervalo de 200 a 400 nm, foi possível estabelecer um comprimento de onda satisfatório para a análise simultânea da THD-2-SO e THD-5-SO, já que cada fármaco absorve mais energia em comprimentos de onda ligeiramente diferentes, conforme apresenta a **FIGURA 14**. O comprimento de onda estabelecido para as análises foi 262 nm que é o comprimento de onda de absorção máxima da THD-2-SO e onde a THD-5-SO também absorve.



## 4.2 Otimização da análise estereosseletiva da THD-2-SO e THD-5-SO

A THD-2-SO e THD-5-SO possuem dois centros quirais e, portanto, se apresentam como 4 estereoisômeros, que foram denominados como (S)-(FE), (R)-(FE), (S)-(SE) e (R)-(SE) por Eap et al. (1995). FE (Fast Eluted) e SE (Slow Eluted) são denominações dadas aos fármacos devido a seu comportamento cromatográfico em colunas de fases reversa; R e S são

48

denominações dadas segundo a IUPAC relativas às configurações absolutas. A

FIGURA 15 mostra os centros quirais da THD-2-SO e THD-5-SO.



O Laboratório possui os padrões das formas (*S*)-(*FE*) *e* (*R*)-(*FE*) para a THD-2-SO e as formas (*S*)-(*SE*) *e* (*R*)-(*SE*) para THD-5-SO e, portanto, para a realização dos estudos foi preciso obter as outras formas de cada fármaco através da exposição à luz UV, ou seja, as formas (*S*)-(*SE*) *e* (*R*)-(*SE*) para a THD-2-SO e as formas (*S*)-(*FE*) *e* (*R*)-(*FE*) para a THD-5-SO (De GAITANI et al., 2003b). Para tanto, 25  $\mu$ L de uma solução 80  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de cada um dos fármacos (racematos da forma *FE* da THD-2-SO e da forma *SE* da THD-5-SO) foram colocados em tubos de ensaio e expostos à luz UV (254 nm) por 4 horas, a uma distância de 10 cm. Acrescentaram-se também 200  $\mu$ L de metanol, para evitar a evaporação de todo o solvente, devido ao aquecimento provocado pela ação da luz. Após exposição da amostra, o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e os resíduos dissolvidos em 100  $\mu$ L de fase móvel. Feito isso, injetou-se 50  $\mu$ L no cromatógrafo para promover a separação das espécies.

Para se obterem as melhores condições cromatográficas de separação simultânea das oito espécies realizaram-se modificações do sistema solvente citado na literatura (EAP et al., 1995), avaliando-se as fases móveis descritas na **TABELA 11**. Para todos os experimentos, a detecção foi realizada

em 262 nm e a coluna utilizada foi a CHIRALPAK<sup>®</sup> AS. Dentre as disponíveis no laboratório, essa foi a coluna que resultou na melhor separação desses compostos, em estudo previamente realizado (BONATO et al., 2002).

Ao longo dos experimentos, pôde-se verificar que com o aumento da porcentagem de dietilamina na fase móvel, a resolução dos picos melhorava pois esta atua como competidor básico com os fármacos, bloqueando os grupos silanóis residuais da sílica (TANG, 1996). A utilização do solvente metanol melhorava a resolução dos analitos e diminuía o tempo de retenção dos compostos mas, os tempos de retenção variavam durante as análises, provavelmente devido à dificuldade de solubilização do metanol em hexano. Por isso, optou-se por utilizar apenas uma pequena porcentagem desse solvente.

**TABELA 11** – Diferentes fases móveis utilizadas para avaliar a separação dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO.

	Solventes	s (%, v/v/v)			Vazão
Hexano	Etanol	Isopropanol	Metanol	+ DEA (%)	(mL min <sup>-1</sup> )
90	10			0,1	1,0
90	10			0,2	1,0
75	25			0,2	1,0
75	25			0,3	1,0
85	15			0,2	1,0
05	15			0.2	1,0
85	15			0,3	1,4
00	10	10		0.5	1,0
80	10	10		0,5	1,4
					0,6
05	10		F	0.5	0,8
65	10		5	0,5	1,0
					1,4
85		10	5	1,0	1,0
75	15		10	0,5	1,0
00	-		-	0 5	1,0
90	5		5	0,5	1,2
00	7		2	0 5	1,2
90	/		٢	0,5	1,4
02	<u> </u>		_		1,2
92	<b>D</b>		2	0,5	1,4

Obs.: em azul, a fase móvel que resultou na melhor separação; DEA, dietilamina

A melhor separação para os padrões utilizados foi obtida empregando hexano : etanol : metanol (92:6:2, v/v/v) + 0,5% de DEA, vazão de 1,4 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 262 nm (**FIGURA 16A**). Nessas condições a THD elui muito próximo ao t<sub>M</sub>, sem que haja resolução dos enantiômeros e a THD-2-SO<sub>2</sub> elui em torno de 16 minutos, mas sem resolução quiral. A separação cromatográfica obtida dos sete estereoisômeros está representada na **FIGURA 16B**.

A separação cromatográfica para os enantiômeros THD-2-SO presentes em maior porcentagem foi excelente, porém para a *(S)*-THD-2-SO *(SE)* e *(R)*-THD-2-SO *(SE)*, não se obteve resolução muito boa.

A mistura racêmica da THD-5-SO exposta à luz UV quando injetada na coluna CHIRALPAK<sup>®</sup> AS apresentou 3 e não 4 picos no cromatograma como se espera, pois (*R*)-THD-5-SO (*SE*) e (*S*)-THD-5-SO (*FE*) coeluem (EAP et al., 1995) (**FIGURA 16B**). Com nenhuma das fases móveis avaliadas obteve-se a resolução dos 4 estereoisômeros da THD-5-SO.



Os parâmetros cromatográficos para a separação dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO estão descritos na **TABELA 12**.

**TABELA 12** – Parâmetros cromatográficos para a separação dos enantiômeros da THD-2-SO e THD-5-SO na coluna CHIRALPAK<sup>®</sup> AS; fase móvel: hexano : etanol : metanol (92:6:2, v/v/v) + 0,5% de DEA; vazão de 1,4 mL min <sup>-1</sup>; detecção em 262 nm.

Picos	1	2	3	4	5	6	7
Rs	1,00		4,67	0,75	1,40	1,27	1,27
k	4,00	4,50	8,00	8,75	10,50	12,25	14,00
α	1,13		1,78	1,09	1,20	1,17	1,14
Ν	1600	1936	1296	1521	940	1797	1600

Onde: Rs, resolução; α, fator de separação; k, fator de retenção; N, número de pratos;  $t_M = 1,94$  min.

A ordem de eluição dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO foi determinada baseando-se em estudos realizados em nosso laboratório por De Gaitani et al. (2003a,b; 2004) e no trabalho desenvolvido por Eap et al. (1995). A ordem de eluição da THD-2-SO foi determinada reproduzindo as condições do trabalho de Eap et al. (1995), na qual os autores também utilizaram uma coluna CHIRALPAK® AS. Nosso laboratório possui o padrão da THD-5-SO como uma mistura da forma SE, ou seja, THD-5-SO (SE). Desta forma, o padrão da THD-5-SO (SE) foi injetado na coluna CHIRALCEL® OD, ou seja, nas condições utilizadas no trabalho de Eap et al. (1995) obtendo-se 2 picos que foram coletados. Adicionalmente, as formas THD-5-SO (FE) foram obtidas expondo-se o padrão da THD-5-SO (SE) à luz e, da mesma forma, os picos foram coletados. Segundo Eap et al. (1995), as formas (R)-THD-5-SO (SE) e (S)-THD-5-SO (FE) coeluem. As frações coletadas foram injetadas nas condições do presente trabalho. Portanto, a ordem de eluição obtida foi: Pico 1 -(S)-THD-2-SO (FE), Pico 2 - (R)-THD-2-SO (SE), Pico 3 - (S)-THD-2-SO (SE), Pico 4 - (R)-THD-2-SO (FE), Pico 5 - (R)-THD-5-SO (SE) + (S)-THD-5-SO (FE), Pico 6 - (S)-THD-5-SO (SE) e Pico 7 - (R)-THD-5-SO (FE).

## 4.3 Desenvolvimento do método para a análise estereosseletiva da THD-2-SO e THD-5-SO em meio de cultura

#### 4.3.1 Procedimento de preparação da amostra

O procedimento de preparação da amostra visa obter uma recuperação máxima dos compostos de interesse e a extração mínina de substâncias que possam interferir na análise. A extração líquido-líquido que é baseada na extração direta dos analitos por solventes imiscíveis com a água, além de ser uma técnica extremamente simples, apresenta vantagens como a variabilidade de solventes que podem ser utilizados. A distribuição dos analitos na fase orgânica ou aquosa segue a Lei de Nernst sendo que a taxa de distribuição entre as duas fases é influenciada pelo tipo e volume do solvente extrator e pH da fase aquosa (McDOWALL, 1989).

Por outro lado, esta técnica possui as seguintes desvantagens: solutos com alta afinidade pela água podem ser apenas parcialmente extraídos pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito; exige solventes ultrapuros pois suas impurezas podem ser concentradas junto com os analitos; pode ocorrer formação de emulsões; volumes relativamente grandes de amostra e solventes são utilizados; toxicidade dos solventes orgânicos; adsorção dos analitos na vidraria e difícil automação (QUEIROZ et al., 2001).

#### 4.3.1.1 Solvente extrator

É de suma importância que o analito seja solúvel no solvente extrator para que possa ocorrer a análise de modo satisfatório. Os solventes extratores devem ter baixo ponto de ebulição para que ocorra evaporação com facilidade, baixas viscosidade e tensão superficial para que possam ter maior interação com a amostra. Segundo De Gaitani et al. (2003b), o éter etílico apresentou bons resultados para a extração da THD e seus metabólitos de amostras de plasma, sendo então empregado nesse estudo. Por possuir baixo ponto de ebulição (p.e. =  $32^{\circ} \pm 3^{\circ}$  C), baixa viscosidade (vis. = 0,24, a  $25^{\circ}$  C) e baixa tensão superficial ( $\gamma$  = 17 mN m<sup>-2</sup>, 20 °C), o éter etílico apresenta boas características para uso como solvente extrator. Para não ocorrer erros devido à evaporação do solvente extrator, já que não se utilizou padrão interno, as etapas envolvidas na preparação das amostras foram realizadas com bastante cuidado, ou seja, os tubos utilizados durante o procedimento de extração e centrifugação foram muito bem vedados e os volumes de solvente colocado ou retirado foram medidos com pipetas volumétricas para se ter melhor precisão nas medidas.

#### 4.3.1.2 Estudo do pH do meio

Para o sucesso do procedimento de extração, o analito deve estar na forma não ionizada, assim sua afinidade pela fase orgânica é máxima e isso facilita a partição entre fase aquosa e orgânica (McDOWALL, 1989). Segundo De Gaitani et al. (2003a,b), a recuperação da THD e seus principais metabólitos foi maior quando se alcalinizou a matriz biológica (plasma) com uma solução de NaOH 4 mol L<sup>-1</sup>. Diante disso, esta concentração foi avaliada no meio de cultura e também apresentou resultados satisfatórios.

#### 4.3.1.3 Tempo de agitação

Avaliaram-se 20 e 10 minutos de agitação em agitadores mecânicos do tipo horizontal e 4 e 2 minutos de agitação em agitador tipo vórtex. Com 20 e 10 minutos em agitadores horizontais, observou-se que estava ocorrendo uma concentração do analito por evaporação do solvente extrator, mesmo com os tubos bem vedados. Este tipo de agitação também pode ser influenciada pela área de superfície de contato da matriz com o solvente extrator (quanto maior a inclinação do tubo no agitador maior a área de contato e maior o poder de extração). Devido à impossibilidade de padronizar a inclinação dos tubos e a evaporação dos solventes, optou-se por empregar a agitação em vórtex (mais rápida). Comparando-se os tempos 4 minutos e 2 minutos de agitação, não se observou diferença na quantidade de analito extraída e nem na perda de solvente por evaporação. Diante disso, optou-se por utilizar a extração em menor tempo.

Outros fatores importantes a serem relatados é a agitação de 30 segundos para a mistura dos padrões na matriz antes do processo de extração e a agitação de 45 segundos para dissolver os analitos na fase móvel antes da injeção no cromatógrafo. Estes tempos foram mantidos com o intuito de otimizar de forma sistemática a agitação das amostras para assim garantir uma boa reprodutibilidade das análises.

#### 4.3.2 Lavagem do injetor

Ao longo dos experimentos, verificou-se que se fazia necessário uma lavagem rigorosa do injetor com a fase móvel. Após alguns testes, estabeleceu-se que o injetor seria lavado de forma sistematizada para que não ocorresse problemas de contaminação da amostra: 10 vezes com um volume de 1 mL na posição de injeção e 5 vezes com um volume de 1 mL na posição após injeção; com isso se garantia uma limpeza eficiente do injetor mesmo para as concentrações mais altas analisadas. Entretanto, após cada análise diária se faz necessário a limpeza do injetor com a fase de lavagem hexano : isopropanol (90:10, v/v) sem a DEA pois esta pode formar cristais no injetor e assim danificá-lo.

### 4.4 Validação do método de análise estereosseletiva da THD-2-SO e THD-5-SO

A validação de um método analítico consiste em realizar estudos laboratoriais que garantam as características de desempenho (pârametros analíticos) do método para a aplicação analítica desejada (QUATTROCCHI et al., 1992). A validação do método de análise da THD-2-SO e THD-5-SO foi realizada somente para o par dos principais enantiômeros de cada fármaco pois, como foi mencionado anteriormente, o padrão da THD-2-SO (formas *FE*) e THD-5-SO (formas *SE*) é constituído por apenas um par de enantiômeros.

#### 4.4.1 Estudo de seletividade

Após obter a melhor condição cromatográfica e de preparação das amostras, alíquotas dos meios de cultura com os fungos foram submetidas ao processo de extração e analisadas para identificar possíveis interferentes. O estudo do meio de cultura + dimetilformamida (DMF) (**FIGURA 17**) foi realizado para verificar possíveis interferentes decorrentes dos constituintes e/ou produtos de degradação das substâncias presentes. Com o estudo da THD dissolvida em DMF e adicionada no meio de cultura (**FIGURA 18**) verificou-se a possível degradação do fármaco nas condições de extração. Já nos estudos realizados com os fungos em meio de cultura verificou-se a interferência dos metabólitos secundários que por ventura poderiam ser produzidos (**FIGURAS 19** a **29**).



















Os cromatogramas referentes aos fungos *Penicillium brevicompactum* (VR5) e *Pestalotiopsis foedans* (VR8) apresentaram um pico (metabólito secundário) próximo ao tempo de retenção dos analitos (picos x e y das **FIGURAS 30** e **31**, respectivamente). Sendo assim, realizou-se um experimento onde foram adicionados os padrões (n = 3) junto com o meio de cultura e os respectivos fungos **FIGURAS 32** e **33**.







Conclui-se portanto que nenhum dos fungos produziu interferentes e/ou metabólitos secundários que pudessem interferir nas análises. Apenas os fungos *Penicillium brevicompactum* (VR5) e *Pestalotiopsis foedans* (VR8) apresentaram a formação de metabólitos secundários próximos aos tempos de retenção dos analitos mas, como mostra os cromatogramas das **FIGURAS 32** -**35**, não houve coeluição dos picos após o processo de biotransformação.



Com os processos de otimização das análises e os estudos de seletividade concluídos, deu-se continuidade na validação do procedimento, ou seja, avaliação das características de desempenho expressas através de curva analítica, linearidade, recuperação, precisão e exatidão e limite de quantificação.

#### 4.4.2 Linearidade e curva analítica

A linearidade mede a capacidade de um método analítico em gerar resultados proporcionais (ou outras transformações matemáticas bem definadas) à concentração da espécie em análise, dentro de um faixa de concentração específicada (PENG; CHIOU, 1990; CAUSON, 1997). Para a análise da THD-2-SO e THD-5-SO, foram feitas curvas analíticas no intervalo de concentração de 12,5 a 5000 ng mL<sup>-1</sup>. Em seguida, os dados do sinal (áreas) foram divididos pelas respectivas concentrações, fornecendo as respostas relativas; um gráfico foi construído relacionando as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítima no eixo x. O intervalo de confiança de 5% foi estabelecido (linhas horizontais paralelas em 95% e 105%) e o método foi linear no intervalo de concentração onde a resposta relativa se manteve entre as linhas de 95 e 105% (BURKE, 2002).

Conforme descrito nas **FIGURAS 36** - **39**, somente o primeiro ponto, 12,5 ng mL<sup>-1</sup>, apresentou-se fora do intervalo linear. Portanto, a linearidade do método foi estabelecida no intervalo de 25 a 5000 ng mL<sup>-1</sup>.



linha de 95% da faixa linear.



**FIGURA 37** – Gráfico demonstrando a linearidade do método de análise da (*R*)-THD-2-SO (*FE*) no intervalo de 25 a 5000 ng mL<sup>-1</sup>. Observa-se que o primerio ponto, 12,5 ng mL<sup>-1</sup>, extrapola a linha de 95% da faixa linear.





linha de 95% da faixa linear.

Também foram avaliados os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e correlação (r) para cada fármaco. As curvas analíticas foram construídas colocando-se no eixo das abscissas as concentrações de cada enantiômero e no eixo das ordenadas a área dos picos obtidos.

A partir da análise estatística da regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que o método desenvolvido possui excelente correlação entre concentração e resposta visto que os valores obtidos para r foram maiores que 0,999. Quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão (a e b, y = ax+b). As equações das curvas analíticas, coeficientes de determinação e regressão estão representados nas **FIGURAS 40** e **41**.





#### 4.4.3 Recuperação

Segundo Causon (1997), a recuperação é fundamental para avaliar a eficiência do método de extração. Durante o procedimento de preparação de amostras pode ocorrer perdas por extração incompleta, adsorção, perda de volume ou co-precipitação. Para que ocorra menores perdas dos fármacos é necessário uma otimização das condições de extração (PENG; CHIOU, 1990).

Nas **TABELAS 13** e **14** encontram-se os resultados referentes à recuperação dos enantiômeros da THD-2-SO e THD-5-SO. Pelos dados dessas tabelas pode-se verificar que houve uma boa recuperação (em torno de 100%) para todos os analitos estudados.

Concentração	( <i>S</i> )-THD-2	2-SO ( <i>FE</i> )	(R)-THD	(R)-THD-2-SO (FE)		
(ng mL <sup>-1</sup> )	R (%)	CV(%)	R (%)	CV(%)		
125	100,7	8,9	101,9	6,6		
500	99,1	9,1	100,6	10,6		
2500	96,8	2,9	97,9	3,0		
Médias	98,9	8,1	100,2	7,1		

**TABELA 13** – Recuperação (R%) do método de análise dos enantiômeros da THD-2-SO.

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	( <i>S</i> )-THD-!	5-SO ( <i>SE</i> )	(R)-THD-5-SO ( <i>SE</i> )			
	R (%)	CV(%)	R (%)	CV(%)		
125	110,4	0,9	114,9	1,7		
500	101,4	12,6	101,9	14,0		
2500	99,4	2,1	97,4	1,4		
Médias	103,7	7,5	104,7	8,7		

TABELA 14 – Recuperação (R%) do método de análise dos enantiômeros da THD-5-SO.

#### 4.4.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão são os critérios mais importantes para a avaliação de um método, pois determinam o erro da análise (PENG; CHIOU, 1990).

A precisão geralmente é expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (RSD) ou como porcentagem do coeficiente de variação (CV%). A precisão pode ser uma medida da repetibilidade que refere-se ao uso do procedimento analítico no laboratório, por curto período, usando o mesmo analista e mesmo equipamento. Também pode ser uma medida de reprodutibilidade e se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios (mudança de operador, local, equipamentos, etc.).

#### 4.4.4.1 Precisão intra e interensaios

Na avaliação da precisão do método analítico foram empregadas alíquotas de meio de cultura fortificadas com 125, 500 e 2500 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero para a THD-2-SO e THD-5-SO. Os valores referentes à precisão intra e interensaios encontram-se nas **TABELAS 15** e **16**. Portanto, pode-se verificar que os coeficientes de variação para as três concentrações analisadas, dos enantiômeros da THD-2-SO e THD-5-SO ficaram abaixo de 10%.

Parâmetros	(S)·	THD-2-SO	( <i>FE</i> )	(R) <sup>.</sup>	THD-2-SO	( <i>FE</i> )
-			Precisão in	tra-ensaio		
Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	126,4	462,7	2571,8	123,0	503,8	2665,6
n	5	5	5	5	5	5
CV(%)	3,3	1,3	2,7	5,7	7,1	2,7
			Precisão in	terensaios		
Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	128,4	480,7	2586,4	126,4	477,9	2567,0
n	3	3	3	3	3	3
CV(%)	7,4	9,4	7,6	6,1	6,4	7,0

TABELA 15 - Precisão do método de análise dos enantiômeros da THD-2-SO.

TABELA 16 – Precisão do método de análise dos enantiômeros da THD-5-SO.

Parâmetros	(S)·	THD-5-SO	(SE)	(R) <sup>.</sup>	-THD-5-SO	(SE)
-			Precisão in	tra-ensaio		
Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	133,1	465,0	2549,6	134,8	480,9	2475,6
n	5	5	5	5	5	5
CV(%)	2,4	1,1	1,9	3,5	6,4	2,2
			Precisão in	terensaios		
Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	137,5	471,8	2500,9	125,9	465,1	2434,2
n	3	3	3	3	3	3
CV(%)	3,7	5,3	5,4	6,3	5,8	6,3

#### 4.4.4.2 Exatidão intra e interensaios

A avaliação da exatidão intra e interensaios foi feita utilizando os dados obtidos do estudo da precisão.

Nas **TABELAS 17** e **18** encontram-se os valores referentes à exatidão intra e interensaios. Sendo assim, pode-se verificar que os erros para as três concentrações analisadas dos enantiômeros da THD-2-SO e THD-5-SO foram inferiores a 10%.

Parâmetros	(S)	-THD-2-SO	( <i>FE</i> )	(R) <sup>-</sup>	-THD-2-SO	( <i>FE</i> )
			Exatidão i	ntra-ensaio		
Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	126,4	462,7	2571,8	123,0	503,8	2655,6
n	5	5	5	5	5	5
E(%)	1,1	-7,5	2,9	-1,6	0,8	6,2
			Exatidão ir	nterensaios		
Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	128,4	480,7	2586,4	126,4	477,9	2567,0
n	3	3	3	3	3	3
E(%)	2,7	-3,9	3,5	1,1	-4,4	2,7

TABELA 17 - Exatidão do método de análise dos enantiômeros da THD-2-SO.

TABELA 18 – Exatidão do método de análise dos enantiômeros da THD-5-SO.

Parâmetros	(S)-	THD-5-SO	(SE)	(R)·	-THD-5-SO ( <i>SE</i> )		
-			Exatidão in	tra-ensaio			
Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	133,1	465,0	2549,3	134,8	480,9	2474,6	
n	5	5	5	5	5	5	
E(%)	6,5	-7,0	2,0	7,9	-3,8	-1,0	
			Exatidão in	terensaios			
Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	137,5	471,8	2500,9	125,9	465,1	2434,0	
n	3	3	3	3	3	3	
E(%)	10,0	-5,6	0	0,7	-7,0	-2,6	

Os valores obtidos para precisão e exatidão tabulados nas **TABELAS 15**, **16**, **17** e **18** são adequados e aceitáveis para a realização das análises (QUATTROCCHI et al., 1992; ANVISA, 2003).

#### 4.4.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação é tido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (CAUSON,

1997). O analito deve ser quantificado com erro inferior a 20% (SHAH et al., 1992).

No método de análise proposto, a menor concentração quantificável para os analitos em estudo foi de 25 ng mL<sup>-1</sup> com CVs e erros menores que 15 % (**TABELA 19**).

**TABELA 19** – Valores dos coeficientes de variação e erros para o limite de quantificação da THD-2-SO e THD-5-SO.

	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	E(%)	CV(%)
(S)-THD-2-SO (FE)	27,6	10,4	7,0
(R)-THD-2-SO (FE)	26,7	6,8	5,8
(S)-THD-5-SO (SE)	28,0	12,8	2,3
(R)-THD-5-SO ( <i>SE</i> )	25,3	1,2	9,1

#### 4.5 Estudo de estabilidade da tioridazina

A avaliação da estabilidade da THD no meio de cultura durante os 6 dias de processo de biotransformação foi realizado com os frascos descobertos e sem cuidados quanto à exposição a luz. Outro experimento foi realizado com os frascos cobertos (papel alumínio + jornal) e com todo cuidado na retirada das alíquotas quanto à exposição a luz. As amostras foram analisadas por HPLC e verificou-se que os frascos não cobertos apresentaram degradação formando os metabólitos em estudo (De GAITANI et al., 2003a,b; 2004). Já para os frascos cobertos e com os cuidados quanto à exposição à luz, verificou-se que os metabólitos em estudo não foram formados no decorrer dos 6 dias de incubação (**FIGURAS 41** e **42**).



#### 4.6 Biotransformação da THD empregando fungos

Os procedimentos de cultivo e crescimento dos fungos já haviam sido anteriormente estabelecidos e nenhuma alteração foi introduzida. Para as reações de biotransformação empregamos um procedimento descrito na literatura para a mirtazapina (MOODY et al., 2002), modificado para atender as especificações desse estudo. Como o estudo aqui realizado é de caráter exploratório para avaliar a aplicabilidade de fungos em reações de biotransformação, optamos por manter todas as condições constantes e avaliar o comportamento de diferentes fungos.

As reações de incubação do fármaco (THD) com os fungos foram acompanhadas durante 6 dias, com coleta de uma alíquota a cada 24 horas. Após extração e análise cromatográfica, a concentração dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO foram plotadas em um gráfico concentração x tempo de incubação (**APÊNDICE A**). A porcentagem de formação dos metabólitos também foi calculada considerando que adicionou-se 1 mg de THD em 50 mL de meio de cultura (20000 ng mL<sup>-1</sup>), obtendo-se 10000 ng mL<sup>-1</sup> de cada enantiômero, (*R*)-THD e (*S*)-THD.

Como mencionado anteriormente, a validação do método foi para o par de enantiômeros da THD-2-SO (FE) e realizada apenas THD-5-SO (SE). A obtenção da concentração das amostras para as formas da THD-2-SO (SE) e THD-5-SO (FE) foi baseada na equação da reta obtida dos picos adjacentes, ou seja, para determinar a concentração da (R)-THD-2-SO (SE) (pico 2) utilizou-se a curva analítica obtida da (S)-THD-2-SO (FE) (pico 1) e para a quantificação da (S)-THD-2-SO (SE) (pico 3) utilizou-se a curva analítica obtida da (R)-THD-2-SO (FE) (pico 4). O mesmo se deu para THD-5-SO (SE), sendo que a curva analítica da (R)-THD-5-SO (SE) (pico 5) foi utilizada para quantificar a (R)-THD-5-SO (SE) + (S)-THD-5-SO (SE) (pico 5). O pico 5 pode indicar a presença de (R)-THD-5-SO (SE), (S)-THD-5-SO (FE) ou a mistura dessas espécies. Pelo método não discriminar estas formas, optou-se por denominá-los de (R)-THD-5-SO (SE) + (S)-THD-5-SO (FE). Por fim, a curva analítica obtida da (S)-THD-5-SO (SE) (pico 6) foi utilizada para quantificar a (R)-THD-5-SO (FE) (pico 7). A validação do método referente a esses enantiômeros não é possível pois não há padrões disponíveis comercialmente.

No **APÊNDICE B** encontram-se as fotos dos fungos em seus respectivos meios de crescimento.

O estudo cinético e o potencial de biotransformação dos fungos em estudo estão descritos a seguir. Adicionalmente, alguns artigos existentes na literatura que utilizaram alguns dos fungos utilizados neste trabalho foram discutidos. Os trabalhos citados relatam a utilização dessas espécies em estudos de biotransformação. Deve-se considerar as diferenças entre as formas de obtenção dos fungos e algumas espécies diferentes embora com o mesmo gênero.

#### 4.6.1 *Phomopsis* sp. (TD2)

O fungo *Phomopsis* sp. (TD2) biotransformou estereosseletivamente a THD em ambos metabólitos. Verificou-se que os principais isômeros formados foram as formas (*S*)-(*SE*) e (*R*)-(*FE*) da THD-2-SO e todas as formas da THD-5-SO (**TABELA 20**).

		Ροι	rcentagem	de forma	ção dos metabólitos (	(%)	
Tempo		THD	-2-SO		THD-	5-SO	
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- $(SE)$ + $(S)$ - $(FE)$	(S)- (SE)	(R)- (FE)
24	2,5	10,1	2,3	6,4	3,6	3,0	1,9
48	3,1	12,1	2,9	6,9	11,4	6,1	5,8
72	3,4	12,7	4,2	7,1	13,2	9,3	5,0
96	0,7	13,8	1,8	8,8	9,7	6,2	4,9
120	-	14,1	0,9	8,8	9,7	6,2	4,9
144	-	14,9	0,7	9,1	10,4	6,5	5,5

TABELA 20 - Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo Phomopsis sp. (TD2).

Portanto, o fungo *Phomopsis* sp. (TD2) apresentou grande potencial de biotransformação para a monosulfoxidação da posição 2, assim como da posição 5 e este processo mostrou ser estereosseletivo.

#### 4.6.2 *Cercospora kikuchii* (TD4).

O fungo *Cercospora kikuchii* (TD4) não foi eficiente em promover a biotransformação da THD nas condições empregadas, havendo apenas a formação dos metabólitos (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e (*R*)-THD-2-SO (*FE*) em pequenas quantidades. As formas (*R*)-THD-5-SO (*SE*) + (*S*)-THD-5-SO (*FE*), (*S*)-THD-5-SO (*SE*) e (*R*)-THD-5-SO (*SE*) e (*R*)-THD-5-SO (*SE*) e (*R*)-THD-5-SO (*FE*), (*S*)-THD-5-SO (*SE*) e (*R*)-THD-5-SO (*SE*) e

		Por	centagem	de forma	ção dos metabólitos	(%)			
Tempo	THD-2-SO				THD-	THD-5-SO			
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- $(SE)$ + $(S)$ - $(FE)$	(S)- (SE)	(R)- (FE)		
24	-	-	-	-	-	-	-		
48	-	0,6	-	0,6	-	-	-		
72	-	0,4	-	0,4	-	-	-		
96	-	-	-	-	-	-	-		
120	-	0,8	-	0,7	-	-	-		
144	-	0,3	-	-	-	-	-		

**TABELA 21** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Cercospora kikuchii* (TD4).

#### 4.6.3 *Glomerella cingulata* (VA1)

O fungo *Glomerella cingulata* (VA1) apresentou grande potencial de biotransformação estereosseletiva para a monosulfoxidação da posição 5, mas também houve a monosulfoxidação na posição 2 em menor porcentagem (**TABELA 22**).

O trabalho de Miyazawa, Hashimoto e Kameoka (2001) relata a biotransformação (-)- $\alpha$ -bisabolol pelo fungo *Glomerella cingulata* em até 80% de óxido de (1*S*, 3*R*, 4*R*, 7*S*, 10*S*)-3,4-diidroxi-bisabolol tendo na via metabólica vários metabólitos intermediários. Adicionalmente, Miyazawa e Hashimoto (2001) utilizaram o fungo *Glomerella cingulata* (biocatálise) na hidrólise enantiosseletiva da mistura racêmica 2-endo-acetoxi-1,8-cineol obtendo 50% do álcool enantiomericamente puro, (-)-2-endo-hidroxi-1,8-cineol, e o acetato, (+)-2-endo-acetoxi-1,8-cineol, foi recuperado sem sofrer biotransformação.

No presente trabalho, o fungo *Glomerella cingulata* (VA1) promoveu a formação da forma (*R*)- (*SE*) + (*S*)- (*FE*) da THD-5-SO em torno de 40% tendo os demais metabólitos com baixas porcentagens de formação.

		Por	centagem	de forma	ção dos metabólitos (	(%)			
Тетро		THD	-2-SO		THD-	THD-5-SO			
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- $(SE)$ + $(S)$ - $(FE)$	(S)- (SE)	(R)- (FE)		
24	5,0	5,6	1,2	8,0	13,5	1,0	-		
48	2,4	6,9	0,9	9,0	10,5	0,5	0,3		
72	1,7	5,2	0,6	7,0	8,1	0,7	-		
96	8,1	10,5	2,1	13,0	36,8	0,6	4,9		
120	6,3	7,4	-	8,2	39,6	1,5	4,9		
144	5,0	5,6	-	5,4	39,7	1,2	5,5		

**TABELA 22** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Glomerella cingulata* (VA1).

#### 4.6.4 *Colletotrichum gloeosporioides* (VA2)

Nas condições empregadas, não houve formação dos estereoisômeros dos metabólitos da THD-5-SO durante o período de incubação de 6 dias. O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (VA2) apresentou baixo potencial de biotransformação visto que ocorreu também baixa porcentagem de monosulfoxidação na posição 2 (**TABELA 23**).

**TABELA 23** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (VA2).

Porcentagem de formação dos metabólitos (%)									
Tempo		THD	-2-SO		THD-	THD-5-SO			
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- (SE) + (S)- (FE)	(S)- (SE)	(R)- (FE)		
24	0,6	7,1	0,5	6,0	-	-	-		
48	0,9	8,0	0,8	6,8	0,4	-	-		
72	1,2	7,3	1,1	6,4	-	-	-		
96	0,9	5,0	0,8	4,3	-	-	-		
120	0,6	3,0	0,5	2,7	-	-	-		
144	0,4	2,9	0,3	2,5	-	-	-		

#### 4.6.5 *Phomopsis amygdali* (VA14)

O fungo *Phomopsis amygdali* (VA14) apresentou pequeno potencial de biotransformação estereosseletiva para a monosulfoxidação das posições 2 e 5 apenas nas primeiras 24 horas de incubação. Este resultado pode ser atribuído ao fato deste fungo apresentar uma cinética rápida de formação dos metabólitos em estudo e após este período promover a formação de outros metabólitos que não foram detectados pelo método empregado (**TABELA 24**).

**TABELA 24** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Phomopsis amygdali* (VA14).

Porcentagem de formação dos metabólitos (%)								
Tempo		THD	-2-SO		THD-5-SO			
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- (SE) + (S)- (FE)	(S)- (SE)	(R)- (FE)	
24	2,8	16,3	2,0	9,8	0,9	0,7	0,3	
48	-	-	-	-	-	-	-	
72	-	-	-	-	-	-	-	
96	-	-	-	-	-	-	-	
120	-	-	-	-	-	-	-	
144	-	-	-	-	-	-	-	

#### 4.6.6 *Guignardia mangiferae* (VA15)

A THD não foi biotransformada pelo fungo *Guignardia mangiferae* (VA15) nas condições empregadas nesse estudo.

#### 4.6.7 *Phomopsis longicolla* (VA19)

O fungo *Phomopsis longicolla* (VA19) apresentou pequeno potencial de biotransformação estereosseletiva para a monosulfoxidação das posição 2 e 5 apenas nas primeiras 96 horas de incubação (**TABELA 25**).

Porcentagem de formação dos metabólitos (%)								
Tempo		THD	-2-SO		THD-5-SO			
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- (SE) + (S)- (FE)	(S)- (SE)	(R)- (FE)	
24	0,4	0,4	-	-	0,3	-	-	
48	0,5	-	-	0,4	0,5	0,5	-	
72	0,7	1,2	0,5	1,1	0,4	-	-	
96	2,2	2,9	1,4	2,4	1,3	1,0	1,2	
120	-	-	-	-	-	-	-	
144	-	-	-	-	-	-	-	

**TABELA 25** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Phomopsis longicolla* (VA19).

#### 4.6.8 *Penicillium ochrochloron* (VA20)

Os perfis obtidos utilizando o fungo *Penicillium ochrochloron* (VA20) no processo de biotransformação da THD em seus metabólitos mostraram ser bastante parecidos, ou seja, todos os metabólitos foram formados em porcentagens parecidas (**TABELA 26**).

Adams, Demyttenaere e De Kimpe (2003) relataram a biotransformação das formas (R)-(+)- e (S)-(-)-limoneno pelo fungo *Penicillium digitatum*, sendo a forma (R)-(+)-limoneno (rendimento de 93%) mais convertida que a forma (S)-(-)- em  $\alpha$ -terpineol. Demyttenaere, Vanoverschelde e De Kimpe (2004) relatam a biotransformação do (R)-(+)-citronelol e (S)-(-)-citronelol em *cis*-óxido rosa (54%), *trans*-óxido rosa (21%) e óxido nerol (12%) pelos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp..

Os resultados deste trabalho mostram porcentagens de formação menores. A forma (R)-(SE) + (S)-(FE) da THD-5-SO foram biotransformadas em torno de 7% e os demais metabólitos apresentaram baixas porcentagens de formação.

Porcentagem de formação dos metabólitos (%)								
Тетро	THD-2-SO				THD-	THD-5-SO		
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- (SE) + (S)- (FE)	(S)- (SE)	(R)- (FE)	
24	-	-	-	-	-	-	-	
48	0,3	0,5	0,3	0,5	-	-	-	
72	0,3	0,4	0,3	0,4	0,5	-	-	
96	1,5	2,3	1,4	1,9	4,2	2,7	2,3	
120	2,1	2,7	1,9	2,3	6,7	4,2	3,8	
144	1,1	1,6	1,1	1,4	4,2	2,8	2,5	

**TABELA 26** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Penicillium ochrochloron* (VA20).

#### 4.6.9 Diaporthe phaseolorum (VR4)

A concentração dos metabólitos (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e (*R*)-THD-2-SO (*FE*) ultrapassou 5000 ng mL<sup>-1</sup> nos 1° e 2° dias e após este período começou a decair gradativamente e a forma (*S*)-THD-2-SO (*SE*) não foi quantificada no 4°, 5° e 6° dias de incubação. A análise das amostras obtidas por este fungo deveriam ser diluídas para serem cromatografadas, pois obtiveram-se concentrações superiores a 5000 ng mL<sup>-1</sup>. Contudo, as análises foram realizadas afim de comprovar o potencial de biotransformação dos fungos em estudo.

Portanto, o fungo *Diaporthe phaseolorum* (VR4) apresentou altíssimo potencial de biotransformação estereosseletiva para a monosulfoxidação da posição 2, principalmente para as formas (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e (*R*)-THD-2-SO (*FE*). A monosulfoxidação da posição 5 foi relativamente pequena em comparação com a posição 2 (**TABELA 27**).

Segundo Agusta et al. (2005) a utilização do fungo endofítico *Diaporthe* sp. isolado de *Camellia sinensis* promove a oxidação estereosseletiva do C-4 em flavonas com porcentagens de formação de 2,4% a 75%.

O fungo *Diaporthe phaseolorum* nas condições desse estudo ofereceu maior porcentagem de formação para a THD-2-SO, em especial para as formas (*S*)-(*SE*) (84,4%) e (*R*)- (*FE*) (82,5%).

Porcentagem de formação dos metabólitos (%)								
Tempo		THD	-2-SO		THD-	THD-5-SO		
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- $(SE)$ + $(S)$ - $(FE)$	(S)- (SE)	(R)- (FE)	
24	15,5	61,1	10,0	60,1	0,8	0,6	0,7	
48	18,1	84,4	13,2	82,5	1,1	0,8	0,9	
72	4,4	27,1	8,2	27,1	0,3	-	0,3	
96	1,6	-	-	15,2	-	-	-	
120	-	-	-	2,6	-	-	-	
144	-	-	-	1,0	-	-	-	

**TABELA 27** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (VR4).

#### 4.6.10 *Penicillium brevicompactum* (VR5)

O fungo *Penicillium brevicompactum* (VR5) apresentou baixo potencial de biotransformação estereosseletiva para a monosulfoxidação da posição 2, principalmente para as formas (*S*)-THD-2-SO (*FE*) e (*R*)-THD-2-SO (*SE*) (**TABELA 28**).

Neste trabalho, da mesma forma que a espécie *Penicillium ochrochloron* (VR5), houve a formação da forma (*S*)-(*SE*) da THD-2-SO em pequena porcentagem (5,4%) Os demais metabólitos da THD-2-SO apresentaram baixas porcentagens de formação.

Porcentagem de formação dos metabólitos (%)									
Tempo		THD	-2-SO		THD-	THD-5-SO			
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- $(SE)$ + $(S)$ - $(FE)$	(S)- (SE)	(R)- (FE)		
24	0,5	5,4	0,3	3,0	0,3	-	-		
48	0,4	3,1	-	1,7	-	-	-		
72	-	1,0	-	0,6	-	-	-		
96	-	1,1	-	0,9	-	-	-		
120	-	0,7	-	0,6	-	-	-		
144	-	1,3	-	1,1	-	-	-		

**TABELA 28** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Penicillium brevicompactum* (VR5).

#### 4.6.11 *Pestalotiopsis foedans* (VR8)

O fungo *Pestalotiopsis foedans* (VR8) apresentou baixo potencial de biotransformação estereosseletiva (menor que 12% para todos os metabólitos) para a monosulfoxidação da posição 2 e da posição 5 (**TABELA 29**).

Segungo Parshikov et al. (2001), o fungo Pestalotiopsis quepinii (VR8) biotransformou o ciprofloxacino e norfloxacino em 4 dos maiores metabólitos destes fármacos. Os metabólitos formados do ciprofloxacino incluem *N*-acetilciprofloxacino (52%), desetileno-N-acetilciprofloxacino (9,2%),N-formilciprofloxacino (4,2%) e ácido 7-amino-1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-1,4diidroquinolina-3-carboxílico (2,3%). O norfloxacino foi biotransformado em *N*-acetilnorfloxaxino (55,4%), desetileno-N-acetilnorfloxacino (8,8%),*N*-formilnorfloxacino (3,6%) e 7-amino-1-etil-6-fluoro-4-oxo-1,4ácido diidroquinolina-3-carboxílico (2,1%). Sabe-se que o N-formilciprofloxacino e os 4 metabólitos formados a partir do norfloxacino também são produzidos pelo metabolismo humano.

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram a formação em torno de 12% da espécie (*R*)-(*SE*) + (*S*)-(*FE*) da THD-5-SO utilizando o fungo *Pestalotiopsis foedans* (VR8).

Porcentagem de formação dos metabólitos (%)								
Tempo		THD-	-2-SO		THD-	THD-5-SO		
(horas)	(S)-(FE)	(S)-(SE)	(R)-(SE)	(R)-(FE)	(R)-(SE) + (S)-(FE)	(S)-(SE)	(R)-(FE)	
24	1,6	2,3	1,5	2,1	2,0	1,0	0,8	
48	2,6	3,6	2,5	3,2	2,6	1,5	1,0	
72	3,5	3,6	3,4	3,2	2,6	1,5	1,3	
96	4,1	4,7	4,0	4,1	5,7	2,1	1,6	
120	3,7	4,8	3,7	4,2	9,6	2,6	2,0	
144	3,0	6,0	3,0	5,4	11,8	3,6	2,4	

**TABELA 29** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Pestalotiopsis foedans* (VR8).

#### 4.6.12 Aspergillus fumigatus (VR12)

O metabólito (*S*)-THD-2-SO (*FE*) apresentou a porcentagem de formação máxima de 20,7% e o (*R*)-THD-2-SO (*SE*) de 34,4%. A % de formação máxima foi de 31,5% para (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e de 29,0% para (*R*)-THD-2-SO (*FE*). Houve uma % de formação máxima de 6,9% no 2° dia para a (*R*)-THD-5-SO (*SE*) + (*S*)-THD-5-SO (*FE*). As formas (*S*)-THD-5-SO (*SE*) e (*R*)-THD-5-SO (*FE*) apresentaram baixa % de formação 0,8% e 0,9%, respectivamente (**TABELA 30**).

**TABELA 30** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12).

Porcentagem de formação dos metabólitos (%)							
Tempo		THD-	·2-SO		THD-5-SO		
(horas)	(S)-(FE)	(S)-(SE)	(R)-(SE)	(R)-(FE)	(R)-(SE) + (S)-(FE)	(S)-(SE)	(R)-(FE)
24	10,7	16,3	20,4	16,6	4,4	0,6	0,7
48	20,7	31,5	34,4	29,0	6,9	0,8	0,9
72	7,4	15,7	13,0	12,9	4,0	-	0,3
96	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-	-

Portanto, o fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12) apresentou grande potencial de biotransformação estereosseletiva para a monosulfoxidação da posição 2. Também houve monosulfoxidação na posição 5 mas em menor porcentagem.

#### 4.6.13 *Penicillium waksmanii* (PW)

Como descrito na **TABELA 31**, o fungo *Penicillium waksmanii* (PW) apresentou baixo potencial de biotransformação estereosseletiva para a monosulfoxidação da posição 2 para as formas (*S*)-THD-2-SO (*FE*) e (*R*)-THD-2-SO (*SE*). Já as formas (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e (*R*)-THD-2-SO (*FE*)
apresentaram maior proporção de formação. A monosulfoxidação na posição 5 ocorreu em pequena porcentagem.

Porcentagem de formação dos metabolitos (%)									
Tempo	THD-2-SO				THD-5-SO				
(horas)	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)- (SE)	(R)- (FE)	(R)- (SE) + (S)- (FE)	(S)- (SE)	(R)- (FE)		
24	-	7,6	-	5,5	-	-	-		
48	-	3,1	-	2,2	-	-	-		
72	-	5,5	-	3,9	-	-	-		
96	0,4	13,5	0,4	9,8	0,6	0,3	-		
120	0,3	11,4	0,3	8,4	0,5	-	-		
144	-	3,8	-	2,8	-	-	-		

**TABELA 31** – Porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelo fungo *Penicillium waksmanii* (PW).

A forma (*S*)-THD pode formar os metabólitos (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e/ou (*S*)-THD-2-SO (*FE*) e a forma (*R*)-THD pode formar os metabólitos (*R*)-THD-2-SO (*SE*) e/ou (*R*)-THD-2-SO (*FE*). Sendo assim, os gráficos foram construídos agrupando-se os metabólitos formados a apartir de cada isômero da THD. Os gráficos de cinética e porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelos fungos encontram-se nos **APÊNDICE A**.

Como mencionado anteriormente, seria realizada uma avaliação qualitativa da presença da THD-2-SO<sub>2</sub>, comparando o tempo de retenção característico do padrão da THD-2-SO<sub>2</sub> nas condições de análise. A **TABELA 32** apresenta os fungos que apresentaram formação da THD-2-SO<sub>2</sub> e os respectivos dias em que houve formação deste metabólito.

Fungos	TD2	TD4	VA1	VA2	VA14	VA15	VA19	VA20	VR4	VR5	VR8	VR12	PW
Tempo de incubação (dias)	-	-	6°	2° 5°	-	-	-	-	2° 3° 4°	3° 4° 5° 6°	-	-	5°

**TABELA 32** – Fungos que apresentaram formação da THD-2-SO<sub>2</sub>.

Aparentemente, a formação da THD-2-SO<sub>2</sub> foi baixa não sendo muito significativa em nenhum dos casos.

De acordo com os dados obtidos pôde-se verificar que os fungos em estudo apresentaram potenciais de biotransformação bem diferentes. Para melhor discussão dos resultados a **TABELA 33** foi plotada com os valores de porcentagem de formação máxima dos metabólitos da THD pelos fungos em estudo.

**TABELA 33** – Porcentagem de formação máxima dos metabólitos da tioridazina pelos fungos em estudo.

		% Formação máxima									
Fungos*		THD	-2-SO		THD-5-SO						
Código	(S)- (FE)	(S)-(SE)	(R)-(SE)	(R)- (FE)	(R)- (SE) + (S)- (FE)	(S)- (SE)	(R)- (FE)				
TD2	3,4	14,9	4,2	9,1	13,2	9,3	5,8				
TD4	-	0,8	-	0,7	-	-	-				
VA1	8,1	10,5	2,1	13,0	39,7	1,5	0,9				
VA2	1,2	7,9	1,1	6,8	0,4	-	-				
VA 14	2,8	16,3	2,0	9,8	0,9	0,7	0,3				
VA15	-	-	-	-	-	-	-				
VA19	2,2	2,9	1,4	2,4	1,3	1,0	1,2				
VA20	2,0	2,7	1,9	2,3	6,7	4,2	3,8				
VR4	18,1	84,4	13,2	82,5	1,1	0,8	0,9				
VR5	0,5	5,4	0,3	3,0	0,3	-	-				
VR8	4,1	6,0	4,0	5,4	11,8	3,6	2,4				
VR12	20,7	31,5	34,4	29,0	6,9	0,8	0,9				
PW	0,4	13,5	0,4	9,8	0,6	0,3	-				

\*Os controle negativos não apresentaram formação de nenhuma das espécies em estudo.

**Obs.**: em azul a porcentagem de formação máxima de cada metabólito para o fungo que apresentou maior biotransformação.

Conforme mostra a tabelas acima, quatro fungos merecem destaque. Segundo trabalhos descritos na literatura, os fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Glomerella* sp. e *Diaporthe* sp. possuem comprovado potencial de biotransformação. No presente trabalho estas afirmações foram certificadas já que estes fungos se destacaram promovendo maior biotransformação da THD. De modo geral, os fungos oxidaram tanto o enxofre da cadeia lateral (posição 2) quanto o enxofre do anel fenotiazínico (posição 5). Contudo, a mono-2-sulfoxidação ocorreu com maior frequência. A di-2-sulfoxidação ocorreu fracamente com alguns fungos.

Diante disso, a utilização destes fungos pode ser uma fonte promissora de obtenção dos metabólitos da THD na forma enantiomericamente pura. A THD-2-SO apesar de ser empregada nos Estados Unidos e Canadá nunca foi comercializada no Brasil. Segundo Bylund (1981), este metabólito, in vitro, apresenta ações mais poderosas nos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos е dopaminérgicos que a THD mas apresenta efeitos adversos vegetativos pronunciados. A THD-2-SO pode se apresentar na forma de 4 diastereoisômeros. Ainda não existem estudos que atribuem o efeito terapêutico ou tóxico a determinado enantiômero. Portanto, metodologias de obtenção de formas enantiomericamente puras da THD pode ser útil para a realização de estudos clínicos e/ou toxicológicos.

Conclusões

## 5 CONCLUSÕES

Para a realização do estudo de biotransformação estereosseletiva da THD empregando fungos (13 fungos, 12 endofíticos e 1 de solo) foi necessário o desenvolvimento de um método estereosseletivo análise para dos estereoisômeros da THD-2-SO e THD-5-SO em meio de cultura. A análise da THD-2-SO e THD-5-SO foi realizada empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna quiral CHIRALPAK<sup>®</sup> AS, utilizando como fase móvel hexano : etanol : metanol (92:6:2, v/v/v) + 0,5% de DEA. Embora, não tenha sido possível obter a resolução das 8 espécies, o método desenvolvido apresentou características de desempenho adequadas para a análise pretendida, tais como linearidade (25 a 5000 ng mL<sup>-1</sup>), recuperação (em torno de 100%), exatidão e precisão (CVs e erros inferiores a 10%), seletividade e limite de quantificação.

Depois de desenvolvido e validado, o método foi utilizado para avaliar a cinética de biotransformação da THD empregando os vários fungos selecionados. Durante os experimentos concluiu-se que é de suma importância a ausência de luz artificial, ou seja, os frascos devem ser protegidos da luz em todos os processos evitando assim que ocorra degradação do fármaco. Além disso, é necessária a secagem da amostra com nitrogênio para evitar sua oxidação.

Com base nos dados obtidos, verificou-se que a utilização de microrganismos para a geração de metabólitos, particularmente fungos endofíticos, pode ser bem proveitosa. Os fungos se comportam de forma bastante diferenciada e a seleção do fungo adequado pode levar a obtenção de um estereoisômero específico.

84

Dentre os fungos estudados, quatro mereceram destaque por biotransformação apresentarem potencial de estereosseletivo um mais evidenciado: Phomopsis sp. (TD2) apresentou maior mono-5-sulfoxidação para as formas (S)-(SE) e (R)-(FE) (9,3% e 5,8%, respectivamente); Glomerella cingulata (VA1) apresentou maior mono-5-sulfoxidação para as formas (S)-(SE) + (R)-(FE) (39,7%); Diaporthe phaseolorum (VR4) apresentou maior mono-2-sulfoxidação das formas (S)-(SE) e (R)-(FE) (84,4% e 82,5%, respectivamente) е Aspergillus fumigatus (VR12) apresentou maior mono-2-sulfoxidação das formas (S)-(FE) (20,7%) e (R)-(SE) (34,4%). Estes dois últimos fungos são alternativas interessantes para a produção dos estereoisômeros da THD-2-SO para posteriormente serem avaliados quanto seus efeitos terapêuticos e/ou toxicológicos.

Por fim, estudos de biotransformação que resultem em novas informações sobre metabolismo de fármacos são importantes pois possibilitam a obtenção de novas metodologias para produção de metabólitos, geração de novas entidades químicas (biocatálise) e estudos que reproduzam as vias de metabolização *in vivo e in vitro* convencionais (microssomas). Além disso, fármacos quirais como a THD, que possuem metabólitos ativos e que podem ser empregados na clínica, merecem que estudos farmacológicos sejam realizados sobre a utilização das espécies enantiomericamente puras. A biotransformação da THD por fungos poder vir a ser uma fonte de obtenção dessas espécies.

## Referências

86

- ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J. C. R.; De KIMPE, N. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene to α-terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions. **Food Chem.**, Oxford, v.80, p.525-34, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RE nº 899**, 29 de maio de 2003.
- AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v.1, p.753-68, 2002.
- AGUSTA, A.; MAEHARA, S.; OHASSHI, K.; SIMANJUNTAK, P.; SHIBUTA, H. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.53, p.1565-9, 2005.
- ALEXOUPOULOS, C. J.; MINS, C. W.;BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 4ed.: Jonh Willey and sons Inc., New York, 1996. cap.11, p.294-322.
- ALLENMARK, S. Chromatographic Enantioseparation: methods and applications. 2ed.: Ellis Harwaad, England, 1991. cap.1-3, p.7-48.
- ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R. ANGLUSTER, J. SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.119, p.17-23, 1992.
- ARIENS, E. J. Stereochemistry: a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. Eur. J. Clin. Pharmacol., New York, v.26, p.663–8, 1984.
- ASAKAWA, I.; TAKAHASHI, H.; TOYOTA, M. NOMA, Y. Biotransformation of monoterpenoids, (-) and (+)-menthols, terpinolene and carvotanacetone by *Aspergillus* species. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, p.3981-7, 1991.

- AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: Advances in Biochemical engineering biotechnology. Nova York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.63, p.169-218, 1998.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-Jr, W.; PEREIRO, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electron. J. Biotechnol.**, Valparaiso, v.3, p.40-65, 2000.
- BALLONE, G. J. Antipsicóticos Sedativos. **PsiqWeb**. Disponível em: "http://www.psiqweb.med.br/farmaco/antipsicse.html" Acesso em: 4 ago.2004
- BACON, C. W. In: **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: McGraw – Hill, 1990, p.259-82.
- BARGMANN-LEYDER, N; TAMBUTÉ, A.; CAUDE, M. A comparison of LC and SFC for celulose and amylose-derived chiral stationary phases. **Chirality**, New York, v.7, p.311-25, 1995.
- BARTOLINCIC, A.; DRUSKOVIC, V.; SPOREC, A.; VINKOVIC, V. Development and validation of HPLC methods for the enantioselective analysis of bambuterol e albuterol. J. Pharm. Biomed. Anal., v.36, p.1003-10, 2005.
- Baumann, P.; Zullino, D. F.; Eap, C. B. Enantiomers' potential in psychopharmacology - a critical analysis with special emphasis on the antidepressant escitalopram. **Eur. Neuropsychopharmacol**, Amsterdam, v.12, p.433-44, 2002.
- BHUSHAN, R.; GUPTA, D. HPLC resolution of thioridazine enantiomers from pharmaceutical dosage form using cyclodextrin-based chiral stationary phase. J. Chromatogr. B, Amsterdam, v.837, p.133-7, 2006.
- BLAKE, B. L.; ROSE, R. L.; MAILMAN, R. B.; LEVI, P. E.; HODGSON, E. Metabolism of thioridazine by microssomal monooxygenases: relative roles of P450 and flavin-containing monooxygenase. **Xenobiotica**, Abingdon, v.25, p.377-93, 1995.

- BOLDEN, C.; CUSACK, B.; RICHELSOM, E. Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five loned human muscarinic cholinergic receptors expressed in chinese hamster ovary cells. J. Pharmacol. Exp. Ther., Bethesda, v.260, p.576-80, 1992.
- BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; De GAITANI, C. M. Análise Enantiosseletiva de Fármacos: Contribuições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar. Quím. Nova, São Paulo, v. 28, p. 683-91, 2005.
- BONATO, P. S.; De GAITANI, C. M.; PAIAS, F. O.; IHA, M. H.; LIMA, R. P. Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide- and protein-based chiral stationary phases. J. Braz. Chem. Soc., v.13, p.190-9, 2002.
- BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland: Timber Press, 1994.
- BURKE, S. Regression and calibration. LC-GC Eur., Duluth, p.13-8, 2002.
- BYLUND, D. B. Interactions of neuroleptic metabolites with dopaminergic, alpha adrenergic and muscarinic cholinergic receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther., Bethesda, v.217, p.81-6, 1981.
- CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.694, p.39-48, 1995.
- CALDWELL, J. Importance of estereospecific bioanalytical monitorine in drug metabolism. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.719, p.3-13, 1996.
- CANER, H; GRONER, E.; LEVY, I. Trends in the development of chiral drugs. **Drug Discov. Today**, Oxford, v.9, p.105-10, 2004.
- CANNELL, R. J. P.; RASHID, T.; ISMAIL, I. M.; SIDEBOTTOM, P. J.; KNAGGS A.
  R.; MARSHALL, P. S. Novel metabolites of warfarin produced *by Beauveria bassiana* and *Streptomyces rimosus*: a novel application of HPLC- NMR.
  Xenobiotica, Abingdon, v.27, p.147-57, 1997.

- CAMILLERI, P. Biomedical applications of chiral liquid chromatography. **Biomed. Chromatogr.**, Chichester Wiley, v.5, p.128-32, 1991.
- CAUSON, R. Validation of Chromatography methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.689, p.175-80, 1997.
- CHANKVETADZE, B.; YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Dimethyl-, dichloro- and chloromethylphenylcarbamates of amylose as chiral phases for high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.694, p.101-9, 1995.
- CHEN, K-H.; LIN, C-E. Enantioseparation of phenothiazines in capillary zone electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.930, p.155-63, 2001.
- CHEN, K-H.; LIN, C-E.; LIAO, W-S.; LIN, W-Y.; HSIAO, Y-Y. Separation and migration behavior of structurally realted phenothiazines in cyclodextrinmodified capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. A, Amsterdam, v.979, p.399-408, 2002.
- DAMLE, S. V.; PATIL, P. N.; SALUNKHE, M. M. Biotransformations with *Rhizopus* arrhizus and *Geotrichum candidum* for the preparation of (S)-Atenolol and (S)- Propranolol. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v.8, p.2067-70, 2000.
- DANIEL, W. A.; SYREK, M.; HADUCH, A. Effects of selective cytochrome P-450 inhibitors on the metabolism of thioridazine. In vitro studies. Pol. J. Pharmacol., Kraków, v.51, p.435-42, 1999.
- DANIEL, W. A.; SYREK, M.; HADUCH, A.;WÓJCIKOWSKI, J. Pharmacokinetics and metabolism of thioridazine during co-administration of tricyclic antidepressants. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.131, p.287-95, 2000.

- DANIEL, W. A.; SYREK, M.; MACH, A.; WÓJCIKOWSKI, J.; BOKSA, J. Pharmacokinetics of thioridazine and its metabolits in blood plasma and brain of rats affter acute and chronic treatment. **Pol. J. Pharmacol.**, Kraków, v.49, p.439-52, 1997.
- DÄPPEN, R.; ARM, H.; MEYER, V. R. Aplications and limitations of commercially available chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.373, p.1-20, 1986.
- De CAMP, W. H. The FDA perspective on the development of stereoisomers. **Chirality**, New York, v.1, p.2-6, 1989.
- De GAITANI, C. M.; MARTINEZ, A. S.; BONATO, P. S. Racemization and degradation of thioridazine and thioridazine 2-sulfone in human plasma and aqueous solutions. **Chirality**, New York, v.15, p.479-85, 2003a.
- De GAITANI, C. M.; MARTINEZ, A. S.; BONATO, P. S. Study on thioridazine 5sulfoxide epimerization and degradation by capillary electrophoresis. Electrophoresis, Weinheim, v.24, p. 2723-30, 2003b.
- De GAITANI, C. M.; MARTINEZ, A. S.; BONATO, P. S. Degradation and configurational changes of thioridazine 2-sulfoxide. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.36, p.601-7, 2004.
- DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORIS-VARAS, F. Screening for novel enzymes. **Top. Curr. Chem.**, Berlim, v. 200, p.1-29, 1999.
- DEMYTTENAERE, J. C. R.; VANOVERSCHELDE, J.; De KIMPE, N. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextration for screenig.
  J. Chromatogr. A, Amsterdam, v.1027, p.137-46, 2004.
- EAP, C. B.; KOEB, L.; POWELL, K.; BAUMANN, P. Determination of the enantiomers of thioridazine, thioridazine-2-sulfone and of isomeric pairs thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide in human plasma.
  J. Chromatogr. B, Amsterdam, v.669, p.271-9, 1995.

- EAP, C. B.; SOUCHE, A.; KOEB, L.; BAUMANN, P. Light-induced racemization: artifacts in the analysis the diastereoisomeric pairs of thioridazine-5sulfoxide in the plasma and urine of patients treated with thioridazine. Ther. Drug Monit., Hagerstown, v.13, p.356-62, 1991.
- EKINS, S.; RING, B. J.; GRACE, J.; MCROBIE-BELLE, D. J.; WRIGHTON, S. A.
  Present and future in vitro approaches for drug metabolism. J. Pharmacol.
  Toxicol. Methods, New York, v.44, p.313-24, 2000.
- ELIEL, E.; WILEN S. H. **Stereochemistry of organic compounds**. 1ed, New York: Jonh Wiley & Sons Inc., cap.1, p.1-8, 1994a.
- ELIEL, E.; WILEN S. H. **Stereochemistry of organic compounds**. 1ed, New York: Jonh Wiley & Sons Inc., cap.7, p.297-440, 1994b.
- FAETH, S.; HAMONN, K. Fungal endophytes in Oak Trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. **Ecology**, Washington, v.78, p.820-7, 1997.
- Food and Drug Administration. Department of Health and human services. The international conference on harmonization; guidance on Q6A specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances, 2000. US Food and Drug Administration. Disponível em: http://www.fda.gov/cber/gdlns/frich122900.htm. Acesso em: 14 mar.2006a.
- Food and Drug Administration. FDA's policy statement for a development of new<br/>stereoisomeric drugs. 57 Fed. Reg. 22 249, 1992. US Food and Drug<br/>AdministrationAdministrationDisponívelhttp://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm. Acesso em: 14 mar.2006b.
- Food and Drug Administration (jun/19/2000). Disponível em: www.fda.gov/cder/ogd/rld/17923s48.PDF - Acesso em: 5 jul.2006c.

- FOSTER, B. C.; LITSTER, D. L.; WILSON, D. L.; ORMSBY, E.; DAWSON, B. A. In vitro assessment of cytotoxicity and biotransformation of propranolol in *Cunninghamella echinulata*. Xenobiotica, Abingdon, v.22, p.1221-8, 1992.
- FRANCOTTE, E. R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. J. Chromatogr. A, Amsterdam, v.906, p.379-97, 2001.
- FREITAG, D. G.; FOSTER, R. T.; COUTTS, R. T.; PICKARD, M. A.; PASUTTO, F. M. Stereoselective metabolism of *rac*-mexiletine by the fungus *Chunnighamella echinulata* yelds the major human metabolites hydroxymethylmexiletine and p-hydroxymexiletine. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v.25, p.685-92, 1997.
- FREITAG, D. G.; FOSTER, R. T.; PICKARD, M. A.; PASUTTO, F. M. Highperformance liquid chromatographic method for resolving the enantiomers of mexiletine and two major metabolites isolated from microbial fermentation media. J. Chromatogr. B, Amsterdam, v.616, p.253-59, 1993.
- FRYE, R. F.; MATZKE, G. R.; ADEDOYIN, A.; PORTER, J. A.; BRANCH, R. A. Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. Clin. Pharmacol. Ther., St. Louis, v.62, p.365-76, 1997.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade: um** enfoque químico – biológico. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1996.
- GÜBITZ, G. Separation of drug enatiomers HPLC using chiral stacionary phases selective review. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.30, p.555-64, 1990.
- HALE P. W. JR.; POKLIS, A. Cardiotoxicity of thioridazine and two stereoisomeric forms of thioridazine 5-sulfoxide in the isolated perfused rat heart. Toxicol.
  Appl. Pharmacol., San Diego, v.86, p.44-55, 1986.

- HEZARI, M.; DAVIS, P. J. Microbial models of mammalian metabolism. *N*-dealkylation of furosemide to yield the mammalian metabolite CSA using *Cunninghamella elegans*. **Drug Met. Disp.**, Bethesda, v.20, p.882-8, 1992.
- HILL, S. J.; YOUNG, M. Antagonism of central histamine H1 receptors by antipsychotic drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.52, p.397-9, 1976.
- HYNECK, M.; DENT, J.; HOOK, J. B. **Chirality: pharmacological action and drug development**. In: BROWN, C. (ed.) Chirality in drug design and synthesis. London, Academic Press, 1990. cap.1, p.1-23.
- JACKOSON, M.; KARWOSWSKI, J. P.; HUMPHREY, P. E.; KOHL, W. L.; BARLOW,G. J.; TANAKA, S. K. Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. J. Antibiot., Tokyo, v.46, p.34-8, 1993.
- JORTANI, S. A.; POKLIS, A. Determination of thioridazine enantiomers in human serum by sequential achiral and chiral High-performance liquid chromatography. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.17, p.374-7, 1993.
- LIN, G.; CHU, K-W; DAMANI, L. A.; HAWES, E. M. Identification of lactms as in vitro metabolites of piperidine-type phenothiazine antipsyhotic drugs.
   J. Pharm. Biomed. Anal., Oxford, v.14, p.727-38, 1996.
- LIN, G., HAWES, E. M., MCKAY, G., KORCHINSKI, E. D., MIDHA, K. K. Metabolism of piperidine-type phenothiazine antpsychotic agents.I.V. Thioridazine in dog, man and rat. **Xenobiotica**, London, v.23, p.1059-74, 1993.
- LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J., TAN, R. X. New bioacive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*.
   **Plant. Sci**., Clare, v. 151, p.67-73, 2000.
- McDOWALL, R. D. Sample preparation for biomedical analysis. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.492, p.3-58,1989.

- MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. J. Chromatogr. A, Amsterdam, v.906, p.3-33, 2001.
- MARTINS, J. M. M.; FARINHA, A. R.; MORAIS, J. A. Separação e análise de enantiômeros de fármacos por HPLC. **Rev. Port. Farm.**, Lisboa, v.41, p.14-20, 1991.
- MARZO, A. How incoming guidelines on chiral drugs xould impact on the international scenary of drug development. Boll. Chim. Farmaceutico, Millano, v.132, p.267-71, 1993.
- MORRISON, R.; BOYD, R. **Química orgânica**. 9.ed. Lisboa, Fundação Caloustre Gulbenkian, 1990. cap.4, p.152-204: Estereoquímica.
- MIYAZAWA, M.; NANKAI, H.; KAMEOKA, H. Biotransformation of (-)-α-bisabolol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. **Phytochemistry**, Oxford, v.39, p.1077-80, 1995.
- MIYAZAWA, M.; HASHIMOTO, Y. Microbial resolution of racemic 2-endo-acetoxy-1,8-cineole by *Glomerella cingulata*. **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v.12, p.3185-7, 2001.
- MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; FU, P. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. Drug Met. Disp., Bethesda, v.30, p.1274-79, 2002.
- NIEDZWIECKI, D. M.; MAILMAN, R. B.;CUBEDDU, L. X. Greater potency of mesoridazine and sulforidazine compared with the parent compound, thioridazine, on striatal dopamine auto receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther., Bethesda, v.228, p.636-9, 1984.
- NIEDZWIECKI, D. M.; CUBEDDU, L. X; MAILMAN, R. B. Comparative antidopaminergic properties of thioridazine, mesoridazine and sulforidazine on the corpus striatum. J. Pharmacol. Exp. Ther., Bethesda, v.250, p.117-25, 1989.

- OGUNI, K.; ODA, H.; ICHIDA, A. Development of chiral stacionary phases consisting of polysaccharide derivatives. **J. Chromatogr. A**., Amsterdam, v.694, p.91-100, 1995.
- OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamate an benzoates as chiral stacionary phases.
   J. Chromatogr. A, Amsterdam, v.666, p.403-19, 1994.
- OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharide derivates for chromatographic separation of enantiomers. Angew. Chem. Int. Ed., Weinhein, v.37, p.1020-43, 1998.
- PARSHIKOV, I. A.; FREEMAN, J. P.; WILLIAMS, A. J. Biotransformations of *N*-acetylphenothiazine by fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, New york, v.52, p.553-7, 1999.
- PARSHIKOV, I. A.; HEINZE, T. M.; MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; WILLIAMS, A. J.; SUTHERLAND, J. B. The fungus *Pestalotiopsis guepinii* as a model for biotransformation of ciprofloxacin and norfloxacin. Appl. Microbiol. Biotechnol., New York, v.56, p.474-7, 2001
- PENG, G. W.; CHIOU, W. L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. J. Chromatogr. B., Amsterdam, v.531, p.131-80, 1990.
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. J. Nat. Toxins, Collins, v.1, p.185-96, 1992.
- PINHEIRO, S.; FERREIRA, V. F. Abordagens em síntese assimétrica. **Quím. Nova**, São Paulo, v.21, p.312-18, 1998.
- PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **J. Med. Vet. Mycol.**, London, v.32, p.17-32, 1994.

- QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. A.; LABA, R. F. Introducction a la HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires, Artes Gráficas Farro, 1992. Cap.12, p.301-28: Validación de métodos.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. Quím. Nova, São Paulo, v.24, p.68-76, 2001.
- REDDY, C, S.; ACOSTA, D.; DAVIS, P. J. Microbial models of mammalian metabolism: biotransformations of phenacetin and its *O*-alkyl homologues with *Cunninghamella* species. **Xenobiotica**; Abingdon, v.20, p.1281-97, 1990.
- REIST, M.; TESTA, B.; CARRUPT, P.; JUNG, M.; SCHURIG, V. Racemization, enantiomerization, diastereomerization, and epimerization: their meaning and pharmacological significance. **Chirality**, New York, v.7, p.396-400, 1995.
- RENTSCH, K. M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. **J. Biochem. Biophys. Methods**, Amsterdam, v. 54, p.1-9, 2002
- ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO J., I. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1991, 126p.
- SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; STANLEY, H. F. Evolution of endophyte – plant symbioses. **Trends Plant Sci.**, London, v.9, p.275-80, 2004
- SANTORO, M. I. R. M. Cromatografia líquida em fase quiral: novos rumos no controle de qualidade de medicamentos. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, São Paulo, v.28, p.1-29, 1992.
- SAÚDE PÚBLICA. Acesso em 2003. Disponível em: http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9798/g003/g003\_2.htm

- SCHMITZ G.; FRANKE, D., STEVENS S.; TAKORS R.; WEUSTER-BOTZ D.; WANDREY C. Regioselective oxidation of terfenadine with *Cunninghamella blakesleeana*. J. Mol. Catal. B-Enzym., Amsterdam, v.104, p.313-24, 2000.
- SEVENDSEN, C. N.; FROIMOWITZ, M.; HERBEK, C.; CAMPBELL, A.; KULA, N.;
  BALDESSARINI, R. J.; COHEN, B. M.; BABB, S.; TEICHER, M. H.; BIRD, E.
  D. Receptor affinity, neurochemistry and behavioral characteristics of the enantiomers of thioridazine: evidence for different stereoselectivities at D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in rat brain. Neuropharmacology, Oxford, v.27, p.1117-24, 1988.
- SHAH, P. V.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; McGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; McDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPECTOR, S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. J. Pharmacol. Sci., Kyoto, v.81, p.309-14, 1992.
- SHIBATA, T.;MORI, K.; OKAMOTO, Y. Polysaccharide phases. In: KRSTULOVIC,
   A. M. (ed) Chiral separations by HPLC applications to pharmaceutical compounds. Chichester, Ellis Horwood, 1989. cap.13, p.336-98.
- SHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol. Res.**, New York, v.109, p.661-86, 2005.
- SHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Mycol. Res., New York, v.106, p.996-1004, 2002.
- SICCARDI, D.; KAMALI, F. Stereoselectivity in thioridazine metabolism in vitro. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v.53, p.445, 2002.
- SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Organic Chemistry**. 7 ed., New York, Jonh Wiley & Sons, Inc., cap. 5, p. 184-210, 2000.

- SRINIVAS, N. R.; IGWEMEZIE, N. L. Chiral separation by liquid chromatography.
   I. Review on indirect separation of enantiomers as diastereomeric derivates using ultraviolet, fluorescence and electrochemical detection. Biomed.
   Chromatogr., Chichester Wiley, v.6, p.163-7, 1992.
- STAINER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E. A. **Mundo dos Micróbios**, 2ed., São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda., cap.2, p.28-41, 1969.
- STROBEL, G. A. Rainforest endophytes an bioactive products. **Crit. Ver. Biotechnol.**, Philadelphia, v.22, p.315-33, 2002.
- TACHIBANA, K.; OHNISH, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases.
  J. Chromatogr. A, Amsterdam, v.906, p.127-54, 2001.
- TANG, Y. Significance of mobile phase composition in enantioseparation of chiral drugs by HPLC on a cellulose-based chiral stationary phase. **Chirality**, New York, v.8, p.136-42, 1996.
- TINGLE, M. D.; HELSBY, N. A. Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies? **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v.21, p.184-90, 2006.
- TUCKER, G. T.; LENNARD, M. S. Enantiomer specific pharmacokinetics. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.45, p.309-29, 1990.
- US Food and Drug Administration (1997). Guidance for industry drug metabolism / drug interation studies in the drug development process: studies in vitro. Rockville, MD: US Food and Drug Administration.
- VÉZINA, C. Biotransformaciones. In: BU'LOCK J.; KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia Básica**. Zaragoza: Editorial Acribria S. A, 1991. p.463-82.

- VULFSON, E. N. Em Lipases: Their Structure, Biochemistry and Aplication: Wooley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambrigde University Press: Great Britain, 1994.
- WANG, F.; KHALEDI, M. G. Chiral separations by nonaqueous capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, Washington, v.68, p.3460-67, 1996.
- WANG, T.; CHEN, Y. W. Application and comparison of derivatized cellulose and amylose chiral stationary phases for the separation of enantiomers of pharmaceutical compounds by high-performance liquid chromatography.
   J. Chromatogr. A, Amsterdam, v.855, p.411-21, 1999.
- WÓRJCIKOWSKI J.; MAUREL, P.; DANIEL, W. A. Characterization of human cytochrome P-450 enzymes involved in the metabolism of the piperidinetype phenothiazine neuroleptic thioridazine. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, v.34, p.471-6, 2006.
- XIE, Z. Y.; HUANG, H. H.; ZHONG, D. F. Biotransformation of pantoprazole by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Xenobiotica**, Abingdon, v.35, p.467-77, 2005.
- YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stacionary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. J. Chromatogr. A, Amsterdam, v.906, p.105-25, 2001.
- ZHANG, D.; EVANS, F. E.; FREEMAN, J. P.; DUHART, B, Jr.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of amitriptyline by *Cunninghamella elegans*. Drug Met. Disp., Bethesda, v.23, p.1417-25, 1995.
- 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*. Chem. – Biol. Interact., Clare, v.102, p.79-92, 1996a.

ZHANG, D.; JR., E. B. H.; DECK, J.; HEINZE T, M.; SUTHERLAND, J. B.; CERNIGLIA, C. E. Fungal biotransformation of the antihistaminine azatadine by *Cunninghamella elegans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, p.3477-9, 1996b.

**Apêndices** 

**Apêndice A** – Gráficos de cinética e porcentagem de formação dos metabólitos da THD pelos fungos em estudo.





**FIGURA 45 -** Cinética de formação dos metabólitos (*R*)-THD-5-SO (*SE*) + (*S*)-THD-5-SO (*FE*), (*S*)-THD-5-SO (*SE*) e (*R*)-THD-5-SO (*FE*) pelo fungo *Phomopsis* sp. (TD2).



































**FIGURA 62 -** Cinética de formação dos metabólitos (*S*)-THD-2-SO (*FE*), (*R*)-THD-2-SO (*SE*), (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e (*R*)-THD-2-SO (*FE*) pelo fungo *Phomopsis amygdali* (VA14).













Phomopsis longicolla (VA19).













(*R*)-THD-2-SO (*SE*), (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e (*R*)-THD-2-SO (*FE*) pelo fungo *Penicillium ochrochloron* (VA20).













(*R*)-THD-2-SO (*SE*), (*S*)-THD-2-SO (*SE*) e (*R*)-THD-2-SO (*FE*) pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* (VR4).



Diaporthe phaseolorum (VR4).






















































**Apêndice B** - Fotos dos fungos em seus respectivos meios de crescimento.



VR 4	VR 5	VR 8	VR 12
Diaporthe	Penicillium	Pestalotioposis	Aspergillus
phaseolorum	brevicompactum	foedans	fumigatus
FIGURA 110 - Fungos isolados de Viguiera robusta (meio BDA, Batata			
Dextrose Ágar).			





