UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos

Keyller Bastos Borges

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em **Ciências**.

Área de concentração: Toxicologia

Orientado: Keyller Bastos Borges

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

co-Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Ribeirão Preto

2010

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

Borges, Keyller Bastos

Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos. Ribeirão Preto, 2010.
212 p.: il.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Programa de Pós-Graduação em Toxicologia.
Orientadora: Bonato, Pierina Sueli.
Co-Orientadora: Pupo, Mônica Tallarico

1. Biotransformação. 2. Fungos Endofíticos. 3. Análise estereosseletiva. 4. Fluoxetina. 5. Propranolol. 6. Omeprazol. 7. Oxibutinina. 8. Ibuprofeno

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Keyller Bastos Borges

Título: Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em **Ciências**.

Área de concentração: Toxicologia

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). :_____

Instituição: _____ **Assinatura:**_____

Prof(a). Dr(a). :_____

Instituição: _____ **Assinatura:**_____

Prof(a). Dr(a). :_____

Instituição: _____ **Assinatura:**_____

Prof(a). Dr(a). :_____

Instituição: _____ **Assinatura:**_____

Prof(a). Dr(a). :_____

Instituição: _____ **Assinatura:**_____

DEDICATÓRIA

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

Ercílio e **Zolma**.

Pai graças a você meus sonhos estão se tornando realidades. Sua constante luta para me ajudar me fez mais forte para superar as dificuldades que tenho encontrado. Você sempre terá minha admiração.

Mãe agradeço a você toda minha 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 dedicar toda sua vida a mim.

À minha querida **Ellen**,

Pelo amor, companheirismo, amizade, compreensão, tranqüilidade, incentivo e ajuda nas horas difíceis.

Ofereço também minha gratidão à **Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato**,

Pelo apoio dado às minhas iniciativas, pela compreensão e dedicação ao trabalho. Seus ensinamentos foram valiosos e contribuíram de forma única em minha formação. MUITO OBRIGADO novamente...

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** todo poderoso que nos faz acreditar nos momentos difíceis e nos dá saúde e força para sempre seguir sonhando.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pela bolsa concedida durante a realização do doutorado.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pela bolsa concedida durante a realização do doutorado sanduíche.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências – área de concentração em Toxicologia** pela enorme contribuição na minha formação.

À **Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira**, pelo incentivo, por acreditar no meu potencial e também por me introduzir no mundo científico da cromatografia.

À **Profa. Denise Aparecida Correa Moreira** pela tutoria no Programa de Educação Tutorial (PET) durante minha formação na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

A **todos os professores** da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) que contribuíram na minha formação.

À **Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo** pela co-orientação e pela enorme contribuição para a realização deste projeto.

À **Profa. Laura Tiemi Okano** pela ajuda com os experimentos de dicroísmo circular.

Ao **Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas** pela ajuda nos experimentos de planejamento experimental.

Ao **Prof. Dr. Isidro González Collado** pela orientação durante o estágio de doutorado sanduíche.

Aos **Profs. Drs. Antonio José Macías Sánchez, Rosa Durán Patrón** e **Rosario Hernández Galán** pela ajuda com os experimentos com microrganismos durante a realização do estágio de doutorado sanduíche.

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

Aos amigos pós-graduandos do CROEC: **Analu**, **Anderson**, **Carmen**, **Fernando**, **Igor**, **Leandro, Milena, Naíssa, Patrícia, Rodrigo** e **Thiago** pelas contribuições, discussões e ajuda. A amizade de vocês é muito valiosa para mim. Obrigado...

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica, em especial ao **Warley** e **Denise** pela amizade e companheirismo.

Aos amigos **Valquíria**, **Roberto de Carvalho**, **Perpétua**, **Solange**, **Luís, Ana Paula, Laila** e **Luciana** pela amizade, disponibilidade e importante ajuda na rotina do laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgánica da Universidad de Cádiz: **Cristina, Gabriela, Antonio, Javi, Maria Jesus, Lolo, Ashlem** e **Gilsane.**

À secretaria da Pós-graduação, em especial, à **Ana** e a **Rosana**.

A toda **minha família** que com ajuda possibilitou minha formação e realização deste trabalho

Enfim, a **todos** que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta tese e de toda minha formação.

"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã."

Chico Xavier

RESUMO

BORGES, K.B. **Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos.** 212f. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Este trabalho teve por finalidade o desenvolvimento e validação de métodos para análise estereosseletiva de alguns fármacos e metabólitos, bem como a aplicação desses métodos na avaliação do potencial de fungos, principalmente endofíticos, em processos de biotransformação. Os seguintes fármacos foram selecionados para esse estudo: fluoxetina, propranolol, omeprazol, oxibutinina e ibuprofeno.

Para determinação simultânea dos enantiômeros da fluoxetina (FLX) e norfluoxetina (NFLX) em meios de cultura de fungos endofíticos, empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção no ultravioleta, em um sistema com duas colunas em série, sendo uma de fase reversa (C18) e outra com fase estacionária quiral (Chirobiotic® V). A fase móvel foi composta por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1}, pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v) e a detecção foi realizada em 227 nm. A extração líquido-líquido foi empregada na preparação das amostras. As curvas analíticas foram lineares no intervalo de concentração de 12,5 a 3750 ng mL^{-1} ($r \geq 0,996$) para todos os enantiômeros analisados. Os coeficientes de variação e erros relativos obtidos nos estudos de precisão e exatidão foram inferiores a 10%. Nas condições empregadas, os cinco fungos endofíticos estudados não foram capazes de promover a biotransformação da FLX (reação de demetilação).

A eletroforese capilar foi empregada para análise enantiosseletiva do propranolol (PROP) e 4-hidroxipropranolol (4-OHPROP). A melhor condição de resolução dos enantiômeros foi encontrada com a aplicação de um planejamento experimental de Box-Behnken: solução de eletrólitos composta por tampão trietilamina / ácido fosfórico (TEA/H_3PO_4), 25 mmol L^{-1}, pH 9,00, carboximetil-β-ciclodextrina 4% (m/v) como seletor quiral e análise realizada na voltagem de 17 kV. O método de extração líquido-líquido também foi empregado para preparação das amostras. As curvas analíticas foram lineares no intervalo de concentração de 0,25 a 10,0 μg mL^{-1} para 4-OHPROP e de 0,10 a 10,0 μg mL^{-1} para PROP, apresentando coeficientes de correlação (r) $\geq$ 0,995 para todos os enantiômeros analisados. Os coeficientes de variação e erros relativos obtidos nos estudos de precisão e exatidão foram inferiores a 15%. Os cinco fungos endofíticos em estudo se mostraram eficientes na biotransformação estereosseletiva do PROP, com maior formação do metabólito (-)-(S)-4-OHPROP. O fungo *Glomerella cingulata* (VA1), em especial, apresentou uma concentração de 1,745 μg mL^{-1} do enantiômero (-)-(S)-4-OHPROP depois de 72 horas de incubação, ao passo que a formação do enantiômero (+)-(R)-4-OHPROP não foi observada. A utilização deste fungo em escalas ampliadas pode ser uma fonte promissora de obtenção do metabólito 4-OHPROP na forma enantiomericamente pura.

A determinação simultânea de omeprazol (OMZ), 5-hidroxiomeprazol (5-HOMZ) e omeprazol sulfona (OMZ SUL) em meio de cultura Czapek Dox modificado

tamponado foi realizada empregando um método rápido de análise por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector por arranjo de diodos (UPLC / DAD), usando coluna monolítica de fase reversa e eluição por gradiente. OMZ, 5-HOMZ e OMZ SUL foram extraídos das amostras utilizando uma mistura de acetato de etila: *t*-butil metil éter (9: 1, v/v). A separação foi obtida empregando uma coluna RP 18 Chromolith Fast Gradient endcapped e fase móvel constituída por 0,15% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) em água (solvente A) e 0,15% (v/v) de TFA em acetonitrila (solvente B). Os tempos de retenção foram de 0,70 min para 5-HOMZ, 0,74 min para OMZ, 0,77 min para OMZ SUL e 0,91 min para o padrão interno (bupropiona, BUP). O método foi linear no intervalo de 0,2 a 10,0 μg mL^{-1} ($r \geq 0,995$) para todos os analitos. O processo de biotransformação foi realizado durante apenas 24 horas de incubação, por causa de problemas de estabilidade do OMZ. Por esse mesmo motivo, a biotransformação estereosseletiva não foi avaliada. Apenas três fungos apresentaram formação do metabólito 5-HOMZ, e dentre estes, apenas o fungo *Botritis cinerea* (BC) produziu esse metabólito em concentração superior ao limite de quantificação do método. A formação do metabólito OMZ SUL foi observada para todos os fungos, exceto para *Glomerella cingulata* (VA1) e *Guignardia mangiferae* (VA15). Esses fungos podem ser úteis para a obtenção dos metabólitos do OMZ, mas estudos detalhados do comportamento do fármaco nas condições de cultivo são necessários, uma vez que este substrato pode sofrer degradação em meio ácido e na presença de luz.

A análise simultânea dos enantiômeros da oxibutinina (OXY) e da *N*-desetiloxibutinina (DEOB) em meio de cultura Czapek foi obtida empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV (HPLC/UV). Os analitos foram separados usando coluna quiral Chiralpak AD e fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v) e detectados em 210 nm. Um estudo piloto de biotransformação empregando os mesmos fungos e as condições de biotransformação utilizadas para os demais fármacos mostrou que não houve a formação do metabólito de interesse. Além disso, não houve uma diminuição significativa da concentração de OXY durante o período de incubação, o que poderia ser um indicativo da formação de outros metabólitos não monitorados nas condições de análise. Como a reação de desetilação da OXY para formar a DEOB não foi observada nos experimentos, não foi necessário realizar a validação do método analítico.

A separação simultânea do ibuprofeno (IBP), dos enantiômeros do 2-hidroxi-ibuprofeno (2-OH-IBP) e dos estereoisômeros do carboxi-ibuprofeno (COOH-IBP) foi realizada empregando-se uma coluna Chiralpak AS-H e fase móvel constituída por hexano: isopropanol: TFA (95: 5: 0,1, v/v/v). O solvente extrator usado na extração líquido-líquido foi uma mistura de hexano: acetato de etila (1: 1, v/v). A detecção foi feita por espectrometria de massas (MS/MS), com a fonte de ionização por eletronebulização operada no modo positivo (ESI+). O método foi linear nos intervalos de 0,1 a 20,0 μg mL^{-1} para IBP, de 0,05 a 7,5 μg mL^{-1} para o cada enantiômero do 2-OH-IBP e de 0,025 a 5,0 μg mL^{-1} para cada estereoisômero do COOH-IBP. Os demais parâmetros de validação obtidos para o método apresentaram-se dentro dos limites recomendados pela literatura. Os sete fungos endofíticos estudados se mostraram eficientes na biotransformação do IBP em seu principal metabólito 2-OH-IBP, mas apenas os fungos *Nigrospora sphaerica* (SS67) e *Chaetomium globosum* (VR10)

biotransformaram o IBP de forma enantiosseletiva mais acentuada, observando-se maior formação do metabólito ativo (+)-(S)-2-OH-IBP. A não estereosseletividade observada para os demais fungos pode ser indício de uma possível conversão quiral do fármaco, similar a que ocorre em humanos. A formação dos estereoisômeros do COOH-IBP não foi observada, provavelmente, porque sua rota de formação envolve uma seqüência de reações.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que fungos, particularmente os endofíticos, podem ser uma fonte promissora para obtenção de metabólitos de fármacos, inclusive de forma enantiomericamente pura.

Palavras chave: análise estereosseletiva, biotransformação, fungos endofíticos, fluoxetina, propranolol, omeprazol, oxibutinina, ibuprofeno.

ABSTRACT

BORGES, K.B. **Stereoselective analysis of drugs with application in biotransformation studies employing fungi.** 212f. Thesis (doctorate) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

This work aimed the development and validation of suitable methods for the stereoselective analysis of some drugs and metabolites, as well as, the application of these methods to assess the potential of fungi, mainly the endophytic ones, in biotransformation processes. The following drugs were selected for this study: fluoxetine, propranolol, omeprazole, oxybutynin and ibuprofen.

The simultaneous determination of fluoxetine (FLX) and norfluoxetine (NFLX) enantiomers in culture media of endophytic fungi was carried out by high-performance liquid chromatography with UV-detection, in a system of two columns coupled in series, in which one of them was a reversed phase (C18) column and the another one was a chiral stationary phase column (Chirobiotic ® V). The mobile phase consisted of ethanol: ammonium acetate buffer, 15 mol L^{-1}, pH 5.90: acetonitrile (77.5: 17.5: 5, v/v/v) and the detection was performed at 227 nm. Liquid-liquid extraction was employed for sample preparation. The analytical curves were linear over the concentration range of 12.5 to 3750 ng mL^{-1} ($r \geq 0.996$) for all enantiomers evaluated. The coefficients of variation and relative errors obtained in the evaluation of method precision and accuracy were lower than 10%. In the studied conditions, the five endophytic fungi used were not able to perform the biotransformation of FLX (demethylation reaction).

Capillary electrophoresis was employed for the enantioselective analysis of propranolol (PROP) and 4-hydroxypropranolol (4-OHPROP). The best condition for enantiomer resolution was obtained by applying an experimental design of Box-Behnken: electrolyte solution composed of triethylamine / phosphoric acid (TEA/H_3PO_4) buffer, 25 mmol L^{-1}, pH 9.00, with 4% (w/v) carboxymethyl-β-cyclodextrin as the chiral selector and analysis performed at 17 kV. Liquid-liquid extraction was also used for sample preparation. The analytical curves were linear over the concentration range of 0.25 to 10.0 μg mL^{-1} for 4-OHPROP and 0.10 to 10.0 μg mL^{-1} for PROP, presenting correlation coefficients (r) $\geq$ 0.995 for all enantiomers evaluated. The coefficients of variation and relative errors obtained in the evaluation of precision and accuracy were lower than 15%. All the five endophytic fungi (*Phomopsis* sp. (TD2), *Glomerella cingulata* (VA1), *Penicillium crustosum* (VR4), *Chaetomium globosum* (VR10) and *Aspergillus fumigatus* (VR12)) showed effectiveness in the stereoselective biotransformation of PROP, with higher formation of (-)-(S)-4-OH-PROP. The fungus *Glomerella cingulata* (VA1), in particular, showed a concentration of 1.745 μg mL^{-1} for the enantiomer (-)-(S)-4-OHPROP after 72 hours of incubation, whereas there was no formation of the enantiomer (+)-(R)-4-OHPROP. Therefore, the use of this fungus in large scale may be a promising source to obtain 4-OHPROP in the enantiomerically pure form.

A fast analytical method based on ultra-performance liquid chromatography / diode array detector (UPLC/DAD) using a monolithic reversed phase column and gradient elution was developed for the simultaneous determination of

omeprazole (OMZ), 5-hydroxyomeprazole (5-HOMZ) and omeprazole sulfone (OMZ SUL) in modified and buffered Czapek-Dox culture medium. OMZ, 5-HOMZ and OMZ SUL were extracted using a mixture of ethyl acetate: methyl *t*-butyl ether (9: 1, v/v). The separation was achieved using a Chromolith Fast Gradient RP 18 endcapped column with the mobile phase consisting of 0.15% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A) and 0.15% (v/v) TFA in acetonitrile (solvent B). Retention times were 0.70 min for 5-HOMZ, 0.74 min for OMZ, 0.77 min for OMZ SUL and 0.91 min for internal standard (bupropion, BUP). The method was linear over the concentration range of 0.2 to 10.0 μg mL^{-1} ($r \geq 0.995$) for all analytes. The biotransformation process was carried out only within 24 hours of incubation, due to OMZ instability. For the same reason, the stereoselectivity in this process was not evaluated. The formation of the metabolite 5-HOMZ was observed only for three fungi, and among them, only the fungus *Botrytis cinerea* (BC) produced this metabolite in concentrations higher than the limit of quantification. The formation of OMZ SUL was observed for all fungi, except for *Guignardia mangiferae* (VA1) and *Glomerella cingulata* (VA15). The fungi evaluated in this study can be useful to obtain the metabolites of OMZ, but detailed study of the drug stability in culture conditions is required, since this substrate can undergo degradation in acidic conditions and in the presence of light.

The simultaneous analysis of oxybutinin (OXY) and *N*-desethyloxybutinin (DEOB) enantiomers in Czapek culture medium was carried out by liquid chromatography with UV detection (HPLC/UV). The analytes were separated using a Chiralpak AD column employing as mobile phase hexane: isopropanol: ethanol: diethylamine (94: 4: 2: 0.05, v/v/v/v) and detection at 210 nm. A pilot study of biotransformation using the same fungi and conditions employed for the biotransformation of the other drugs showed that the metabolite of interest was not formed. Moreover, the decrease in the concentration of OXY, which could be indicative of the formation of other metabolites not monitored under the conditions of analysis, was not observed. Since the reaction of OXY desethylation to form DEOB was not observed in the experiments, the validation of the analytical method was not required.

The method for the simultaneous analysis of ibuprofen (IBP), 2-hydroxyibuprofen (2-OH-IBP) enantiomers and carboxyibuprofen (IBP-COOH) stereoisomers was developed using a Chiralpak AS-H column and a mobile phase consisting of hexane: isopropanol: TFA (95: 5: 0.1, v/v/v). A mixture of hexane: ethyl acetate (1: 1, v/v) was used as solvent extractor for sample preparation. The detection was performed by tanden mass spectrometry (MS/MS) with the electrospray interface operated in the positive mode (ESI+). The method was linear over the concentration range of 0.1 to 20.0 μg mL^{-1} for IBP, 0.05 to 7.5 μg mL^{-1} for each 2-OH-IBP enantiomer and 0.025 to 5.0 μg mL^{-1} for each COOH-IBP stereoisomer. The other validation parameters studied were within the limits established in the literature. The seven studied endophytic fungi showed to be efficient in the biotransformation of IBP to its main metabolite 2-OH-IBP, however, only the fungi *Nigrospora sphaerica* (SS67) and *Chaetomium globosum* (VR10) biotransformed IBP enantioselectively, with greater formation of the active metabolite (+)-(S)-2-OH-IBP. The lack of stereoselectivity observed for the other fungi could be caused by a possible chiral inversion process occurring for IBP, in a similar way that happens in humans. The formation of COOH-IBP

stereoisomers was not observed probably because the route of formation of this metabolite requires a sequence of reactions.

The results presented here show that fungi, particularly the endophytic ones, may be a promising source to obtain the metabolites of drugs, including in their enantiomerically pure form.

Key words: stereoselective analysis, biotransformation, endophytic fungi, fluoxetine, propranolol, omeprazole, oxybutynin, ibuprofen.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	fator de separação
API	ionização à pressão atmosférica
APCI	ionização química à pressão atmosférica
BBD	planejamento de Box-Behnken
BDA	batata dextrose ágar
CD	ciclodextrina
CE	eletroforese capilar
CEC	eletrocromatografia capilar
CGE	eletroforese capilar por focalização isoelétrica
CZE	eletroforese capilar de zona
CITP	isotacoforese capilar
COOH-IBP	Carboxi-ibuprofeno
CV (%)	coeficiente de variação
CYP 450	citocromo P450
CSPs	fases estacionárias quirais
DAD	detector por arranjos de diodos
DC	dicroísmo circular
DEA	dietilamina
DEOB	*N*-desetiloxibutinina
DMF	*N,N*-dimetilformamida
DAD	detector por arranjo de diodos
E (%)	erro relativo
EOF	fluxo eletrosmótico
ESI	eletronebulização
FBZ	fenilbutazona
FDA	*Food and Drug Administration*
FLX	fluoxetina
FSCE	eletroforese capilar em gel
FT-ICR	transformada de Fourier do tipo ressonância ciclotrônica de íons
GC	cromatografia gasosa
HF-LPME	microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HTLC	cromatografia líquida de alta temperatura
5-HOMZ	5-hidroxiomeprazol
IBP	ibuprofeno
LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LLE	extração líquido-líquido
LERC	lercanidipina
k	fator de retenção
MEA	extrato de malte e levedura
MECK	cromatografia eletrocinética micelar
MRM	*multiple reaction monitoring*

n	número de amostras
N	número de pratos
NFLX	norfluoxetina
2-OH-IBP	2-hidroxi-ibuprofeno
4-OHPROP	4-hidroxipropranolol
OMZ	omeprazol
OMZ SUL	omeprazol sulfona
OXY	oxibutinina
p.a.	padrão analítico
PI	padrão interno
PROP	propranolol
Q	quadrupolo
r	coeficiente de correlação
r^2	coeficiente de determinação
R(%)	recuperação
R_s	resolução
rpm	rotações por minuto
SD	estimativa do desvio padrão
TFA	ácido trifluoroacético
ToF	tempo de vôo
UPLC	cromatografia líquida de ultra eficiência
UV-Vis	ultravioleta-visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de um equipamento para eletroforese capilar (CE).....**13**

Figura 2.2. Foto de um cassete e de um capilar; em destaque a janela de detecção quando se retira a camada de poliimida.....**14**

Figura 2.3. Esquema doo fluxo eletrosmótico (EOF) em um capilar de sílica fundida em soluções neutras ou alcalinas.....**16**

Figura 2.4. (A) Esquema de um perfil parabólico apresentado no HPLC devido ao uso de bombas ocasionando o alargamento dos picos (fluxo pressurizado); (B) Esquema de um perfil plano na eletroforese capilar ocasionando uma maior eficiência (fluxo eletrosmótico).....**17**

Figura 2.5. Comportamento de moléculas com diferentes cargas e tamanhos em uma separação por eletroforese capilar.....**18**

Figura 2.6. Representação da molécula da ciclodextrina em forma de cone truncado.....**20**

Figura 2.7. Representação das estruturas da α, β, e γ-ciclodextrina.....**20**

Figura 2.8. Substratos e produtos de biotransformação de reações biocatalisadas por fungos endofíticos.....**24**

Figura 4.1. Estruturas moleculares dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina. (*) Centros quirais.....**35**

Figura 4.2. Esquema do procedimento empregado para a realização do teste de recuperação da FLX e NFLX: adição das soluções-padrão depois da partição (concentrações reais).....**44**

Figura 4.3. Esquema do procedimento empregado para a realização do teste de recuperação da FLX e NFLX: adição das soluções-padrão antes da partição (concentrações obtidas).....**45**

Figura 4.4. (A) *Phomopsis* sp. (TD2); (B) *Phoma sorgina* (TD5); (C) *Glomerella cingulata* (VA1); (D) *Penicillium crustosum* (VR4); (E) *Chaetomium globosum* (VR10) e (F) *Aspergillus fumigatus* (VR12).....**49**

Figura 4.5. Estrutura molecular do glicopeptídeo macrocíclico vancomicina. Os números 1, 2 e 3 representam suas cavidades de inclusão.....**51**

Figura 4.6. Separação cromatográfica dos padrões da FLX (em preto), NFLX (em azul) e ambos (em vermelho). Condições cromatográficas: coluna Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**53**

Figura 4.7. Separação cromatográfica dos padrões da FLX (em preto) e NFLX (em azul). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**53**

Figura 4.8. Separação cromatográfica dos enantiômeros da FLX e NFLX e da MEX. Condições cromatográficas: coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 210 nm (linha azul) / 227 nm (linha preta).....**54**

Figura 4.9. (A) Espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros da fluoxetina em água a 25°C; (B) Espectros de dicroismo circular dos enantiômeros da norfluoxetina em água a 25°C; (C) Comparação dos espectros de dicroísmo circular da (-)-(R)-fluoxetina e (-)-(R)-norfluoxetina; (D) Comparação dos espectros de dicroísmo circular da (+)-(S)-fluoxetina e (+)-(S)-norfluoxetina; (E) Comparação dos espectros de dicroísmo circular da (-)-(R)-norfluoxetina e (+)-(S)-fluoxetina; (F) Comparação dos espectros de dicroísmo circular da (-)-(R)-fluoxetina e (+)-(S)-norfluoxetina. Os traços sólidos e pontilhados nos espectros de dicroísmo circular correspondem aos primeiros e segundos enantiômeros eluídos nas condições descritas neste capítulo.....**54**

Figura 4.10. Cromatogramas referentes ao meio de cultura Czapek + DMF e meio de cultura Czapek + FLX dissolvida em DMF depois de quatro dias (96 horas) de incubação. Condições cromatográficas: coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**58**

Figura 4.11. Cromatogramas referentes aos meios de cultura com os fungos *Phomopsis* sp. (TD2), *Glomerella cingulata* (VA1), *Diaporthe phaseolorum* (VR4), *Chaetomium*

globosum (VR10) e *Aspergillus fumigatus* (VR12) após de quatro dias (96 horas) de incubação. Condições cromatográficas: coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**59**

Figura 4.12. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da FLX pelo fungo *Phomopsis* sp. (TD2). Condições cromatográficas: coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**66**

Figura 4.13. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da FLX pelo fungo *Glomerella cingulata* (VA1). Condições cromatográficas: coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**67**

Figura 4.14. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da FLX pelo fungo *Penicillium crustosum* (VR4). Condições cromatográficas: coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**67**

Figura 4.15. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da FLX pelo fungo *Chaetomium globosum* (VR10). Condições cromatográficas: coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**68**

Figura 4.16. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da FLX pelo fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12). Condições cromatográficas: coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5: 17,5: 5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**68**

Figura 5.1. Estruturas moleculares dos enantiômeros do propranolol e 4-hidroxipropranolol. (*) Centros quirais.....**75**

Figura 5.2. Diagramas de superfície de resposta: (A) Resolução 1 (R_s 1); (B) Resolução 2 (R_s 2); (C) Resolução 3 (R_s 3); (D) Resolução 4 (R_s 4) e (E) Tempo de migração (T_m)....**92**

Figura 5.4. Painel de separação descrevendo a influência de cada fator na separação de cada pico e no tempo total de análise. (A) Parâmetros obtidos na otimização; (B) As melhores condições experimentais obtidas. As linhas verticais contínuas de cada fator refletem os valores obtidos e as linhas horizontais tracejadas refletem os valores esperados....**96**

Figura 5.5. Eletroferogramas obtidos do (A) tampão de análise (usado para dissolver os analitos); (B) solução de DMSO adicionado ao tampão de corrida....**97**

Figura 5.6. Eletroferograma obtido nas condições otimizadas: concentração do tampão de 25 mmol L^{-1}, pH do tampão de 9,00, 4,0% de CM-β-CD e uma voltagem de 17 kV. As outras condições são: capilar de sílica fundida, 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento até o detector, 50 μm de diâmetro interno e detecção em 208 nm. O capilar foi lavado com NaOH 1,0 mol L^{-1} por 0,5 min, NaOH 0,1 mol L^{-1} por 1,5 min, água for 1 min e tampão de corrida por 2 min. As amostras foram injetadas no modo hidrodinâmico com 50 mbar de pressão por 20 segundos e a temperatura do capilar foi mantida à 25°C. ACET foi usado como padrão interno....**96**

Figura 5.7. Separação cromatográfica dos padrões do 4-OHPROP e PROP. Condições cromatográficas descritas por Herring & Johnson[32]: coluna Chiralcel OD®; fase móvel constituída por hexano: etanol: DEA (91: 9: 0,1, v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 227 nm....**100**

Figura 5.8. Separação eletroforética dos picos coletados na condição descrita por Herring & Johnson[32]....**100**

Figura 5.9. Eletroferogramas referentes ao (A) meio de cultura Czapek + DMF e (B) meio de cultura Czapek + PROP dissolvido em DMF. O padrão interno (ACET) foi adicionado antes do procedimento de preparação da amostra. Condições eletroforéticas: concentração do tampão de 25 mmol L^{-1}, pH do tampão de 9,00, 4,0% de CM-β-CD e uma voltagem de 17 kV. As outras condições são: capilar de sílica fundida, 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento até o detector, 50 μm de diâmetro interno,

detecção em 208 nm. O capilar foi lavado com NaOH 1,0 mol L^{-1} por 0,5 min, NaOH 0,1 mol L^{-1} por 1,5 min, água for 1 min e tampão de corrida por 2 min. As amostras foram injetadas no modo hidrodinâmico com 50 mbar de pressão por 20 segundos e a temperatura do capilar foi mantida em 25°C.....**102**

Figura 5.10. Eletroferogramas referentes aos fungos (A) *Phomopsis* sp. (TD2), (B) *Glomerella cingulata* (VA1), (C) *Diaporthe phaseolorum* (VR4), (D) *Chaetomium globosum* (VR10) e (E) *Aspergillus fumigatus* (VR12) com meio de cultura nas condições otimizadas: concentração do tampão de 25 mmol L^{-1}, pH do tampão de 9,00, 4,0% de CM-β-CD e uma voltagem de 17 kV. As outras condições são: capilar de sílica fundida, 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento até o detector, 50 μm de diâmetro interno, detecção em 208 nm. O capilar foi lavado com NaOH 1,0 mol L^{-1} por 0,5 min, NaOH 0,1 mol L^{-1} por 1,5 min, água for 1 min e tampão de corrida por 2 min. As amostras foram injetadas no modo hidrodinâmico com 50 mbar de pressão por 20 segundos e a temperatura do capilar foi mantida em 25°C.....**103**

Figura 5.11. Estudo cinético de biotransformação dos enantiômeros do PROP pelo fungo *Phomopsis* sp. (TD2).....**108**

Figura 5.12. Estudo cinético de biotransformação dos enantiômeros do PROP pelo fungo *Glomerella cingulata* (VA1).....**109**

Figura 5.13. Estudo cinético de biotransformação dos enantiômeros do PROP pelo fungo *Penicillium crustosum* (VR4).....**110**

Figura 5.14. Estudo cinético de biotransformação dos enantiômeros do PROP pelo fungo *Chaetomium globosum* (VR10).....**110**

Figura 5.15. Estudo cinético de biotransformação dos enantiômeros do PROP pelo fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12).....**111**

Figura 5.16. Eletroferogramas dos fungos *Phomopsis* sp. (TD2), *Glomerella cingulata* (VA1), *Penicillium crustosum* (VR4), *Chaetomium globosum* (VR10) e *Aspergillus fumigatus* (VR12) após 72 horas de incubação. Sendo: 1) ACET; 2) (-)-(S)-4-OHPROP; 3) (+)-(R)-4-OHPROP; 4) (-)-(S)-PROP; 5) (+)-(R)-PROP.....**112**

Figura 5.17. Eletrofeogramas dos fungos *Phomopsis* sp. (TD2), *Glomerella cingulata* (VA1) e *Chaetomium globosum* (VR10) no sexto dia de incubação. Sendo: 1) ACET; 2) (-)-

(S)-4-OHPROP; 3) (+)-(R)-4-OHPROP; 4) (-)-(S)-PROP; 5) (+)-(R)-PROP; A) Metabólitos não identificados A; B) Metabólitos não identificados B.....**113**

Figura 6.1. Estruturas moleculares do omeprazol (OMZ), 5-hidroxiomeprazol (5-HOMZ) e omeprazol sulfona (OMZ SUL).....**120**

Figura 6.2. Estruturas dos poros de uma coluna típica de sílica monolítica (esquerda) e uma imagem ampliada de uma entrada do macroporo (direita). Modificada de [22].....**122**

Figura 6.3. (A) Cromatograma referente à fase móvel nas condições analíticas otimizadas; (B) Separação cromatográfica de 1) 5-HOMZ, 2) OMZ, 3) OMZ SUL e 4) BUP (PI). Condições cromatográficas: coluna Chromolith Fast gradient RP 18 endcapped, fase móvel 0,15% de ácido trifluoroacético (TFA) em água (v/v) (solvente A) e 0,15% de TFA em acetonitrila (ACN) (v/v) (solvente B) usando gradiente de 5 a 90% de B em 1 min, temperatura da coluna em 30°C, vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 220 nm.....**132**

Figura 6.4. Cromatogramas referentes aos frascos controles dos fungos endofíticos: (A) *Glomerella cingulata* (VA1), (B) *Guignardia mangiferae* (VA15); (C) *Penicillium crustosum* (VR4), (D) *Chaetomium globosum* (VR10) e (E) *Aspergillus fumigatus* (VR12). Condições cromatográficas: coluna Chromolith Fast gradient RP 18 endcapped, fase móvel 0,15% de ácido trifluoroacético (TFA) em água (v/v) (solvente A) e 0,15% de TFA em acetonitrila (ACN) (v/v) (solvente B) usando gradiente de 5 a 90% de B em 1 min, temperatura da coluna em 30°C, vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 220 nm.....**134**

Figura 6.5. Cromatogramas referentes aos frascos controles dos fungos fitopatógenos: (A) *Botrytis cinerea* (BC), (B) *Colletotrichum acutatum* (CA), (C) *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) e (D) *Eutypa lata* (EL). Condições cromatográficas: coluna Chromolith Fast gradient RP 18 endcapped, fase móvel 0,15% de ácido trifluoroacético (TFA) em água (v/v) (solvente A) e 0,15% de TFA em acetonitrila (ACN) (v/v) (solvente B) usando gradiente de 5 a 90% de B em 1 min, temperatura da coluna em 30°C, vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 220 nm.....**135**

Figura 6.6. Concentração de OMZ no frasco controle.....**139**

Figura 6.7. Cromatogramas referentes ao estudo de estabilidade de OMZ no meio de cultura líquido de Czapek Dox modificado tamponado com 0 horas e 144 horas de incubação. O Cromatograma (A) apresenta OMZ e BUP e o cromatograma (B), além de

OMZ e OMZ SUL, apresenta os picos 1, 2, 3, 4 e 5 que são produtos não identificados. Condições cromatográficas: coluna Chromolith Fast gradient RP 18 endcapped, fase móvel 0,15% de ácido trifluoroacético (TFA) em água (v/v) (solvente A) e 0,15% de TFA em acetonitrila (ACN) (v/v) (solvente B) usando gradiente de 5 a 90% de B em 1 min, temperatura da coluna em 30°C, vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 220 nm.....**140**

Figura 6.8. Cromatograma referente ao estudo de biotransformação empregando o fungo endofítico *Glomerella cingulata* (VA1). 1) OMZ, 2) OMZ SUL, 3) Produto A não identificado, 4) BUP (PI) e 5) Produto B não identificado.....**141**

Figura 6.9. Cromatograma referente ao estudo de biotransformação empregando o fungo endofítico *Guignardia mangiferae* (VA15). 1) OMZ, 2) OMZ SUL, 3) Produto A não identificado, 4) BUP (PI) e 5) Produto B não identificado.....**141**

Figura 6.10. Cromatograma referente ao estudo de biotransformação empregando o fungo endofítico *Chaetomium globosum* (VR10). 1) OMZ, 2) OMZ SUL, 3) Produto A não identificado, 4) BUP (PI), 5) Produto B não identificado, 6) Produto C não identificado e 7) Produto D não identificado.....**142**

Figura 6.11. Cromatograma referente ao estudo de biotransformação empregando o fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* (VR12). 1) 5-HOMZ, 2) OMZ, 3) OMZ SUL, 4) Produto A não identificado e 5) BUP (PI).....**142**

Figura 6.12. Cromatograma referente ao estudo de biotransformação empregando o fungo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (BC). 1) 5-HOMZ, 2) OMZ, 3) OMZ SUL, 4) Produto A não identificado e 5) BUP (PI).....**143**

Figura 6.13. Cromatograma referente ao estudo de biotransformação empregando o fungo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* (CA). 1) 5-HOMZ, 2) OMZ, 3) OMZ SUL, 4) Produto A não identificado, 5) Produto B não identificado e 6) BUP (PI).....**143**

Figura 6.14. Cromatograma referente ao estudo de biotransformação empregando o fungo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (CG). 1) OMZ, 2) OMZ SUL, 3) Produto A não identificado, 4) Produto B não identificado e 5) BUP (PI).....**144**

Figura 6.15. Cromatograma referente ao estudo de biotransformação empregando o fungo fitopatógeno *Eutypa lata* (EL). 1) OMZ, 2) OMZ SUL, 3) Produto A não identificado, 4) Produto B não identificado e 5) BUP (PI).....**145**

Figura 7.1. Estruturas moleculares da oxibutinina (OXY) e *N*-desetiloxibutinina (DEOB).....**152**

Figura 7.2. Separação cromatográfica dos enantiômeros da OXY e DEOB e da LERC (PI). Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min $^{-1}$ e detecção em 210 nm. Em azul destaca-se a separação dos enantiômeros da OXY e da DEOB e em preto a linha de base referente à injeção da fase móvel.....**159**

Figura 7.3. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo *Penicillium crustosum* (VR4) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do fungo *Penicillium crustosum* (VR4) sem a presença do fármaco (em azul). Os picos 1 e 2 referem-se a produtos não identificados do metabolismo secundário do fungo estudado. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**161**

Figura 7.4. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo *Pestalotiopsis foedans* (VR8) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do fungo *Pestalotiopsis foedans* (VR8) sem a presença do fármaco (em azul). O pico 1 refere-se a produto não identificado do metabolismo secundário do fungo estudado. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**161**

Figura 7.5. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo *Chaetomium globosum* (VR10) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do fungo *Chaetomium globosum* (VR10) sem a presença do fármaco (em azul). Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**162**

Figura 7.6. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do fungo

Aspergillus fumigatus (VR12) sem a presença do fármaco (em azul). O pico 1 refere-se a produto não identificado do metabolismo secundário do fungo estudado. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**162**

Figura 7.7. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) sem a presença do fármaco (em azul). Os picos 1 e 2 referem-se a produtos não identificados do metabolismo secundário do fungo estudado. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**163**

Figura 7.8. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do fungo *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67) sem a presença do fármaco (em azul). Os picos 1 e 2 referem-se a produtos não identificados do metabolismo secundário do fungo estudado. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**163**

Figura 7.9. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo marinho não identificado (09M) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do fungo marinho não identificado (09M) sem a presença do fármaco (em azul). Os picos 1 a 6 referem-se a produtos não identificados do metabolismo secundário do fungo estudado. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**164**

Figura 7.10. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo marinho não identificado (63M) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do fungo marinho

não identificado (63M) sem a presença do fármaco (em azul). O picos 1 refere-se a produto não identificado do metabolismo secundário do fungo estudado. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**164**

Figura 7.11. Cromatogramas referentes ao processo de biotransformação da OXY empregando o fungo *Phomopsis* sp. (81M) com 0 horas de incubação (tempo zero, em preto), com 96 horas de incubação (em vermelho) e ao branco do *Phomopsis* sp. (81M) sem a presença do fármaco (em azul). Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD; fase móvel constituída por hexano: isopropanol: etanol: DEA (94: 4: 2: 0,05, v/v/v/v); vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....**165**

Figura 8.1. Estruturas moleculares do ibuprofeno (IBP), 2-hidroxi-ibuprofeno (2-OH-IBP) e carboxi-ibuprofeno (COOH-IBP).....**171**

Figura 8.2. Esquema da formação de íons na fonte ESI. Adaptado de [49].....**174**

Figura 8.3. Princípio do funcionamento de um instrumento triplo quadrupolo.....**176**

Figura 8.4. (A) Cromatograma referente a fase móvel nas condições analíticas otimizadas; (B) Separação cromatográfica de IBP; (C) Separação cromatográfica dos enantiômeros do 2-OH-IBP; (D) Separação cromatográfica dos estereoisômeros do COOH-IBP e (E) Separação cromatográfica da FBZ (PI). Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AS-H usando hexano: isopropanol: TFA (95: 5: 0,1, v/v/v), temperatura da coluna em 8°C, vazão de 1,2 mL min^{-1} e detecção por ESI(+) no modo MRM.....**187**

Figura 8.5. Espectro de varredura do IBP no ESI positivo com a formação de aduto com NH_4^+.....**188**

Figura 8.6. Espectro de varredura do 2-OH-IBP no ESI positivo com a formação de aduto com NH_4^+.....**189**

Figura 8.7. Espectro de varredura do COOH-IBP no ESI positivo com a formação de aduto com NH_4^+.....**189**

Figura 8.8. Espectro de varredura da FBZ no ESI positivo.....**189**

Figura 8.9. Monitoramento da concentração do IBP durante os seis dias de incubação no meio de cultura nas mesmas condições utilizadas no processo de biotransformação.....**197**

Figura 8.10. Estudo cinético de biotransformação do IBP pelo fungo *Penicillium crustosum* (VR4).....**199**

Figura 8.11. Estudo cinético de biotransformação do IBP pelo fungo *Pestalotiopsis foedans* (VR8).....**199**

Figura 8.12. Estudo cinético de biotransformação do IBP pelo fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12).....**200**

Figura 8.13. Estudo cinético de biotransformação do IBP pelo fungo *Papulaspora immersa* (SS13).....**200**

Figura 8.14. Estudo cinético de biotransformação do IBP pelo fungo *Chaetomium globosum* (VR10).....**201**

Figura 8.15. Estudo cinético de biotransformação do IBP pelo fungo *Nigrospora sphaerica* (SS67).....**202**

Figura 8.16. Estudo cinético de biotransformação do IBP pelo fungo *Phoma* sp. (ET).....**202**

Figura 8.17. Cromatograma referente ao processo de biotransformação dos fungos (A) *Chaetomium globosum* (VR10) e (B) *Nigrospora sphaerica* (SS67) após 120 horas de incubação.....**203**

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Diâmetros internos[a] (d_1, d_2 e d_3) e altura (h) para α, β e γ-ciclodextrina.....**20**

Tabela 4.1. Avaliação da seletividade do método para análise dos enantiômeros da FLX e NFLX.....**43**

Tabela 4.2. Constituinte do meio BDA.....**50**

Tabela 4.3. Constituintes do meio pré-fermentativo de malte.....**50**

Tabela 4.4. Constituintes do meio fermentativo de Czapek modificado.....**50**

Tabela 4.5. Parâmetros cromatográficos para a separação dos enantiômeros da NFLX e FLX na coluna C18 / Chirobiotic® V; fase móvel constituída por etanol: tampão acetato de amônio 15 mmol L^{-1} pH 5,90: acetonitrila (77,5:17,5:5, v/v/v); vazão de 0,9 mL min^{-1} e detecção em 227 nm.....**54**

Tabela 4.6. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros da NFLX e FLX em meio de cultura.....**59**

Tabela 4.7. Linearidade do método validado para FLX e NFLX.....**60**

Tabela 4.8. Limite de quantificação do método de análise dos enantiômeros da NFLX e FLX em meio de cultura.....**61**

Tabela 4.9. Precisão do método de análise dos enantiômeros da NFLX.....**62**

Tabela 4.10. Precisão do método de análise dos enantiômeros da FLX.....**62**

Tabela 4.11. Exatidão do método de análise dos enantiômeros da NFLX.....**63**

Tabela 4.12. Exatidão do método de análise dos enantiômeros da FLX.....**63**

Tabela 4.13. Teste de estabilidade dos enantiômeros da NFLX e FLX no meio de cultura.....**65**

Tabela 5.1. Avaliação da seletividade do método para análise dos enantiômeros do PROP e 4-OHPROP.....**87**

Tabela 5.2. Planejamento experimental de Box-Benhken gerado pelo Minitab® e os valores obtidos para as respostas estudadas.....**91**

Tabela 5.3. Coeficientes de regressão e valores de probabilidades (*p*-valor) para cada resposta.....**93**

Tabela 5.4. Desirability e otimização de múltiplas respostas.....**96**

Tabela 5.5. Parâmetros eletroforéticos obtidos na resolução dos enantiômeros do PROP, 4-OHPROP e do PI ACET usando 4% CM-β-CD em tampão 25 mmol L^{-1} de TEA/H_3PO_4, pH 9,00 como eletrólito de análise e 17 kV de voltagem.....**99**

Tabela 5.6. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros do 4-OHPROP e PROP em meio de cultura.....**104**

Tabela 5.7. Linearidade do método de análise dos enantiômeros do PROP e 4-OHPROP.....**104**

Tabela 5.8. Limite de quantificação do método de análise dos enantiômeros do 4-OHPROP e PROP em meio de cultura.....**105**

Tabela 5.9. Precisão do método de análise dos enantiômeros do 4-OHPROP.....**105**

Tabela 5.10. Precisão do método de análise dos enantiômeros do PROP.....**106**

Tabela 5.11. Exatidão do método de análise dos enantiômeros do 4-OHPROP.....**106**

Tabela 5.12. Exatidão do método de análise dos enantiômeros do PROP.....**107**

Tabela 5.13. Teste de estabilidade dos enantiômeros do 4-OHPROP e PROP no meio de cultura.....**107**

Tabela 6.1. Avaliação da seletividade do método para análise simultânea de 5-HOMZ, OMZ e OMZ SUL.....**128**

Tabela 6.2. Constituintes do meio fermentativo de Czapek Dox modificado tamponado.....**130**

Tabela 6.3. Parâmetros cromatográficos para a análise simultânea de 5-HOMZ, OMZ, e OMZ SUL na coluna Chromolith Fast gradient RP 18 endcapped.....**131**

Tabela 6.4. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise simultânea de 5-HOMZ, OMZ e OMZ SUL em meio de cultura.....**136**

Tabela 6.5. Limite de quantificação do método de análise simultânea de 5-HOMZ, OMZ e OMZ SUL em meio líquido de Czapek Dox modificado tamponado empregando extração líquido-líquido.....**136**

Tabela 6.6. Linearidade do método validado para análise simultânea de OMZ, 5-HOMZ e OMZ SUL.....**137**

Tabela 6.7. Precisão e exatidão do método para a análise simultânea de 5-OMZ, OMZ e OMZ SUL em meio Czapek.....**135**

Tabela 6.8. Teste de estabilidade para 5-HOMZ, OMZ e OMZ SUL em meio de Czapek Dox modificado tamponado.....**136**

Tabela 6.9. Biotransformação de OMZ em 5-HOMZ ou/e OMZ SUL pelos fungos estudados após 24 horas de incubação.....**144**

Tabela 7.1. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros da OXY e DEOB em meio de cultura.....**160**

Tabela 8.1. Avaliação da seletividade do método para análise de IBP, 2-OH-IBP e COOH-IBP.....**182**

Tabela 8.2. Parâmetros cromatográficos obtidos para o IBP, os enantiômeros do 2-OH-IBP e dos estereoisômeros do COOH-IBP na coluna Chiralpak AS-H.....**186**

Tabela 8.3. Parâmetros otimizados para a detecção por MS/MS do IBP, dos enantiômeros do 2-OH-IBP e dos estereoisômeros do COOH-IBP no modo positivo (ESI+), utilizando infusão pós coluna com uma solução constituída por acetato de amônio 10 mmol L^{-1} em metanol.....**188**

Tabela 8.4. Teste de supressão de ionização no método por LC-MS/MS com as diferentes matrizes provenientes dos brancos dos fungos endofíticos em estudo.....**191**

Tabela 8.5. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise do IBP e dos enantiômeros do 2-OH-IBP em meio de cultura.....**191**

Tabela 8.6. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos estereoisômeros do COOH-IBP em meio de cultura.....**192**

Tabela 8.7. Linearidade do método de análise estereosseletiva do IBP, 2-OH-IBP e COOH-IBP.....**192**

Tabela 8.8. Limite de quantificação do método de análise do IBP, dos enantiômeros do 2-OH-IBP e dos estereoisômeros do COOH-IBP em meio de cultura.....**193**

Tabela 8.9. Precisão do método de análise do IBP.....**193**

Tabela 8.10. Precisão do método de análise dos enantiômeros do 2-OH-IBP.....**194**

Tabela 8.11. Precisão do método de análise dos estereoisômeros do COOH-IBP.....**194**

Tabela 8.12. Exatidão do método de análise do IBP.....**195**

Tabela 8.13. Exatidão do método de análise dos enantiômeros do 2-OH-IBP.....**195**

Tabela 8.14. Exatidão do método de análise dos estereoisômeros do COOH-IBP.....**196**

Tabela 8.15. Teste de estabilidade do IBP e dos enantiômeros do 2-OH-IBP no meio de cultura.....**197**

Tabela 8.16. Teste de estabilidade dos estereoisômeros do COOH-IBP no meio de cultura.....**197**

Capítulo 1: Introdução Geral

"A ciência serve para nos dar uma idéia de quão extensa é a nossa ignorância."

Félicité Robert de Lamennais

1 ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

As reações de compostos orgânicos feitas por células microbianas intactas, células vegetais ou enzimas isoladas são denominadas de reações de biotransformações. A molécula de um determinado composto é modificada por transformações dos grupos funcionais, com ou sem degradação do esqueleto carbônico. Estas alterações resultam na formação de novos produtos úteis que são difíceis ou impossíveis de serem obtidos por processos químicos convencionais. Freqüentemente, as reações de biotransformação são estereosseletivas, produzindo grande variedade de produtos de alto valor agregado, ou seja, intermediários de fármacos, fármacos, ingredientes alimentares, produtos e intermediários agroquímicos, etc. A biotransformação tem sido uma ferramenta alternativa com grande potencialidade, especialmente, para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis (química verde) para a produção de produtos químicos e fármacos. No entanto, o número e a diversidade de aplicações ainda são modestos, considerando a grande biodiversidade de microorganismos e a vasta biodisponibilidade de reações que podem ser realizadas por eles.[1]

Na busca por novos catalisadores, microrganismos especialmente fungos, têm sido empregados na descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial.[1] Os fungos, em especial, produzem enzimas que normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação. Em particular, os microrganismos isolados em território brasileiro já demonstraram excelente potencial biocatalisador frente a diferentes substratos.[2-4]

Adicionalmente, a quiralidade tem tido grande impacto em muitos campos de interesse econômico, como por exemplo, no desenvolvimento de novos fármacos, produtos agropecuários, indústria de alimentos, perfumaria e na produção de novos materiais. As técnicas tradicionais, como a resolução de racematos, o uso de blocos de construção quiral (*chiral building blocks*) e a síntese assimétrica convencional requerem equipamentos e reagentes caros, pessoal altamente qualificado e, em alguns casos, a substância produzida pode apresentar baixa pureza enantiomérica. A capacidade

hidrolítica e redutiva dos microrganismos tem sido reconhecida ao longo dos anos, sendo constantemente usada em reações preparativas.[5,6] As reações oxidativas apresentadas pelos microrganismos provaram ser similares às monooxigenases produzidas pelos humanos. Desta forma, Smith & Rosazza (1974; 1975)[7,8] sugeriram o uso de microrganismos para se estudar a metabolização de xenobióticos.

Por isso, informações sobre as modificações de grupos funcionais de moléculas por microrganismos (fungos) são extremamente importantes para a biocatálise. Estudos com este direcionamento são muito promissores e mostram que, futuramente, fungos podem vir a ser importantes fontes de fornecimento de substâncias enantiomericamente puras.[9,10]

2 EMPREGO DE FUNGOS EM BIOTRANSFORMAÇÃO

Recentemente, muitos esforços têm sido feitos para estudar sistemas biomiméticos que reproduzem a ação das enzimas do citocromo P450 ou promovem a adição de grupos de interesse em certas posições das moléculas que seria dificilmente realizada por síntese convencional. Um dos principais focos dos estudos de sistemas biomiméticos é tentar demonstrar paralelos entre as reações de fase I da biotransformação de fármacos e outros xenobióticos em mamíferos e microrganismos.[7,11]

O uso de fungos no processo de biotransformação é um campo promissor, pois pode gerar os metabólitos de fármacos já existentes e de novas entidades químicas em escala industrial. Visto que o mercado mundial não pára de lançar novos fármacos, fazem-se necessárias novas metodologias para a geração de seus metabólitos. Dentre as aplicações de biotransformação empregando microrganismos destaca-se a realizada por Hench et al. (1949)[12] que conseguiram produzir a corticosterona, um derivado da cortisona, através da ação de microrganismos na deoxicorticosterona. Com isso, foi possível funcionalizar o C-11 de forma muito mais simples que a proposta por síntese química.[5] Peterson et al. (1952)[13] promoveram a hidroxilação na posição 11α-hidroxiprogesterona. Esta reação foi decisiva para o desenvolvimento da síntese de hormônios adrenocorticóides de forma economicamente viável.[14]

O uso de fungos permite estudar reações específicas de biotransformações sob condições rigorosamente controladas. É possível utilizar altas concentrações de substrato (larga escala de fermentação) que, combinado com uma matriz relativamente limpa, facilita a análise dos produtos obtidos. Além disso, os fungos podem gerar processos regio-, enantio- e estereoseletivos para a produção de intermediários ou de fármacos propriamente ditos.

Dentre os fungos que podem ser usados em biocatálise ou em estudos de biotransformação destacam-se os fungos endofíticos. Segundo Schulz & Boyle (2005)[15], fungos endofíticos são aqueles que podem ser encontrados em um momento particular associado aos tecidos da planta hospedeira aparentemente saudável. Os fungos endofíticos estar presentes em todos os órgãos de uma planta hospedeira sendo que a colonização promovida pode se apresentar inter ou intracelular, localizada ou sistêmica.[16] Algumas associações podem ser benéficas para ambos os organismos, por isso, o termo endofítico tem sido utilizado como sinônimo de mutualismo.[17] 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.[18,19] 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.[15,19,20]

Neste trabalho selecionamos cinco fármacos quirais metabolizados por diferentes enzimas do citocromo P450: fluoxetina (CYP 2D6, reação de demetilação), propranolol (CYP1A2, reação de hidroxilação), omeprazol (CYP2C19, reação de hidroxilação), oxibutinina (CYP3A4, reação de desetilação) e ibuprofeno (CYP2C9, reação de hidroxilação). A avaliação da biotransformação desses fármacos empregando fungos endofíticos gerará informações adicicionais sobre a capacidade do sistema enzimático desses microorganismos em mimetizar as enzimas do citocromo P450, principais responsáveis pela biotransformação de fármacos em humanos.

Para facilitar a compreensão dos estudos realizados, o texto foi dividido em capítulos. Neste capítulo (Capítulo 1) foi apresentada uma introdução geral sobre biotransformação empregando fungos. No segundo capítulo, foi apresentada uma revisão bibliográfica sobre as técnicas analíticas empregadas e sobre fungos endofíticos utilizados nos processos de biotransformação. O terceiro capítulo apresenta os objetivos gerais deste trabalho. O quarto capítulo apresenta o desenvolvimento de um método analítico por HPLC/UV para a determinação dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina e sua aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos endofíticos. O quinto capítulo mostra o desenvolvimento e validação de um método enantiosseletivo por CE/DAD para a determinação de propranolol e 4-hidroxipropranolol e sua aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos endofíticos. No sexto capítulo, foi desenvolvido um método para a determinação simultânea de omeprazol, 5-hidroxiomeprazol e omeprazol sulfona por UPLC/DAD empregando coluna monolítica para se estudar a biotransformação do omeprazol por fungos endofíticos e fitopatógenos. No sétimo capítulo, foi apresentado um método enantiosseletivo para a determinação da oxibutinina e *N*-desetiloxibutinina por HPLC/UV e sua aplicação em estudos de biotransformação por fungos endofíticos e marinhos. O oitavo capítulo mostra o desenvolvimento e validação de um método estereosseletivo para a determinação de ibuprofeno, 2-hidroxi-ibuprofeno e carboxi-ibuprofeno por LC-MS/MS para estudar a biotransformação do ibuprofeno por fungos endofíticos. O nono (último capítulo) apresenta as conclusões gerais obtidas com a realização deste trabalho.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORIS-VARAS, F. Screening for novel enzymes. ***Top. Curr. Chem.***, v. 200, p.1-29, 1999.

[2] VULFSON, E. N. In: ***Lipases: Their Structure, Biochemistry and Aplication***. Wooley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambrigde University Press: Great Britain, 1994

[3] BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. ***Appl. Biotechnol. Microbiol.***, v.77, p.669-674, 2007.

[4] BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: an investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. ***J. Pharm. Biomed. Anal.***, v.46, p.945-952, 2008.

[5] CHARNEY, W. & HERZOG, H. L. ***Microbial transformations of steroids. A handbook***. New York: Academic Press, 1967. 728p.

[6] AZERAD, R. ***Microbial models for drug metabolism***. In: Advances in Biochemical engineering biotechnology. Nova York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.63, p.169-218, 1999.

[7] SMITH, R. V. & ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. ***Arch. Biochem. Biophys.***, v.161, p.551-558, 1974.

[8] SMITH, R. V. & ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. ***J. Pharm. Sci.,*** v.11, p.1737-1759, 1975.

[9] PINHEIRO, S. & FERREIRA, V. F. Abordagens em síntese assimétrica. ***Quím. Nova***, v.21, p.312-318, 1998.

[10] MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. ***J. Chromatogr. A***, v.906, p.3-33, 2001.

[11] SCHLENK, D.; BEVERS, R. J.; VERTINO, A. M.; CERNIGLIA, C. E. P450 catalysed *S*-oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. ***Xenobiotica***, v.24, p.1077-1083, 1994.

[12] HENCH, P. S.; KENDALL, E. C.; SLOCUMB, C. H. e POLLEY, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-corticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. ***Mayo Clin. Proc.***, v.24, p.181-197, 1949.

[13] PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C.; EPPSTEIN, S. H.; REINEKE, L. M.; WEITRAUB, A. Microbial transformations of steroids. Introduction of oxygen at Carbon-11 of progesterone. ***J. Am. Chem. Soc.***, v.74, p.5933-5936, 1952.

[14] STOUDT, T. H. ***The microbiological transformation of steroids***. In: Advanced Applied Microbiology. 2a ed. 1960.

[15] SCHULZ, B. & BOYLE, C. The endophytic continuum. ***Mycol. Res.***, v.109, p.661-686, 2005.

[16] PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. ***J. Nat. Toxins***, v.1, p.185-196, 1992.

[17] FAETH, S. & HAMONN, K. Fungal endophytes in Oak Trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. ***Ecology***, v.78, p.820-827, 1997.

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

[19] SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; STANLEY, H. F. Evolution of endophyte – plant symbioses. ***Trends Plant Sci.***, v.9, p.275-280, 2004.

[20] SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. ***Mycol. Res.***, v.106, p.996-1004, 2002.

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

"O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria."

Isaac Asimov

A síntese bibliográfica desta Tese refere-se aos seus pontos mais importantes, tais como conceitos das técnicas de análise estereosseletivas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral e eletroforese capilar, além da utilização de fungos endofíticos em processos de biotransformação.

1 TECNICAS DE ANÁLISE ESTEREOSSELETIVA

O desenvolvimento de métodos de análise adequados para estudar os processos de biotransformação estereosseletiva é extremamente importante para gerar dados corretos para que, futuramente, os microrganismos estudados possam ser empregados em pesquisas acadêmicas e, até mesmo nas indústrias farmacêuticas, como promotores de reações específicas, eficientes e mais baratas.

A seleção de técnicas analíticas deve ser adequada para cumprir os objetivos especificados e garantir a qualidade dos dados gerados. As principais técnicas cromatográficas de separação quiral podem ser sumariamente classificadas em 3 categorias: cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia por fluido supercrítico (SPC). Técnicas de eletromigração como a eletroforese capilar (CE) e eletrocromatografia capilar (CEC) também são largamente empregadas em análises estereosseletivas. No primeiro caso, o seletor quiral é adicionado ao tampão empregado na análise e no segundo, empregam-se fases estacionárias quirais.

1.1 RESOLUÇÃO DE ESTEREOISÔMEROS POR HPLC USANDO FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS

A resolução de enantiômeros por métodos cromatográficos pode ser realizada através de métodos diretos (fases móveis quirais ou fases estacionárias quirais) e indiretos (derivatização quiral). Os métodos diretos que fazem uso de fases estacionárias quirais são preferidos devido ao grande número de colunas quirais disponíveis comercialmente, à facilidade de desenvolvimento do método, ao menor custo

e maior praticidade e, também, à aplicabilidade em separações em escala analítica e preparativa.[1] No entanto, este método exige uma coleção de colunas caras para separar os enantiômeros de analitos com características distintas. A utilização de aditivos quirais na fase móvel não é largamente utilizada devido à necessidade de aditivos quirais caros, dificuldades de detecção e obtenção de picos com baixa resolução. As fases estacionárias quirais (CSPs) que são freqüentemente utilizadas na resolução de enantiômeros são baseadas em derivados de polissacarídeos, proteínas e antibióticos macrocíclicos, principalmente.

Dentre as três CSPs anteriormente citadas, as mais difundidas são as constituídas de derivados de polissacarídeos, principalmente amilose e celulose. Estes polissacarídeos helicoidais são encontrados em abundância na natureza na forma *in natura*. Nesta forma, estes polissacarídeos 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.[2-4] O mecanismo de interação depende dos substituintes presentes nas moléculas desses polissacarídeos. Os principais tipos de interações que podem ocorrer entre o soluto e a fase estacionária são interações polares como ligações de hidrogênio, interações π-π e interação dipolo-dipolo.[5]

As CSPs baseadas em polissacarídeos são muito usadas para separações quirais em escala analítica e preparativa por apresentarem durabilidade, eficiência, estabilidade, versatilidade e alto poder de resolução.[6] Estas CSPs podem ser empregadas nos modos de eluição normal (fases móveis constituídas por mistura de hexano e isopropanol ou etanol, além de pequenas quantidades de aditivos como ácido trifluoroacético e dietilamina), reverso (fases móveis constituídas por soluções aquosas tamponadas ou não, acrescidas de um solvente orgânico) e polar-orgânico (fases móveis constituídas por solventes orgânicos polares puros ou misturas), o que pode proporcionar

a separação de grande variedade de compostos quirais, tanto em escala analítica como preparativa.[5-7]

As proteínas (aminoácidos) e glicoproteínas (aminoácidos e açúcares), ambos quirais, possuem a habilidade de discriminar moléculas quirais, contudo, um número limitado de proteínas vem sendo usado no desenvolvimento de CSPs. As vantagens dessas colunas incluem a possibilidade de uso de fase móvel aquosa, enantiosseletividade para grande número de compostos e análise direta sem a necessidade de derivação quiral. Entre as desvantagens, destacam-se a falta de robustez, o limitado entendimento dos mecanismos de reconhecimento quiral e a baixa capacidade das colunas, que geralmente não são usadas em separações em escala preparativa.[8]

As CSPs baseadas em antibióticos macrocíclicos são produzidas pela imobilização de glicopeptídeos macrocílicos através de cinco ligações covalentes à superfície da sílica. Desde sua introdução, por Daniel Armstrong, como fase estacionária quiral para HPLC em 1994, estas colunas têm sido usadas para a separação de uma larga variedade de moléculas quirais. Os antibióticos macrocíclicos podem ser ácidos, básicos ou neutros e podem ter pouca ou nenhuma absorbância no UV-Vis. Os antibióticos macrocíclicos vancomincina, teicoplamina, ristocetina A, avoparcina, rifamicina B e tiostreptona vêm sendo bastante utilizados em separações quirais por HPLC. Estas colunas exibem boa estabilidade mecânica, apresentam bom custo/benefício, podem ser usadas para fins preparativos e, principalmente, nos três modos de eluição: reverso, polar-orgânco e normal sem maiores problemas para as colunas.[9]

A estrutura destas fases indica que todas as interações típicas estão presentes: ligações do tipo π-π, ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, inclusões, interações estéreas, ligações aniônicas ou catiônicas. Entretanto, dependendo da escolha das condições da fase móvel, alguns tipos de interações são favorecidos. Por exemplo, as condições de fase reversa favorecem inclusões e ligações de hidrogênio e, dependendo do pH, podem ocorrer ligações aniônicas ou catiônicas. Já as ligações dipolo-dipolo e do tipo π-π são favorecidas em condições de fase normal. O modo polar orgânico tem

potencial para promover todas as interações acima citadas, especialmente, as interações iônicas e, portanto, este modo possui um amplo espectro de aplicações.[9-13]

1.2 RESOLUÇÃO DE ESTEREOISÔMEROS POR ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese clássica baseia-se na migração de espécies carregadas através de um meio líquido, sob influência de um campo elétrico. A eletroforese capilar (CE) utiliza tubos capilares de sílica (SiO_2) fundida revestidos de poliimida. Estes tubos podem possuir diâmetro interno de 15 a 100 μm e comprimento de 30 a 100 cm. A separação dos analitos nestes tubos ocorre devido ao potencial elétrico (cerca de 30 kV) aplicado em uma solução com eletrólito condutor.[14]

A CE é uma técnica versátil, usada para a separação de uma grande variedade de analitos, por exemplo, hidrocarbonetos aromáticos, vitaminas hidro e lipossolúveis, peptídeos, aminoácidos, proteínas, íons inorgânicos, catecolaminas, fármacos, substâncias quirais, polinucleotídeos como o DNA e muitas outras.[15] Também pode ser empregada em estudos visando a determinação de parâmetros físico-químicos, como por exemplo, valores de pKa, viscosidade, constante de dissociação entre outros.[16]

A CE pode ser executada em diferentes mecanismos de separação, sendo que os mais utilizados são a cromatografia eletrocinética micelar (MECK ou MECC, *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*), a eletroforese capilar de zona (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*) ou eletroforese capilar em solução livre (FSCE, *Free Solution Capillary Electrophoresis*), eletroforese capilar em gel (CGE, *Capillary Gel Electrophoresis*), eletroforese capilar por focalização isoelétrica (CIEF, *Capillary Isoeletric Focusing*), isotacoforese capilar (CITP, *Capillary Isotachophoresis*) e eletrocromatografia capilar (CEC, *Capillary electrochromatography*).[17] Três modos são mais usados para a resolução de enantiômeros: CZE, MECK e CEC. Apenas o modo CZE será discutido em maiores detalhes.

1.2.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os principais componentes de um equipamento para CE são mostrados na **Figura 2.1**.[14,17]

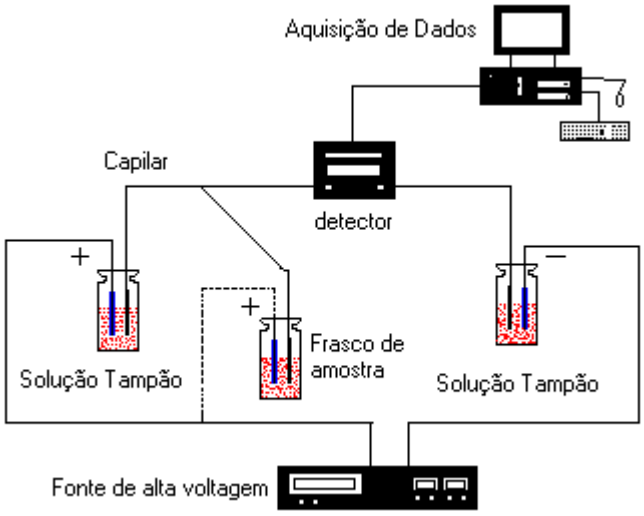

Figura 2.1. Esquema de um equipamento para eletroforese capilar (CE).

O tubo capilar, normalmente de sílica fundida, é preenchido com uma solução de eletrólitos (geralmente uma solução tampão aquosa). Em seguida, a amostra (cerca de 1 a 20 nL) é introduzida na extremidade do capilar oposta ao detector (usualmente o ânodo), pela substituição de um dos frascos da solução tampão por um outro que contém a amostra. Por último, as duas extremidades do capilar e os eletrodos são mergulhados em frascos contendo soluções tampão adequadas para completar o contato elétrico. Os eletrodos são feitos de um material inerte, geralmente a platina. A aplicação de tensão através do capilar causa mobilidades eletroforética e eletrosmótica, promovendo o movimento dos analitos da amostra pelo capilar e passagem através do sistema de detecção. O sinal do detector, geralmente por absorbância no UV-Vis, em função do tempo é chamada eletroferograma.[14,18]

A CE possui vantagens como a possibilidade de injeção e detecção em fluxo, elevada eficiência e conseqüente poder de resolução, curto tempo de análise, baixo custo, além de utilizar pequenos volumes de amostra nas injeções, na ordem de

nL.[18] Por outro lado, os limites de detecção obtidos em CE com detecção por absorção no UV-Vis são superiores aos obtidos em HPLC pela resposta ser diretamente proporcional ao caminho óptico (**Figura 2.2**), definido pelo diâmetro interno do capilar, e devido à utilização de pequenos volumes de amostra na injeção (± mil vezes menor do que o usado em HPLC).[18]

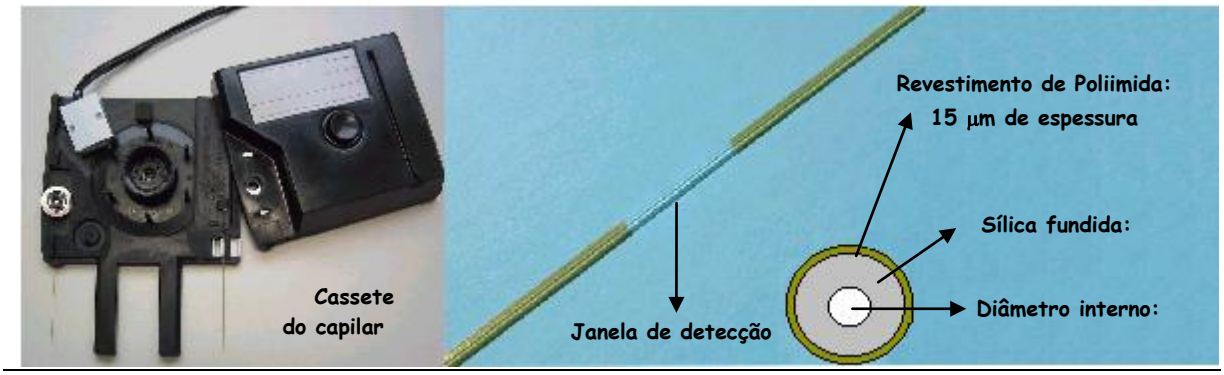

Figura 2.2. Foto de um cassete e de um capilar; em destaque a janela de detecção quando se retira a camada de poliimida.

1.2.2. PRINCÍPIO DE SEPARAÇÃO EM CZE

A separação de analitos em CE é obtida pela diferença na mobilidade do soluto, que é dependente da sua carga, do seu tamanho e da viscosidade do meio.[19] A velocidade de um soluto, sob a influência de um campo elétrico, é determinada pela **Equação 2.1**:

(2.1) $$v = \mu_{EP} x\, E$$

Onde: v = velocidade do íon (cm s^{-1}); E = campo elétrico aplicado (volts cm^{-1}) e μ_{EP} = mobilidade eletroforética.

A mobilidade eletroforética (μ_{EP}) de um soluto, que varia com sua carga e tamanho, é descrita pela **Equação 2.2**[20]:

(2.2)
$$\mu_{EP} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Onde: q = carga do íon; r = raio do íon η = viscosidade da solução.

Pode-se calcular a mobilidade aparente (μ_{AP}) de um soluto quando se tem os parâmetros conhecidos ou medidos experimentalmente (dados do eletroferograma) conforme a **Equação 2.3**:

(2.3)
$$\mu_{AP} = \frac{L_T \ x \ L_{EF}}{t_m \ x \ E}$$

Onde: L_T = comprimento total do capilar (cm); L_{EF} = comprimento efetivo do capilar (cm); t_m = tempo de migração e E = campo elétrico aplicado (volts cm $^{-1}$).

A eletroforese capilar apresenta dois tipos de fluxos, o fluxo eletroforético e o eletrosmótico. No fluxo eletroforético os cátions migram em direção ao eletrodo negativo e os ânions em direção ao eletrodo positivo. Já o fluxo eletrosmótico (EOF, *electroosmotic flow*) existe devido à presença de grupos silanóis ácidos na parede interna do capilar quando em contato com uma solução tampão. Este fluxo se origina no anodo e segue em direção ao catodo movimentando os íons do soluto em direção ao detector.[14,17]

Em solução tampão de pH alto (acima de 7,00), os grupos silanóis (SiOH) da parede do capilar de sílica se ionizam ($SiO^- + H^+$). Esta dissociação deixa a superfície carregada negativamente. Nestas condições, uma camada de contra-íons (cátions) é formada próxima à superfície do capilar (camada fixa) a fim de manter a eletroneutralidade. Isto forma a dupla camada e cria uma diferença de potencial muito próxima à superfície, sendo o fenômeno conhecido como potencial zeta. Estes contra-

íons não são suficientes para neutralizar a carga negativa, então, uma nova camada de íons também é atraída (camada móvel).

Quando uma diferença de potencial é aplicada neste sistema, forças elétricas atuam na camada móvel provocando um movimento dos íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Estes íons solvatados com moléculas de água se movem e originam um fluxo de solução ao longo do capilar chamado de fluxo eletrosmótico (**Figura 2.3**).[14,17]

O EOF depende do pH da solução tampão, sendo que em pH baixo (3,00 a 4,00) a ionização dos grupos silanóis é pequena e o EOF não é significante, enquanto que acima de pH 9,00 os silanóis ficam completamente ionizados aumentando o potencial zeta e, conseqüentemente, a velocidade do EOF. Em pHs inferiores a 2,00, praticamente não há EOF, pois os grupos silanóis estão protonados.[17-19]

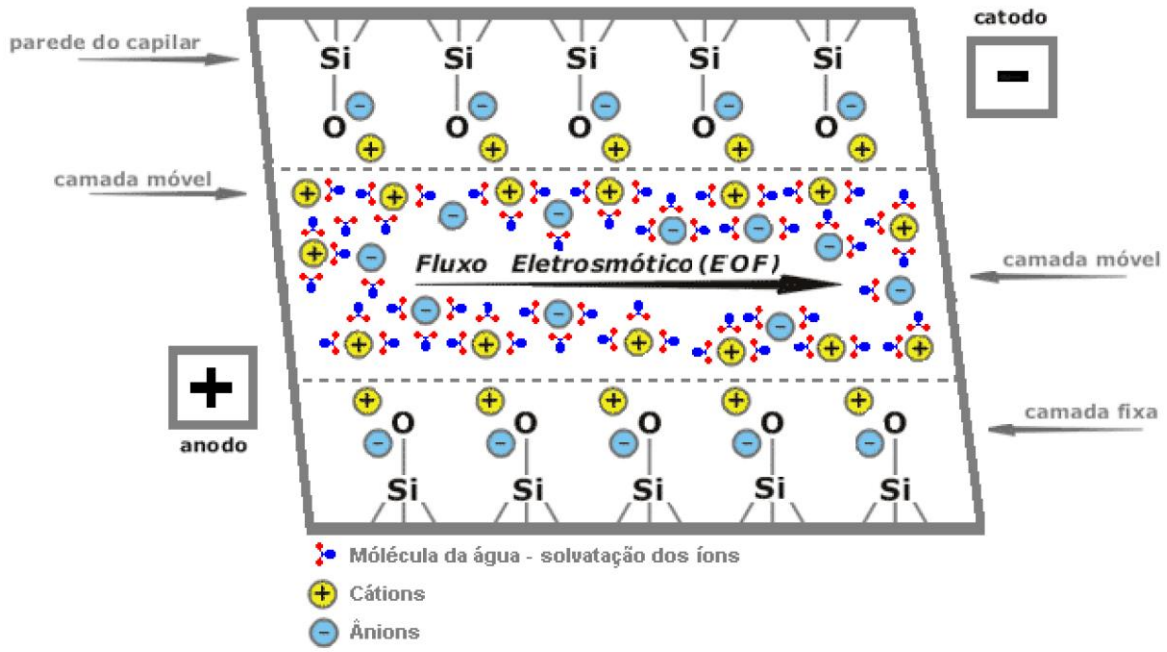

Figura 2.3. Esquema do fluxo eletrosmótico (EOF) em um capilar de sílica fundida em soluções neutras ou alcalinas.

Devido ao EOF, as moléculas possuem uma velocidade uniforme através do capilar, ou seja, a solução se movimenta mais lentamente nas proximidades da parede do

capilar apresentando um perfil plano em relação ao perfil parabólico encontrado em HPLC devido ao uso de bombas. Este perfil plano encontrado no EOF resulta em menor resistência à transferência de massa deixando todas as moléculas com a mesma velocidade, o que causa uma menor dispersão da amostra e, portanto, uma maior eficiência (**Figura 2.4**).[17,20]

Muitas estratégias são usadas para se exercer um controle adequado do EOF, como por exemplo, controle das propriedades físico-químicas da solução de eletrólitos(pH, concentração e força iônica da solução tampão), adição de um eletrólito inerte ou aditivo orgânico, controle da temperatura, revestimento da parede interna co capilar, etc.[18]

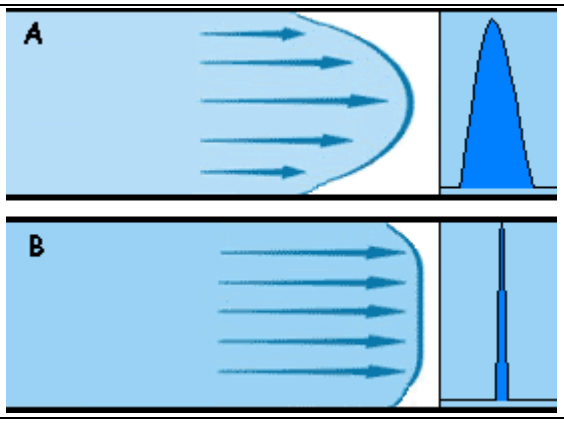

Figura 2.4. (A) Esquema de um perfil parabólico apresentado no HPLC devido ao uso de bombas ocasionando o alargamento dos picos (fluxo pressurizado); (B) Esquema de um perfil plano na eletroforese capilar ocasionando uma maior eficiência (fluxo eletrosmótico).

A magnitude do EOF pode ser expressa em termos de velocidade (V_{EOF}) (**Equação 2.4**) ou mobilidade (μ_{EOF}) (**Equação 2.5**):

(2.4)
$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta E}{4 \pi \eta} (cm\ s^{-1})$$

Onde: ε = constante dielétrica do meio; ζ = potencial zeta; E = campo elétrico; η = viscosidade da solução.

(2.5) $$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta} (cm^2 / Vs)$$

Onde: ε = constante dielétrica do meio; ζ = potencial zeta; η = viscosidade da solução.

Na prática, a velocidade do EOF é medida usando o tempo de migração (t_m) de um marcador neutro (por exemplo, dimetilsulfóxido, acetona e metanol) que irá mover com velocidade igual ao EOF. O marcador neutro pode ser adicionado à amostra ou injetado diretamente em um capilar de comprimento efetivo conhecido (**Equação 2.6**).[21]

(2.6) $$v_{EOF} = \frac{L_{EF}}{t_m}$$

onde: V_{EOF} = velocidade do fluxo eletrosmótico; L_{EF} = comprimento efetivo do capilar; t_m = tempo de migração do marcador neutro.

Em função da mobilidade eletroforética e fluxo eletrosmótico, a CE pode ser usada para a separação simultânea de solutos neutros e com cargas positivas e negativas. Íons carregados positivamente se movem em direção ao catodo devido a sua mobilidade eletroforética e também devido ao fluxo eletrosmótico. Ânions têm mobilidade eletrosmótica em direção ao anodo, mas o EOF os arrasta em direção ao catodo. As moléculas neutras possuem mobilidade eletroforética igual a zero, mas também são carregadas em direção ao detector pelo EOF (**Figura 2.5**).[14]

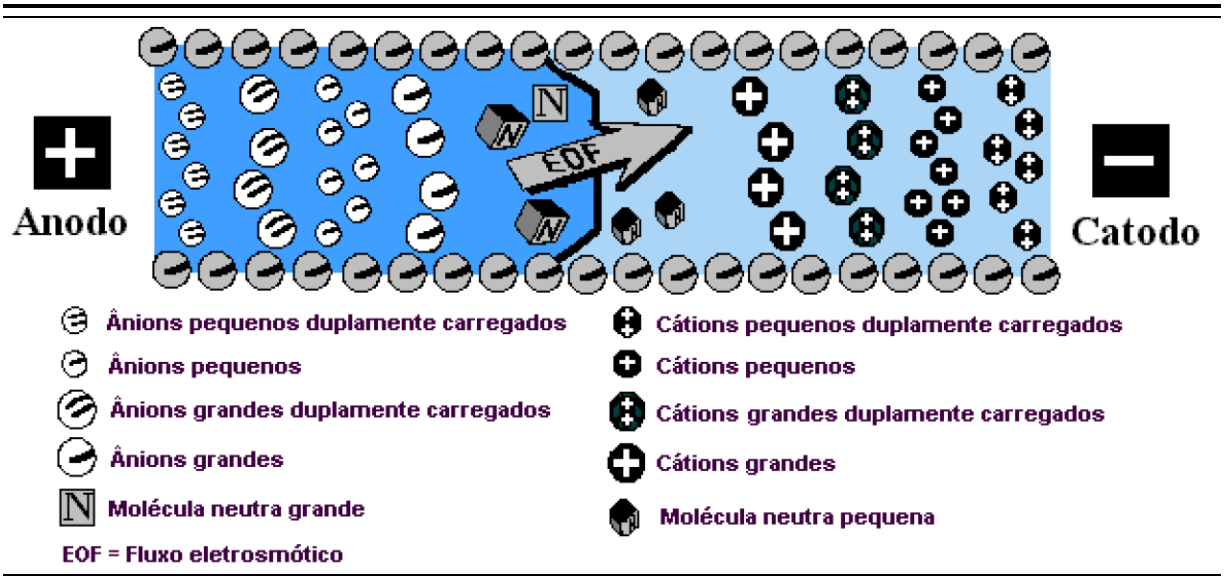

Figura 2.5. Comportamento de moléculas com diferentes cargas e tamanhos em uma separação por eletroforese capilar.

1.2.3 SEPARAÇÃO DE ENANTIÔMEROS POR CE

A enantioseparação na eletroforese capilar não é baseada nas diferentes densidades de carga do analito, pois os enantiômeros de um composto quiral possuem a mesma densidade de carga. Desta forma, os enantiômeros não podem ser diferenciados pela mobilidade eletroforética ou pelo EOF, sendo necessária a adição de um seletor quiral à solução de eletrólitos.[22] Os seletores quirais mais utilizados em CE são as ciclodextrinas (CDs), éteres coroa, polissacarídeos, proteínas, sais biliares e antibióticos.[23]

As CDs e seus derivados são excepcionalmente seletivos para os compostos quirais. Estima-se que quase 85% das separações enantioméricas em CE são obtidas pelo uso de CDs e seus derivados.[24-26] As CDs são moléculas cíclicas de oligossacarídeos de origem natural, com estrutura similar a de um cone truncado (**Figura 2.6** e **Tabela 2.1**) e com uma cavidade hidrofóbica capaz de formar complexos de inclusão com os analitos. A superfície externa da ciclodextrina (CD) é hidrofílica devido à presença de grupos hidroxilas. As CDs mais comuns possuem seis (α-CD), sete (β-CD) e oito (γ-CD) subunidades de glicose que formam anéis (**Figura 2.7**).[22]

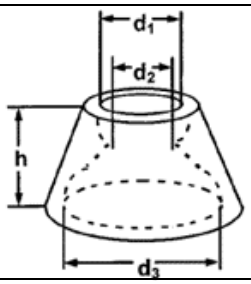

Figura 2.6. Representação da molécula da ciclodextrina em forma de cone truncado.

Tabela 2.1. Diâmetros internos [a] (d_1, d_2 e d_3) e altura (h) para α, β e γ-ciclodextrina.

Ciclodextrinas	d_1	d_2	d_3	h
α	5,6	4,2	8,8	7,8
β	6,8	5,6	10,8	7,8
γ	8,0	6,8	12,0	7,8

[a] valores em Å.

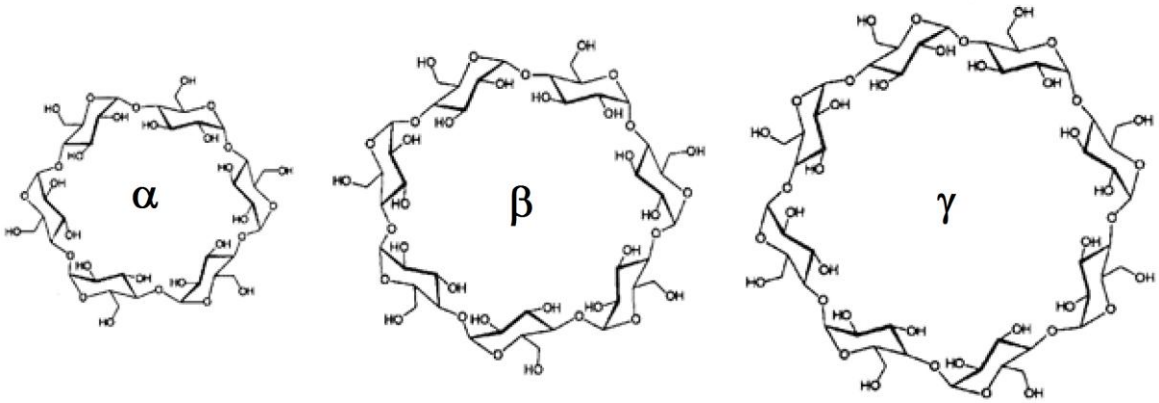

Figura 2.7. Representação das estruturas da α, β, e γ-ciclodextrina.

As moléculas anulares possuem os grupos hidroxila primários situados na parte mais estreita do tronco do cone, ao passo que as hidroxilas secundárias encontram-se situadas na parte mais larga deste tronco. Assim, as hidroxilas situam-se nas extremidades do cone, tornando as CDs solúveis em água. Devido ao alinhamento dos hidrogênios C(3)-H e C(5)-H e pela ligação éter O(4), o interior da cavidade apresenta

caráter hidrofóbico. Em solução aquosa, portanto, estas cavidades proporcionam uma matriz hidrofóbica em um ambiente hidrofílico. Assim, CDs em solução aquosa podem formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas, limitados exclusivamente por restrições estereoquímicas. Para que ocorra complexação, a molécula deve entrar parcial ou totalmente na cavidade da CD; interações secundárias específicas (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e de transferência de carga) da parte da molécula que ficou para fora da cavidade com os grupos hidroxilas ou outros grupos da borda da CD ou derivado também contribuem para a estabilização do complexo formado.

Estas interações específicas podem ser estereosseletivas e serem responsáveis pela separação de moléculas quirais. A estabilidade dos complexos de inclusão é influenciada pela estrutura química e hidrofobicidade da molécula do analito, pela composição da solução de eletrólitos, pH, solvente orgânico e temperatura.[27-29]

Os analitos de caráter básico ou ácido sofrem influência do pH da solução tampão e este parâmetro é importante para se obter uma melhor eficiência na resolução, uma vez que o grau de ionização dos analitos afeta a capacidade de complexação com o seletor quiral. Além disso, quando se aumenta a concentração de CD aumenta-se a probabilidade de interações, mas existe uma concentração ótima para a resolução quiral e se esta for ultrapassada pode ocorrer perda de resolução.[24,27,30]

Solventes orgânicos podem competir com os analitos pela formação de complexos de inclusão, diminuindo a afinidade dos enantiômeros pela CD.[31] Entretanto, vários sistemas de soluções tampão e modificadores orgânicos (por exemplo, metanol e acetonitrila) têm sido usados para melhorar a separação através da modificação do equilíbrio secundário, pela alteração do EOF e para facilitar a dissolução de compostos hidrofóbicos.[32]

Segundo Rogan & Altria (1996),[30] a temperatura interfere nas separações com CDs, pois afeta a cinética de transferência de massa do complexo analito-CD.

O poder de discriminação quiral da CD pode ser modificado por derivação química com a introdução de radicais sem carga, como, por exemplo, metil, hidroxietil,

hidroxipropil e acetil. Estes radicais podem aumentar o tamanho da cavidade, facilitando a complexação, e melhorando a solubilidade da CD. Alguns radicais com carga também são usados, tais como: carboxila, fosfato, alquilsulfato, metilamino e outros. Da mesma forma, estes grupos alteram as dimensões da cavidade e, além disso, podem promover interações coulômbicas com os analitos a serem separados.[23,29]

A β-CD, uma das mais utilizadas para derivação, possui 21 grupos hidroxilas que podem ser modificados pela substituição do átomo de hidrogênio ou do grupo hidroxila. O grau de substituição e a concentração das CDs podem determinar a separação quiral.[32,33] Os derivados da β-CD mais utilizados em separações quirais em CE e que estão disponíveis comercialmente são: 2-hidroxipropil-β-CD (HP-β-CD), (2,3,6-tri-orto-metil)-β-CD (TM-β-CD), (2,6-di-orto-metil)-β-CD (DM-β-CD), carboximetil β-CD (CM-β-CD), sulfobutiléter-β-CD (SBE-β-CD) e β-CD sulfatada (S-β-CD).[34]

2 FUNGOS ENDOFÍTICOS EM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Até o momento, existem poucos trabalhos publicados na literatura relatando a utilização de fungos endofíticos em processos de biotransformação. Werner et al. (1997)[35] reportaram que a aphelandrina (**1**), uma poliamina macrocíclica encontrada em raízes de diferentes espécies do gênero *Aphelandra* (Acanthaceae), é metabolizada por vários fungos endofíticos isolados das raízes de *A. Tetragona*. A habilidade dos fungos para crescerem na presença de aphelandrina indica que a degradação do alcalóide poliamina não se limita à oxidação fenólica do esqueleto cumarínico, mas que a molécula de poliamina também é metabolizada (**Figura 2.8**).

Benzoxazinonas, uma classe de fitoanticipinas que ocorre nas famílias Gramineae, Acanthaceae, Ranunculaceae e Scrophulariaceae, podem servir como compostos de defesa contra bactérias, fungos e insetos. O fungo *Fusarium moniliforme*, um fungo endofítico comumente associado ao milho (*Zea mays* L.),[36] mostrou-se capaz de biotransformar 6-metoxi-benzoxazolinona (**2**) e 2-benzoxazolinona (**3**) em *N*-(2-hidroxi-4-metoxifenil) ácido malonâmico e *N*-(2-hidroxifenil) ácido malonâmico, respectivamente (**Figura 2.8**). A biotransformação de **3** e 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (**4**) (**Figura**

2.8) por quatro fungos endofíticos isolados de *Aphelandra Tetragona* também foi relatada por Zikmundová et al. (2002).[37] Eles identificaram vários novos produtos de acilação, acetilação, oxidação, redução, hidrólise e nitração. Por exemplo, *Fusarium sambucinum* detoxificou **3** e **4** em *N*-(2-hidroxifenil) ácido malonâmico. *Plectosporium tabacinum*, *Gliocladium cibotii* e *Chaetosphaeria* sp. biotransformou **4** em 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxifenil)acetamida, *N*-(2-hidroxifenil)acetamida, *N*-(2-hidroxi-5-nitrofenil)acetamida, *N*-(2-hidroxi-3-nitrofenil)acetamida, 2-amino-3*H*-phenoxazin-3-ona, 2-acetilamino-3*H*-phenoxazin-3-ona e 2-(*N*-hidroxi)acetilamino 3*H*-phenoxazin-3-ona. O composto **3** não foi degradado por estes três fungos.

Além disso, a biotransformação de **4** e os seus principais produtos de degradação 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxifenil)acetamida e *N*-(2-hidroxifenil)acetamida por *Chaetosphaeria* sp., um fungo endofítico isolado de *Aphelandra Tetragona*, foi relatada por Zikmundová et al. (2002).[38] Três novos metabólitos foram identificados como 2-amino-7-hidroxi-3*H*-phenoxazin-3-ona, 2-acetilamino-7-hidroxi-3*H*-phenoxazin-3-ona e 7-hidroxi-2-(2-hydroxyacetyl)-amino-3*H*-phenoxazin-3-ona. Portanto, presume-se que as enzimas responsáveis pelas reações de biotransformação de **3** e **4** foram *N*-acetil e *N*-malonil-transferases, bem como oxidases e redutases, por exemplo, monoxigenases do citocromo P-450 (**Figura 2.8**). Enquanto as primeiras enzimas são conhecidas como enzimas de desintoxicação de xenobióticos em sistemas vivos, estas últimas são biocatalizadores muitas vezes muito específicos.

Glenn et al. (2003)[39] reportaram a desintoxicação do composto antimicrobiano **3**, isolado do milho (*Zea mays*), pelo fungo endofítico *Fusarium verticillioides*. Além disso, os autores sugeriram 2-aminofenol (**5**) como um metabólito intermediário e 2-acetamidofenol (**6**) como outro metabólito derivado (**Figura 2.8**).

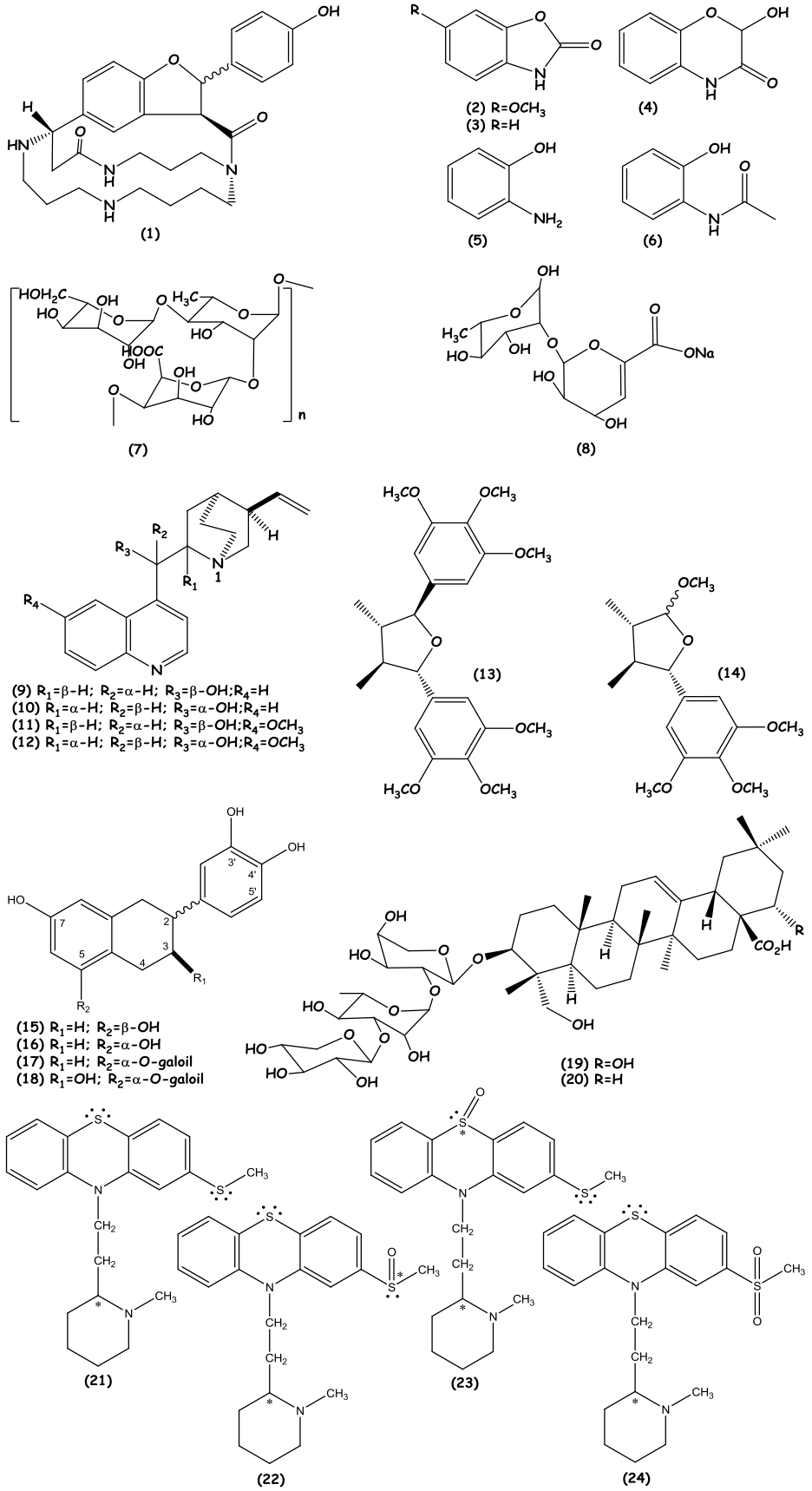

Figura 2.8. Substratos e produtos de biotransformação de reações biocatalisadas por fungos endofíticos.

Várias cepas de endofíticos isolados do quiabo, *Abelmoschus esculentum* Moench (Okra), foram capazes de utilizar polissacarídeos (**7**) adicionados ao meio de cultura como fonte de carbono, para a produção de lepidimoide (**8**), uma substância alelopática (**Figura 2.8**).[40]

As transformações microbianas dos alcalóides antimaláricos quinina (**9**), quinidina (**10**), cinchonidine (**11**) e cinchonine (**12**) foram realizadas por fungos endofíticos isolados de *Cinchona pubescens*.[41] O fungo endofítico *Xylaria* sp. biotransformou o alcalóide *Cinchona* em seus derivados 1-*N*-óxido (**Figura 2.8**).

A lignana grandisina (**13**), um tetraidrofurano tripanossomicida, foi biotransformado a um novo derivado (**14**) pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp., isolado de *Viguiera arenaria*. O produto **14** gerado manteve a atividade tripanossomicida, representando, portanto, uma interessante simplificação molecular para a concepção de novos análogos com ação tripanossomicida (**Figura 2.8**).[42]

Alguns exemplos de biotransformação estereosseletiva empregando fungos endofíticos também estão descritos na literatura. A biotransformação de flavanos por fungos endofíticos isolados de *Camellia sinensis* (chá verde) foi relatada por Agusta et al. (2005)[43] e Shibuya et al. (2005).[44] O fungo endofítico *Diaporthe* sp. oxidou estereosseletivamente o carbono na posição 4 da (+)-catequina (**15**) e (-)-epicatequina (**16**), formando os derivados 3,4-*cis*-dihidroxiflavanos. (-)-Epicatequina 3-*O*-galato (**17**) e (-)-epigalocatequina-3-*O*-galato (**18**) também foram oxidadas pelo fungo em derivados 3,4-dihidroxiflavanos (**Figura 2.8**).

A saponina 3-*O*-(β-*D*-xilopiranosil)-(1→3)-α-*L*-ramnopiranosil-(1→2)-α-*L*-arabinopiranosil-22-α-hidroxihederagenina (**19**), uma saponina 22α-hidroxilada, foi obtida a partir da biotransformação da 3-*O*-(β-*D*-xilopiranosil)-(1→3)-α-*L*-ramnopiranosil-(1→2)-α-*L*-arabinopiranosil-hederagenina (**20**) pelo fungo do grupo Xylariaceous isolado como um endofítico dos frutos de *Sapindus saponaria*. Curiosamente, **19** também foi obtido a partir dos frutos de *Sapindus saponaria* (**Figura 2.8**).[45]

Os estudos de biotransformação de fármacos também são importantes porque eles podem gerar metabólitos ativos ou novos intermediários que podem ser utilizados pelas indústrias farmacêuticas. Por exemplo, muitos derivados fenotiazínicos, como a tioridazina (**21**) sofrem *S*-oxidação formando derivados sulfóxidos. Ambos átomos de enxofre presentes na molécula da tioridazina podem sofrer esta reação de *S*-oxidação.[46,47] A *S*-oxidação do grupo tioetil forma o metabólito tioridazina-2-sulfóxido (**22**) e a *S*-oxidação no anel tiazina forma a tioridazina-5-sulfóxido (**23**). Posteriormente, a tioridazina e tioridazina-2-sulfóxido podem sofrer uma oxidação a sulfona e formar a tioridazina-2-sulfona (**24**).[46,47] Os compostos **22** e **24** são metabólitos farmacologicamente ativos, enquanto **23** contribui para a cardiotoxicidade do fármaco.[48,49] Particularmente, **22** foi introduzido em uso clínico como Serentil® (Novartis Pharmaceuticals) e é cerca de duas vezes mais potente como agente antipsicótico do que **21** em humanos.[50] Considerando que os metabólitos também são terapeuticamente ativos, mas com efeitos colaterais indesejáveis que podem ser atribuídos a estereoisômeros específicos, o estudo de sua biotransformação por fungos endofíticos pode ser útil na obtenção dos metabólitos de **21** na forma enantiomericamente pura, para depois serem usados em estudos clínicos e toxicológicos.

Nosso grupo de pesquisa estudou a biotransformação estereosseletiva do composto **21** por fungos endofíticos isolados de plantas da família Asteraceae.[51,52] Em geral, o átomo de enxofre da cadeia lateral (posição 2) ou do anel fenotiazínico (posição 5) foi oxidado, formando os principais metabólitos encontrados em humanos **22** e **23** (**Figura 2.8**). A quantidade de metabólitos formados variou entre os 12 fungos endofíticos estudados, entretanto, a mono-2-sulfoxidação ocorreu em maior razão e freqüência.[51,52]

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] GÜBITZ, G. & SCHMID, M. G. Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review. ***Biopharm. Drug Dispos.***, v.22, p.291-336, 2001.

[2] DÄPPEN, R.; ARM, H.; MEYER, V. R. Aplications and limitations of commercially available chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. ***J. Chromatogr. A***, v.373, p.1-20, 1986.

[3] 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.336-398.

[4] GÜBITZ, G. Separation of drug enatiomers HPLC using chiral stacionary phases – selective review. ***Chromatographia***, v.30, p.555-564, 1990.

[5] YASHIMA, E & OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. ***Bull. Chem. Soc. Jpn.***, v.68, p.3289-3307, 1995.

[6] OKAMOTO, Y. & KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamate an benzoates as chiral stacionary phases. ***J. Chromatogr. A***, v.666, p.403-419, 1994.

[7] TACHIBANA, K. & OHNISH, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. ***J. Chromatogr. A***, v.906, p.127-154, 2001.

[8] HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatography techniques. ***J. Pharm. Biomed. Anal.***, v.27, p.357-372, 2002.

[9] ARMSTRONG, D. W.; TANG, Y.; CHEN, S.; ZHOU, Y.; BAGWILL, C.; CHEN, J.-R. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. ***Anal. Chem.***, v.66, p.1473-1484, 1994.

[10] EKBORG-OTT, K. H.; LIU, Y.; ARMSTRONG, D. W. Highly enantiosselective HPLC separations using the covalently bonded macrocyclic antibiotic, ristocetin A, chiral stationary phase. ***Chirality***, v.10, p. 434-483, 1998.

[11] RAMOS, L.; BAKHTIAR, R.; MAJUMDAR, T.; HAYES, M.; TSE, F. Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry enantiomeric separation of *dl-threo*-methylphenidate, (Ritalin®) using a macrocyclic antibiotic as the chiral selector. ***Rapid Commun. Mass Spectrom.***, v.13, p.2054-2062, 1999.

[12] BAKHTIAR, R. & TSE, F. High-throughput chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. ***Rapid Commun. Mass Spectrom.***, v.14, p.1128–1135, 2000.

[13] BAKHTIAR, R.; RAMOS, L.; TSE, F. L. S. Use of atmospheric pressure ionization mass spectrometry in enantiosselective liquid chromatography. ***Chirality***, v.13, p.63-74, 2001.

[14] ALTRIA, K. D. ***Fundamentals of capillary electrophoresis theory***. In: ALTRIA, K. D. Capillary electrophoresis guide book. New Jersey, Humana Press, 1996. Cap. 1, p.3-15.

[15] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. ***Princípios de Análise Instrumental***. 5 ed., Bookman: São Paulo, 2002. 834p.

[16] ISSAQ, H. J. A decade of capillary electrophoresis. ***Electrophoresis***, v.21, p.1921-1939, 2000.

[17] KUHN, R.; HOFFESTETTER-KUHN, S. ***Capillary electrophoresis: principles and practice***. New York: Springer-Verlag, 1993. 375p.

[18] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. ***Quím. Nova***, v.20, p.493-511, 1997.

[19] BOER, T. de; ZEEUW, R. A. de; JONG, G. J. de; ENSING, K. Selectivity in capillary electrokinetic separations. ***Electrophoresis***, v.20, p.2989-3010, 1999.

[20] JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. De-A. High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. ***J. Chromatogr. B***, v.218, p.209-216, 1981.

[21] BAKER, D. R. ***Capillary electrophoresis***. John Wiley & Sons: New York, 1995. 244p.

[22] VERLEYSEN, K. & SANDRA, P. Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. ***Electrophoresis***, v. 19, p.2798-2833, 1998.

[23] VESPALEC, R. & BOCEK. Chiral separations in capillary electrophoresis. ***Electrophoresis***, v.20, p.2579-91, 1999.

[24] NIELEN, M. W. F. Chiral separation of basic drugs using cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. ***Anal. Chem.***, v.65, p.885-893, 1993.

[25] BLASCHKE, G. & CHANKVETADZE, B. Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration techniques. ***J. Chromatogr. A***, v.875, p.3-25, 2000.

[26] HADLEY, M. R.; CAMILLERI, P. HUTT, A. J. Enantiospecific analysis by capillary electrophoresis: aplications in drug metabolism and pharmacokinetics. ***Electrophoresis***, v.21, p.1953-1976, 2000.

[27] FANALI, S. & KILÁR, F. The utility of cyclodextrins in capillary electrophoresis. ***J. Capillary. Electrophor.***, v.001:1, p.72-78, 1994.

[28] St. PIERRE, L. A. & SENTEL, K. B. Cyclodextrins as enantioselective mobile phase modifiers for chiral capillary electrophoresis. Effects of pH and cyclodextrin concentration. ***J. Chromatogr. B***, v.657, p.291-300, 1994.

[29] GÜBITZ, G. & SCHMID, M. G. Chiral separation principles in capillary electrophoresis. ***J. Chromatogr. A***, v.792, p.179-225, 1997.

[30] ROGAN, M. M. & ALTRIA, K. D. In: ALTRIA, K. D. (Ed.) ***Chiral separations by capillary electrophoresis***. New Jersey: Humana Press, 1996. Cap.14, p.171-96.

[31] BRESSOLLE, F.; AUDRAN, M.; PHAN, T.; VALLON, J. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatographic methods: Aplications to pharmacokinetics. ***J. Chromatogr. B***, v.686, p.3-10, 1996.

[32] GUTTMAN, A. Novel separation scheme for capillary electrophoresis of enantiomers. ***Electrophoresis***, v.16, p.1900-1905, 1995.

[33] HA, P. T. T.; HOOGMARTENS, J.; VAN SCHEPDAEL, A. Recent advances in pharmaceutical applications of chiral capillary electrophoresis. ***J. Pharm. Biomed. Anal.***, v.41, p.1-11, 2006.

[34] BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. ***Trac-Trends Anal. Chem.***, v.22, p.428-439, 2003.

[35] WERNER, C.; PETRINI, O.; HESSE, M. Degradation of the polyamine alkaloid aphelandrine by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. ***FEMS Microbiol. Lett.***, v.155, p.147-153, 1997.

[36] YUE, Q.; BACON, C.W.; RICHARDSON M.D. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 6-methoxy-benzoxazolinone by *Fusarium moniliforme*. ***Phytochemistry***, v.48, p.451-454, 1998.

[37] ZIKMUNDOVÁ, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; HESSE, M.; WERNER, C. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hydroxy-1,4- benzoxacin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. ***Appl. Environ. Microbiol.***, v.68, p.4863-4870, 2002.

[38] ZIKMUNDOVÁ, M.; DRANDAROV, K.; HESSE, M.; WERNER, C. Hydroxylated 2-amino-3*H*-phenoxazin-3-one derivatives as products of 2-hydroxy-1,4-benzoxacin-3-one (HBOA). Biotransformation by *Chaetosphaeria* sp., an endophytic fungus from *Aphelandra Tetragona*. ***Z. Naturforsch. C,*** v.57, p.660-665, 2002.

[39] GLENN, A. E.; MEREDITH, F. I.; MORRISON III, W .H.; BACON, C. W. Identification of intermediate and branch metabolites resulting from biotransformation of 2-benzoxazolinone by *Fusarium verticillioides*. ***Appl. Environ. Microbiol.***, v.69, p.3165-3169, 2003.

[40] TANAKA, M.; YOSHIMURA, M.; SUTO, M.; YOKOTA, A.; ASANO, K.; SUKARA, E.; TOMITA, F. Production of lepidimoide by an endophytic fungus from polysaccharide extracted from *Abelmoschus* sp.: identification of the product and the organism producing it. ***J. Biosci. Bioeng.***, v.93, p.531-536, 2002.

[41] SHIBUYA, H.; KITAMURA, C.; MAEHARA, S.; NAGAHATA, M.; WINARNO, H.; SIMANJUNTAK, P.; KIM, H-S.; WATAYA, Y.; OHASHI, K. Transformation of *Cinchona* alkaloids into 1-N-oxide derivatives by endophytic *Xylaria* sp. isolated from *Cinchona pubescens*. ***Chem. Pharm. Bull.***, v.51, p.71-74, 2003.

[42] VERZA, M.; ARAKAWA, N. S.; LOPES, N. P.; KATO, M. J.; PUPO, M. T.; SAID, S.; CARVALHO, I. Biotransformation of a tetrahydrofuran lignin by the endophytic fungus *Phomopsis* sp. ***J. Braz. Chem. Soc.***, v.20, p.195-200, 2009.

[43] AGUSTA, A.; MAEHARA, S.; OHASSHI, K.; SIMANJUNTAK, P.; SHIBUTA, H. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. ***Chem. Pharm. Bull.***, v.53, p.1565-1569, 2005.

[44] SHIBUYA, H.; AGUSTA, A.; OHASHI, K.; MAEHARA, S.; SIMANJUNTAK, P. Biooxidation of (+)-catechin and (-)-epicatechin into 3,4-dihydroxyflavan derivatives by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. ***Chem. Pharm. Bull.***, v.53, p.866-867, 2005.

[45] MURGU, M.; SANTOS, L. F. A.; DE SOUZA, G. D.; DAOLIO, C.; SCHNEIDER, B.; FERREIRA, A. G.; RODRIGUES-FILHO, E. Hydroxylation of a hederagenin derived saponin by a *Xylareaceous fungus* found in fruits of *Sapindus saponaria*. ***J. Braz. Chem. Soc.***, v.19, p.831-835, 2008.

[46] GRUENKE, L. D.; CRAIG, J. C.; DINOVO, E. C.; GOTTSCHALK, L. A.; NOBLE, E. P.; BIENER, R. Identification of a metabolite of thioridazine and mesoridazine from a human plasma. ***Res. Commun. Chem. Path.***, v.10, p.221-225, 1975.

[47] ZEHNDER, K.; KALBERER, F.; KREIS, W.; RUTSCHMANN, J. Metabolism of thioridazine (Mellaril) and one of its pyrrolidine analogues in rat. ***Biochem. Pharmacol.***, v.11, p.535-550, 1962.

[48] GOTTSCHALK, L. A.; DINOVO, E.; BIENER, R.; NANDI, B. R. Plasma concentrations of thioridazine metabolites and ECG abnormalities. ***J.Pharm. Sci.,*** v.67, p.155-157, 1978.

[49] 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.,*** v.86, p.44-55, 1986.

[50] AGUILAR, S. J. An open study of mesoridazine (Serentil) in chronic schizophrenics. ***Dis. Nerv. Syst.***, v.36, p.484-489, 1975.

[51] BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: an investigation of *rac*-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. ***J. Pharm. Biomed. Anal.,*** v.46, p.945-952, 2008

[52] BORGES, K. B; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, v.77, p.669-674, 2007.

Capítulo 9: Conclusões Gerais

"A educação é um constante ato de desenvolvimento. Só ela apriora a conduta de um indivíduo."

Roberta Santana Juvencio (Prêmio Frase Jovem Cientista)

Nesse estudo, as técnicas de HPLC/UV, CE/DAD, UPLC/DAD e LC-MS/MS foram empregadas para estudar a biotransformação de diferentes fármacos por fungos, principalmente endofíticos. Essas técnicas de análise foram eficientes para separar os fármacos selecionados e seus metabólitos e possibilitar a obtenção de métodos seletivos, precisos, exatos e com detectabilidade adequada para a análise pretendida. A CE mostrou ser particularmente interessante devido ao poder de separação e uso reduzido de reagentes, o que possibilitou o desenvolvimento de um método de baixo custo. A coluna monolítica usada com o equipamento UPLC também foi bastante apropriada, possibilitando uma grande economia em solventes orgânicos devido ao tempo de análise inferior a 2 minutos. Infelizmente, ainda não existem colunas monolíticas quirais disponíveis comercialmente para utilização em análises enantiosseletivas. O emprego de planejamento experimental mostrou ser bastante útil na otimização de métodos que requerem o ajuste de muitas variáveis como, por exemplo, aqueles que empregam a CE. As principais vantagens da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) empregada no desenvolvimento do método de análise do IBP e seus metabólitos são a seletividade e detectabilidade.

Reações de biotransformação enantiosseletivas empregando os fungos endofíticos selecionados foram observadas para o PROP e IBP. No caso do PROP observou-se a reação de hidroxilação aromática com formação preferencial do enantiômero ativo (-)-(S)-4-OHPROP. A hidroxilação alifática do carbono 2 da molécula do IBP, com formação do metabólito 2-OH-IBP, também foi observada. De forma geral, o enantiômero ativo (+)-(S)-2-OH-IBP foi observado em maior freqüência e proporção.

Para o OMZ, a reação de sulfonação aconteceu de forma preferencial. Outras reações empregando fungos, como a demetilação (FLX) e desetilação (OXY) devem ser mais cuidadosamente avaliadas para se obter condições propícias em que os microrganismos possam biotransformar o fármaco.

O estudo de biotransformação deve ser realizado com particular atenção para fármacos que possuam problemas de estabilidade, como no caso do OMZ, ou para aqueles nos quais podem acontecer reações de racemização ou inversão quiral (IBP).

Além disso, a obtenção de metabólitos que requerem mais de uma etapa de reação (COOH-IBP) também deve ser mais cuidadosamente estudada, buscando-se condições propícias para que este tipo de reação ocorra.

Finalmente, os fungos empregados foram bastante viáveis nos processos de biotransformação dos fármacos estudados. Apesar da utilização de apenas uma condição de biotransformação durante todo o estudo, verificou-se que os fungos realizaram reações de oxidação em diferentes fármacos. Até o momento, não havia informações sobre o potencial desses fungos endofíticos em promover reações de biotransformação. Portanto, os dados aqui apresentados contribuem com conhecimentos adicionais para a obtenção de metabólitos de forma enantiosseletiva ou não e para a realização de reações estereosseletivas de moléculas de interesse.