UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras em estudos estereosseletivos de biotransformação e metabolismo in vitro

MARIANA ZUCCHERATO BOCATO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras em estudos estereosseletivos de biotransformação e metabolismo in vitro

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Mariana Zuccherato Bocato

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 09/09/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RIBEIRÃO PRETO - SP

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

Bocato, Mariana Zuccherato

Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras em estudos estereosseletivos de biotransformação e metabolismo in vitro

174 p.: il.; 30cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP — Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Aréa de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: De Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes

- 1. Técnicas miniaturizadas de preparação de amostras.
 - Análise enantiosseletiva.
 Biotransformação estereosseletiva empregano fungos
 - 4. Estudos de metabolismo in vitro

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Zuccherato Bocato

Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras em estudos estereosseletivos de biotransformação e metabolismo in vitro

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr	
	Assinatura:
Prof. Dr	
	Assinatura:
Prof. Dr	
	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Dedicatória

É com imensa gratidão e amor que dedico este trabalho aos meus pais: Jair e Marlene.

Pai, graças a você eu consegui concluir mais uma etapa da minha vida profissional, a você toda minha gratidão e respeito eternos.

Mãe, você é a peça fundamental da minha vida. Obrigada pela amizade, incentivo e dedicação.

Dedico também a meu querido irmão, Rodolfo.

Ao meu querido companheiro, Rodrigo: obrigada pelo carinho.

E, ao meu orientador: Anderson:

Obrigada, pela paciência e pelos ensinamentos de todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e mais uma vez a meus pais;

Ao professor Anderson por me aceitar mais uma vez em seu laboratório e por toda a orientação;

Agradeço à minha amiga Fernanda de Lima Moreira por todos os ensinamentos e ajuda durante o desenvolvimento do meu projeto;

Á Marcela Armelim Bortoleto pela paciência, amizade e auxílio;

Meu agradecimento, em especial, à professora Cristiane Mazetto de Gaitani por ceder espaço em seu laboratório e tornar possível a realização de etapas deste projeto;

Aos professores: Mônica T. Pupo e Niegi A.J.C. Furtado;

Ao técnico do LABMETS: Thiago Cavassani por todo seu auxílio;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelos auxílios na pesquisa e oportunidade de realização deste projeto;

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto;

As agências de fomento: CAPES pela bolsa de estudos e FAPESP pelo auxílio financeiro;

Aos demais colegas de laboratório pelo auxílio e companheirismo.

"Educação é uma descoberta progressiva de nossa própria ignorância." (Voltaire)

RESUMO

BOCATO, M. Z. Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras em estudos estereosseletivos de biotransformação e metabolismo in vitro. 2016. 174 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As técnicas de extração miniaturizadas são atualmente muito empregadas em diversos setores da química analítica por possuírem diversas vantagens, como por exemplo, a capacidade de extrair analitos a níveis de traços empregando quantidades mínimas ou nulas de solventes orgânicos, facilidade de automação e em algumas delas, rapidez no procedimento de extração. Novas metodologias com o intuito de produzir enantiômeros puros ou que possibilitem determinar o perfil metabólico estéreo- ou enantiosseletivo de fármacos comercializados como racematos são também bem promissoras, principalmente pela escassez de pesquisas científicas neste âmbito. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar as técnicas miniaturizadas de preparação de amostras, microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase liquida com membranas porosas e ocas (HF-LPME) e microextração liquido-liquido dispersiva (DLLME), na extração dos fármacos e seus metabólitos: oxcarbazepina (OXC) e tetrabenazina (TBZ) de matrizes complexas como o meio microssomal e meio de cultura liquido, para posterior aplicação em estudos estereosseletivos de metabolismo in vitro empregando microssomas hepático de humanos (HLMs) e biotransformação empregando fungos. Anteriormente aos estudos biotransformação e metabolismo in vitro, todos os métodos propostos foram validados e os resultados corroboraram de acordo com os quiais oficiais. Inicialmente foi desenvolvido um método para determinação simultânea da OXC e os enantiômeros de seu metabólito em meio de cultura empregando a eletroforese capilar. A separação foi realizada utilizando como eletrólito de análise uma mistura da β-ciclodextrina fosfatada (P-β-CD) 1% (m/v) como seletor quiral em solução tampão tris-fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 2,5. O comprimento efetivo do capilar foi 20 cm, a tensão aplicada foi de -20 kV e a temperatura de análise foi de 15° C. Para esse método, nenhuma técnica miniaturizada de preparação de amostra foi efetiva na extração desses analitos do meio de cultura. Portanto, optou-se por utilizar extração líquido-líquido empregando metil-terc-butil éter como solvente extrator. Os estudos de biotransformação demonstraram enantiosseletividade na formação da licarbazepina (LIC) a partir da OXC para duas espécies de fungos. A espécie Glomerella cingulata (VA1), biotransformou com 100% de fração enantiomérica (fe) o enantiômero (S)-(+)-LIC enquanto que a espécie Beuveria bassiana (ATCC 7159) metabolizou com fe de 79% o enantiômero (S)-(+)-LIC. Um outro método empregando a eletroforese capilar também foi desenvolvido neste trabalho. Este novo método foi empregado para a análise enantiosseletiva dos metabólitos da diHTBZ após o procedimento de metabolismo in vitro empregando microssomas hepático de humanos para o fármaco TBZ e também foi utilizado para análise dos metabólitos diHTBZ após o procedimento de biotransformação da TBZ empregando fungos. Neste método de EC foi utilizada como eletrólito de análise a

carboximetil-β-ciclodextrina (CM-β-CD) 1% (m/v) como seletor quiral adicionada em solução tampão tris-fosfato 80 mmol L-1 pH 2,5. O comprimento efetivo do capilar correspondeu a 20 cm e a tensão aplicada foi de +15 kV. A temperatura de análise foi de 15° C. Entre as técnicas miniaturizadas de preparação de amostras avaliadas para extração destes metabólitos diHTBZ tanto em meio microssomal quanto em meio de cultura líquido, a DLLME foi escolhida. Para tanto, utilizando a matriz de meio microssomal (para aplicação dos estudos de metabolismo in vitro da TBZ) foi empregado 75 µL de diclorometano como solvente extrator e 150 µL de acetona como solvente dispersor. Os estudos de metabolismo in vitro demonstraram que o perfil cinético do metabolismo da TBZ corresponde a um comportamento de inibição pelo substrato e trata-se de um metabolismo diastereoe enantiosseletivo. Estes estudos também demonstraram que os enantiômeros dos diastereoisômeros diHTBZ foram catalisados principalmente pela CYP2C19 e o clearance predito sugere que o metabolismo pelo fígado é a principal via para a eliminação da TBZ. Já, nos estudos de biotransformação com fungos para a TBZ, o método por CE foi utilizado e, assim como para o meio microssomal, as técnicas de microextração foram avaliadas. Novamente, foi escolhida a técnica DLLME como técnica de extração, e também foi utilizado 75 µL de diclorometano como solvente extrator e 150 µL de acetona como solvente dispersor. Os estudos preliminares de biotransformação da TBZ demonstraram diastereoisomerismo para todos os fungos avaliados, e, adicionalmente, para algumas espécies de fungos, houve também enantiosseletividade na formação dos isômeros. O fungo Chaetomiun globusum (VR10) metabolizou ambos isômeros da diHTBZ, sendo que a produção dos metabólitos foi diastereosseletiva para a formação majoritária do estereoisômero trans-diHTBZ e enantiosseletividade somente na produção do estereoisômero cis-diHTBZ. As espécies Glomerella cingulata (VA1), Mucor rouxii, e Beuveria bassiana (ATCC 7159), metabolizaram diastereoisomericamente e também enantiosseletivamente ambos metabólitos da diHTBZ, sendo que o fungo da espécie Mucor rouxii apresentou um perfil de metabolização bem interessante, com a formação majoritária dos enantiômeros (E1) dos diastereoisômeros cis- e trans- e formação majoritária do metabólito trans-diHTBZ. Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que somente a DLLME foi efetiva na extração da TBZ em meio microssomal e em meio de cultura. Para analitos com características bastante básicas, como é o caso da OXC, as demais técnicas de microextração avaliadas não foram eficientes nas condições de análise empregadas nesse estudo devido principalmente à dificuldade de manter estes analitos na forma molecular. Porém, a importância deste trabalho recai sobre os resultados obtidos a partir da aplicação dos estudos estereosseletivos de biotransformação com fungos de ambos os fármacos e, principalmente, nos resultados obtidos do metabolismo in vitro da TBZ que corroboram com dados in vivo da literatura e traz novas informações a respeito do metabolismo deste fármaco.

Palavras-chave: Técnicas de microextração; Estudos enantiosseletivos de metabolismo in vitro

ABSTRACT

BOCATO, M. Z. Evaluation of miniaturized sample preparation techniques in enantioselective biotransformation and in vitro metabolism studies. 2016. 174 pages. PhD Thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2016.

Nowadays miniaturized extraction techniques are widely used in many sectors of analytical chemistry because they present several advantages such as: the ability to extract analytes in levels of trace employing minimal or none amounts of organic solvents; facility of automation and speed in the extraction procedure. New methodologies with the aim of producing pure enantiomers of drugs marketed as racemates are also very promising. In this context, this study aimed to evaluate the miniaturized sample preparation techniques, Solid Phase Microextraction (SPME), Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME) and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) in extraction of drugs and their metabolites: oxcarbazepine (OXC) and tetrabenazine (TBZ) from complex matrices such as microsomal medium and liquid culture medium for subsequent application in stereoselective in vitro metabolism using human liver microsomes (HLMs) and in biotransformation studies employing fungi as catalytic agent. Prior to the biotransformation and the in vitro metabolism studies, all the proposed methods were validated and the results were in agreement with the official guidelines. Initially, an enantioselective capillary electrophoresis method was developed for the simultaneous determination of OXC and its metabolites in liquid culture medium. The chiral separation was carried out using phosphated β-cyclodextrin (Pβ-CD) 1% (w/v) as the chiral selector in tris-phosphate 10 mmol L⁻¹ pH 2.5 buffer solution. The effective length of the capillary was 20 cm, the applied voltage was -20 kV and the temperature of analysis was 15 °C. For this method, no miniaturized sample preparation technique was effective in extracting these

analytes from the culture medium. Therefore, liquid-liquid extraction using methyl tert-butyl ether as solvent extractor as employed. The biotransformation studies showed enantioselectivity in the formation of licarbazepine (LIC) by two fungus species. The specie Glomerella cingulata (VA1) biotransformed OXC with 100% of enantiomeric fraction (EF) for the (S)-(+)-LIC enantiomer while the fungus Beuveria bassiana (ATCC 7159) metabolized with EF of 79% for the (S)-(+)-LIC enantiomer. Next, another method by capillary electrophoresis was also developed in this work. This new method was employed for the enantioselective analysis of diHTBZ metabolites after in vitro microsomal metabolism of the drug TBZ. Additionally, this method was used to analyze the diHTBZ metabolites after TBZ biotransformation by fungi. The chiral separation of diHTBZ metabolites was performed by using carboxymethyl-β-cyclodextrin (CM-β-CD) 1% (w/v) as the chiral selector added to tris-phosphate buffer solution 80 mmol L⁻¹ pH 2.5. The effective length of the capillary was 20 cm and the applied voltage was +15 kV. The analysis temperature was 15 °C. Among the miniaturized sample preparation techniques evaluated for the extraction of diHTBZ metabolites from both matrices, human liver microsomal and in liquid culture medium, DLLME showed to be the most adequate. Therefore, using microsomal medium as matrix 75 µL dichloromethane as solvent extractor and 150 µL acetone as disperser solvent was used. The in vitro metabolism of TBZ showed a kinetic profile of inhibition by substrate and demonstrated a diastereoand enantioselective metabolism. These studies showed also that the enantiomers of the diastereomers of the diHTBZ were catalyzed mainly by CYP2C19 and the predicted clearance suggests that the metabolism by the liver is the major pathway for the elimination of TBZ. For the last, for fungal biotransformation studies with TBZ, 75 µL was used as extracting solvent of dichloromethane and 150 µL acetone as solvent disperser for the DDLME procedure. Preliminary biotransformation studies TBZ demonstrated a diastereoisomerism for all evaluated fungi, and additionally for some species of fungi, showed enantioselectivity in the formation of isomers. The fungus Chaetomiun globusum (VR10) metabolized both isomers of diHTBZ, and the production of metabolites was diastereoselective with majority formation of the trans-stereoisomer diHTBZ and enantioselectivity only in the production of cis-stereoisomer diHTBZ. The species Glomerella cingulata (VA1), Mucor rouxii, and Beuveria bassiana (ATCC 7159), metabolized diastereomerically and also enantiosselectively both metabolites of diHTBZ. The fungus *Mucor rouxii* showed an interesting biotransformation profile, with the majority training enantiomers (E1) of cis- and trans- diastereoisomers and majority formation of trans-diHTBZ metabolite. The results presented in this study showed that only DLLME was effective in extracting the TBZ from microsomal and liquid culture medium. For analytes with very basic features such as the OXC, the other evaluated microextraction techniques were not effective under the conditions

employed in this study due mainly to the difficulty of keeping these analytes in the molecular form.

Keywords: Microextraction techniques; Enantioselective in vitro metabolism studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Tipos de configurações das fibras empregadas em SPME	4
Figura 2 –	Sistema empregado em nossos estudos e baseado na configuração desenvolvido por Magalhães e Bonato, 2008	12
Figura 3 –	Estruturas químicas da OXC e seu metabólito quiral Lic. a) OXC, b) (S)-(+)-LIC e c) (R)-(-)-LIC	19
Figura 4 –	Estruturas químicas da TBZ e seus metabólitos <i>cis</i> - e <i>trans</i> -diHTBZ	21
Figura 5 –	Comparação da eficiência analítica típicas de CLAE e EC	28
Figura 6 –	Tipos e especificações das ciclodextrinas nativas	29
Figura 7 –		

	80:10:10 (v/v/v) + 2% de HAc e uma vazão de 1 mL min ⁻¹ . 1) LIC (E1); 2) LIC (E2) e 3) OXC. Rs $_{1 e 2}$ =1,96; Rs $_{2 e 3}$ = 1,68	59
Figura 8 –	Separação da OXC e dos enantiômeros da LIC por eletroforese capilar empregando dois tipos de CDs. Capilar de sílica de 40 cm de comprimento efetivo, 75 μm de d.i. solução tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ pH 2,5 e temperatura de 20°C para ambas CD utilizadas; A) 1% de P-β-CD; tensão aplicada: –15 kV; B) 10 mmol L ⁻¹ de CM-β-CD; tensão aplicada:15 kV	60
Figura 9 –	Separação da OXC e dos enantiômeros da LIC por eletroforese capilar. Capilar de sílica de 20 cm de comprimento efetivo, 75 μ m de d.i.; tensão aplicada: –20 kV; temperatura de análise 15°C; solução tampão tris-fosfato 10 mmol L ⁻¹ , pH 2,5 + 1% β -CD-fosfatada sódica; detecção em 215 nm. 1) OXC; 2) (<i>S</i>)-(+)-LIC e3) (<i>R</i>)-(-)-LIC. Rs _{1 e 2} =2,34 ; Rs _{2 e 3} = 1,88	64
Figura 10 –	Efeito do pH na recuperação da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio de cultura líquido Czapek. Extração realizada por 45 minutos a 25°C com agitação de 900 rpm. Volume da matriz: 2 mL meio de cultura e 2 mL tampão fosfato (pH variado) 0,25 mol L^{-1} + 20% NaCl (m/v). Dessorção na fase móvel hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, $v/v/v$) + 2% HAc a 25°C por 5 minutos. Concentração 25 µg mL $^{-1}$ de cada analito. $n = 3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	67
Figura 11 –	Efeito da adição de NaCl na recuperação da OXC e dos enantiômeros de seu metabólito LIC em meio de cultura líquido Czapek. Extração por 45 minutos a 25°C e agitação de 900 rpm. Volume da matriz: 2 mL meio de cultura e 2 mL solução tampão fosfato pH 7,0, 0,25 mol L ⁻¹ . Dessorção em fase móvel: hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, $v/v/v$) + 2% HAc a 25°C por 5 minutos. Concentração 25 μ g mL ⁻¹ de cada analito. $n = 3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	68
Figura 12 –	Efeito da agitação na recuperação da OXC e dos enantiômeros de seu metabólito LIC em meio de cultura líquido Czapek. Extração por 45 minutos a 25°C. Volume da matriz: 2 mL meio de cultura e 2 mL tampão fosfato (pH 7,0), 0,25 mol L ⁻¹ + 20% NaCl (m/v) . Dessorção na fase móvel hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, $v/v/v$) + 2% HAc a 25°C por 5 minutos. Concentração 25 μ g mL ⁻¹ de cada analito. $n = 3$	69
Figura 13 –	Efeito do tempo de extração na recuperação da OXC e dos enantiômeros de seu metabólito LIC em meio de cultura líquido	O o

	Czapek. Extração a 25°C com agitação a 900 rpm. Volume de matriz: 2 mL meio de cultura e 2 mL solução tampão fosfato (pH 7,0), 0,25 mol L ⁻¹ + 20% NaCl (m/v). Dessorção na fase móvel: hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, $v/v/v$) + 2% HAc por 5 minutos. Concentração 25 µg mL ⁻¹ de cada analito. $n = 3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.	70
Figura 14 –	Efeito do volume de matriz na recuperação da OXC e dos enantiômeros de seu metabólito LIC em meio de cultura líquido Czapek. Extração por 30 minutos a 25°C com agitação a 900 rpm. Meio de cultura (quantidade variada) completando-se com solução tampão fosfato (pH 7,0) 0,25 mol L ⁻¹ (em um volume final de 4 mL) + 20% NaCl (m/v). Dessorção na fase móvel: hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, $v/v/v$) + 2% HAc a 25°C por 5 minutos. Concentração 25 μ g mL ⁻¹ de cada analito. $n = 3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a	
Figura 15 –	eluir Efeito do solvente dispersor na recuperação da OXC e dos enantiômeros da LIC de meio de cultura. Temperatura de extração 25°C. Volume da matriz: 2 mL do meio de cultura e 2 mL de NaOH 100 mmol L^{-1} (pH final superior a 13,0). 50 μ L de solvente extrator clorofórmio e 500 μ L de cada solvente dispersor. $n=3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a	71 74
Figura 16 –	eluir Efeito do solvente extrator na recuperação da OXC e dos enantiômeros da LIC de meio cultura Czapek. Volume da matriz: 2 mL de meio de cultura, 2 mL de NaOH 100 mmol L ⁻¹ , 500 μ L de solvente dispersor acetona e 50 μ L de cada solvente extrator. Extração em 25°C. $n = 3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a	75
Figura 17 –	eluir Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio cultura. Volume da matriz: meio de cultura 2 mL e 2 mL de NaOH 100 mmol L ⁻¹ . Volume de solvente dispersor variável e 50 µL de solvente extrator (clorofórmio). Temperatura de extração a 25°C, $n = 3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a	76
Figura 18 –	eluir Efeito do volume de solvente extrator na recuperação da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio cultura. Volumeda matriz: meio de cultura 2 mL crescido de 2 mL de NaOH 100 mmol L^{-1} , volume de solvente dispersor 600 μ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. $n=3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a	77
Figura19 –	eluir Estrutura guímica da risperidona, padrão interno utilizado na	

Figura 20 –	validação do método	79
Figura 21 –	produziu nenhum metabólito secundário no mesmo tempo de migração dos analitos. (B). Eletroferograma representativo no tempo t=0 h de incubação (C). (1) Padrão Interno; (2) OXC; (3) (S)-(+)-LIC	83
	incubado com o fungo <i>Beuveria bassiana</i> mostrando que o fungo não produziu nenhum metabólito secundário no mesmo tempo de incubação dos analitos. (B). Eletroferograma representativo no tempo t=0 h de incubação (C). (1) Padrão Interno; (2) OXC; (3) (S)-(+)-LIC e (4) (R)-(-)-	84
Figura 22 –	LIC Eletroferograma correspondente a separação dos metabólitos diHTBZ, picos 1 e 2 correspondem aos enantiômeros da <i>trans</i> -diHTBZ e picos 3 e 4 correspondem aos enantiômeros da <i>cis</i> -diHTBZ	107
Figura 23 –	Melhor condição cromatográfica obtida na separação da TBZ. 1) TBZ (E1) e 2) TBZ (E2). Coluna Chiralcel OJ, fase móvel: metanol: isopropanol (90:10, v/v), vazão de 0,5 mL min ⁻¹ e temperatura de 25°C.	108
Figura 24 –	Efeito do solvente dispersor na extração dos enantiômeros do metabólito diHTBZ em meio microssomal. Temperatura de extração 25°C. Volume da matriz: 200 μL do meio microssomal, 800 μL de solução tampão fosfato pH 12, concentração 500 mmol L ⁻¹ . Solvente extrator: clorofórmio (50 μL). Solvente dispersor: 100 μL de cada solvente dispersor. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a	110
Figura 25 –	migrar Efeito do tipo de solvente extrator na recuperação dos enantiômeros da diHTBZ em meio microssomal. Volume da matriz: 200 μL do meio microssomal, 800 μL de solução tampão fosfato pH 12, 500 mmol L ⁻¹ . Solvente dispersor: acetona (100 μL) e 50 μL de cada solvente extrator. Extração em 25°C. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a	
Figura 26 –	migrar Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos enantiômeros da diHTBZ em meio microssomal. Volume da matriz: 200 μL do meio microssomal, 800 μL de solução tampão fosfato pH 12, 500 mmol L ⁻¹ . Volume de solvente dispersor variável e 50 μL de solvente extrator (diclorometano).	111

	a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar	112
Figura 27 –	Efeito do volume de solvente extrator na recuperação dos enantiômeros da diHTBZ em meio microssomal. Volume da matriz: 200 μL do meio microssomal, 800 μL de solução tampão fosfato pH 12, 500 mmol L ⁻¹ , volume de solvente dispersor 150 μL e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar.	
Figura 28 –	A) Eletroferograma representativo da análise dos enantiômeros do diHTBZ após a otimização da DLLME. Os picos 1) e 2) representam os enantiômeros do padrão interno (PI); 3) e 4) representam os enantiômeros <i>trans</i> -diHTBZ, 5) e 6) representam os enantiômeros <i>cis</i> -diHTBZ. B) Eletroferograma do branco de meio microssomal após DLLME. Condições de análise descrita na Figura 23. Condições de extração: solvente extrator: diclorometano (75 μL); solvente dispersor: acetona (150μL); agitação no vórtex por 10 s após a formação do ponto	
Figura 29 –	nuvem Efeito da variação da quantidade de proteínas na formação da diHTBZ. Concentrações do <i>rac-</i> TBZ utilizadas nos gráficos 6,15 μΜ. 1) os gráficos correspondentes à formação do enantiômero <i>trans-</i> diHtBZ (E1), 2) ao enantiômero <i>trans-</i> diHTBZ (E2) e 3) ao enantiômero <i>cis-</i> diHTBZ (E1). Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Tempo de incubação 30 min. Equações das retas estão demonstradas abaixo de cada gráfico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata	
Figura 30 –	Efeito da variação do tempo de incubação na produção de diHTBZ. Concentração de <i>rac</i> -TBZ 6,15 μM. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Concentração de proteínas microssomais de 0,5 mg mL ⁻¹ . sendo 1) o gráfico correspondente à formação do enantiômero <i>trans</i> -diHtBZ (E1), 2) ao enantiômero <i>trans</i> -diHTBZ (E2) e 3) ao enantiômero <i>cis</i> -diHTBZ (E1). Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Tempo de incubação variável. Equações das retas estão demonstradas abaixo de cada gráfico. Todos os experimentos foram realizados em	
Figura 31 –	triplicata Perfil cinético das enzimas microssomais frente à <i>rac</i> -TBZ obtido pelo monitoramento da formação da <i>trans</i> -diHTBZ (E1).	,

Temperatura de extração em 25°C. E1 = primeiro enantiômero

	Gráfico de inibição pelo substrato e gráfico de Eadie-Hofstee (gráfico menor). As condições de metabolismo foram descritas na seção 3.2.4.	121
Figura 32 –		122
Figura 33 –	Perfil cinético das enzimas microssomais frente à <i>rac</i> -TBZ obtido pelo monitoramento da formação da <i>cis</i> -diHTBZ (E1). Gráfico de inibição pelo substrato e gráfico de Eadie-Hofstee (gráfico menor). As condições de metabolismo foram descritas na seção 3.2.4.	122
Figura 34 –	A) Eletroferograma representativo para análise dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ após metabolismo da TBZ por microssomas hepáticos de humanos. PI = Padrão interno. 1) trans-diHTBZ(E1) 2) trans-diHTBZ(E2) e 3) cisdiHTBZ(E1). B) Eletroferograma do branco de microssoma humano. Condições de extração descrita na Figura 29. Condições de análise descrita na Figura	124
Figura 35 –	23	129
Figura 36 –	humanos	129
Figura 37 –	humanos Efeito da inibição das principais isoformas da CYP com inibidores químicos seletivos sobre o metabolismo da TBZ, monitorado pela formação de <i>cis</i> -diHTBZ (E1) em microssomas hepático	130
Figura 38 –	humanos Enzimas envolvidas na rota de eliminação da TBZ pelo	131
Figura 39 –	fígado Efeito do solvente dispersor na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura liquido Czapek. Temperatura de extração 25°C. Volume da matriz: 1 mL do meio de cultura e 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L-1	

(pH 7,0). 50 μ L de solvente extrator clorofórmio e 200 μ L de cada solvente dispersor. $n=3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	147
Efeito do solvente extrator na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio cultura liquido Czapek. Volume da matriz: 1 mL de meio de cultura, 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L^{-1} (pH 7,0), 200 μ L de solvente dispersor acetona e 50 μ L de cada solvente extrator. Extração em 25°C. $n=3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	148
Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos da diHTBZ em meio cultura liquido Czapek. Volume da matriz: meio de cultura 1 mL e 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L^{-1} (pH 7,0). Volume de solvente dispersor variável e 50 μ L de solvente extrator (diclorometano). Temperatura de extração a 25°C, $n=3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	149
Efeito do volume de solvente extrator na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio cultura de cultura liquido Czapek. Volume da matriz: meio de cultura 1 mL crescido de 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L^{-1} (pH 7,0) volume de solvente dispersor 150 μ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. $n=3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	150
Efeito da concentração da solução tampão na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio cultura de cultura liquido Czapek. Volume da matriz: meio de cultura 1 mL crescido de 1 mL de solução tampão, concentração variável (mmol L ⁻¹ em pH 7,0) volume de solvente dispersor 150 μ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. $n = 3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	151
Efeito do pH da solução tampão na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio cultura de cultura liquido Czapek. Volume da matriz: meio de cultura 1 mL crescido de 1 mL de solução tampão, concentração 250 mmol L^{-1} em pH variável. Volume de solvente dispersor 150 μ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. $n = 3$. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	152
	cada solvente dispersor. <i>n</i> =3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir. Efeito do solvente extrator na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio cultura liquido Czapek. Volume da matriz: 1 mL de meio de cultura, 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L¹¹ (pH 7,0), 200 μL de solvente dispersor acetona e 50 μL de cada solvente extrator. Extração em 25°C. <i>n</i> = 3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos da diHTBZ em meio cultura liquido Czapek. Volume da matriz: meio de cultura 1 mL e 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L¹ (pH 7,0). Volume de solvente dispersor variável e 50 μL de solvente extrator (diclorometano). Temperatura de extração a 25°C, <i>n</i> = 3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir Efeito do volume de solvente extrator na recuperação dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio cultura 1 mL crescido de 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L¹ (pH 7,0) volume de solvente dispersor 150 μL e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. <i>n</i> = 3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir

Figura 45 –	A) Eletrorerograma representativo para analise dos	
	enantiômeros da diHTBZ após a otimização do procedimento	
	de DLLME em meio de cultura liquido Czapek. Condições de	
	análise: solução tampão tris-fosfato (pH 2,5) 80 mmol L ⁻¹	
	contendo CM-β-CD 1% (m/v) e 20 cm de comprimento efetivo	
	do capilar. A temperatura e tensão capilar foram mantidas	
	constantes a +15 kV e 15°C, respectivamente. As amostras	
	foram injetadas por injeção hidrodinâmica aplicando uma	
	pressão de 0,5 psi por x8 segundos.(1) e (2) Enantiômeros do	
	P.I. (3) trans-diHTBZ(E1); (4) trans-diHTBZ(E2); (5) cis-	
	diHTBZ(E1) e (6) cis-diHTBZ(E2). B) Branco do meio de cultura	
	Czapek nas mesmas condições eletroforéticas	153
Figura 46 –	Eletroferograma representativo após a biotransformação da	
	TBZ com o fungo Cunninghamella elegans (ATCC 8688A) após	
	240 h de incubação. (A) Eletroferograma representativo no	
	tempo 240 hs de incubação (B) Eletroferograma representativo	
	do meio Czapek (controle) incubado com a espécie do fungo	
	também no tempo 240 hs mostrando que o fungo não produziu	
	nenhum metabólito secundário no mesmo tempo de migração	
	dos analitos (1) trans-diHTBZ(E1); (2) trans-diHTBZ(E2); (3) cis-	
	diHTBZ(E1) e (4) cis-diHTBZ(E2)	160
Figura 47 –	Eletroferograma representativo após a biotransformação da	
	TBZ com o fungo Chaetomiun globosum (VR10) após 240 h de	
	incubação. (A) Eletroferograma representativo no tempo 240 hs	
	de incubação (B) Eletroferograma representativo do meio	
	Czapek (controle) incubado com a espécie do fungo também no	
	tempo 240 hs mostrando que o fungo não produziu nenhum	
	metabólito secundário no mesmo tempo de migração dos	
	analitos (1) trans-diHTBZ(E1); (2) trans-diHTBZ(E2); (3) cis-	
	diHTBZ(E1) e (4) cis-	161
	diHTBZ(E2)	

Figura 48 – Eletroferograma representativo após a biotransformação da TBZ com o fungo *Beuveria bassiana* (ATCC 7159) após 240 h de incubação. (A) Eletroferograma representativo no tempo 240 hs de incubação (B) Eletroferograma representativo do meio Czapek (controle) incubado com a espécie do fungo também no tempo 240 hs mostrando que o fungo não produziu nenhum metabólito secundário no mesmo tempo de migração dos analitos (1) trans-diHTBZ(E1); (2) trans-diHTBZ(E2) e (3) cisdiHTBZ(E1). Os outros picos de possíveis metabólitos ou

	identificados	endogenos	nao	toram	161
Figura 49 –	TBZ com o fungo Eletroferograma r (B) Eletroferogrami incubado com a mostrando que secundário no m trans-diHTBZ(E1) (4)	representativo após o Mucor rouxii após 2 representativo no tempo a representativo do espécie do fungo taro o fungo não producesmo tempo de migo; (2) trans-diHTBZ(E2)	240 h de incu co 240 hs de meio Czapek nbém no tem ziu nenhum gração dos a 2); (3) cis-diH	bação. (A) incubação c (controle) po 240 hs metabólito inalitos (1) TBZ(E1) e cis-	162
	UI□ I D∠(E∠)				

Tabela 1 –	Exemplos de fases estacionárias baseadas em polissacarídeos	25
Tabela 2 –	Estudos de biotransformação enantiosseletiva empregando fungos	35
Tabela 3 –	Limite de quantificação e linearidade do método meio de cultura líquido Czapek para validação da OXC e LIC	80
Tabela 4 –	Precisão e exatidão intraensaio para análise da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio de cultura líquido	81
Tabela 5 –	Precisão e exatidão interensaio para análise da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio de cultura líquido	81
Tabela 6 –	Ensaio de estabilidade para análise da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio de cultura líquido	82
Tabela 7 – Tabela 8 –	Excesso enantiomérico obtido para cada espécie de fungo Linearidade do método desenvolvido para análise da trans-	84
Tabela 9 –	diHTBZ e da cis-diHTBZ em meio microssomal Precisão e exatidão intraensaio para o método desenvolvido para	115
Tabela 10 –	análise da trans-diHTBZ e da cis-diHTBZ em meio microssomal Precisão e exatidão interensaio para o método desenvolvido para	115
Tabela 11 –	análise da trans-diHTBZ e da cis-diHTBZ em meio microssomal Estabilidade da trans-diHTBZ e da cis-diHTBZ em meio	116
Tabela 12 –	microssomal Parâmetros enzimáticos obtidos para cada enantiômero dos	117
Tabela 13 –	metabólitos da TBZParâmetros farmacocinéticos preditos para a TBZ calculados a	124
	partir dos dados obtidos monitorando-se os enantiômeros da diHTBZ no estudo de metabolismo in vitro com microssomas hepáticos humanos	127
Tabela 14 –	Limite de quantificação e linearidade do método para análise dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura	
Tabela 15 –	líquido Precisão e exatidão intraensaio para análise dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido	154 155
Tabela 16 –	Precisão e exatidão interensaio para análise dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido	156
Tabela 17 –	Ensaio de estabilidade para análise dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC "American Type Culture Collection"

CA Concentração alta CB Concentração baixa CBZ Carbamazepina

Ciclodextrina **CFS** Cromatografia de fluido supercrítico

CG Cromatografia gasosa

CLAE Cromatografia líquida de Alta Eficiência

Clearance in vivo C_L C_{LH} Clearance hepático Clearance intrínseco C_{Lint} CM Concentração média

CYP Citocromo

CD

d.i. Diâmetro interno

DiHTBZ Di idroxitetrabenazina

DLLME Microextração líquido-líquido dispersiva

DP Desvio padrão

DPR Desvio padrão relativo Ε Taxa de extração hepática

EC Eletroforese capilar

ECC Eletrocromatografia capilar Fe Fração enantiomérica

ΕM Espectrometria de massas "European Medice Agency" **EMA**

ER Erro relativo

FDA "Food and Drug Administration"

FEQ Fase estacionária quiral

 F_{livre} Fração de proteínas não ligadas

Fração livre do substrato na incubação microssomal f_{umic}

Fração livre do substrato no plasma f_{up}

GST Glutationa S-transferase

HF-LPME Microextração líquida empregando membranas cilíndricas ocas

HLMs Microssomas hepático de humanos IC₅₀ Medida da inibição do substrato

Ki Constante de dissociação no equilíbrio para a ligação do substrato no sítio

inibitório da enzima

K_m Constante de Michaelis-Menten

K_s Constante de associação

LC-MS Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LIC Licarbazepina

LLE Extração Líquido-líquido LQ Limite de quantificação \overline{M} Média da concentração

NADP nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NAT N-acetil transferase
OXC Oxcarbazepina
PA Poliacrilato

PDA Potato Dextrose Agar
PDMS Polidimetilsiloxano

PDMS-DVB Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno

Ph Produto hidrogeniônico

P.I. Padrão interno

PKa - log da constante de acidez

Rs Resolução

[S] Concentração do substrato SPE Extração em fase sólida

SPME Microextração em fase sólida

ST Sulfotransferase
TBZ Tetrabenazina
TEA Trietilamina

TFA Ácido trifluoroacético t_R Tempo de retenção

UGT Uridina difosfoglucuronosil transferase
VMAT2 Transportador vesicular monoamina

V_{máx} Velocidade inicial máxima

 V_0 Velocidade inicial V_0 Concentração inicial

SUMÁRIO

Resumo
Abstract
Lista de figuras
Lista de tabelas
Lista de abreviaturas e siglas

CAPÍTULO 1:

Revisão Bibliográfica

1. Preparo de amostras	2
1.1. Técnicas miniaturizadas de preparo de amostras	3
1.1.1. Microextração em fase sólida (SPME)	3
1.1.2. Microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME)	9
1.1.3. Microextração líquido-líquido dispersiva	13
2. Fármacos quirais	16
2.1. Fármacos selecionados para o projeto	17
2.1.1. Oxcarbazepina	17
2.1.2. Tetrabenazina	19
3. Análise enantiosseletiva	21
3.1. Análise enantiosseletiva por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	22
3.1.1. Fases estacionárias quirais em CLAE	24
3.2. Análise enantiosseletiva por Eletroforese Capilar (EC)	26
3.2.1. Ciclodextrinas	28
4. Estudos de Metabolismo in vitro	30
1 1 Microssomas henático	31

5. Bi	otransformação empre	egando fungos	
5.1. Bi	otransformação enant	iosseletiva empregando fungos	
6. Va	alidação de métodos p	ara análise em matrizes biológicas	
6.1. Li	nearidade		
6.2. Li	mite de quantificação		
6.3. Pr	ecisão		
6.4. Ex	catidão		
6.5. Es	stabilidade		
	CAPÍTULO 2:		
	<u>Biotransformação</u>	<u>estereosseletiva da Oxcarbazepina emprega</u>	ndo fungos
1. INT	RODUÇÃO		
2. OB	JETIVO		
2.1 . G	eral		
2.2 . Es	specífico		
3. M.	ATERIAIS E MÉTODO)S	
3.1. Ed	quipamentos de anális	e e acessórios gerais	
3.2. Re	eagentes e solvente u	tilizados na preparação das fases móveis e no	os procedimentos de
ех	tração		
3.3. Co	olunas quirais e proced	dimento de análise por CLAE	
3.4. So	oluções-padrão		
3.5. So	oluções-tampão		
		mento de análise por EC	
3.7. Pr	eparo dos meios de d	cultura: PDA, Malte e Czapek; fungos utilizados	s e procedimento de
bi	· otransformação		
	_		
3.10.			
3.11.		uido (LLE)	
3.12.		dos enantiômeros da LIC	
3.12.	Validação	da da	metodologia
J. 1J.	v aliuaçau	ua	metodologia

4.2. Cinética enzimática.....

32

	ana	alítica
4.	RE	SULTADOS E DISCUSSÃO
4.1	.Oti	mização das condições de separação da OXC e LIC por CLAE
4.2	. Oti	mização das condições de separação da OXC e LIC por EC
4.3	. Ava	aliação das técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na extração da OXC e
	LIC	em meio Czapek
4.3	3.1.	SPME
4.3	3.2.	HF-LPME
4.3	3.3.	DLLME
4.4	.Ext	ração líquido-líquido
4.5	.Val	idação da metodologia analítica para análise da OXC e enantiômeros da LIC em meio
	de	cultura Czapek
4.6	.Bio	transformação estereosseletiva da OXC empregando fungos
5.	CO	NCLUSÕES
		CAPÍTULO 3 Metabolismo in vitro da TBZ empregando microssomas hepático de humanos
1	INTR	RODUÇÃO
		IETIVO
		ral
		Decífico
	•	
		TERIAIS E METODOS
		TERIAIS E MÉTODOSuipamentos de análise e acessórios gerais
		uipamentos de análise e acessórios gerais
3.3		
		uipamentos de análise e acessórios geraisagentes e solventes utilizados na preparação das fases móveis, no preparo do meio
3.5	I. Pro	uipamentos de análise e acessórios geraisagentes e solventes utilizados na preparação das fases móveis, no preparo do meio crossomal e nos procedimentos de extração
		uipamentos de análise e acessórios geraisagentes e solventes utilizados na preparação das fases móveis, no preparo do meio crossomal e nos procedimentos de extração
	.Pre	uipamentos de análise e acessórios gerais
3.7	.Pre .Pro	uipamentos de análise e acessórios gerais
	i.Pre i.Pro i.SPI	uipamentos de análise e acessórios gerais

3.10.	Validação do	método	analítico						
3.11.	Procedimento	o de inci	ubação para o estu	ido de meta	abolismo in vitro.				
3.12.	Procedimento para determinação da cinética enzimática da TBZ								
3.13.	3. Determinação da ligação da proteína microssomal e plasmática								
3.14.	Extrapolação	in vitro-	in vivo (EIVIV)						
3.15.	Estudos	de	fenotipagem	com	inibidores	químicos	da		
C	′P								
4. RE	SULTADOS E	DISCU	SSÃO						
4.1. Ot	imização da se	paração	eletroforética dos	metabólito	s da TBZ				
4.2. Se	paração dos e	nantiôm	eros da TBZ por C	LAE					
4.3. Ot	imização da SF	PME e F	IF-LPME						
4.4. Ot	imização da DL	LME							
4.5. Va	lidação do mét	odo							
4.6. Me	etabolismo ena	ntiossel	etivo in vitro da TB	Z e determi	nação dos parâ	metros enzimáti	cos		
4.7. Li	gação às proteí	nas mic	rossomais e plasm	áticas					
4.8. Ex	trapolação in v	itro-in vi	ivo (EIVIV)						
4.9. De	eterminação da	as isofor	mas da CYP resp	onsáveis _l	pela produção o	dos enantiômer	os da		
dil	HTBZ								
5. CO	ONCLUSÕES								
	CAPÍTULO 4 Estudos pre		es de biotransfor	mação est	ereosseletiva c	da TBZ empre <u>c</u>	g <u>ando</u>		
	<u>fungos</u>								
	_								
2. OB	JETIVO								
2.1. Ge	eral								
			S						
3.1. Ed	uipamentos de	análise	e e acessórios gera	is					
3.2. Sc	luções-padrão	e reage	entes utilizados no	preparo da	s soluções tamp	ão e nas técnic	as de		

extração.....

137

3.3. Procedimento de análise por EC	138
3.4. Preparo dos meios de cultura: PDA, Malte e Czapek; fungos utilizados e prod	edimento de
biotransformação	138
3.5. SPME	141
3.6. HF-LPME	141
3.7. DLLME	142
3.8. Validação do método analítico	143
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	144
4.1. Separação dos metabólitos diHTBZ por EC	144
4.2. Avaliação das técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na extraçã	o da diHTBZ
em meio líquido Czapek	144
4.2.1. SPME	144
4.2.2. HF-LPME	145
4.2.3. DLLME	146
4.3. Validação do método analítico para análise dos enantiômeros dos metabólitos	s diHTBZ em
meio de cultura líquido Czapek	153
4.4. Biotransformação estereosseletiva da TBZ empregando fungos	158
5. CONCLUSÃO	162
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Preparação de Amostras

Dentre as inúmeras técnicas de análises instrumentais existentes atualmente, poucas oferecem a possibilidade de inserção das matrizes que contêm os analitos de interesse diretamente no equipamento. Isso se deve ao fato da maioria das matrizes possuírem outros compostos que podem ocasionar danos às colunas cromatográficas, capilares, detectores e demais partes dos instrumentos analíticos. Como exemplo, a análise de fármacos e metabólitos provenientes de matrizes biológicas requer cuidados especiais para que a instrumentação analítica não seja deteriorada. Dessa forma, antes de inserir a amostra no equipamento de análise, empregam-se técnicas de preparação de amostras para que haja a redução ou eliminação de componentes endógenos, tais como proteínas, sais, gorduras ou outros compostos.

Há muitos anos, técnicas convencionais, como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração por fase sólida (SPE) têm sido extensivamente empregadas. Entretanto, com as tendências atuais de redução de solventes orgânicos responsáveis por desequilíbrios ambientais e também devido ao crescente interesse por técnicas passíveis de automação, algumas técnicas miniaturizadas de preparação de amostras vem sendo desenvolvidas (OCAÑA-GONZÁLEZ et al., 2016).

1.1. TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARO DE AMOSTRAS

As técnicas de preparação de amostras miniaturizadas vêm sendo empregadas com o intuito de reduzir o tempo de trabalho envolvido e o consumo de solventes orgânicos no processo de extração. Neste contexto, podemos citar três das inúmeras possibilidades de miniaturização de técnicas de preparação de amostras, as quais foram escolhidas para avaliação e realização deste projeto: a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Estas três técnicas foram escolhidas por serem bem distintas e por serem capazes de extrair os analitos de interesse empregando uma mínima quantidade ou nenhuma quantidade de solvente orgânico, obtendo-se elevados valores de fator de enriquecimento. Dessa forma, avaliá-las empregando matrizes complexas que contêm analitos e seus respectivos metabólitos pôde proporcionar a este trabalho uma discussão mais detalhada em termos de eficiência de uma técnica de microextração em relação às características físicoquímicas dos analitos de interesse e da complexidade da matriz. Além disso, estas técnicas estão sendo utilizadas em todos os setores da química analítica: análises ambientais, análises clínicas e biológicas, análises forenses e análises de alimentos (DE OLIVEIRA et al., 2008).

1.1.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

Introduzida no início de 1990, a SPME vem sendo evolutivamente muito empregada como técnica de extração, devido, principalmente, à sua

capacidade de limpeza da amostra e não empregar nenhum solvente orgânico no processo de extração e normalmente apresentar um tempo relativamente curto no processo quando empregamos dispositivos capazes de extrair várias amostras ao mesmo tempo. É uma técnica não-exaustiva, , portátil, apresenta uma grande variedade de polímeros extratores comercializados e com bom custo-benefício, além de fácil automação quando acoplada a cromatografia gasosa (CG) (SOUZA-SILVA et al., 2015).

Em SPME, a fase extratora corresponde a polímeros fabricados a partir de diversos tipos de compostos cujas características variam desde apolares a polares e que poderão ter afinidade por diversos analitos de propriedades físico-químicas distintas. Estes polímeros, na SPME, existem atualmente em diversas configurações como as configurações em fibras "fibers" que existem no formato suportado por um dispositivo de aço inoxidável e sílica fundida ou em formatos de agulhas hipodérmicas, "in-tip", que correspondem a filmes poliméricos recobrindo hélices; "in tube" (fases poliméricas preenchendo internamente capilares), "thin-film" (filme fino, que recobrem frascos ou quaisquer outros recipientes onde conterão as amostras) e "disk or membranes" (membranas ou discos recobertos por filmes poliméricos), (Figura 1), sendo passíveis de automação ou não (PAWLISZYN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2006).

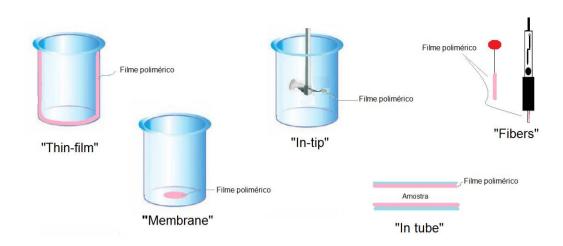


Figura 1 – Tipos de configurações das fibras empregadas em SPME. Fonte: Adaptado de Pawliszyn e Pedersen-Bjergaard, 2006.

Dentre as características da SPME se apresenta o fato de ser uma técnica não-exaustiva de extração o que a difere dos métodos convencionais como a SPE. A técnica se estabelece pelo princípio de equilíbrio de partição/adsorção entre os analitos presentes na matriz e na fibra. Por conseguinte, uma segunda etapa está envolvida na SPME, a dessorção. Nessa etapa os analitos presentes na fibra extratora são transferidos para um recipiente (vial) contendo alguns microlitros da fase móvel ou outro solvente adequado quando a análise é feita por cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) ou eletroforese capilar (EC), ou então, são termicamente removidos quando os analitos são analisados por CG (KUDLEJOVA; RISTICEVIC; VUCKOVIC, 2012).

A SPME é uma técnica muito versátil, aplicada à análise de compostos voláteis e não-voláteis. Além disso, a SPME pode ser feita por imersão direta ou por "headspace". No caso de analitos voláteis utiliza-se a técnica no modo denominado de "headspace", onde a fibra é inserida no frasco contendo a amostra, porém não entra em contato direto com a matriz. Nesse caso o frasco com a amostra é aquecido, os analitos de interesse são volatilizados e

extraídos pela fibra. Por outro lado, em caso de analitos não-voláteis, as fibras são inseridas no frasco da amostra e entram diretamente em contato com a matriz (imersão direta) e assim a extração tem início (KUDLEJOVA; RISTICEVIC; VUCKOVIC, 2012).

O processo de extração por SPME ocorre por adsorção/partição e é governado pela polaridade dos analitos. Portanto, polímeros polares terão maior afinidade em extrair analitos polares e polímeros apolares terão maior facilidade de extrair os analitos com características mais apolares. Outra característica peculiar da SPME é o fato da possibilidade de suas fibras serem reutilizáveis, melhorando, dessa forma, o custo-benefício do método (RISTECEVIC et al., 2010). Porém, uma desvantagem na reutilização das fibras é o efeito de memória (*carryover*) que pode ser detectado neste tipo de extração e, portanto, deve ser considerado no processo de otimização.

A extração dos analitos de interesse empregando a SPME pode ser otimizada através da avaliação de diversos parâmetros, como por exemplo, o tipo de polímero empregado; o tempo de extração; a agitação da amostra; o volume de amostra empregado; o pH e a força iônica da amostra; a temperatura de extração e também o solvente empregado na etapa de dessorção (RISTECEVIC et al., 2010). Aqui, estão descritos os parâmetros de otimização comuns ao emprego da SPME tanto por CG e CLAE, enfatizando o uso por CLAE, uma vez que é relativo a este trabalho.

O tipo de polímero das fibras extratoras que será empregado no procedimento de extração deve apresentar características físico-químicas similares às do analito. Como exemplos, as fibras comercializadas pela Supelco possuem fases extratoras à base de polímeros de polidimetilsiloxano

(PDMS), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), octadecilsilixano (C18), poliacrilato (PA), entre outras.

O tempo de extração corresponde ao tempo ótimo em que os analitos atingem o valor máximo de recuperação; quando o equilíbrio entre o analito na matriz e no polímero extrator é atingido. Entretanto, diversos fatores podem afetar este processo de equilíbrio, tais como: espessura da fibra utilizada, coeficiente de difusão do soluto, agitação e temperatura do sistema (SOUZA-SILVA et al., 2015).

A agitação do sistema promove um aumento na velocidade de transferência de massa da amostra para o polímero extrator, fazendo com que o analito atinja o equilíbrio mais rapidamente, e, portanto, promove uma diminuição do tempo de extração, além disso, a agitação tem a finalidade de diminuir a barreira estática formada pelos analitos e a fibra (KUDLEJOVA; RISTICEVIC; VUCKOVIC, 2012).

O pH da amostra deverá ser avaliado devido a dois fatores: a compatibilidade do pH empregado com o tipo de fibra utilizado (uma vez que o emprego das fibras em valores de pHs não adequados pode provocar a degradação das mesmas) e também devido às características dos analitos naquela condição, pois os analitos devem estar na sua forma neutra para que sejam eficientemente extraídos por SPME. Portanto, o conhecimento do valor do pKa de ácidos ou bases ionizáveis é muito importante nessa técnica de preparação de amostras.

A força iônica também influencia na extração dos analitos, pelo efeito "salting out". Nesse caso os analitos se tornam mais "disponíveis" no meio da matriz para serem extraídos pela fibra quando um eletrólito é adicionado. Esse

aumento na disponibilidade do analito ocorre porque as moléculas de água que estão solvatando os analitos passarão a solvatar o eletrólito adicionado (KUDLEJOVA; RISTICEVIC; VUCKOVIC, 2012) "liberando" assim os analitos para serem extraídos pelo polímero da SPME. Entretanto, um aumento muito significativo na concentração do eletrólito na matriz pode provocar uma diminuição da extração devido um aumento na viscosidade do sistema e também devido a formação de uma camada iônica ao redor do analito devido saturação do sistema (PSILLAKIS; KALOGERAKISI, 2003).

Por fim, um parâmetro menos avaliado no caso de SPME para analitos não-voláteis é a temperatura de extração. A temperatura influencia na extração aumentando a velocidade com que o sistema atinge o equilíbrio de extração. Em contrapartida, um aumento da temperatura também pode diminuir a constante de distribuição do analito entre a matriz e o polímero pois havendo um aumento de entropia pode acarretar em movimentos caóticos prejudiciais à transferência de massa dos analitos (RISTICEVIC et al., 2010).

A segunda etapa da SPME corresponde à etapa de dessorção. Nessa etapa pode ser otimizado o tempo de dessorção, o solvente empregado no procedimento da dessorção e o efeito memória (*carryover*). O solvente empregado no procedimento de dessorção dos analitos não deve degradar a fibra, deve ter polaridade suficiente para liberar os analitos da fibra, além de ser compatível com o sistema de análise. Quando possível, a dessorção deve ser feita na fase móvel para posterior injeção do extrato diretamente no sistema cromatográfico. O tempo de dessorção também deve ser otimizado. Ele corresponde ao tempo necessário para a solubilização do analito e, portanto, sua completa liberação do polímero extrator.

Por último e não menos importante, o efeito memória deve ser considerado e otimizado. Uma vez que as fibras são reutilizáveis é preciso garantir que todo analito retido na fibra no procedimento de extração tenha se liberado no processo de dessorção. Dessa forma, há uma diminuição dos erros causados por possíveis resíduos de analitos que não se desprenderam nesta etapa. Portanto, recomenda-se, se necessário, procedimentos de lavagem entre cada extração.

É importante destacar que a etapa da dessorção por SPME-CLAE pode ocorrer de dois modos distintos: o modo online e o offline. No modo "on-line" há uma interface ou módulo junto ao sistema cromatográfico. Neste modo, ao analitos são dessorvidos diretamente no equipamento e em seguida, a análise é realizada. Por outro lado, no modo "off-line", a dessorção é realizada fora do equipamento de análise em um frasco contendo alguns microlitros de um solvente apropriado o qual é posteriormente recolhido com uma microsseringa e analisado (KUDLEJOVA; RISTICEVIC; VUCKOVIC, 2012).

1.1.2. MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA EMPREGANDO MEMBRANAS CILÍNDRICAS OCAS (HF-LPME)

A microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME) surgiu poucos anos após a SPME. Mais especificamente, foi introduzida em 1999 quando Pedersen-Bjergaard e Rasmussen empregaram no processo de extração membranas capilares ocas, porosas e hidrofóbicas (geralmente constituídas de polipropileno variando em diâmetro interno, espessura e tamanhos de poros) em uma configuração em "U" suportadas por

microsseringas em suas extremidades (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999). Esta microtécnica surgiu com o intuito de solucionar problemas relacionados à grande quantidade de solventes orgânicos empregados em LLE e também evitar problemas relacionados ao efeito memória no emprego da SPME. O baixo custo das membranas utilizadas proporciona que, nesta técnica, as membranas sejam descartadas a cada extração, evitando assim o efeito memória.

A HF-LPME pode ser empregada em dois modos: no modo duas fases ou no modo três fases. A escolha entre esses modos se dará dependendo da característica físico-química do analito a ser extraído. O modo de três fases é empregado geralmente para analitos ionizáveis (ácidos ou bases) com log P superiores a 1,5; já, o modo de duas fases é recomendado para analitos não-ionizados e apolares (DE OLIVEIRA et al., 2008; LEE et al., 2008).

Para entender melhor a diferença entre esses modos de extração, os conceitos de fase doadora e fase aceptora devem estar bem definidos. A fase denominada doadora em HF-LPME corresponde à fase onde os analitos estão presentes. A fase aceptora corresponde à fase interna presente no lúmen da fibra que tem a função de reter os analitos; esta fase poderá ser aquosa ou orgânica, dependendo do modo utilizado.

No modo duas fases, o analito é extraído da fase doadora para o lúmen da membrana contendo um solvente orgânico imiscível em água. A extração ocorrerá por difusão de modo que o analito deve estar na forma neutra. Este mesmo solvente orgânico presente no lúmen da membrana é também imobilizado nos poros da membrana. Neste sistema de duas fases, o solvente

orgânico da fase aceptora, se compatível, poderá ser diretamente injetado nos equipamentos de EC, CLAE ou CG (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

No modo três fases, tanto a fase aceptora quanto a fase doadora são aquosas. A fase orgânica imiscível em água é aqui empregada nos poros da membrana com o intuito de formar uma barreira para que a fase aceptora e a doadora não entrem em contato entre si. Além disso, o analito também deverá ter polaridade compatível com o solvente orgânico para que sua difusão seja facilitada da fase doadora para a aceptora. Neste sistema, os analitos devem ser ionizáveis, e poderão ter caráter ácido ou básico. No caso de analitos de caráter básico, o pH da fase doadora deve ser ajustado para a faixa alcalina de modo que eles permaneçam neutros e sejam facilmente atraídos pela fase orgânica impregnada nos poros da membrana. Porém, a fase aceptora (presente no lúmen da membrana) deverá ter caráter ácido para que lá, os analitos sejam protonados e impedidos de retornar para o solvente orgânico. No caso de analitos ácidos, a fase doadora deverá ser ácida e a fase aceptora alcalina (RASMUSSEN: PEDDERSEN-BJERGARRD, 2004, DE OLIVEIRA et al., 2008). O volume de solventes orgânicos na HF-LPME é baixo e varia de acordo com as dimensões da fibra. Dentre as características destes solventes orgânicos podemos destacar: i) devem ser imiscíveis em água para que não se dispersem no meio; ii) devem ser pouco voláteis para que não haja perdas durante o procedimento da extração e, iii) devem ser compatíveis com a membrana e os analitos de interesse devem ser solúveis nele. Os solventes mais empregados, geralmente, são: 1-octanol, éter n-hexílico, acetato de dodecila e tolueno (DE OLIVEIRA et al., 2008).

A HF-LPME geralmente é empregada para analitos com caráter mais apolar, sendo que os analitos polares apresentam tendência de permanecer na fase doadora. Porém, para sanar este problema, analitos polares podem ser extraídos com o emprego de carreadores com caráter relativamente hidrofóbico, mas que possua solubilidade aceitável na fase doadora ou pela aplicação de uma diferença de potencial (extração por eletromembrana). Os carreadores terão a função de formar par-iônico com o analito de interesse, diminuindo sua polaridade e aumentando a sua afinidade para a fase orgânica presente nos poros da membrana e, portanto, favorecendo a extração (RASMUSSEN: PEDERSON-BJERGAARD, 2004). Já 0 emprego eletromembrana tem como princípio a migração de compostos carregados para o solvente durante a aplicação de uma diferença de potencial adequada. O solvente deve possuir uma polaridade adequada de forma que ele atinja uma condutividade elétrica suficiente para atrair os analitos (DE ALBUQUERQUE; BORTOLETO; DE OLIVEIRA, 2013).

A configuração da HF-LPME descrita por Rasmussen e Pedersen-Bjergaard com o formato em "U" suportadas por microsseringas foi adaptada, anos mais tarde, por Magalhães e Bonato (2008), que desenvolveram um sistema na qual a membrana é suportada por duas ponteiras de biologia molecular onde a fase aceptora é introduzida e retirada do interior do lúmen da fibra com o auxílio de uma microsseringa. Esse sistema permitiu a extração de diversas amostras ao mesmo tempo pois não era mais necessário o uso de pares de microsseringas na extração. Devido à facilidade e agilidade do processo, a configuração empregada neste trabalho foi baseada nos trabalhos de Magalhães e Bonato, 2008.



Figura 2 – Sistema empregado em nossos estudos e baseado na configuração desenvolvido por Magalhães e Bonato, 2008. Foto tirada em nosso laboratório de pesquisa no Departamento de Química da FFCLRP-USP

Outros parâmetros, além das características físico-químicas do analito, devem ser levados em consideração no processo de extração por HF-LPME, por exemplo: pH da fase doadora, força iônica, tipo e dimensões da membrana de polipropileno, tempo de extração, temperatura e agitação do sistema.

Os parâmetros força iônica, temperatura, tempo de extração, agitação do sistema e o pH da fase doadora seguem o mesmo raciocínio que os descritos na SPME. Porém, a otimização das dimensões da fibra poderá influenciar na seletividade no processo de extração, uma vez que membranas com poros maiores tendem a facilitar a passagem de outras moléculas que tenham afinidade pela fase aceptora para o dentro do lúmen da fibra e provocar possíveis interferências nas análises cromatográficas/eletroforéticas. Além disso, o aumento no comprimento da fibra leva a um aumento no tempo de extração (PSILLAKIS, KALOGERAKISIN, 2003).

1.1.3. MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)

A última técnica de microextração que será aqui discutida é a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME). Desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores, pode ser considerada uma miniaturização da extração líquido-líquido convencional. A DLLME é uma técnica muito simples, sendo a de maior facilidade no manuseio, entre as técnicas já discutidas anteriormente; apresenta excelente custo-benefício e é acessível a qualquer laboratório analítico. Além disso, é uma técnica muito versátil, pois sua condição para a extração do analito de interesse da matriz é que o analito apresente solubilidade na fase orgânica empregada e esteja na sua forma neutra. Para o emprego desta técnica são necessários poucos microlitros de solventes comuns em laboratório como os solventes clorados (diclorometano, dicloroetano e clorofórmio) sendo esses os solventes mais utilizados como extratores e também demais solventes orgânicos como: a acetona, acetonitrila, etanol, metanol e isopropanol que são empregados como solventes dispersantes, além também de uma microsseringa e uma centrífuga.

No procedimento de DLLME faz-se a injeção (com o uso de uma microsseringa) de poucos microlitros de uma mistura de um solvente orgânico extrator imiscível na matriz aquosa e outro solvente orgânico de solubilidade mista (solúvel tanto na matriz aquosa quanto no solvente extrator) e que tenha a capacidade de dispersar este solvente extrator na matriz que está presente em um tubo de ensaio cônico; sendo assim, denominado de solvente dispersante. Este volume de solventes é rapidamente injetado nessa amostra aquosa formando gotículas do solvente de extração dispersos nessa matriz, o que deixa a amostra turva (fenômeno conhecido como "ponto nuvem"). Este processo causa um aumento da área superficial entre o solvente extrator e a

matriz fazendo com que o equilíbrio seja alcançado rapidamente, possibilitando assim, uma extração eficiente do analito (REZAEE et al., 2006). Numa etapa posterior, centrifuga-se o tubo de ensaio, o que leva à sedimentação da fase extratora a qual é posteriormente coletada e analisada (REZAEE et al., 2010).

As vantagens dessa técnica consistem no baixo consumo de solventes orgânicos, o rápido tempo de extração e boa recuperação dos analitos.

Entre os parâmetros que podem ser avaliados na DLLME para otimização do processo de extração, os mais importantes são: tipos de solventes extratores e dispersantes, quantidades de solventes extratores e dispersantes, tempo de agitação (no caso de DLLME assistida), pH e volume da amostra.

O solvente extrator deve possuir um valor de densidade maior que o da água, pois assim é possível manter os analitos extraídos na fase sedimentada e coletá-los facilmente após o processo de centrifugação, além disso, deve ser capaz de extrair os analitos de interesse e serem insolúveis em água (REZAEE et al., 2006). Por outro lado, o solvente dispersante deve ser tanto solúvel no solvente extrator como também na fase aquosa a fim de possibilitar a transferência dos analitos para a fase orgânica.

Existe também um volume "ótimo" da mistura entre o solvente extrator e o dispersante, portanto, a mistura em volumes desses solventes deve ser considerada. Seus volumes implicarão diretamente na recuperação dos analitos de interesse. Volumes muito grandes de solvente extrator, se comparado ao volume de solvente dispersante, pode prejudicar a formação do ponto nuvem e, consequentemente, a recuperação dos analitos. Da mesma forma, volumes muito grandes de solvente dispersante leva a um prejuízo na

solubilidade dos analitos na fase extratora, prejudicando e diminuindo a extração (REZAEE et al., 2010).

Teoricamente, apenas o processo de dispersão ocasionado pelo ponto nuvem seria suficientemente necessário para promover uma boa recuperação dos analitos de interesse da matriz. Entretanto, estudos demonstraram que a agitação do sistema (DLLME assistida), pode promover uma melhor recuperação dos analitos. Atualmente, existem muitos tipos de DLLME assistida, porém, somente enfatizaremos a DLLME assistida por vórtex pois foi o tipo empregada neste estudo. Assim, a agitação do tubo de extração em em um agitador to tipo vórtex por alguns segundos logo após a formação do ponto nuvem, pode aumentar a recuperação dos analitos devido a uma melhora na transferência de massa da fase aquosa para orgânica.

2. FÁRMACOS QUIRAIS

Fármacos quirais são produtos com propriedades terapêuticas que apresentam um ou mais centros, eixos ou planos de assimetria, originando compostos que são denominados enantiômeros. Estes, por sua vez, são compostos que partilham de propriedades termodinâmicas similares, tais como: índice de refração, ponto de fusão, ponto de ebulição e solubilidade e que diferem quanto a sua estrutura tridimensional (são imagens especulares e não-sobreponíveis entre si) e com a interação com uma luz plano-polarizada (CREMASCO, 2013). Estas diferenças estruturais ou de interação, na maioria das vezes, são muito significativas, conferindo a um único enantiômero a atividade biológica desejada enquanto que a sua imagem especular poderá ser inativa, de menor atividade, apresentar efeitos colaterais indesejados ou até

mesmo elevada toxicidade (REMKO; REMKOVÁ; BROER, 2016). Como consequência, os enantiômeros de um fármaco podem demonstrar diferenças na atividade farmacológica, tanto ao que se refere à sua farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) ou à sua farmacodinâmica (interação com os sítios alvos de ação). Dessa forma, é de grande importância estudos individuais dos enantiômeros de um fármaco antes que este seja comercializado para que seja assegurado que as possíveis diferenças de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas estejam caracterizadas e bem estabelecidas (NATARAJAN; BASAK, 2011).

Entretanto. no Brasil, ainda não há exigências órgãos regulamentadores como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) quanto aos estudos relacionados aos enantiômeros individuais de um fármaco. Em outros países há uma grande preocupação de órgãos regulamentadores no controle de qualidade de fármacos quirais. O FDA ("Food and Drug Administration"), por exemplo, exige estudos completos quanto ao perfil farmacológico e farmacocinético de enantiômeros individuais na concessão de novas patentes de misturas racêmicas desde meados de 1995. Nos EUA, esses estudos são muito importantes pois de 10 fármacos comercializados, 6 correspondem a enantiômeros puros, 2 aquirais e somente 2 comercializados como racematos (CREMASCO, 2013). Porém, estudar os enantiômeros individuais e suas propriedades farmacocinéticas exige técnicas analíticas de separação e quantificação de racematos que sejam eficientes e/ou também procedimentos complexos de sínteses orgânicas de enantiômeros puros, o que torna os estudos estereosseletivos altamente complexos e de alto custo (BARREIRO; FRAGA, 2008).

2.1. FÁRMACOS SELECIONADOS PARA O PROJETO

2.1.1. OXCARBAZEPINA

Um dos fármacos selecionados para este projeto foi a Oxcarbazepina (OXC) (Figura 3 A). A OXC é um medicamento aquiral empregado para o tratamento de convulsões ocasionadas por diversos fatores (LLOYD, 1994). Este fármaco é um análogo da carbamazepina (CBZ), diferindo apenas no grupo ceto localizado na posição-10 (SHORVON, 2000). Ambos os fármacos, OXC e CBZ são fármacos antiepilépticos enzima-indutores com capacidade de aumentar ou diminuir as concentrações séricas de lipídios em humanos (BRÄMSWIG et al., 2003; SCHWANINGER, 2000). A OXC tem sido relatada como sendo preferível à CBZ no que se refere ao seu efeito sobre os lipídios séricos em adultos, além de apresentar melhor tolerabilidade, farmacocinética mais favorável e um perfil metabólico melhor ao da CBZ (SCHMIDT, 2004). A grande diferença entre estes dois fármacos está no fato da OXC não ser metabolizada a um metabólito epóxido com propriedades tóxicas o qual é formado no metabolismo da CBZ (SHORVON, 2000). O metabolismo présistêmico da OXC é rápido e inclui uma reação de redução mediada pela enzima citosólica hepática aril cetona redutase, resultando na formação do 10-hidroxi-10,11-diidrocarbamazepina metabólito quiral (MAY; KORN-MERKER; RAMBECK, 2003). A OXC, portanto, atua como um pró-fármaco, pois de seu metabolismo origina a sua forma ativa que é responsável pelo efeito terapêutico (LLOYD, 1994). Este metabólito quiral formado também é conhecido como Licarbazepina (LIC) e possui um centro quiral na posição 10, coexistindo nas formas enantioméricas (S)-(+)- e (R)-(-)-LIC (Figura 3 a e b, respectivamente). Embora ambos enantiômeros apresentem efeitos

antiepilépticos similares (DE JESUS ANTUNES et al., 2013; FRENCH et al., 2014), o enantiômero (S)-LIC já é comercializado na forma de acetato, levando o nome de acetato de eslicarbazepina. Este fármaco foi desenvolvido e patenteado em meados dos anos 1990 por Bial (Portela e Co., S.A) (BENÉS; SOARES-DA-SILVA, 1998). Assim, rotas alternativas de obtenção do metabólito LIC na forma enantiomericamente pura tem se mostrado promissoras. Devido a este interesse e a dados escassos na literatura quanto a estudos enantiosseletivos de metabolismo empregando este fármaco, a OXC foi, então, um dos fármacos escolhidos para a realização, neste projeto, de estudos de biotransformação com fungos.

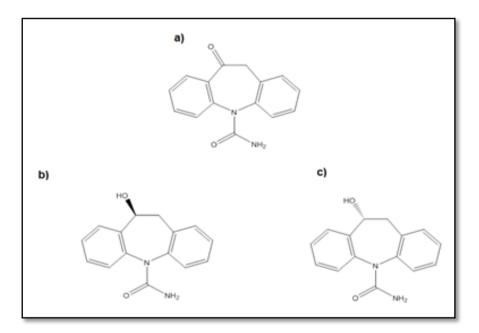


Figura 3 – Estruturas químicas da OXC e seu metabólito quiral Lic. a) OXC, b) (S)-(+)-LIC e c) (R)-(-)-LIC. Fonte: estruturas químicas baseadas no trabalho de ALVES et al., 2007.

2.1.2. TETRABENAZINA

A tetrabenazina (TBZ) é um fármaco reduto pamina que foi introduzido em 1970 para ser empregado para o tratamento de distúrbios de movimentos hipercinéticos (FASANO; BENTIVOGLIO, 2009). Recentemente,

esse fármaco mostrou eficácia como agente terapêutico para a doença de Huntington e vem sendo extensivamente utilizado para tratamento de pacientes que sofrem desta doença (FRANK, 2015). Além da redução das concentrações de dopamina, a TBZ atua através da inibição do transportador vesicular monoamina 2 (VMAT2) que é predominantemente expresso no cérebro (DERANGULA et al., 2013). A TBZ é comercializada na forma de mistura racêmica, coexistindo nas formas enantioméricas (+)-(R,R)- e (-)-(S,S)-, sendo que seus outros dois estereoisômeros possíveis são termodinamicamente instáveis (Mc GEAGH; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2011). Estudos in vivo têm demonstrado que seu metabolismo pré-sistêmico é rápido, promovendo uma redução no seu grupo 2-ceto, formando dois metabólitos quirais diidrotetrabenazina (diHTBZ), um na configuração cis- e o outro na configuração trans- resultando em quatro formas estereoisoméricas estáveis destes metabólitos: cis-(+)-(R,S,R)-diHTBZ, cis-(-)-(S,R,S)-diHTBZ, trans-(+)-(S,R,R)-diHTBZdiHTBZ e trans-(-)-(R,S,S)-diHTBZ (Mc GEAGH; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2011), ao passo que seus outros estereoisômeros possíveis são também. presumidamente, instáveis (apesar de existirem no metabolismo humano, possuem um tempo de meia-vida curto). A Figura 4 mostra as estruturas químicas da TBZ e seus metabólitos diHTBZ indicando seus centros quirais enquanto. A trans-diHTBZ é o metabólito majoritário da TBZ e acredita-se ser ele o responsável pela atividade do fármaco atuando através de uma potente redução de catecolamina por inibição reversível do transportador VMAT2, sendo que a ligação do metabólito à VMAT2 é estereoespecífica (KILBOURN et al., 1995). Portanto, pode-se afirmar que o metabolismo da TBZ pelo fígado humano influencia na atividade farmacológica final atingida devido à

dependência direta de biotransformação no metabolismo hepático da TBZ e a produção de metabólitos quirais mais ativos. Uma vez que há uma grande escassez de novas informações a respeito dos enantiômeros individuais dos estereoisômeros diHTBZ, estudos esrereosseletivos empregando a TBZ foram propostos neste trabalho de modo a fornecer uma visão mais detalhada sobre as potenciais diferenças na cinética enzimática da formação dos estereoisômeros da diHTBZ em microssomas hepático de humanos (HLMs) e também, através dos estudos de biotransformação empregando os fungos como agentes catalisadores que teve como objetivo prever a possibilidade de obtenção de enantiômeros puros dos metabólitos da TBZ.

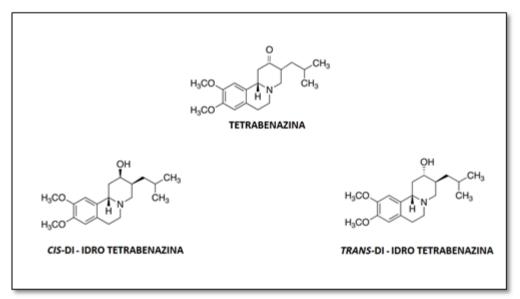


Figura 4 – Estruturas químicas da TBZ e seus metabólitos *cis*- e *trans*-diHTBZ, respectivamente.Fonte: estruturas químicas baseadas no trabalho de Mc GEAGH; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2011.

3. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA

A separação enantiosseletiva de compostos pode ser realizada através de diversas técnicas analíticas, dentre as quais podemos citar a Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Eletroforese Capilar (EC), Cromatografia com Fluido Supercrítico (CFS) e

Eletrocromatografia Capilar (ECC). Entretanto, a técnica mais empregada na separação enantiosseletiva é a cromatografia líquida de alta eficiência (ISAKE, 2007) devido o fato da CLAE ser uma técnica de separação muito versátil, capaz de resolver uma mistura complexa de compostos de diversos pesos moleculares, de caráter ácido e/ou básico e também de diferentes polaridades (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005). Outra técnica muito eficiente na separação de enantiômeros é a EC que apresenta, dentre suas inúmeras vantagens, a ausência de solventes orgânicos nas análises.

Neste trabalho, duas técnicas analíticas distintas para análise enantiosseletiva foram escolhidas para avaliar a resolução dos fármacos escolhidos e seus metabólitos: a CLAE e a EC. Portanto, somente estas duas técnicas serão discutidas nos próximos parágrafos.

3.1. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A separação de enantiômeros por CLAE pode ocorrer utilizando-se métodos indiretos ou diretos de análise. No método indireto, o racemato é submetido a reações de derivatização com um reagente quiral e enantiomericamente puro visando a obtenção dos diasteroisômeros correspondentes (SMITH, 2009). Após esta etapa, os diasteroisômeros podem ser analisados utilizando colunas aquirais convencionais.

No método direto os enantiômeros são separados através da formação de complexos diastereoisoméricos transitórios formados pela interação entre os enantiômeros (*R*– ou *S*–) do analito (*A*) e o seletor quiral (S) empregado. Estes complexos são denominados transitórios porque se tratam de formações

rápidas e reversíveis. A formação desses diasteroisômeros pode ser explicada através das reações abaixo, por exemplo, se o seletor quiral tiver a configuração (R)— (ou seja, ele for o seletor (R)— S):

$$(R)$$
-A + (R) -S $\stackrel{\text{KR}}{\rightleftharpoons} [(R) - A \dots (R) - S]$ (1)

$$(S)-A + (R)-S \stackrel{KS}{\leftrightarrows} [(S) - A \dots (R) - S]$$
 (2)

O seletor quiral com a configuração (R)-S, de acordo com a equação (1), ao interagir com o analito de configuração (R)-A, formará o complexo $(R) - A \dots (R) - S$ com uma determinada constante de associação dada por K_R, o mesmo se dá com o seletor (R)-S interagindo com o analito de configuração (S)-A, que irá formar o complexo descrito na equação (2) com uma determinada constante de associação Ks. O que ocorre são diferenças físico-químicas que acarretam em diferenças nas velocidades de formação dos complexos diastereoisoméricos representadas pelas constantes KR e KS, que têm como consequência tempos de retenção diferentes na eluição dos enantiômeros através da coluna e, assim, a separação é efetivada (YOUNES et al., 2013). Quimicamente, as interações responsáveis pela formação dos complexos entre seletor e analito são de diversas naturezas, como: interações iônicas, interações íon-dipolo ou dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, interações de Van Der Waals e interações do tipo π - π . Além delas, fatores estéricos de ajustes ou não-ajustes do soluto em uma cavidade ou fenda do seletor quiral contribuem para o reconhecimento quiral (NÚNEZ et al., 2013).

A separação dos enantiômeros em colunas com fases estacionárias quirais (FEQs) que são as mais comumente empregadas (SMITH, 2009). Podese destacar também que o método direto é mais vantajoso devido há algumas dificuldades operacionais encontradas quando o método indireto é empregado e também pela grande eficiência encontrada empregando colunas com fases estacionárias quirais.

3.1.1. FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS EM CLAE

Diversas colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais (FEQs) tem sido desenvolvidas ao longo dos anos e com grande evolução; essas colunas podem ser baseadas em seletores macromoleculares como os derivados de biopolímeros (proteínas, polissacarídeos como celulose e amilose) ou polímeros sintéticos (politartaramidas, poli(met)acrilamidas); podem ser baseadas em seletores macrocíclicos como ciclodextrinas, antibióticos macrocíclicos, éteres de coroa quirais; ou podem ser baseadas em seletores de baixa massa molecular como os seletores do tipo de troca iônica quiral, os seletores do tipo doador-receptor e seletores por troca de ligantes (agentes quelantes) (QIU et al., 2011).

No processo de fabricação destas colunas, os seletores quirais podem ser adsorvidos ou ligados quimicamente (através de ligações covalentes) em um suporte de sílica. As colunas podem ser recheadas com partículas totalmente porosas de sílica, ou então, com partículas de núcleo denso e invólucro poroso (as colunas "core-shell") (SCRIBA, 2012).

Embora exista uma grande diversidade de colunas quirais, daremos ênfase às colunas baseadas em polissacarídeos, devido ao emprego prioritário destas nesse projeto já que dados da literatura demonstram que são muito empregadas na análise enantiosseletiva de fármacos (WETLI; FRANCOTTE, 2007) e também devido à sua grande versatilidade em separar uma imensa gama de compostos (YAMAMOTO; INAGAKI; OKAMOTO, 2006). Os seletores baseados em polissacarídeos mais comuns como a amilose e a celulose são muito estudados e sabe-se que a diferença entre um e outro se dá devido à diferença na ligação glicosídica que leva à formação de suas estruturas espacialmente distintas. Embora ambas sejam compostas de várias subunidades de glicose, na amilose a ligação das unidades de glicose ocorre na posição $\alpha(1\rightarrow 4$ glicosídica), conferindo-lhe uma estrutura helicoidal e a celulose é formada através da ligação $\beta(1\rightarrow 4$ glicosídica), que lhe confere a estrutura linear (WANG et al., 2008).

A formação destas estruturas helicoidais ou lineares é muito importante para o reconhecimento quiral uma vez que são estas as responsáveis pelas cavidades ou calhas formadas no interior da coluna e, assim, possibilitam que os analitos interajam ou não com estas calhas e promovam, juntamente com as outras interações químicas possíveis já citadas, a separação enantiosseletiva (NÚNEZ, 2013). Alguns exemplos de colunas deste tipo estão representados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Exemplos de fases estacionárias baseadas em polissacarídeos.

Polissacarídeo	Tipo de seletor quiral	Nome comercial	
Celulose	tris-cinamato	Chiralcel OK®	
	3,5-dimetilfenil carbamato	Chiralcel OD [®] , Chiralcel OD-H [®] , Chiralcel OD-R [®] , Lux-Celullose-1 [®]	
	4-metilbenzoato	Chiralcel OJ [®] , Chiralcel OJ-R [®] , Chiralcel OJ-H [®]	
	celulose microcristalina triacetato	Chiralcel CA-1®	
	tris-4-cloro-metilbenzoato	Lux-Cellulose-4®	
	tris-3-cloro-4- metilfenilcarbamato	Lux-Cellulose-2 [®]	
Amilose	tris(3,5-dimetilfenil carbamato)	Chiralpak AD [®] , Chiralpak AD-H [®] , Chiralpak AD-R [®]	
	tris[(S)-α-feniletil carbamato	Chiralpak AS [®] , Chiralpak AS-H [®] , Chiralpak AS-R [®]	
	tris(5-cloro-2- metilfenilcarbamato)	Lux-Amylose-2®	

As vantagens em se utilizar estas colunas derivadas de polissacarídeos estão no seu alto poder de enantiorresolução, podendo ser utilizadas também em escalas semipreparativas e preparativas além de serem compatíveis com os modos de eluição (i) reverso, (ii) normal e (iii) polar-orgânico. Porém, como desvantagens, as colunas que são recobertas ao suporte apresentam restrição a alguns tipos de solventes como: diclorometano, acetona, clorofórmio, tetraidrofurano, tolueno, acetato de etila, já que a presença destes solventes pode causar danos à fase estacionária (CHEN; YAMAMOTO; OKAMOTO, 2007).

3.2. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA POR ELETROFORESE CAPILAR (EC)

A separação de enantiômeros por EC segue o mesmo princípio que a separação por CLAE, ou seja, através da formação de complexos diastereoisoméricos transitórios entre o analito de interesse e o seletor quiral empregado. A análise enantiosseletiva de compostos em EC é predominantemente realizada adicionando-se um seletor quiral no eletrólito de análise.

O emprego da eletroforese capilar na análise enantiosseletiva é bem vantajoso se comparado à CLAE devido a diversos fatores. Em EC, o uso de poucos miligramas de seletores quirais como aditivos no eletrólito de análise já é capaz de promover a separação dos analitos o que leva a um menor custo de análise se comparado as análises por CLAE, pois as colunas com fases estacionárias quirais apresentam um preço relativamente elevado. Além disso, quantidades consideráveis de solventes orgânicos de alto grau de pureza (fases móveis) são empregados em CLAE contribuindo também para um custo maior de análise. Adicionalmente, as vantagens comuns da EC também podem ser citadas na análise enantiosseletiva como: a eficiência de separação dos analitos que é muito maior devido à ausência da resistência de transferência de massa que é ocasionada pela fase estacionária em CLAE, ao fluxo induzido por campo elétrico (fluxo eletrosmótico) que se comparado a CLAE que possui um fluxo induzido por pressão com perfil laminar, acarreta em um sinal analítico muito mais eficiente e mais fino (Figura 5) (WEINBERGER, 1999) e o baixo (ou nulo) consumo de solventes orgânicos empregados. Por outro lado, as desvantagens desta técnica são à impossibilidade de coleta de grandes quantidades dos analitos após a separação para posterior caracterização dos

mesmos em equipamentos adequados e também ao baixo poder de detecção quando o espectrômetro UV-Vis é utilizado como detector. O pequeno diâmetro interno do capilar e o baixo volume de analito introduzido no capilar levam a baixos valores de absorbância comprometendo assim o poder de detectabilidade do método. Além disso, quando acoplada à espectrometria de massas o interfaceamento deste sistema é difícil, já que este acoplamento envolve vazões muito baixas do efluente eletroforético (nL min⁻¹) e a necessidade do fechamento de alta tensão na extremidade de saída do capilar de separação para que o efluente passe por outra tensão que agora é gerada no capilar do espectrômetro de massas (WEINBERGER, 1999). Além disso, os seletores quirais devem ser voláteis para serem compatíveis com o espectrômetro de massa, o que leva a uma maior dificuldade na otimização da separação.

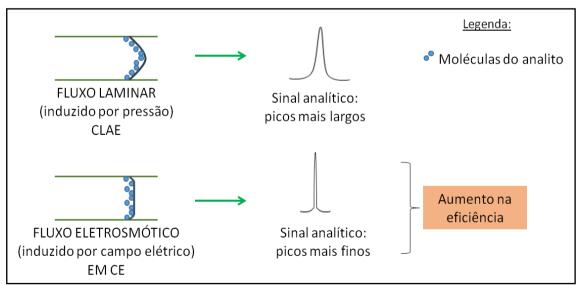


Figura 5 – Comparação da eficiência analítica típicas de CLAE e EC. Fonte: autoria própria

Como já citado anteriormente, emprega-se com mais frequência na análise enantiosseletiva por eletroforese capilar a adição de seletores quirais no eletrólito de análise e entre esses, as ciclodextrinas e seus derivados se destacam sendo os seletores mais extensivamente empregados, e desta forma, serão discutidas no próximo item.

3.2.1. CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas são moléculas cujas estruturas possuem formato de cone truncado, com a cavidade interior composta de grupamentos hidrofóbicos e a parte exterior com grupamentos mais hidrofílicos. São formadas a partir de reações enzimáticas com o amido (VENTURINI et al., 2008), e uma grande modificadas são produzidas variedade de ciclodextrinas modificações estruturais nas ciclodextrinas nativas. As ciclodextrinas modificadas são preparadas através de processos industriais de modo a se adequarem aos interesses de sua empregabilidade nos setores da indústria alimentícia e farmacêutica (KHAN et al., 1998). Dentre os tipos de ciclodextrinas nativas encontradas, as mais estudadas são as ciclodextrinas α, β e y, as quais apresentam diferença na quantidade de monômeros de glicose interligados (6 para a α , 7 para β e 8 para a γ) que, consequentemente, apresentam tamanhos de diâmetro interno das cavidades diferentes (VENTURINI et al., 2008) (Figura 6). Já, as ciclodextrinas modificadas são inúmeras, sendo que a maioria delas possui grupamentos químicos ligados aos grupos hidrofílicos externos, podendo modificá-las tanto na estrutura espacial quanto na sua carga (neutras, catiônicas ou aniônicas).

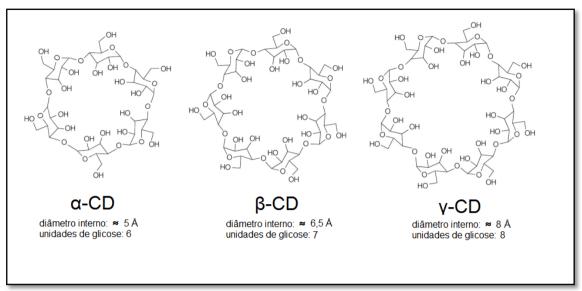


Figura 6 – Tipos e especificações das ciclodextrinas nativas. Fonte: autoria própria

Geralmente diversos tipos de interações estão relacionados na separação enantiosseletiva de um analito. Assim como em CLAE, interações do tipo dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e Van der Waals podem estar envolvidas no processo de separação e, devido à sua estrutura cônica truncada, as ciclodextrinas também formam complexos de inclusão com os analitos. Estas interações podem acarretar em diferentes propriedades físico-químicas entre os enantiômeros individuais no momento da complexação com a CD, acarretando em diferenças nos tempos de migração dos enantiômeros. Além desta contribuição cromatográfica, a separação enantiosseletiva por EC ocorre também devido a diferenças nas mobilidades eletroforéticas do complexo formado com cada enantiômero separadamente (VENTURINI et al., 2008).

4. ESTUDOS DE METABOLISMO IN VITRO

Devido às questões éticas, técnicas para o estudo de metabolismo de fármacos decorrentes do uso de animais é cada vez mais fortemente

desencorajado. Portanto, o foco para o desenvolvimento e validação de métodos alternativos e eficazes de metabolismo in vitro, que oferecem uma plataforma para o desenvolvimento de modelos preditivos de farmacocinética que possam corroborar com os estudos in vivo tem aumentado nos últimos anos (AGGARWAL et al., 2014).

A maioria dos xenobióticos está sujeita a um processo de biotransformação mediado por reações enzimáticas onde esses compostos passarão por modificações estruturais produzindo metabólitos, os quais, frequentemente, possuem um caráter polar maior em relação ao seu substrato (BARREIRO; FRAGA, 2008). Esse processo desempenha um importante papel na eliminação dos xenobióticos, principalmente através da urina, impedindo que estes compostos permaneçam por tempo indeterminado no organismo (PEREIRA, 2007).

O procedimento de biotransformação de xenobióticos é dividido em duas fases (Fase I e Fase II) e pode ser realizado em diversos tecidos como: rins, intestino, pele, pulmões. Porém, o órgão de maior responsabilidade no processo de metabolização é o fígado, pois nele estão localizadas abundantemente as hemeproteínas oxidativas, denominadas de citocromo P450 (CYP450) (LAINE, 2008). Tais proteínas são responsáveis pelas reações de metabolismo de Fase I. Nessas reações, um grupo funcional é introduzido na molécula original, tornando-a mais polar (CRETTOL et al., 2010); são geralmente reações de hidroxilação aromática ou alifática; N-desalquilação e O-desalquilação oxidativas; S-oxidação; redução e hidrólise. Já, as reações de Fase II consistem em modificações estruturais no produto da Fase I, ou no próprio substrato, que são convertidos por conjugação, resultando em reações

de glicuronidação, sulfatação, acilação e metilação e são realizadas pelas enzimas uridina difosfoglucuronosil transferase (UGT), glutationa S-transferase (GST), N-acetil transferase (NAT) e sulfotransferase (ST) (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

Sendo o fígado o órgão mais importante nas biotransformações de xenobióticos, estudos in vitro com modelos baseados em frações hepáticas permitem a identificação das isoformas da CYP envolvidas no metabolismo; fornecem informações sobre a inibição ou ativação das enzimas da CYP e também sobre possíveis interações medicamentosas entre os xenobióticos. Dentre esses modelos, podemos destacar: os microssomas hepático, frações S9 de fígados, hepatócitos e superssomas (isoformas isoladas da CYP). Dessa forma, o modelo microssomas hepático de humanos, o qual foi empregado nesse projeto, será discutido brevemente no próximo item.

4.1. MICROSSOMAS HEPÁTICO

O modelo mais empregado nos estudos de metabolismo in vitro é os microssomas hepático. Também corresponde ao modelo mais usado em estudos de estabilidade, perfil metabólico e inibição enzimática das enzimas da CYP. Os microssomas hepáticos são frações que correspondem aos fragmentos do retículo endoplasmático liso (DESHMUKH; HARSCH, 2011) e são obtidos por meio de homogeneização do fígado seguido por centrifugações diferenciais (PELKONEN et al., 1974). Os microssomas são usados na avaliação das reações de Fase 1 do metabolismo, pela adição do cofator NADPH. Entretanto, podem também ser empregados em estudos de reações de Fase 2, desde que os cofatores adequados sejam adicionados ao meio. As

suas principais vantagens são a simplicidade, estabilidade e o relativo baixo custo além de ser um modelo bem caracterizado (LAHOZ et al., 2008).

4.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

A caracterização in vitro da rota metabólica de xenobióticos geralmente começa com uma análise dos parâmetros enzimáticos relacionados à velocidade de formação do metabólito ou consumo do substrato. Isso não confirma diretamente o mecanismo bioquímico, mas permite verificar a capacidade do processo metabólico (VENKATAKRISHNAN et al., 2001). Para transformações mediadas pela CYP450, uma análise típica envolve uma descrição da velocidade metabólica, que é NADPH-dependente, como uma função da concentração do substrato [S]. O modelo de cinética enzimática mais empregado é o modelo de Michaelis-Menten que pode ser representado pela Equação 3:

$$V_0 = \frac{V \max[S]}{Km + [S]} \tag{3}$$

A equação de Michaelis-Menten corresponde à equação da velocidade de uma reação catalisada por uma enzima que tem afinidade por um único substrato. Nesse modelo, a curva que expressa a relação entre a [S] e V_0 se aproxima de uma hipérbole retangular, sendo a velocidade inicial máxima obtida durante a reação, representada por $V_{\rm max}$, e $K_{\rm m}$ (constante de Michaelis-Menten) a concentração de substrato, quando V_0 é igual à metade de $V_{\rm max}$ (VENKATAKRISHNAN et al., 2001).

Além do modelo Michaeliano, algumas cinéticas atípicas podem ser observadas nos estudos de metabolismo in vitro e outras equações

matemáticas descrevem o perfil de cada uma delas. São elas: cinética bifásica, cinética de Hill (ou sigmoidal), multienzimática e inibição pelo substrato (SEIBERT; TRACY, 2014).

5. BIOTRANSFORMAÇÃO EMPREGANDO FUNGOS

O processo de biotransformação empregando fungos como agentes catalisadores já é um procedimento biotecnológico extensivamente empregado na indústria. O interesse na catálise mediada por fungos vai desde o processo de fermentação de alimentos para consumo, produção de enzimas, ácidos orgânicos de interesse industrial a produção de aromas e utilização de processos que sejam capazes de produzir novos fármacos (PARSHIKOV et al., 2015).

Na biotransformação, um composto em particular é modificado através das transformações de seus grupos funcionais, pois muitas reações metabólicas em mamíferos de Fase I e Fase II ocorrem também em modelos microbiológicos (SORTINO; ZACCHINO, 2010). As vantagens da utilização de sistemas empregando fungos são inúmeras, dentre elas, pode-se destacar: (i) a reprodutibilidade e a facilidade de detecção, pois a fácil preparação e o baixo custo dos meios de cultura tornam o método reprodutivo já que os processos envolvidos são de simples repetição e a quantidade dos produtos formados é maior em relação aos modelos animais (maior concentração inicial do substrato é suportada) favorecendo a detecção, identificação e elucidação estrutural; (ii) o baixo custo, pois a manutenção das culturas-estoque de micro-organismos é relativamente simples; (iii) a probabilidade de ocorrer transformações regio- e

estereosseletivas e a (iv) possibilidade da descoberta de novos metabólitos (AZERAD, 1999).

5.1. BIOTRANSFORMAÇÃO ENANTIOSSELETIVA EMPREGANDO FUNGOS

A produção de enantiômeros individuais e de intermediários quirais tem se tornado cada vez mais importante na indústria farmacêutica. Estes enantiômeros podem ser produzidos por síntese química ou síntese quimio-enzimática (biocatálise) sendo que a última oferece inúmeras vantagens entre elas a capacidade de uma reação altamente enantio- ou regiosseletiva (ALDRIDGE, 2013).

Além disso, são reações que podem ser realizadas nas condições normais de temperatura e pressão, evitando possivelmente problemas com isomerização, racemização, epimerização e rearranjos que outras condições mais extremas empregadas na síntese química acarretariam (TURNER; CARR, 2007).

A **Tabela 2** resume alguns resultados obtidos na biotransformação enantiosseletiva de alguns fármacos.

Tabela 2: Estudos de biotransformação enantiosseletiva empregando fungos.

Fármaco Biotransformado	Fungo (espécie)	Metabólito majoritário obtido	Ref.
Venlafaxina	Cunninghamella elegans ATCC10028B	(+)-(S)-N- desmetilvenlafaxina	Bortoleto, M. A. et al.
Zopiclona	Cunninghamella elegans ATCC10028B e Cunninghamella echinulata ATCC 8688ª	N-desmetilzopiclona	Albuquerque, N. C. P., et al.
Oxcarbazepina	Glomerella cingulata (VA1) e Beuveria bassiana	(+)-(S)-Licarbazepina	Bocato, M. Z., et al.
Hidroxizina	Cunninghamella elegans ATCC10028B	(S)-Cetirizina	Fortes, S. S., et al.
Risperidona	Cunninghamella elegans ATCC10028B e Cunninghamella echinulata ATCC 8688ª	(+)-9-Hidroxirisperidona	Bocato, M. Z., et al
Albendazol	Nigrospora sphaerica Sacc.) E. W. Mason (SS67),Pestalotiopsis foedans (VR8), Papulaspora immersa Hotson (SS13) e Mucor rouxii	Albendazol sulfóxido (Ricobendazol)	Hilário, V. C., et al.
Albendazol	Penicillium crustosum (VR4)	Albendazol sulfóxido (Ricobendazol)	Carrão, D. B., et al.
Risperidona	Mucor rouxii	(+)-9-Hidroxirisperidona	De Jesus, L. I., et al.

6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE MATRIZES BIOLÓGICAS

Não há uma legislação específica para validação analítica de fármacos e metabólitos em microssomas hepáticos ou meio de cultura. Entretanto, a Resolução RDC n°27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza os requisitos mínimos de uma validação bioanalítica para medicamentos com fins de registro ou pós-registro. Compativelmente, legislações internacionais como a *European Medicines Agency* (EMA) possuem normas bem estabelecidas para validação de métodos

para análise de fármacos em matrizes biológicas e, portanto, estes guias foram aplicados nas validações realizadas neste trabalho e os principais parâmetros serão descritos abaixo.

6.1. LINEARIDADE

A linearidade é uma das etapas mais importantes da validação analítica. Através dela, pode-se assegurar que uma concentração medida durante as análises corresponda fielmente à encontrada na amostra em um dado intervalo de concentração. No ensaio da linearidade, a curva analítica é elaborada propiciando a linearidade do método, ou seja, que os resultados obtidos sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em um intervalo préestabelecido. O ensaio corresponde a uma reta obtida pela regressão linear dos dados (na maioria das vezes), a partir do qual se obtêm os coeficientes linear (a) e angular (b) e de correlação dos dados (r).

Estima-se que a dispersão das medidas ao longo da curva analítica seja independente dos níveis de concentração avaliada. Nesse caso dizemos que o comportamento da curva se caracteriza como homocedástico e a equação da reta, neste caso, pode ser empregada para o cálculo das concentrações obtidas no método sem que haja nenhum tratamento estatístico mais elaborado. Entretanto, quando se utiliza um intervalo muito extenso de concentração na curva analítica, muito comum em métodos bioanalíticos, os dados variâncias diferentes podem apresentar diferentes para as concentrações empregadas na curva e, assim, os desvios se tornam maiores e causarão um comportamento de dados que é denominado de heterocedástico (MULHOLLAND; HIBBERT, 1997). Quando este comportamento é encontrado, um tratamento estatístico é permitido para que os desvios da curva sejam minimizados de maneira a atribuir novos valores para os coeficientes (a) e (b), e assim, atribui-se pesos para a curva analítica. Os pesos são valores empíricos ($1/\chi$; $1/\chi^2$; 1/y; $1/y^2$, etc). Sendo que a escolha irá recair sobre a menor porcentagem de erro individual de cada concentração ou somatória dos resíduos.

6.2. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LQ) em métodos bioanalíticos corresponde a menor concentração que pode ser determinada pelo método empregado e que apresente precisão e exatidão adequadas. O LQ pode também ser determinado pela concentração do analito que fornece um sinal 10 vezes maior que o ruído da linha de base (relação sinal/ruído 10:1) (ICH, 2005). A determinação é feita de acordo com a **Equação 4**:

$$LQ = 10 x \frac{s}{s}$$
 (4)

Onde "s" é o desvio padrão do intercepto e "S" representa o coeficiente angular da curva de calibração.

Frequentemente, em métodos bioanalíticos, o limite de quantificação é o primeiro ponto da curva analítica cujos valores de precisão (representado pelo coeficiente de variação) e de exatidão (representado pelo erro relativo porcentual) devem ser inferior a 20% e ±20%, respectivamente.

6.3. PRECISÃO

A precisão é expressa pela estimativa do desvio padrão absoluto ou pelo desvio padrão relativo (desvio padrão relativo, DPR%). Esse parâmetro avalia a confiabilidade de uma análise ao se repetir sequencialmente. No geral, são utilizados quatro níveis de concentração de uma curva analítica, o limite de quantificação (LQ), uma concentração baixa (CB), uma concentração média (CM) e uma concentração alta (CA). Os valores aceitáveis de coeficiente de variação para os dados são de 15% para as concentrações ao longo da curva sendo que, para o LQ é permitido 20% (EMA, 2011). O coeficiente de variação pode ser determinado de acordo com a **Equação 5**:

DPR =
$$\frac{DP}{M} \times 100$$
 (5)

Onde, "DP", é o desvio padrão e, *M*, a média dos valores de concentrações obtidas das amostras analisadas em replicatas.

6.4. EXATIDÃO

A exatidão expressa o quão os dados de concentração obtidos experimentalmente corroboram com os valores aceitos como verdadeiros (concentração nominal) e pode ser determinado através da análise do erro relativo em percentual ER% (**Equação 6**):

$$ER = 100 \times \frac{Concentração \ experimental - concentração \ nominal}{Concentração \ nominal}$$
 (6)

Os guias de validação preconizam a avaliação da exatidão em pelo menos 4 níveis distintos de concentração (limite de quantificação, concentração baixa, média e alta) em pelo menos triplicata dos ensaios analíticos (EMA, 2011).

6.5. ESTABILIDADE

Os ensaios de estabilidade para cada método deste trabalho foram avaliados para garantir que os analitos empregados permaneceriam estáveis nas condições de análise. Esses ensaios podem variar dependendo do tipo de estudo desenvolvido. Nesse trabalho, os ensaios foram avaliados em 2 níveis de concentração (baixa e alta) em quintuplicata. Posteriormente o coeficiente de variação e o erro relativo dessas amostras foram determinados com o auxílio de uma curva analítica preparada recentemente e não submetida a tais condições. O analito foi considerado estável se os valores de DPR e ER% neste ensaio foram inferiores a 15%.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Biotransformação estereosseletiva da oxcarbazepina empregando fungos

1. INTRODUÇÃO

A introdução desta etapa do projeto será brevemente discutida uma vez que descrições anteriores sobre as etapas aqui pertinentes já constam no Capítulo 1 desta Tese.

A oxcarbazepina (OXC) é um fármaco antiepiléptico aquiral e em humanos o seu metabolismo resulta no metabólito quiral Licarbazepina (LIC).

Entre os métodos de separação quiral apresentados na literatura para a análise OXC e LIC, apenas um artigo relatou a separação dos enantiômeros da LIC empregando EC, porém o mesmo é realizado na ausência de seu fármaco precursor OXC. Neste estudo citado, a análise é realizada empregando a Eletrocromatografia Capilar (MARZIALI et al., 2002) e o seletor quiral utilizado na separação da LIC é a ciclodextrina octakis-6-sulfo-γ-CD. Outros estudos relatam a separação quiral da LIC na presença da OXC, porém empregando a cromatografia líquida de alta eficiência no modo normal ou no modo reverso de análise (DE JESUS ANTUNES et al., 2013; FRENCH et al., 2014). Tais estudos são realizados empregando matrizes complexas, porém não foi encontrado nenhum relato de estudos que empreguem o processo de biotransformação com fungos ou meio de cultura como matriz.

Adicionalmente, nenhum estudo foi desenvolvido empregando técnicas de microextração, sendo assim, este fármaco e seu metabólito quiral se demonstraram excelentes candidatos para tais estudos. As técnicas miniaturizadas de preparação de amostras têm sido extensivamente

empregadas com o intuito de reduzir o tempo e simplificar o processo de extração. Assim, a avaliação das técnicas miniaturizadas de preparação de amostras como a SPME, DLLME e HF-LPME na extração da OXC e LIC foram aqui realizadas empregando meio de cultura líquido como matriz. Posteriormente, a técnica mais promissora foi empregada nos estudos de biotransformação enantiosseletiva da OXC.

A biotransformação empregando fungos como agentes catalisadores é uma ferramenta alternativa que permite que as reações moleculares sejam associadas diretamente ao metabolismo dos mamíferos (AZERAD, 1999). A biotransformação microbiana foi inicialmente utilizada com o intuito de obter metabólitos que poderiam depois ser correlacionados com os resultados obtidos in vivo ou em modelos in vitro (KHALED et al., 2013). Além disso, a biotransformação empregando micro-organismos pode apresentar enantiosseletividade na produção de metabólitos sendo essa característica um fator de grande motivação para o desenvolvimento deste projeto.

Uma vez que o metabólito quiral LIC é um metabólito biologicamente ativo e a (S)-LIC já é comercializada como um fármaco, o emprego de fungos no processo de biotransformação foi aqui avaliado para estudar a bioconversão da OXC nos enantiômeros da LIC. Com base nisto, um método enantiosseletivo empregando uma metodologia de análise simultânea da OXC e LIC foi desenvolvida para análise desses analitos em meio de cultura líquido.

2. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar mostraram-se eficientes na separação simultânea da OXC e dos enantiômeros da LIC. Contudo, a eletroforese capilar foi escolhida para a validação do método e estudos de biotransformação já que é uma técnica ambientalmente mais favorável que a CLAE. Além disso, não havia dados na literatura acerca da análise simultânea da OXC e os enantiômeros de seu metabólito por EC. As técnicas miniaturizadas avaliadas nesse projeto e as condições de análise empregadas não se mostraram satisfatórias para posterior aplicação nos estudos de biotransformação mediada por fungos. Isto pode ser explicado pelas características físico-químicas destas moléculas. O caráter fortemente básico da OXC e da LIC dificultou sua extração da matriz com boa reprodutibilidade pois para manter estes anaitos na sua forma molecular era preciso utilizar de condições extremas de pH, sendo necessário também utilizar uma grande quantidade desolvente orgânico na extração para favorecer a transferência de massa dos analitos para a fase extratora e assim, conseguir uma extração mais eficiente. Os resultados obtidos no procedimento de biotransformação demonstraram ser possível a obtenção de um único enantiômero, no caso, o (S)-(+)-LIC que já é comercializado como fármaco, portanto, pode-se concluir que este procedimento de biotransformação, em larga escala, poderia ser utilizado para produzir este fármaco através do emprego do fármaco precursor, a oxcarbazepina.

<u>Metabolismo in vitro da TBZ empregando microssomas hepático de</u> <u>humanos</u>

1. INTRODUÇÃO

Conforme descrito no capítulo 1, a TBZ é um fármaco quiral, empregado no tratamento de distúrbios hipercinéticos, incluindo a doença de Huntington (FRANK, 2010). O seu metabolismo resulta nos metabólitos quirais diHTBZ, os qual possuem quatro formas estereoisoméricas estáveis, sendo duas na configuração *cis*- e duas na configuração *trans*- (McGEAGH; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2011). Estudos in vivo têm demonstrado que a forma *trans*- é responsável pela atividade do fármaco que atua na inibição do transportador VMAT2 por ligações estereoespecíficas (KILBOURN et al., 1995).

O metabolismo hepático da TBZ influencia na atividade farmacológica final devido à dependência direta de sua biotransformação e a produção de seus metabólitos. Como também já descrito anteriormente, o metabolismo hepático é um fator que pode afetar o perfil terapêutico e tóxico de um fármaco e pode levar a detoxificação e excreção, mas também à sua bioativação.

Nesta etapa do projeto, a fim de estudar via metabólica da TBZ, estudos de metabolismo in vitro foram conduzidos empregando microssomas de fígado humano de maneira a mimetizar as condições do metabolismo hepático deste fármaco.

No capítulo 1 foi descrito o modelo matemático mais empregado para estes estudos, o modelo de Michaelis-Menten. Entretanto, o perfil Michaeliano de uma enzima corresponde à equação da velocidade da reação catalisada por

uma enzima que tem afinidade por um único substrato e, portanto, é importante ressaltar que outros perfis cinéticos podem ser observados durante os estudos de cinética enzimática, como, por exemplo: (i) bifásico, (ii) multienzimático, (iii) sigmoidal e (iv) inibição pelo substrato (SEIBERT; TRACY, 2014).

Para análise do fármaco e seus metabólitos foram otimizados métodos para análise por EC e por CLAE. Como técnica de preparo de amostras para análise desses analitos em microssomas hepático de humanos foram avaliadas as técnicas SPME, HF-LPME e DLLME.

Até o presente momento, não há relatos de separação quiral dos metabólitos da TBZ empregando EC e existe na literatura apenas um método para a separação quiral dos enantiômeros dosestereoisômeros *trans-* e *cis-*diHTBZ por CLAE. Os autores separaram os enantiômeros da (±) *trans-*di-idrotetrabenazina e (±) *cis-*di-idrotetrabenazina por CLAE utilizando uma coluna quiral Chirex 3014® e fase móvel composta por hexano:1,2-dicloroetano: etanol: ácido trifluoroacético (60: 30: 9,5: 0,5, v/v/v/v) (BOLDT et al., 2009). Adicionalmente, nenhuma técnica de microextração foi relatada para extração deste fármaco e seus metabólitos de qualquer tipo de matriz.

2. CONCLUSÕES:

O presente capítulo demonstrou o desenvolvimento de um método analítico enantiosseletivo inédito para análise dos metabólitos da diHTBZ por DLLME-EC. O método desenvolvido mostrou ser eficiente, rápido, simples e com baixo consumo de solvente orgânico. Os estudos de metabolismo in vitro demonstrou um perfil cinético de inibição pelo substrato estereosseletivo das enzimas da CYP450 frente à TBZ. Os dados obtidos pela extrapolação in vitro-

in vivo, mediante os parâmetros cinéticos enzimáticos in vitro, reforçaram os dados farmacocinéticos presentes na literatura, tais como a importância do fígado no metabolismo da TBZ e um metabolismo de primeira passagem significante. A CYP2C19 mostrou ser uma isoforma importante na formação da diHTBZ, juntamente com a enzima carbonil redutase, oferecendo novas explicações para a rota de eliminação da TBZ pelo fígado e motivando a importância de um estudo futuro a respeito do impacto de interações medicamentosas e do genótipo da CYP2C19 em relação á TBZ.

<u>Estudos preliminares de biotransformação estereosseletiva da TBZ</u> empregando fungos

1. INTRODUÇÃO

Nos capítulos 1 e 3 já foram discutidos a importância, as propriedades físico-químicas, a ação farmacológica e também as estruturas químicas da TBZ e dos enantiômeros de seus metabólitos, diHTBZ. Adicionalmente, em todos os capítulos anteriores, discutiu-se a respeito das técnicas miniaturizadas de preparação de amostras e nos capítulos 1 e 2 foram descritas a importância dos estudos de biotransformação enantiosseletivos de fármacos empregando fungos. Portanto, neste capítulo, não haverá uma nova introdução destes temas.

4. CONCLUSÃO

Mais uma vez, podemos ressaltar a importância da eletroforese capilar na química analítica, uma vez que, aliada a DLLME pôde proporcionar uma análise eficiente dos metabólitos formados nos procedimentos de biotransformação enantiosseletiva da TBZ com fungos.

Quanto à possibilidade do emprego das demais técnicas de extração avaliadas, a SPME e a HF-LPME, foi verificado que, mais uma vez, pelo fato do caráter básico e mais apolar dos analitos de interesse, estas técnicas não foram adequadas para a realização destes estudos na condição de análise estabelecida.

Os resultados obtidos no procedimento de biotransformação demonstraram ser possível a obtenção majoritária de um dos estereoisômeros dos metabólitos da diHTBZ, contudo, não foi observado em nenhum caso, 100% de fração enantiomérica. Adicionalmente, os fungos mais uma vez comprovaram ser uma forma de catálise assimétrica bem promissora. Sendo que somente uma das espécies empregadas neste projeto não foi capaz de metabolizar enantiosseletivamente o fármaco TBZ. O fato de haver poucos relatos dos enantiômeros individuais tanto deste fármaco quanto de seus metabólitos, torna o procedimento de biotransformação enantiosseletiva com fungos ainda mais interessante pois trata-se de uma técnica simples e barata que pode ser utilizada na obtenção de enantiômeros individuas de fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELÖ, A.; ANDERSSON, T. B.; ANTONSSON, M. NAUDOT, A. K.; SKÅNBERG, I., WEIDOLF, L. Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 28, n°8, p. 966-972, 2000.

AGGARWAL, M.; BATTALORA, M.; FISHER, P.; HÜSER, A.; PARR-DOBRZANSKI, R.; SOUFI, M.; MOSTERT, V.; STRUPP, C.; WHALLEY, P.; WIEMANN, C.; BILLINGTON, R. Assessment of in vitro human dermal absorption studies on pesticides to determine default values, opportunities for read-across and influence of dilution on absorption. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Michigan, v. 68, n°3, p. 412-423, 2014.

ALDRIDGE, S. Industry backs biocatalysis for greener manufacturing. **Nature Biotechnology**, Londres, v. 31, n°2, p. 95-96, 2013.

ALVES, G.; FIQUEIREDO, I.; CASTEL-BRANCO, M.; LOUREIRO, A.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A.; CARAMONA, M. Enantioselective HPLC-UV method for determination of eslicarbazepine acetate (BIA 2-093) and its metabolites in human plasma. **Biomedical Chromatography**, Georgia, v. 21, n°11, p. 1127-1134, 2007.

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos-Legislação-Resolução-RE. de 29 no. 899, de maio de 2003. http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE 899 validacao.pdf. Acesso em 10 de abril de 2016.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.160, n°2, p.1699-1722, 2010.
- ATKINS, W. M. Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450-catalyzed reactions. **Annual Review Pharmacology and Toxicology,** Seatle, v. 45, p. 291-310, 2005.
- AUSTIN, R. P.; BARTON, P.; MOHMED, S.; RILEY, R.J. The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physicochemical properties. **Drug Metabolism and Disposition,** Kansas city, V.33, n°3, p.419-425, 2005.
- AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Scheper, T. (ed). Springer Verlag, Berlin, Germany, p.169-218, 1999.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A importância do conhecimento do mecanismo molecular de ação dos fármacos. In:______. **Química Medicinal:** As bases moleculares da ação dos fármacos. 2 ed. Porto Alegre, Editora Artmed, Capítulo 4, p.133-160, 2008
- BARTH, T.; HABENSCHUS, M. D.; LIMA, F. M.; FERREIRA, L. S.; LOPES, N. P.; DE OLIVEIRA, A. R. M. In vitro metabolism of the lignan (-)-grandisin, an anticancer drug candidate, by human liver microsomes. **Drug Testing and Analysis,** Cork, v.7 n°9, p.780-786, 2015.
- BENÉS, J.; SOARES-DA-SILVA, P., **USP to patent n°5753646**, 19 Maio de 1998.
- BIALER, M. In: LEVY, R. H., MATTSON, R. H., MELDRUM, B. S., PERUCCA, E., ed. **Antiepileptic Drugs**, 5th ed., Philadelphia: Lippncott Willians & Wilkins, p. 459-465, 2002.
- BJORNSSON, T. D.; CALLAGHAN, J. T; EINOLF, H. J.; FISCHER, V.; GAN, L.; GRIMM, S.; KAO, J.; KING, P. S.; MIWA, G.; NI, L.; KUMAR, G.; McLEOD, J.; OBACH, R. S.; ROBERTS, S.; ROE, A.; SHAH, A.; SNIKERIS, F.; SULLIVAN, J. T.; TWEEIDE, D.; VEGA, J. M.; WALSH, J.; WRIGHTON, S. A. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. **Drug Metabolism and Disposition**, Kansas city, v. 31, n°7, p. 815-832, 2003.

- BOCATO, M. Z.; BORTOLETO, M. A.; PUPO, M. T.; DE OLIVEIRA, A. R. M. A new enantioselective CE method for determination of oxcarbazepine and licarbazepine after fungal biotransformation, **Electrophoresis**, Weinhem, v. 35, p. 2877-2884, 2014.
- BOCATO, M. Z.; MOREIRA, F. L.; DE ALBUQUERQUE, N. C. P.; GAITANI, C. M. DE OLIVEIRA, A. R. M. In vitro enantioselective human liver microsomal metabolism and prediction of in vivo pharmacokinetic parameters of tetrabenazine by DLLME-CE. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.128, p.528-537, 2016.
- BOLDT, K. G.; BIGGERS, M. S.; PHIFER, S. S.; BRINE, G. A.; REHDER, K. S. Synthesis of (+)- and (-)- tetrabenazine from the resolution of dihydrotetrabenazine. **Synthetic Communication**, Norwich, v.39, p.3574-3585, 2009.
- BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise Enantiosseletiva de fármacos: contribuição da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n° 4, p.683-691, 2005.
- BRÄMSWIG, S.; SUDHOP, T.; LUERS, C.; VON BERGMANN, K.; BERTHOLD, H. K. Lipoprotein(a) Concentration Increases during Treatment with Carbamazepine. **Epilepsia**, Cologne, v.44, n°3, p.457-460, 2003.
- CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostras para a determinação de resíduos agrotóxicos em água por Cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas, **Química Nova**, São Paulo, v.34, n° 9, p. 1604-1617, 2011.
- CHARLAB, R.; ZHANG, L. Pharmacogenomics: historical perspective and current status. **Methods in Molecular Biology,** Clifton, v.1015, p.3-22, 2013.
- CHEN, L., BUTERS, J. T., HARDWICK, J. P., TAMURA, S., PENMAN, B. W., GONZALEZ, F. J.; CRESPI, C. L. Coexpression of cytochrome P450 2A6 and human NADPH-P450 oxido reductase in the baculo virus system. **Drug Metabolism and Disposition**, Kansas city, v.25, p. 399–405, 1997.
- CHEN, X.; YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y. Polysaccharide derivatives as useful chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, Nagoya, v.79 n° 9, p.1561–1573, 2007.
- CHEN, Y.; JIN, J. Y.; MUKADAM, S.; MALHI, V.; KENNY, J. R. Application of IVIVE and PBPK modeling in prospective prediction of clinical pharmacokinetics: strategy and approach during the drug discovery phase with four case studies. **Biopharmaceutics & Drug Disposition,** Toronto, v. 33, n°2, p. 85-98, 2012.

- CONRADO, D. J.; ROGERS, H. L.; ZINEH, I.; PACANOWSKI, M.A. Consistency of drug-drug and gene-drug interaction information in US FDA-approved drug labels. **Pharmacogenomics**, London, v.14, n°2, p. 215-223, 2013.
- CREMASCO, M. A. A fronteira da indústria farmacêutica no Brasil: enantiômeros. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.65, n°3, p.4-5, 2013.
- CRETTOL, S.; PETROVIC, N.; MURRAY, M. Pharmacogenetics of Phase I and Phase II drug metabolism, **Current Pharmaceutical Design**, Washington, v. 16, n°2, p.204-219, 2010.
- DE ALBUQUERQUE, N. C.; BORTOLETO, M. A.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Análaise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas empregando técnicas miniaturizadas de preparação de amostras. **Scientia Chromatographica**, Ribeirão Preto, v.5, n°3, p. 214-228, 2013.
- DE JESUS ANTUNES, N. A.; WICHERT-ANA, L.; COELHO, E. B.; DELLA PASQUA, P. O.; ALEXANDRE, V. Jr.; TAKAYANAGUI, O. M.; TOZATTO, E.; LANCHOTE, V. L. Analysis of Oxcarbazepine and the 10-hydroxycarbazepine enantiomers in plasma by LC-MS/MS: application in a pharmacokinetic study. **Chirality**, New York, v.25, n°12, p.97-903, 2013.
- DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n°3, p.627-644, 2008.
- DERANGULA, V. R.; PILLI, N. R.; NADAVALA, S. K.; ADIREDDY, V.; INAMADUGU, J. K.; PONNERI, V. Liquid-Chromatography-tandem mass spectrometric assay for the determination of tetrabenazine and its active metabolites in human plasma: a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, Oxford, v.27 n°6, p.792-801, 2013.
- DESHMUKH, S.; HARSCH, A. Direct determination of the ratio of unbound fraction in plasma to unbound fraction in microsome system (fu_p/fu_{mic}) for refined prediction of phase I mediated metabolic hepatic, **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, London, v. 63, n°1, p. 35-39, 2011.
- EECKHAUT, A. V., MICHOTTE, Y. Chiral Separations by capillary electrophoresis: Recent Developments and applications, **Electrophoresis**, Wheinheim, v. 27, n° 14, p.2880-2895, 2006.
- EMA, European Medicines Agency. **Guideline on Bioanalytical Method 554 Validation**, 201. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en GB/document library/ 555 Scientific guideline/2011/08/WC500109686.pdf Acesso em 06 de abril de 2016.

- EMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n°1, p.112-122, 2003.
- FASANO, E.; BENTIVOGLIO, A. R. Tetrabenazine. **Expert Opinion on Pharmacoterapy**, Liege, v.10, p.2883-2896, 2009.
- FDA, Food and Drug Administration. **Guideline on drug analytical methods.** http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021894s004lbl.pdf. 2011. Acesso em 12 de outubro de 2015.
- FORREST, G. L.; GONZALEZ, B. Carbonyl reductase. **Chemico-Biological Interactions**, Lowa city, v.129, n°1-2 p. 21-40, 2000.
- FRANK, S. Tetrabenazine: the first approved drug for the treatment of chorea in US patients with Hungtington desease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, Danville, v.5, n°6, p.657-665, 2010.
- FRENCH, J. A.; BAROLDI, P.; BRITTAIN, S. T.; JOHNSON, J. K. Efficacy and safety of extended-release oxcarbazepine (Oxtellar XR[™]) as adjunctive therapy in patients with refractory partial-onset seizures: a randomized controlled trial. **Acta Neurologica Scandinavica**, Gothenburg, v.129, p.143-153, 2014
- GOMES-GONZÁLEZ, B.; CABÃNAS-MORALES, A. M.; HURTADO-ALVARADO, G.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Neuronal-Glial-Endothelial Interactions Regulate Central Nervous System Homeostasis. In: **Endothelial Cell Plasticity in the Normal and Injured Central Nervous System**, Ed. By Esperanza Meléndez Herrera, Bryan V. Phillips-Farfán, Gabriel Gutiérrez Ospina, Mexico City, Chapter 3. p.37, 2010.
- HUTZLER, J. M.; TRACY, T. S. Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. **Drug Metabolism and Disposition,** Kansas city, v.30, n°4, p.355-362, 2002.
- ICH International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Step 4 Version, 2005.
- ISAKE, E. L. Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: an overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Queensland, v.96, n°7, p.1659-1976, 2007.
- JAMEI, M.; DICKINSON, G. L.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. A Framework for Assessing Inter-individual Variability in Pharmacokinetics Using Virtual Human Populations and Integrating General Knowledge of Physical Chemistry, Biology, Anatomy, Physiology and Genetics: A Tale of 'Bottom-Up' vs 'Top-Down' Recognition of Covariates. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics,** Nagoya v.24, n°1, p. 53-75, 2009.

- JANKOVIC, J.; CLARENCE-SMITH, K. Tetrabenazine for the treatment of chorea and other hyperkinetic movement disorders. **Expert Review of Neurotherapeutics**, New York, v.11, n°11, p. 1509-1523, 2011.
- KHALED, A. A.; PERVAIZ, K.; KARIM, S.; FARZANA, K., MURTAZA, G. Development of in vitro-in vivo correlaction for encapsulated metaprolol tartrate. **Acta Poloniae Pharmaceutica,** Varsovia, v. 70, n° 4, p; 743-747, 2013.
- KHAN, A. R.; FORGO, P.; STINE, K. J.; D'SOUZA, V. T. Methods for selective Modifications of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, Saint Louis, v.98, n°5, p.1977-1996, 1998.
- KILBOURN, M.; LEE, L.; VANDER, B. T.; JEWETT, D.; FREY, K. Binding of α-dihydrotetrabenazine to the vesicular monoamine transporter is stereospecific. **European Journal of Pharmacology,** Utrecht, v. 278, n°3, p. 249-252, 1995.
- KROEMER, H. K.; ECHIZEN, H.; HEIDEMANN, H.; EICHELBAUM, M. Predictability of the in vivo metabolism of verapamil from in vitro data: contribution of individual metabolic pathways and stereoselective aspects. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 260, n°3, p. 1052-1057, 1992.
- KUDLEJOVA, L. RISTECEVIC, S.; VUCKOVIC, D. **Solid Phase Microextraction method development**. In: Handbook of Solid Phase Microextraction: SPME 1st ed. (ed. Pawliszyn, J.), University of Waterloo, Waterloo, p.128-171, 2007.
- KUDLEJOVA, L.; RISTICEVIC, S.; VUCKOVIC, D. Solid Phase Microextraction method development. **In: Handbook of Solid Phase Microextraction: SPME,** 1st ed. (ed. Pawliszyn, J.), University of Waterloo, p.201-249, 2012.
- LAHOZ, A.; DONATO, M. T.; CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Strategies to in vitro assessment of major human CYP Enzyme Activities by using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Current Drug Metabolism**, Manchester, v. 9, p. 12-19, 2008.
- LAINE, R. Metabolic stability: Main enzymes involved and best tools to assess it. **Current Drug Metabolism**, Manchester, v.9, n°9, p. 921-927, 2008.
- LEE, H. K.; MOON, J. K.; CHANG, C. H.; CHOI, H.; PARK, H. W.; PARK, B. S.; LEE, H. S.; HWANG, E. C.; LEE, Y. D.; LIU, K. H.; KIM, J. H. Stereoselective metabolism of endosulfan by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms. **Drug Metabolism and Disposition**, Kansas city v. 34, n°7, p.1090-1095, 2006.
- LEE, J.; LEE, H. K.; RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdan, v.624, n°2, p.253-268, 2008.

- LEHNERT, P.; PRIBYLKA, A.; MAIER, V.; ZNALEZIONA, J.; SEVCIK, J.; DOUSA, M. Enantiomeric separation of R,S-tolterodine and R,S-methoxytolterodine with negatively charged cyclodextrins by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, Wheinheim, v.36, p.1561-1567, 2013.
- LI, M.-J.; ZHANG, H.-Y.; LIU, X.-Z;.CUI, C.-Y.; SHI, Z.-H. Progress of extraction solvent dispersion strategies for dispersive liquid-liquid microextraction. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Shanghai, v.43, p.1231-1240, 2015.
- LLOYD, P.; FLESCH, G.; DIETERLE, W. Clinical pharmacology and pharmacokinetics of oxcarbazepine. **Epilepsia**, Los Angeles, v.35, n°3, p.10-13, 1994.
- LLOYD, T. Techniques for Determining Protein Binding in Drug Discovery and Development In: ZHANG, D. e SURAPANENI, S. (Ed.). **ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development**, New Jersey: John Wiley & Sons, cap. 12, p.177-187, 2012.
- MAGALHÃES, I. R. S.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, Ribeirão Preto, v. 1, p.11-17, 2008
- MARZIALI, E., RAGGI, M. A., KOMAROVA, N., KENNDLER, E. Octakis-6-sulfato-cyclodextrin as additive for capillary electrokinetic chromatography of dibenzoazepines: Carbamazepine, oxcarbamazepine and their metabolites. **Electrophoresis**, Weinhem, v.23, p.3020-3026, 2002.
- MAZZUCCHELLI, I.; FRANCO, V.; FATTORE, C.; MARCHISELLI, R.; PERUCCA, E.; GATTI, G. A novel enantioselective microassay for the high-performance liquid chromatography determination of oxcarbazepine and its active metabolite monohydroxycarbazepine in human plasma. **Therapeutic Drug Monitoring**, Pavia, v. 29, n° 3, p. 319-324, 2007.
- MAY, T.W.; KORN-MERKER, E.;RAMBECK, B. Clinical pharmacokinetics of Oxcarbazepine. **Clinical Pharmacokinetcs**, Kingston, v.42, n°12, p.1023-1042, 2003.
- Mc GEAGH, J. D.; RANAGHAN, K.; MULHOLLAND, A. J. E. Protein dynamics and enzyme catalysis: Insights from simulations. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdan, v.1814, n°8, p. 1077-1092, 2011.
- MEHANNA, R.; HUNTER, C.; DAVIDSON, A.; JIMENEZ-SHAHED, J.; JANKOVIC, J. Analysis of CYP2D6 genotype and response to tetrabenazine. **Movement Disorder**, Houston, v.28, n°2, p. 210-215, 2013.

- MEHVAR, R.; JAMALI, F.; WATSON, M. W.; SKELTON, D. Pharmacokinetics of tetrabenazine and its major metabolite in man and rat. Bioavailability and dose dependency studies. **Drug Metabolism and Disposition**, Kansas city, v. 15, n°2, p. 250-255, 1987.
- MULHOLLAND, M.; HIBBERT, D. B. Linearity and the limitations of least squares calibration. **Journal of Chromatography A**, Amsterdan, v.762, n°1-2, p.73-82, 1997.
- NATARAJAN, R.; BASAK, S. C.; Numerical Descriptors for the characterization of chiral compounds and their applications in modeling biological and toxicological activities. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Netherlands, v.11 (7), p.771-787, 2011.
- NELSON, R. J., BURGI, D. S., in: LANDERS, J. P. (Ed.). Temperature control in capillary electrophoresis, **Handbook of Capillary Electrophoresis**, CRC Press, Boca Raton, p. 549-562, 1994.
- NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C. P. B.; LUCCI, P.; BUSQUETS, R. State-of-the-art in fast liquid chromatography-mass spectrometry for bio-analytical applications. **Journal of Chromatography B,** Malden, v.927, n°15, p.3–21, 2013.
- OBACH, R. S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, Kansas city, v. 27, n°11, p. 1350-1359, 1999.
- OBACH, R. S. Predicting Clearance in Humans from In Vitro Data. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Doylestown, v.11, n°4, p. 334-339, 2011.
- OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; BELLO-LÓPEZ, M., RAMOS-PAYÁN, M. New developments in microextraction techniques in bioanalysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdan, v.905 p.8-23, 2016.
- OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharides derivates for chromatography separation of enantiomers. **Angewandte Chemie International Edition**, Wheinheim, v.37, n° 8, p.1020-1043, 1998.
- PARSHIKOV, J. A.; WOODLING, K. A.; SUTHERLAND, J. B. Biotransformation of organic compounds mediated by cultures of Aspergillus niger. **Applied Microbiology and Biothechology**, Berlin, v.99, p.6971-6986, 2015.
- PAWLISYN, J.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends. **Journal of Chromatographic Science**, Washington, v.44, p.291-307, 2006.

- PEDERSEN-BJERGAARD, S; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, London, v.71, n°14, p.2650-2656, 1999.
- PEDERSEN-BJERGAARD, S; RASMUSSEN K. E. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids. **Journal of Chromatography A,** Amsterdan, v.1109, p. 183-190, 2006.
- PELKONEN, O.; KALTIALA, E. H.; LARMI, T. K.; KÄRKI, N. T. Cytochrome P450 linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes. **Chemico- Biological Interactions**, East Park Shannon, v.9, n°3, p. 205–216, 1974.
- PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n° 1, p. 171-177, 2007.
- POULIN, P.; KENNY, J. R.; HOP, H. C.; HADDAD, S. In vitro-in vivo extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. **Journal of Pharmaceutical Science**, Queensland, v. 101, n°2, p. 838-851, 2012.
- PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v.22, n°9, p. 565-574, 2003.
- QIU, H. D.; LIANG, X. J.; SUN, M.; JIANG, S. X. Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Washington, v.399, n°10, p.3307-3322, 2011.
- RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fiber-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v.23, n°1, p.1-10, 2004.
- REMKO, M.; REMKOVÁ, A.; BROER, R. A comparative study of molecular structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption and polar surface are of some antiplatelet drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, Bratislava, v.17, n°3, p.388-390, 2016.
- REZAEE, M.; ASSAD, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdan, v.1116, n°1-2, p.1-9, 2006.
- REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p.2342-2357, 2010.

- RISTECEVIC, S.; LORD, H.; GÓRECKI, T.; ARTHUR, L. C.; PAWLISYN, J. Protocol for solid-phase microextraction method development. **Nature Protocols**, New York, v.5, n°1, p.122-139, 2010.
- ROBERTS, M. S.; McLEAN, S.; MILLINGEN, K. S.; GALLOWAY, H. M. The pharmacokinetics of tetrabenazine and its hydroxy metabolite in patients treated for involuntary movement disorders. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Dublin, v. 29, n°6, p. 703-708, 1986.
- SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **Trac-trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v.29, n°1, p. 1-14, 2010.
- SCHERMAN, D.; HENRY, J. P. Acido-basic properties of the catecholamine uptake inhibitors tetrabenazine and dihydrotetrabenazine. **Biochimie**, Paris, v.64, n° 10, p.915-921, 1982.
- SCHMIDT, D.; ELGER, C. E. What is the evidence that oxcarbazepine and carbamazepine are distinctly different antiepileptic drugs? **Epilepsy & Behavior**, Boston, v.5, n°5, p.627-635, 2004.
- SCHWANINGER, M.; RINGLEB, P.; ANNECKE, A.; WINTER, R.; KOHL, B.; WERLE, E.; FIEHN, W.; RIESER, P.; WALTER-SACK, I.. Elevated Plasma Concentrations of lipoprotein(a) in medicated epileptic patients. **Journal of Neurology**, Cambrigde, v.247, p.687-690, 2000.
- SCOTT, S. A.; SANGKUHL, K.; GARDNER, E. E.; STEIN, C. M.; HULOT, J. S.; JOHNSON, J. A.; RODEN, D. M.; KLEIN, T. E.; SHULDINER, A. R. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy. **Clinical Pharmacoly and Therapeutics**, New York, v. 90, n°2, p. 328-332, 2011.
- SCRIBA, G. K. E. Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences. **Chromatographia**, Heidelberg v. 75, p.815–838, 2012.
- SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Different Enzyme Kinetics Models, cap. 3, In: **Enzyme Kinetics in Drug metabolism: Fundamentals and Applications**, NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. Editors, Cambrigde, MA, USA. Springer Science Business Meddia, 2014.
- SHORVON, S. Oxcarbazepine: a Review. **Seizure**, Philadelphia, v.9, n°2, p.75-79, 2000.
- SMITH, S. W. Chiral Toxicology: It's the same thing...Only different. **Toxicological Sciences**, New York, Cary v.110, n°1, p.4-30, 2009.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Completing the method validation and transfer. In: **Practical CLAE method development (2ed.)**, John Wiley & Sons, Inc., Cap.15, New York, p.685-713, 2012.

- SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A.; Efficient asymmetric hydrogenation of the C–C double bond of 2-methyland 2,3-dimethyl-N-phenylalkylmaleimides by Aspergillus fumigatus. **Tetrahedron: Asymmetry**, Philadelphia, v.21, p.535-539, 2010.
- SOUZA-SILVA, E. A.; PAWLISZYN, J. Direct Immersion Solid-Phase Microextraction with Matrix-Compatible Fiber Coating for Multiresidue Pesticide Analysis of Grapes by Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (DI-SPME-GC-ToFMS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, München, v.63, n°18, p. 4464-4477, 2015.
- SUBRAMANIAN, M.; TRACY, T. Methods for Determination of Enzyme Kinetics and Metabolic Rates. In: LYUBIMOV, A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**, New York: John Wiley & Sons, cap. 9, p.1-22, 2012.
- SUPELCO. Ficha de dados. **SPME LC Fiber probes**, cat. N°57281-U, Supelco, Bellefonte, PA, EUA, 2010.
- TAKAHASHI, H.; KASHIMA, T.; KIMURA, S.; MURATA, N.; TAKABA, T.; IWADE, K., ABE, T.; TAINAKA, H.; YASUMORI, T.; ECHIZEN, A. H.. Pharmacokinetic interaction between warfarin and a uricosuric agent, bucolome: Application of in vitro approaches to predicting in vivo reduction of (S)-warfarin clearance. **Drug Metabolism and Disposition**, Kansas city, v. 27, n°10, p. 1179-1186, 1999.
- TESTA, B. Types of stereoselectivity in drug metabolism: a heuristic approach. **Drug Metabolism Reviews, London**, v. 47, n°2, p. 239-251, 2015.
- TRACY, T. S.; KORZEKWA, K. R.; GONZALEZ, F. J.; WAINER, I. W. Cytochrome P450 isoforms involved in metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil. **British Journal of Clinical Pharmacoly**, London, v. 47, n°5, p. 545-552, 1999.
- TURNER, N. J.; CARR, R. In: **Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries**, Patel, R. N. Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, Fla, USA, p.743-755, 2007.
- VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Human drug metabolism and cytochromes P450: Application and relevance of in vitro models. **Journal of Clinical Pharmacology**, Boston, v.41, p. 1149-1179, 2001.
- VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n°2, pg. 360-368, 2008.
- VOLOSOV, A.; XIAODONG, S.; PERUCCA, E.; YAGEN, B.; SINTOV, A.; BIALER, M. Enantioselective pharmacokinetics of 10-hydroxycarbazepine after

oral administration of oxcarbazepina to healthy Chinese subjects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, New York, v. 66, p.547-553, 1999. VUCKOVIC, D.; SHIREY, R., CHEN, Y.; SIDISKY, L.; AURAND, C.; STENERSON, K.; PAWLISZYN, J. In vitro evaluation of new biocompatible coatings for solid-phase microextraction: ImpLications for drug analysis in vivo sampling appLications. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.638, p.175, 2009

WANG, F.; HAN, J.; YEUNG, D.; SEMIN, D.; CHEETHAM, J. Effect of column temperature on enantioseparation of dihydropyrimidinones using alcohol solvated Chiralpak AS and AS-H column. **Journal of Separation Science**, v.31, n°6, Wheiheim p.1027-1033, 2008.

WEINBERGER, R. Capillary zone electrophoresis: Basics concepts. In: _____. Practical Capillary Electrophoresis. 2. Ed. New York: Academic Press, 1999. Capítulo 2, p. 25-71.

WETLI, H. A.; FRANCOTTE, E. Automated screening platform with isochronal-parallel analysis and conditioning for rapid method development of chiral separations. **Journal of Separation Science**, Wheiheim, v. 30, n° 9, p.1255–1261, 2007.

WILK-ZASADNA, I.; BERNASCONI, C.; PELKONEN, O.; COECKE, S. Biotransformation in vitro: An essential consideration in the quantitative in vitro-to-in vivo extrapolation (QIVIVE) of toxicity data. **Toxicology**, New York, v. 332, p. 8-19, 2015.

YAMAMOTO, C.; INAGAKI, S.; OKAMOTO, Y. Enantioseparation using alkoxyphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, Wheiheim, v.29, n° 6, p.915–923, 2006.

YEO, K. R.; JAMEI, M.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. Predicting drug-drug interactions: application of physiologically based pharmacokinetic models under a systems biology approach. **Expert Review of Clinical Pharmacoly**, New York, v. 6, n°2, p. 143-157, Mar 2013.

YOUNES, A. A.; ATES, H.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y. V. A separations strategy combining three HPLC modes and polysaccharide-based chiral stationary phases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** Oxford, v.75, n°5, p.74–85, 2013.