# 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.
  - 2. Análise enantiosseletiva. 3. 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	
Instituição:	
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 de 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<sup>-1</sup> 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 líquidolíquido 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 cinqulata (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 diastereo- e 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 cisdiHTBZ. As espécies Glomerella cingulata (VA1), Mucor rouxii, e Beuveria bassiana diastereoisomericamente 7159), metabolizaram 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  $\beta$ -cyclodextrin (P- $\beta$ -CD) 1% (w/v) as the chiral selector in tris-phosphate 10 mmol L<sup>-1</sup> 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 trisphosphate buffer solution 80 mmol L<sup>-1</sup> 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 diastereo- and 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 studies procedure. Preliminary biotransformation TBZ demonstrated 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 cinqulata (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 –	Separação da OXC e dos enantiômeros da LIC empregando como fase móvel hexano:etanol:isopropanol na proporção de 80:10:10 (v/v/v) + 2% de HAc e uma vazão de 1 mL min <sup>-1</sup> . 1) LIC (E1): 2) LIC (E2): 23 OXC Para a 1.06 : Para a 1.69	50
Figura 8 –	(E1); 2) LIC (E2) e 3) OXC. Rs 1 e 2 = 1,96; Rs 2 e 3 = 1,68 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	59 60
Figura 9 –	Separação da OXC e dos enantiômeros da LIC por eletroforese capilar. Capilar de sílica de 20 cm de comprimento efetivo, 75 $\mu$ 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% $\beta$ -CD-fosfatada sódica; detecção em 215 nm. 1) OXC; 2) ( <i>S</i> )-(+)-LIC e3) ( <i>R</i> )-(-)-LIC. Rs <sub>1 e 2</sub> =2,34; Rs <sub>2 e 3</sub> = 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 <sup>-1</sup> de cada analito. $n$ = 3. E1 =	0.7
Figura 11 –	primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir 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 µg mL-1 de cada analito. $n = 3$ . E1 =	67
	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 ( <i>m/v</i> ). Dessorção na fase móvel hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, v/v/v) + 2% HAc a 25°C por 5 minutos. Concentração 25 um ml 1 do cado apolito no 2	69
Figura 13 –	25 μg mL <sup>-1</sup> de cada analito. $n = 3$ Efeito do tempo de extração na recuperação da OXC e dos enantiômeros de seu metabólito LIC em meio de cultura líquido 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 <sup>-1</sup> + 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 <sup>-1</sup> 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 <sup>-1</sup> (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 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> de cada analito. $n = 3$ . E1 = primeiro enantiômero a eluir.	71
Figura 15 –	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 <sup>-1</sup> (pH final superior a 13,0). 50 $\mu$ L de solvente extrator clorofórmio e 500 $\mu$ L de cada solvente dispersor. $n=3$ . E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.	71
Figura 16 –	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 $\mu$ L de solvente dispersor <b>acetona</b> e 50 $\mu$ L de cada solvente extrator. Extração em 25°C. $n = 3$ . E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.	75
Figura 17 –	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 $\mu$ L de solvente extrator (clorofórmio). Temperatura de extração a 25°C, $n = 3$ . E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	76
Figura 18 –	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 $\mu$ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. $n=3$ . E1 = primeiro	
	enantiômero a eluir F2 = segundo enantiômero a eluir	77

Figura19 –	Estrutura química da risperidona, padrão interno utilizado na validação do método	79
Figura 20 –	Eletroferograma representativo após a biotransformação da OXC	13
Figura 21 –	com o fungo VA1 após 360 h de incubação (A). Eletroferograma representativo do meio Czapek (controle) incubado com o fungo VA1 mostrando que o fungo não 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
Figura 22 –	(3) (S)-(+)-LIC e (4) (R)-(-)-LIC Eletroferograma correspondente a separação dos metabólitos diHTBZ, picos <b>1 e 2</b> correspondem aos enantiômeros da <i>trans</i> - diHTBZ e picos <b>3 e 4</b> correspondem aos enantiômeros da <i>cis</i> -	84
Figura 23 –	diHTBZ 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 <sup>-1</sup> e temperatura de 25°C	107 108
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 <sup>-1</sup> . Solvente extrator: clorofórmio (50 μL). Solvente dispersor: 100 μL de cada solvente dispersor. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar	110
Figura 25 –	Efeito do tipo de solvente extrator na recuperação dos enantiômeros da diHTBZ em meio microssomal. Volume da matriz: 200 $\mu$ L do meio microssomal, 800 $\mu$ L de solução tampão fosfato pH 12, 500 mmol L-1. Solvente dispersor: acetona (100 $\mu$ L) e 50 $\mu$ L 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). Temperatura de extração em 25°C. E1 = primeiro enantiômero a migrar. E2 = segundo enantiômero a migrar.	111

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 <sup>-1</sup> , 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.	113
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);	
Figura 29 –	agitação no vórtex por 10 s após a formação do ponto 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	114
Figura 30 –	experimentos foram realizados em triplicata	119
Figura 31 –	Perfil cinético das enzimas microssomais frente à <i>rac</i> -TBZ obtido pelo monitoramento da formação da <i>trans</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.	120
Figura 32 –	Perfil cinético das enzimas microssomais frente à <i>rac</i> -TBZ obtido pelo monitoramento da formação da <i>trans</i> -diHTBZ (E2). 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 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) cis-diHTBZ(E1). B)	
	Eletroferograma do branco de microssoma humano. Condições	
	de extração descrita na Figura 29. Condições de análise descrita	
	na Figura 23	124
Figura 35 –	Efeito da inibição das principais isoformas da CYP com inibidores	
	químicos seletivos sobre o metabolismo da TBZ, monitorado pela	
	formação de trans-diHTBZ (E1) em microssomas hepático	
	humanos	129
Figura 36 –	Efeito da inibição das principais isoformas da CYP com inibidores	
_	químicos seletivos sobre o metabolismo da TBZ, monitorado pela	
	formação de trans-diHTBZ (E2) em microssomas hepático	
	humanos	129
Figura 37 –	Efeito da inibição das principais isoformas da CYP com inibidores	
	químicos seletivos sobre o metabolismo da TBZ, monitorado pela	
	formação de cis-diHTBZ (E1) em microssomas hepático	
	humanos	130
Figura 38 –	Enzimas envolvidas na rota de eliminação da TBZ pelo fígado	131
Figura 39 –	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 µL de solvente extrator clorofórmio e 200 µL de cada	
	solvente dispersor. $n = 3$ . E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 =	
	segundo enantiômero a eluir	147
Figura 40 –	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 <sup>-1</sup> (pH 7,0), 200 μL de solvente dispersor <b>acetona</b> e	
	50 μL de cada solvente extrator. Extração em 25°C. $n = 3$ . E1 =	
	primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	148
Figura 41 –	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 µL de solvente extrator	
	(diclorometano). Temperatura de extração a 25°C, $n = 3$ . E1 =	
	primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	149
Figura 42 –	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 <sup>-1</sup> (pH 7,0) volume	
	de solvente dispersor 150 µL e volume de solvente extrator	
	variável. Extração a 25°C. $n = 3$ . E1 = primeiro enantiômero a	
	eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	150

Figura 43 –	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 $\mu$ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. $n = 3$ . E1 = primeiro	
Figura 44 –	enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	151
Figura 45 –	enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir	152
Figura 46 –	diHTBZ(E1) e <b>(6)</b> <i>cis</i> -diHTBZ(E2). <b>B)</b> Branco do meio de cultura Czapek nas mesmas condições eletroforéticas	153
Figura 47 –	Eletroferograma representativo após a biotransformação da TBZ com o fungo <i>Chaetomiun globosum</i> (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-diHTBZ(E2).	161

Figura 48 –	Eletroferograma representativo após a biotransformação da TBZ com o fungo <i>Beuveria bassiana</i> (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	404
Figura 49 –	componentes endógenos não foram identificados	161
	diHTBZ(E2)	162

## LISTA DE TABELAS

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-diHTBZ	84
Tabela 9 –	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 microssomal	116 117
Tabela 12 –	Parâmetros enzimáticos obtidos para cada enantiômero dos metabólitos da TBZ	124
Tabela 13 –	Parâmetros farmacocinéticos preditos para a TBZ calculados a partir dos dados obtidos monitorando-se os enantiômeros da diHTBZ no estudo de metabolismo in vitro com microssomas	
Tabela 14 –	hepáticos humanos Limite de quantificação e linearidade do método para análise dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido	127 154
Tabela 15 –	Precisão e exatidão intraensaio para análise dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido	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
CD Ciclodextrina

CFS Cromatografia de fluido supercrítico

CG Cromatografia gasosa

CLAE Cromatografia líquida de Alta Eficiência

CLClearance in vivoCLHClearance hepáticoCLintClearance intrínsecoCMConcentração média

CYP Citocromo

d.i. Diâmetro interno

Di HTBZ Di idroxitetrabenazina

DLLME Microextração líquido-líquido dispersiva

DP Desvio padrão

DPR Desvio padrão relativo

E Taxa de extração hepática

EC Eletroforese capilar

ECC Eletrocromatografia capilar

Fe Fração enantiomérica

EM Espectrometria de massas
EMA "European Medice Agency"

ER Erro relativo

FDA "Food and Drug Administration"

FEQ Fase estacionária quiral

Flivre Fração de proteínas não ligadas

f<sub>umic</sub> Fração livre do substrato na incubação microssomal

f<sub>up</sub> Fração livre do substrato no plasma

GST Glutationa S-transferase

HF-LPME Microextração líquida empregando membranas cilíndricas ocas

HLMs Microssomas hepático de humanos IC<sub>50</sub> Medida da inibição do substrato

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

inibitório da enzima

K<sub>m</sub> Constante de Michaelis-Menten

Ks 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 substratoSPE Extração em fase sólida

SPME Microextração em fase sólida

ST Sulfotransferase
TBZ Tetrabenazina
TEA Trietilamina

TFA Ácido trifluoroacético t<sub>R</sub> Tempo de retenção

UGT Uridina difosfoglucuronosil transferase
VMAT2 Transportador vesicular monoamina

V<sub>máx</sub> Velocidade inicial máxima

 $V_0$  Velocidade inicial  $V_0$  Concentração inicial

W<sub>b</sub> Largura da base do pico cromatográfico

## **SUMÁRIO**

#### Resumo

**Abstract** 

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

## CAPÍTULO 1:

## Revisão Bibliográfica

1.	Pre	paro de amostras	2
1.1.	Téc	cnicas 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.	Fár	macos quirais	16
2.1.	Fár	macos selecionados para o projeto	17
2.1.	1.	Oxcarbazepina	17
2.1.	2.	Tetrabenazina	19
3.	Aná	álise enantiosseletiva	21
3.1.	. Aná	álise enantiosseletiva por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	22
3.1.	1.	Fases estacionárias quirais em CLAE	24
3.2.	. Aná	álise enantiosseletiva por Eletroforese Capilar (EC)	26
3.2.	1.	Ciclodextrinas	28
4.	Est	udos de Metabolismo in vitro	30
4.1.	Mic	rossomas hepático	31
4.2.	Cin	ética enzimática	32
5.	Bio	transformação empregando fungos	33
5.1.	Bio	transformação enantiosseletiva empregando fungos	34
6.	Val	idação de métodos para análise em matrizes biológicas	35
6.1.	Line	earidade	36
6.2.	Lim	ite de quantificação	37
6.3.	Pre	cisão	37
6.4.	Exa	atidão	38
6.5.	Est	abilidade	39

## **CAPÍTULO 2:**

	Biotransformação estereosseletiva da Oxcarbazepina empregando fungos
1. INTF	RODUÇÃO
<b>2.</b> OBJ	IETIVO
<b>2.1.</b> Ge	ral
<b>2.2.</b> Esp	pecífico
<b>3.</b> MA	TERIAIS E MÉTODOS
<b>3.1.</b> Eq	uipamentos de análise e acessórios gerais
	agentes e solvente utilizados na preparação das fases móveis e nos procedimentos de ração
<b>3.3.</b> Co	lunas quirais e procedimento de análise por CLAE
<b>3.4.</b> Sol	uções-padrão
<b>3.5.</b> Sol	uções-tampão
<b>3.6.</b> Cio	lodextrinas e procedimento de análise por EC
<b>3.7.</b> Pre	eparo dos meios de cultura: PDA, Malte e Czapek; fungos utilizados e procedimento de
bio	transformação
<b>3.8.</b> SP	ME
3.9. HF	-LPME
3.10.	DLLME
3.11.	Extração Líquido-líquido (LLE)
3.12.	Ordem de migração dos enantiômeros da LIC
3.13.	Validação da metodologia analítica
<b>4.</b> RE	SULTADOS E DISCUSSÃO
<b>4.1.</b> Oti	mização das condições de separação da OXC e LIC por CLAE
<b>4.2.</b> Oti	mização das condições de separação da OXC e LIC por EC
<b>4.3.</b> Ava	aliação das técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na extração da OXC e LIC
	meio Czapek
4.3.1.	SPME
4.3.2.	HF-LPME
4.3.3.	DLLME
<b>4.4.</b> Ext	ração líquido-líquido
<b>4.5.</b> Val	idação da metodologia analítica para análise da OXC e enantiômeros da LIC em meio de
	tura Czapek
<b>4.6.</b> Bio	transformação estereosseletiva da OXC empregando fungos
5 CC	NCLUSÕES

	Metabolismo in vitro da TBZ empregando microssomas hepático de humanos
1. IN	FRODUÇÃO
<b>2.</b> OF	BJETIVO
<b>2.1</b> . G	Geral
<b>2.2.</b> E	specífico
<b>3.</b> N	MATERIAIS E MÉTODOS
<b>3.1</b> . E	quipamentos de análise e acessórios gerais
<b>3.2.</b> R	leagentes e solventes utilizados na preparação das fases móveis, no preparo do meio
m	nicrossomal e nos procedimentos de extração
<b>3.3.</b> C	Colunas quirais e procedimento de análise por CLAE
<b>3.4.</b> P	rocedimento de análise por EC
<b>3.5.</b> P	reparo do meio microssomal
<b>3.6.</b> P	rograma empregado na determinação da cinética enzimática
<b>3.7.</b> S	PME
<b>3.8.</b> H	IF-LPME
<b>3.9.</b> D	PLLME
3.10.	Validação do método analítico
3.11.	Procedimento de incubação para o estudo de metabolismo in vitro
3.12.	Procedimento para determinação da cinética enzimática da TBZ
3.13.	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 CYP
<b>4.</b> R	RESULTADOS E DISCUSSÃO
<b>4.1</b> . C	Otimização da separação eletroforética dos metabólitos da TBZ
<b>4.2</b> . S	Separação dos enantiômeros da TBZ por CLAE
<b>4.3.</b> C	Otimização da SPME e HF-LPME
<b>4.4.</b> C	Otimização da DLLME
<b>4.5</b> . ∨	'alidação do método
<b>4.6.</b> N	Metabolismo enantiosseletivo in vitro da TBZ e determinação dos parâmetros enzimáticos
<b>4.7.</b> L	igação às proteínas microssomais e plasmáticas
<b>4.8.</b> E	xtrapolação in vitro-in vivo (EIVIV)
	Peterminação das isoformas da CYP responsáveis pela produção dos enantiômeros da iHTBZ
<b>5.</b> C	ONCLUSÕES

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

1. II	NTRODUÇÃO	135
2. (	OBJETIVO	135
2.1.	Geral	135
2.2.	Específico	135
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	136
3.1.	Equipamentos de análise e acessórios gerais	136
3.2.	Soluções-padrão e reagentes utilizados no preparo das soluções tampão e nas técnicas 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 procedimento 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 extração 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 diHTBZ em	
	meio de cultura líquido Czapek	153
4.4.	Biotransformação estereosseletiva da TBZ empregando fungos	158
5.	CONCLUSÃO	162
REI	FERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

#### 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

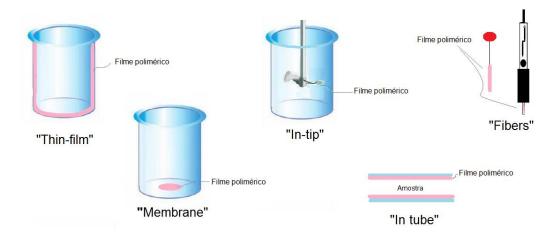
As técnicas de preparação de amostras miniaturizadas vêm sendo empregadas com o intuito de reduzir o tempo de trabalho envolvido e o consumo de solventes orgânicos no processo de extração. Neste contexto, podemos citar três das inúmeras possibilidades de miniaturização de técnicas de preparação de amostras, 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 líquidolíquido 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, obtendose 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 físico-químicas 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 (PEDERSEN-BJERGAARD: microsseringas suas extremidades em 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 o emprego da 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 nãosobreponíveis 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, ainda não há no Brasil, exigências de 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 são 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).

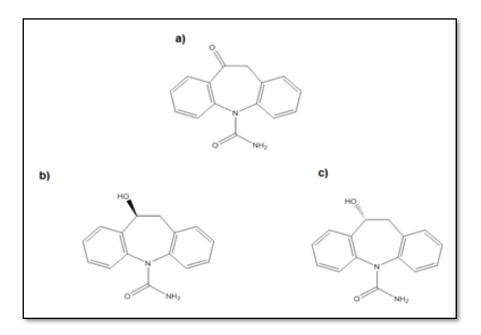
# 2.1. FÁRMACOS SELECIONADOS PARA O PROJETO

#### 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 (BRÂMSWIG 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 pré-sistêmico da OXC é rápido e inclui uma reação de redução mediada pela enzima citosólica hepática aril cetona redutase, resultando na formação do metabólito quiral 10-hidroxi-10,11diidrocarbamazepina (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 redutí opamina 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  $\stackrel{\text{KR}}{\leftrightarrows}$   $[(R) - A ... (R) - S]$  (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...(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  $\pi$ - $\pi$ . Além delas, fatores estéricos de ajustes ou não-ajustes do soluto em uma cavidade ou fenda do seletor quiral contribuem para o reconhecimento quiral (NÚÑEZ 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: Exemplos de fases estacionárias baseadas em polissacarídeos.

Tabela 1.

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 <sup>®</sup> , Chiralcel OJ-R <sup>®</sup> , Chiralcel OJ-H <sup>®</sup>	
	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 <sup>®</sup> , Chiralpak AD-H <sup>®</sup> , Chiralpak AD-R <sup>®</sup>	
	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.

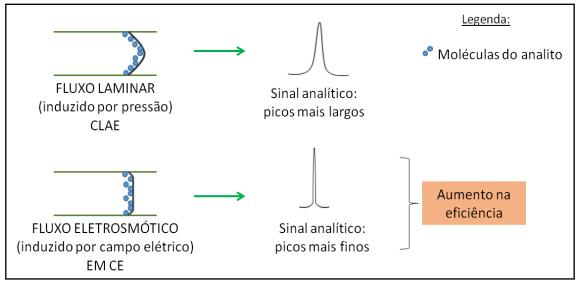


Figura 5 – Comparação da eficiência analítica típicas de CLAE e EC. Fonte: autoria própria

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 variedade de ciclodextrinas modificadas são produzidas através de 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 γ, 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).

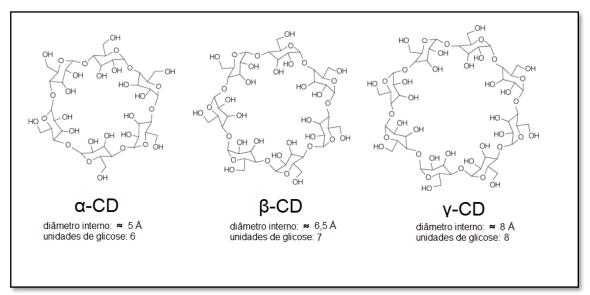


Figura 6 – Tipos e especificações das ciclodextrinas nativas. Fonte: autoria própria

Geralmente diversos tipos de interações estão relacionados na separação enantiosseletiva de um analito. Assim como em CLAE, interações do tipo dipolodipolo, 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  $V_{\text{max}}$ , e  $K_{\text{m}}$  (constante de Michaelis-Menten) a concentração de substrato, quando  $V_0$  é igual à metade de  $V_{\text{max}}$  (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 podem apresentar variâncias diferentes para as diferentes 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**):

$$ER = 100 \text{ x} \frac{Concentração experimental - concentração nominal}{Concentração nominal}$$
 (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. OBJETIVO

#### **2.1. GERAL**

O objetivo geral desta etapa do trabalho foi avaliar a eficiência das microtécnicas de preparação de amostras: SPME, HF-LPME e DLLME em extrair os analitos OXC e LIC do meio de cultura liquido para posterior aplicação em estudos de biotransformação da OXC por fungos.

### 2.2. ESPECÍFICO

Os objetivos específicos foram:

- i) Desenvolver um método enantiosseletivo para análise simultânea da OXC e LIC empregando EC ou CLAE.
- ii) Avaliar a eficiência das microtécnicas de preparação de amostras: SPME, HF-LPME e DLLME em extrair os analitos OXC e LIC do meio de cultura.
- iii) Aplicar o método de análise desenvolvido e a técnica de preparação de amostras mais adequada nos estudos de biotransformação da OXC empregando fungos como agentes catalisadores.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1. EQUIPAMENTOS DE ANÁLISE E ACESSÓRIOS GERAIS

Para a otimização da separação da OXC e seu metabólito LIC por CLAE foi empregado um equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por duas bombas LC 10AS, um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD 10A operando em 235 nm, um forno para coluna modelo CTO 10AS, e um injetor Rheodyne modelo 7125 com amostrador de 50 μL. Os dados foram monitorados usando uma controladora modelo SCL 10A e o software utilizado para aquisição dos dados foi o Class-VP (Shimadzu). Para a otimização da separação da OXC

e seu metabólito LIC por EC foi empregado um equipamento da marca Beckman Coulter, modelo P/ACE MDQ (Fullerton, CA, EUA), contendo um analisador de dados 32 Karat®, injetor automático e detector de arranjo de diodos. Capilares de sílica fundida revestido com poliimida da Polymicro (Phoenix, AZ, EUA) com 75 µm de diâmetro interno (d.i) e com comprimentos efetivos variáveis foram empregados para na otimização da separação dos analitos.

No preparo das soluções-padrão empregou-se balança analítica Sartorius AG Germany modelo CP225D (Sartorius, Santo André, SP, Brasil) e agitador de soluções modelo AP56 (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) que também foi utilizado para a homogeneização das amostras no processo de microextração. Para medida do pH das soluções-tampão foi utilizado um peagômetro Orion modelo 420A+ da Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, EUA). Um sistema Direct-Q 3 UV Ultrapure Water Systems® - Millipore (Bedford, MA, EUA) forneceu água purificada para o preparo das amostras analisadas por eletroforese capilar e também para o preparo das soluções-tampão.

# 3.2. REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS E NOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Os reagentes utilizados (grau CLAE) foram: acetonitrila, isopropanol, clorofórmio, hexano, acetato de etila, etanol, metil-terc-butil éter e metanol obtidos da Panreac (Castellar Del Vallès, Barcelona, Espanha). Tetracloreto de carbono obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e 1,1-dicloroetano obtido da Fluka (Buchs, Suíça). Ácido acético glacial, ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e ácido trifluoroacético (TFA) foram obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil); trietilamina (TEA), éter diexílico, éter dibutílico, acetato de butila e octanol foram

obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). As soluções empregadas como fase móvel foram preparadas por simples misturas dos componentes (metanol, acetonitrila, etanol, isopropanol para o modo polar orgânico e hexano, isopropanol e etanol no modo fase normal) com posterior homogeneização. Os aditivos orgânicos trietilamina, ácido acético e ácido trifluoroacético foram adicionados na fase móvel com o objetivo de melhorar a simetria dos picos e a resolução em porcentagens dentro dos parâmetros preconizados para cada tipo específico de coluna de modo a não ocorrer danos ocasionados por excesso destes aditivos.

### 3.3. COLUNAS QUIRAIS E PROCEDIMENTO DE ANÁLISE POR CLAE

Para separação dos enantiômeros do metabólito LIC, oito tipos de colunas quirais foram avaliadas, dentre elas, as colunas derivadas de celulose: Coluna Chiralcel OD-H<sup>®</sup> (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 μm de d.i.; Coluna Chiralcel OJ<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado *tris*(4-metilbenzoato) recobrindo partículas de sílica de 10 μm de d.i.; Coluna Lux 5μ Cellulose-2 (150 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA) constituída pelo derivado 3-cloro-4-metilfenilcarbamato quimicamente ligados a partículas de sílica de 5 μm de d.i. e a Coluna Chiralcel OD-R<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 μm de d.i.. As colunas derivadas de amilose foram: Coluna Chiralpak AD<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado de amilose tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo

partículas de sílica de 10 μm de d.i.; Coluna Chiralpak AD-RH® (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado de amilose *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 μm de d.i.; Coluna Chiralpak AD-H® (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de amilose *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 μm de d.i. e a Coluna Lux 5μ Amylose-2 (150 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA) constituída pelo derivado *tris*(5-cloro-2-metilfenilcarbamato) quimicamente ligados a partículas de sílica de 5 μm de diâmetro interno.

Em todos os experimentos realizados foi empregado uma coluna de guarda C18 (4,6 x 12,5 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) com partículas de sílica de 5 µm de d.i.

A avaliação da separação dos analitos foi realizada injetando as soluções-padrão solubilizadas em 100  $\mu$ L da fase móvel (25  $\mu$ L de cada analito em uma concentração de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). O parâmetro usado para avaliação da separação foi a resolução (Rs), calculada segundo a **Equação 7** (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 2012):

$$Rs = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \tag{7}$$

Onde,  $t_{R2}$  é o tempo de retenção do analito mais retido, e  $t_{R1}$  do menos retido.  $w_{b1}$  e  $w_{b2}$  são as respectivas larguras das bases dos picos, calculadas pelo método da tangente.

A vazão da fase móvel empregada foi ajustada conforme a viscosidade da mesma, respeitando a pressão máxima permitida para cada tipo de coluna, resolução entre os analitos e tempo de análise. As análises foram efetuadas à temperatura ambiente.

# 3.4. SOLUÇÕES-PADRÃO

A OXC e seu metabólito LIC foram adquiridos da Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá). Soluções padrão da OXC e do racemato da LIC foram preparadas em metanol individualmente na concentração 100 μg mL-1 a partir de uma solução estoque de 1000 μg mL-1. Estas soluções foram utilizadas na otimização das condições de separação tanto por EC quanto por CLAE e também na otimização das técnicas de preparação de amostras. As soluções foram estocadas em tubos de vidro à –20°C, e assim, permaneceram estáveis por pelo menos seis meses.

## 3.5. SOLUÇÕES-TAMPÃO

Os reagentes, grau analítico, que foram utilizados no preparo das soluções-tampão e no procedimento de extração foram: fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato de sódio monobásico (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O), ácido bórico granular (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), borato de sódio decaidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O) e trishidroximetilaminometano (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) obtidos J.T. Baker (Edo de México, México). As soluções-tampão empregadas para a análise dos analitos por EC ou para serem utilizadas no procedimento de preparação de amostras foram preparadas nas concentrações desejadas e o pH foi ajustado com adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Para as soluções-tampão utilizadas em

EC, posteriormente foram adicionadas as ciclodextrinas nas concentrações desejadas. As soluções-tampão empregadas nas análises por EC foram previamente levadas por 5 minutos em ultrassom da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, SP, Brasil) e, posteriormente, filtradas.

#### 3.6. CICLODEXTRINAS E PROCEDIMENTO DE ANÁLISE POR EC

As ciclodextrinas (CD) utilizadas no processo de separação enantiosseletiva empregando EC foram:  $\beta$ -CD-fosfatada sódica adquirida da Cyclolab Ltda (Budapest, Pest, Hungria), CD- $\alpha$ -sulfatada, carboximetil- $\beta$ -CD sódica, (2-hidroxipropil)- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD-sulfatada sódica e  $\beta$ -CD adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

A avaliação da separação dos analitos foi realizada por injeção hidrodinâmica das soluções-padrão (25 μL de cada analito em uma concentração de 100 μg mL<sup>-1</sup>) solubilizadas em 150 μL de água ultrapura. Da mesma forma que para a avaliação da separação quiral por CLAE, a resolução dos analitos foi calculada através do emprego da **Equação 7**.

Em seu primeiro uso, um capilar de sílica fundida de 75 μm d.i. e 40 cm de comprimento efetivo foi condicionado percolando por ele uma solução de NaOH 1,0 mol L-1 por 10 min; NaOH 100 mmol L-1 por mais 10 min e posteriormente com água por mais 10 min. No início do dia, antes de iniciar as análises, o capilar era pré-condicionado lavando-o com solução de NaOH 100 mmol L-1 por 10 min e posteriormente com água ultrapura por mais 10 min. Entre as análises, o capilar é pré-condicionado com NaOH 100 mmol L-1 por 1 min, água ultrapura por 1 min e o eletrólito de análise por 2 min. Terminadas as

análises, o capilar é novamente lavado com solução de NaOH 100 mmol L-1 por 10 min e depois com água ultrapura por 10 min. Quando o capilar não estava sendo utilizado, ele foi preenchido com água e suas extremidades foram imersas em água até o outro dia de análise. Inicialmente, a avaliação da separação enantiosseletiva por EC foi realizada empregando uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L-1 pH 2,5 contendo 1,0% de CD (para ciclodextrinas carregadas: β-CD-fosfatada sódica, CD-α-sulfatada e β-CD-sulfatada sódica) ou 10 mmol L-1 de CD (ciclodextrinas neutras: carboximetil-β-CD sódica, (2-OHprop)-β-CD e β-CD) e os experimentos foram realizados em duplicata. As injeções foram realizadas empregando uma pressão 0,5 psi por 8 s. Nesta condição inicial, o capilar e as amostras permaneceram na temperatura de 20° C.

# 3.7. Preparo dos Meios de cultura: pda, malte e czapek; fungos utilizados e procedimento de biotransformação

Para o preparo do meio de cultura PDA foi utilizado o reagente *Potato Dextrose Agar* da Acumedia (Lansing, Michigan, EUA) na concentração de 39 g L-1. Após a pesagem deste reagente, completou-se o Erlenmeyer com quantidade necessária de água ultrapura para tantos quantos forem o número de placas de Petri a serem utilizadas nesta primeira etapa. Para o cálculo das quantidades, toma-se como necessário cerca 15 mL de meio para cada placa de Petri. Por fim, essa mistura é esterilizada em autoclave por cerca de 30 minutos, e, na capela de fluxo laminar, distribui-se 15 mL do meio em cada placa.

Para o meio Malte (pré-fermentativo) foram utilizados os reagentes: triptona (5,0 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (3,0 g L<sup>-1</sup>) e extrato de malte (10 g L<sup>-1</sup>)

todos da Acumedia (Lansing, Michigan, EUA) e dextrose (10 g L<sup>-1</sup>) da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, EUA) que foram previamente pesados e transferidos para um béquer. Posteriormente é adicionado água ultrapura no volume desejado desde que as concentrações em massa permaneçam as mesmas. Tal mistura gera uma solução líquida de pH próximo a 7,0 que é, então, corrigido para pH 6,2 utilizando-se ácido clorídrico 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, esse meio é também esterilizado em autoclave da mesma forma que para o meio PDA.

Para o preparo do meio de cultura líquido Czapek modificado foram utilizados os reagentes: sacarose (3%) da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, EUA); cloreto de potássio (0,05%), sulfato de magnésio heptaidratado (0,05%), fosfato de potássio (0,1%), sulfato de ferro heptaidratado (0,001%) todos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e, nitrato de sódio (0,2%) da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Em seguida, adiciona-se água ultrapura no volume desejado desde que as concentrações em massa permaneçam as mesmas. A mistura gera uma solução líquida de pH próximo de 8,0 que deve ser corrigido para pH 5,0 utilizando-se HCl 1,0 mol L-1. Da mesma forma que para os outros meios de cultura, esta mistura foi esterilizada em autoclave.

No desenvolvimento do processo de biotransformação da OXC foram utilizadas várias espécies de fungos. *Penicilium crustosum* (VR4), *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Fusarium oxysporum* (SS50), *Papulaspora immersa Hotson* (SS13) e *Nigrospora sphaerica E. W. Mason* (SS67), *Phomopsis sp* (TD2), *Glomerella cingulata* (VA1) e *Chaetomium globosum* (VR10). Esses fungos endofíticos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Monica T. Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Os fungos foram

cedidos na forma de "plugs de agar" e foram mantidos em meio de glicerol:água (8:2, v/v) a -20°C.

Os fungos *Cunninghamella elegans* (ATCC 8688-A), *Cunninghamella echinulata* (ATCC 10028-B) e *Beuveria bassiana* (ATCC 7159) foram adquiridos da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Universidade Boulevard, Manassas, VA, EUA).

O fungo *Mucor rouxii* foi cedido por cortesia do Dr. C. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, ARS, USDA, Peoria, IL, EUA) e pertence à coleção de culturas de fungos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. O micro-organismo foi conservado em uma suspensão de sílica gel (6-12 mesh, grade 40, dessecante ativo) na temperatura de 4°C e em "*slants*" constituídos por 0,4% de aveia e 1,8% de ágar (p/v). Esse micro-organismo está sob responsabilidade da Profa. Dra. Niege A. J. C. Furtado, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

No procedimento de biotransformação, inicialmente, empregando placas de Petri contendo o meio de cultura PDA, são empregados 3 repiques de fungos para cada espécie de fungo em estudo, em duplicata, e incubados a 30° C. Em seguida, após o crescimento dos fungos sobre a placa, três discos de 0,5 cm do meio de cultura com os fungos foram retirados com o auxílio de um tubo de transferência (*transfer tube*) e inoculados assepticamente em 10 mL de meio préfermentativo malte e em seguida colocados sob agitação de 120 rpm a uma temperatura de 30° C por 10 dias para o crescimento dos fungos. Na etapa seguinte, a massa micelial formada foi transferida assepticamente para 100 mL de meio Czapek juntamente com 3 mg da OXC. A incubação (30° C, 120 rpm)

foi realizada por 15 dias sendo que a cada 5 dias foi coletada uma alíquota de 4 mL do fluído da cultura assepticamente e armazenado a –20°C até o momento da análise. Paralelamente aos estudos de biotransformação foram realizados controles contendo: (i) somente o meio de cultura e o fármaco, (ii) somente o meio de cultura e o fungo sem o fármaco. Os resultados obtidos no processo de biotransformação foram expressos em termos de fração enantiomérica (*fe*), determinado pela **Equação 8** (EMBA; OLIVEIRA; DONNICI, 2003):

$$fe = (A-B/A+B) \times 100$$
 (8)

onde A é a concentração do enantiômero formado majoritariamente e B a concentração do outro enantiômero.

#### 3.8. **SPME**

Os acessórios empregados no procedimento de extração por SPME foram: fibras de SPME C18 com espessura de 45 µm da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA); um agitador Vibrax modelo VRX (IKA®, Staufen, Alemanha) e também uma centrífuga CF-15 (Hitachi Koki®, Kyoto, Japão) para a centrifugação das amostras contendo os fungos. Inicialmente, para avaliação do processo de extração, foram empregados 2 mL de meio de cultura Czapek, 2 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 na concentração de 500 mmol L-1 contendo 20 µL da OXC e do racemato da LIC na concentração de 100 µg mL-1 cada, totalizando um volume de 4 mL final. As fibras foram então mergulhadas nesta matriz e o frasco foi submetido à agitação no Vibrax a 1200 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, estas fibras foram recolhidas da amostra e

submetidas ao processo de dessorção em 100 µL da fase móvel. Os parâmetros otimizados foram: pH e força iônica da amostra, tempo de extração, tempo de dessorção, agitação do sistema, volume de matriz e *carryover*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em temperatura ambiente (25°C).

#### **3.9. HF-LPME**

Microponteiras da marca Sorenson Bioscience (Salt Lake City, UT, EUA) com 0,57 mm de diâmetro externo e 83 mm de comprimento foram usadas para a extração por HF-LPME. As extrações foram realizadas empregando uma membrana de 15 cm de comprimento com um diâmetro interno de 600 μm, espessura de 200 μm e tamanho de poros de 0,2 μm (Q3/2 Accurel PP, Membrana, Alemanha). Foi utilizada também uma microsseringa com capacidade para 100 μL da marca Hamilton, modelo 702SNR (Reno, NV, EUA) para a introdução e retirada para fase aceptora do interior da fibra. O tubo de extração era composto por 2 mL de meio de cultura Czapek e 2 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 100 mmol L-1 contendo 20 μL da OXC e do racemato da LIC, em concentração de 100 μg mL-1 cada, totalizando 4 mL de volume final. Os parâmetros otimizados foram: tipo de solvente orgânico, tempo de extração, pH da fase doadora e composição da fase aceptora. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em temperatura ambiente (25°C).

#### 3.10. DLLME

Para o preparo da amostra empregando a DLLME foi utilizado uma microsseringa de 1 mL obtida da Hamilton® (Bonaduz, Suíça) e tubos cônicos

transparentes com capacidade de 8 mL. As amostras foram agitadas em um vórtex da marca Phoenix e centrifugadas em uma centrífuga Himac CF16RXII.

Os solventes (grau CLAE) utilizados na otimização da DLLME foram: dispersores: acetonitrila, acetona, metanol, etanol, e extratores: diclorometano e clorofórmio, tetracloreto de carbono e 1,1-dicloroetano. O preparo de amostra foi realizado empregando 2 mL de meio de cultura liquido Czapek acrescido de 2 mL de NaOH 100 mmol L-1 afim de que o pH estivesse acima de 13,0, totalizando 4 mL de volume final adicionando 20 µL de cada analito estudado na concentração de 100 µg mL-1. Os parâmetros otimizados foram tipo e volume de solvente extrator e dispersor e tempo de agitação (DLLME assistida por vórtex). Todos os experimentos foram realizados em triplicata em temperatura ambiente (25°C).

### 3.11. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)

OXC e LIC foram também extraídas a partir do meio de cultura líquido empregando a extração líquido-líquido. Alíquotas de 2 mL do meio de cultura líquido enriquecidas com 20 µL de soluções-padrão de OXC, LIC, e do padrão interno (PI) foram transferidos para tubos de vidro de 10 mL, alcalinizada com 0,5 mL de uma solução de NaOH 0,1 mol L-1 adicionados de 20% (m/v) de NaCl. As amostras foram então submetidas a agitação em vórtex durante 15 s, e em seguida, 5 mL de metil-terc-butil-éter foram adicionados ao tubo. Os tubos foram vedados com tampa esmerilhada e agitados utilizando um agitador Vibrax a 1000 rpm durante 30 min. Posteriormente essas amostras foram centrifugados a 1800 x g durante 10 min a 10 °C numa centrífuga CF-15 (Hitachi Koki). A fase orgânica (4 mL) foi transferida para um tubo cônico de vidro com capacidade de 10 mL e

o solvente foi evaporado até à secura sob um fluxo suave de ar comprimido à temperatura ambiente. Os extratos secos foram posteriormente solubilizados em 150 µL de água ultrapura e analisados por eletroforese capilar.

#### 3.12. ORDEM DE MIGRAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA LIC

Para estabelecer a ordem de migração dos enantiômeros da LIC, os enantiômeros puros foram isolados por CLAE de acordo com condições previamente descritas na literatura (VOLOSOV et al., 1999). Resumidamente, os enantiômeros foram separados numa coluna Chiralcel OD® (250 mm x 4,6 mm, 10 μm d.i.) usando hexano: etanol: 2-propanol (18:2:1, v/v/v) + ácido acético glacial 0,1% como fase móvel sob condição isocrática. Após a separação, cada pico correspondente a cada enantiômero da LIC foi coletado em tubos de ensaio e a fase móvel foi evaporada. O resíduo remanescente foi solubilizado em água e posteriormente analisado por EC de acordo com as condições ótimas obtidas estabelecidas. A ordem de migração foi estabelecida mediante comparação dos tempos de migração e retenção de ambos os estudos.

#### 3.13. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Uma vez que não há um guia para análise de fármacos e seus metabólitos em meio de cultura, a validação foi realizada segundo as normas do *European Medicines Agency* (EMA, 2011) para análise de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas.

A linearidade foi avaliada em quintuplicata. Alíquotas de OXC e *rac*-LIC foram adicionadas em 2 mL de meio de cultura liquido Czapek nas concentrações de 1000; 3000; 9000; 15000; 18000; 22500 e 30000 ng mL<sup>-1</sup> e

150; 300; 450; 900; 1100; 1350 e 1800 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O coeficiente de correlação (r) foi determinado pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados obtidos foram ponderados empregando o peso  $1/\chi^2$  pois a análise residual da curva analítica apresentou comportamento heterocedástico. O teste F(lack-of fit) para falta de ajuste ( $F_{LOF}$ ) foi empregado na avaliação da linearidade empregando para tanto o software MINITAB release versão 14.1 (State College, PA, EUA).

O limite de quantificação de cada enantiômero da LIC foi estabelecido considerando que pelo menos 1% da OXC fosse bioconvertida em LIC. Para tanto foram avaliadas amostras de meio liquido Czapek contendo OXC e cada enantiômero da LIC nas concentrações finais de 1000 ng mL<sup>-1</sup> e 75 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. As amostras foram consideradas aprovadas se a exatidão (representada pelo erro relativo) e a precisão (expressa como desvio padrão relativo, DPR) fossem inferiores a 20%. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (n=5).

A precisão e exatidão foram determinadas fortificando 2 mL de meio de cultura líquido Czapek com o fármaco e seu metabólito nas concentrações equivalente ao LQ, baixa, média e alta (1000, 3000, 15000 e 22500 ng mL-1, respectivamente) para a OXC e, 75,150, 450 e 675 ng mL-1, respectivamente, para cada enantiômero da LIC. A precisão do método foi expressa como desvio padrão relativo (DPR, %) e a exatidão como erro relativo (ER, %). As amostras foram consideradas aprovadas se a exatidão e a precisão fossem inferiores a 20% para o LIQ e inferiores a 15% para as demais concentrações analisadas. A precisão/exatidão intraensaio foi realizada no mesmo dia enquanto que a

precisão/exatidão interensaio foi determinada em três dias consecutivos de análise. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (n=5).

A estabilidade dos analitos foi avaliada após ciclos de congelamento e descongelamento e sob bancada por 8 horas. Para tanto, 2 mL de meio de cultura liquido Czapek foi fortificado nas concentrações baixa (1000 ng mL<sup>-1</sup> para OXC e 150 ng mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero da LIC) e concentrações alta (22500 ng mL<sup>-1</sup> para OXC e 675 ng mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero da LIC). As amostras foram consideradas estáveis se a porcentagem de degradação dos analitos se mantireram com valores inferiores a 15%, determinados com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia da análise.

A seletividade do método também foi avaliada através da análise do meio de cultura Czapek na ausência da OXC, contendo somente a espécie de fungo utilizada na biotransformação.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DA OXC E LIC POR CLAE

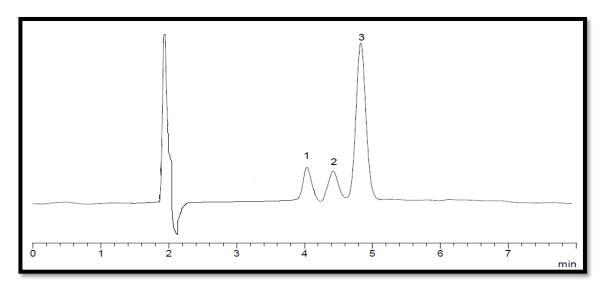
O objetivo principal desta etapa foi realizar a separação simultânea da OXC e dos enantiômeros da LIC utilizando condições ainda não descritas na literatura, preferencialmente, no modo polar-orgânico. Dentre os métodos descritos na literatura, um emprega uma coluna baseada em ciclodextrina: a Chiradex β-Ciclodextrin® em fase reversa (ALVES et al., 2007) e os outros métodos empregam a coluna baseada em celulose Chiralcel OD® ou suas variações como a OD-H® e OD-R® (VOLOSOV et al., 1999; ANTUNES et al., 2013; MAZZUCCHELLI et al., 2007) ambos em fase normal. Portanto, o objetivo

desta etapa foi obter um método de separação rápido e eficiente para análise desses analitos nos estudos de biotransformação.

Dessa forma, na otimização da separação, foram avaliados vários tipos de colunas bem como diferentes tipos de fases móveis. Oito colunas quirais foram empregadas: Lux Cellulose-2®, Chiralpak AD-H®, Chiralpak AD®, Chiralpak AD-RH®, Chiralcel OD-H®, Chiralcel OD-R®, Lux Amylose-2®, Chiralcel OJ®.

Após avaliação de todas as colunas descritas e empregando tanto o modo polar-orgânico quanto o modo normal, somente a coluna Chiralpak AD-H® e a fase móvel composta por hexano: etanol: isopropanol na proporção de 80:10:10 (v/w/v) com adição de 2% de HAc e vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, foi capaz de separar todos os analitos com valores de resolução aceitáveis e tempo de análise relativamente curto (**Figura 7**). Esta coluna possui uma boa capacidade de reconhecimento quiral para muitas classes de compostos como: aminoácidos, aminas, éteres e diversas classes de fármacos (OKAMOTO; YASHIMA, 1998). O provável mecanismo para o reconhecimento quiral envolve a interação do tipo π-π com os anéis aromáticos da LIC com o seletor quiral da coluna, além de outras interações iônicas como ligações de hidrogênio com o grupo hidroxila da LIC além de fatores estéricos como ajustes e não-ajustes dos enantiômeros nas cavidades do preenchimento interno da amilose.

Embora esta separação obtida tenha sido em fase normal e não no modo polar-orgânico como desejado, esta condição foi empregada na otimização das técnicas miniaturizadas de preparação de amostras que serão descritas mais adiante.



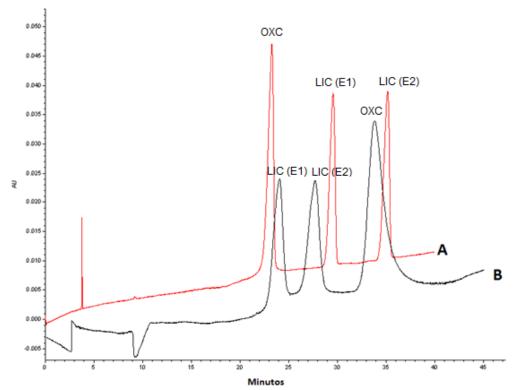
**Figura 7** – Separação da OXC e dos enantiômeros da LIC empregando como fase móvel hexano:etanol:isopropanol na proporção de 80:10:10 (v/v/v) + 2% de HAc e uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. 1) LIC (E1); 2) LIC (E2) e 3) OXC. Rs 1 e 2 = 1,96; Rs 2 e 3 = 1,68

#### 4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DA OXC E LIC POR EC

Da mesma forma que descrito anteriormente, nessa etapa objetivou-se desenvolver a separação simultânea da OXC e dos enantiômeros da LIC em condições ainda não descritas na literatura. Até o presente momento, não há relatos na literatura que demonstram a separação enantiosseletiva da LIC e OXC, simultaneamente, por EC. Nestes estudos, os experimentos foram realizados considerando-se as constantes de dissociação dos analitos. A OXC e a LIC são analitos com características básicas e seus valores de pKa são de10,70 (MARZIALI et al., 2002) e 13,75 (BIALER et al., 2002), respectivamente. Portanto, uma das estratégias analíticas de resolução enantiosseletiva desses analitos em EC é avaliar a separação dos enantiômeros empregando diferentes ciclodextrinas em pH ácido.

Nesse trabalho, seis tipos de CDs foram avaliadas em condições preliminares idênticas de análise para avaliar a influência do tipo de seletor quiral (CD) empregado. Foi utilizado tanto polaridade reversa quanto polaridade

normal. Assim, utilizando-se um capilar de comprimento efetivo de 40 cm e solução tampão fosfato 50 mmol L-1 pH 2,5 com 1% ou 10 mmol L-1 das CD avaliadas, foi observado a separação efetiva da OXC e dos enantiômeros da LIC tanto utilizando a CM-β-CD quanto a β-CD-fosfatada adicionadas ao eletrólito de análise. As demais condições de análise estão descritas no item 3.6. Após o estudo do tipo de CD empregada, avaliou-se o efeito da variação do pH da solução tampão entre 2,0 a 5,0 para estas CD. Entretanto, a separação dos analitos foi somente possível empregando um pH de 2,5 para ambas CD. Posteriormente, optou-se por prosseguir com os demais experimentos de ajuste na resolução dos analitos empregando a β-CD-fosfatada por apresentar melhor resolução entre os analitos e menores tempos de migração (**Figura 8**).



**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- $\beta$ -CD; tensão aplicada: –15 kV; B) 10 mmol  $L^{-1}$  de CM- $\beta$ -CD; tensão aplicada:15 kV.

A β-CD-fosfatada é uma CD aniônica (LEHNERT et al., 2013) e, portanto, ao empregar esta CD, sua mobilidade eletroforética deve ser considerada. Em pH 2,5 os analitos estarão em suas formas catiônicas, por isso, utilizando a polaridade reversa em EC, eles migrarão em direção ao cátodo (lado de injeção). Por outro lado, essa CD irá migrar em direção ao ânodo (lado de detecção). Assim, quando a CD aniônica migrar em direção ao ânodo ela irá interagir eletrostaticamente com os analitos catiônicos, carregando-os no sentido do ânodo e promovendo, assim, a detecção dos mesmos. Além dos parâmetros anteriormente avaliados tais como tipo de CD e pH do eletrólito de análise, foram também avaliados os seguintes parâmetros na resolução da OXC e dos enantiômeros da LIC: tipo e concentração do eletrólito de análise, concentração do seletor quiral, tensão aplicada, temperatura do capilar e, por último, comprimento do capilar.

Após a escolha do tipo de CD e do pH do eletrólito de análise, o tipo de eletrólito de análise foi avaliado. Em pH 2,5, foram avaliadas as soluções-tampão tris-fosfato e fosfato de sódio na concentração de 50 mmol L-1. A melhor resolução e menor tempo de migração de todos os analitos foi obtida empregando a solução tampão tris-fosfato. Quando a solução tampão fosfato de sódio foi empregada, os valores de corrente gerados foram maiores que 100 μA, o que levou a um maior alargamento dos picos provavelmente devido o efeito Joule (NELSON; BURGI; LANDERS, 1994), o que não foi observado com o emprego da solução tampão tris-fosfato (valores de corrente torno de 90 μA). Dessa forma, a solução tampão tris-fosfato foi escolhida para continuar com a otimização da metodologia.

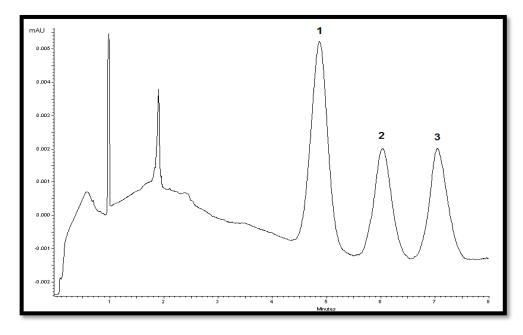
Após a escolha do tipo de eletrólito, a sua concentração foi avaliada. Avaliou-se a solução tampão tris-fosfato nas concentrações de 10 - 100 mmol L<sup>-1</sup>. Um aumento na força iônica do eletrólito pode oferecer melhores valores de resolução devido ao aumento no número de pratos (EEACKHAUT; MICHOTTE, 2006). Entretanto, uma força iônica muito elevada pode ocasionar em um maior tempo de migração dos analitos e também maiores valores de corrente. A avaliação na concentração da solução tampão demonstrou que para maiores concentrações do eletrólito, valores muito altos de corrente eram obtidos, resultando também em grandes tempos de migração dos analitos e maiores assimetrias nos picos, sendo que os menores valores de concentração do eletrólito levaram a uma análise mais rápida e com menores valores de assimetria dos picos dos analitos. Dessa forma, para os estudos posteriores foi empregado uma solução tampão tris-fosfato 10 mmol L-1.

O próximo parâmetro avaliado foi a concentração de CD. A concentração de CD pode afetar na mobilidade dos enantiômeros e também os valores de resolução (EEACKHAUT; MICHOTTE, 2006). Dessa forma, a concentração de β-CD-fosfatada foi variada no intervalo de 0,5 a 2,0% (m/v). Foi obervado que 1% de CD apresentou os melhores valores de resolução e menor tempo de migração, além de apresentar valores de corrente aceitáveis. Posteriormente, a tensão aplicada (5 - 30 kV, no modo reverso) e temperatura do capilar (10 - 25°C) foram avaliadas. O melhor valor de resolução e condição de análise mais adequada foi obtido empregando um valor de –20 kV de tensão e controlando a temperatura do capilar em 15 °C. Por último, para reduzir o tempo de análise, o comprimento do capilar foi reduzido de 40 para 20 cm de comprimento efetivo.

Essa mudança não levou a perda de resolução dos analitos e o tempo total de analise foi inferior a 8 minutos.

A melhor condição de separação para análise da OXC e seu metabólito quiral LIC foi encontrada empregando um capilar de 20 cm de comprimento efetivo e solução tampão tris-fosfato 10 mmol L-1 pH de 2,5 contendo 1% da β-CD-fosfatada. A tensão aplicada e a temperatura do capilar foram mantidas constantes em –20 kV e 15°C, respectivamente. Após serem estabelecidas estas condições (**Figura 9**) o valor de corrente permaneceu em torno de 80 μA.

A ordem de migração dos enantiômeros da LIC também foi estabelecida. Os enantiômeros da LIC foram coletados separadamente reproduzindo o método de separação por CLAE descrito por VOLOSOV et al 1999. Nesse método, o primeiro enantiômero a eluir é o (R)- LIC e o segundo o (S)- LIC. No presente estudo, empregando as condições eletroforéticas otimizadas nesse trabalho, o primeiro enantiômero a migrar foi o (S)- LIC e o segundo enantiômero foi o (R)- LIC.



**Figura 9** – Separação da OXC e dos enantiômeros da LIC por eletroforese capilar. Capilar de sílica de 20 cm de comprimento efetivo, 75 μm de d.i.; tensão aplicada: -20 kV; temperatura de análise  $15^{\circ}$ C; solução tampão tris-fosfato 10 mmol L-1, pH 2,5 + 1% β-CD-fosfatada sódica; detecção em 215 nm. 1) OXC; 2) (*S*)-(+)-LIC e3) (*R*)-(-)-LIC. Rs <sub>1 e 2</sub> =2,34; Rs <sub>2 e 3</sub> = 1,88. Fonte: Bocato et al, Electrophoresis, v. 35, p. 2877-2884, 2014. Reproduzido com permissão da John Wiley and Sons (número de licença: 3887190841633).

# 4.3. AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS NA EXTRAÇÃO DA OXC E LIC DE MEIO CZAPEK

#### 4.3.1. SPME

A técnica SPME é uma técnica que consiste em extrair de uma amostra analitos em sua forma neutra, durante um tempo pré-determinado, por um fino recobrimento polimérico presente em um capilar de sílica fundida (VUCKOVIC et al., 2009). A extração inicia-se imediatamente após a fibra ser exposta à amostra e termina quando o equilíbrio entre a concentração dos analitos presentes no polímero e a concentração dos analitos presentes na amostra for atingido. As condições de extração que podem influenciar no processo de equilíbrio e, assim, afetar a SPME são: temperatura de extração, agitação do sistema, espessura do filme polimérico, pH e força iônica da amostra. Por isso,

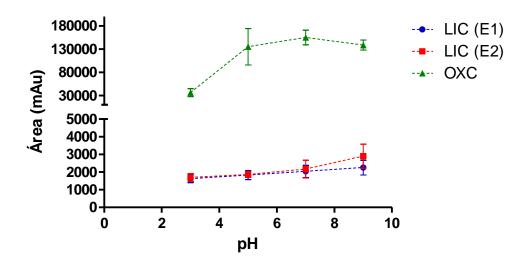
estes fatores devem ser avaliados durante a otimização da técnica (RISTICEVIC et al., 2010).

Os parâmetros da SPME avaliados neste trabalho foram: pH e força iônica da matriz, agitação, tempo de extração e volume da amostra.

Nesses estudos, a extração foi realizada utilizando frascos de 4 mL acrescido de 2 mL de meio de cultura e 2,0 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L-1 pH 7,0. Todo procedimento foi realizado adicionando 20 µL de cada analito estudado na concentração de 100 µg mL-1, em triplicata (n=3). Os resultados obtidos foram expressos em forma de gráficos das áreas dos analitos obtidas frente à modificação realizada.

A primeira etapa para o início da extração por SPME é a escolha da **fibra de extração**. O tipo de recobrimento polimérico deve ser compatível em polaridade com os analitos que se deseja extrair, uma vez que a extração ocorre seguindo o conceito de "similar atrai similar". É necessário conhecer as propriedades físico-químicas dos analitos para a escolha das fibras, uma vez que as fibras possuem faixas de pH adequadas de trabalho e também para se garantir que durante o processo de extração, os analitos sejam extraídos em sua forma neutra. Tanto a OXC quanto a LIC apresentam caráter básico com valores de pKa próximos de 11 e 14, respectivamente (MARZIALI et al., 2002). Desta forma, neste trabalho, foi utilizada apenas a fibra do tipo C18 (45 μm) cujo revestimento é apolar e possui uma faixa de estabilidade em um amplo intervalo de pH (entre 1-9) (SUPELCO, 2010). É necessário enfatizar que devido às restrições do uso destas fibras em pH's mais elevados, não foi possível manter as matrizes com pH's onde os analitos se encontrassem em sua forma completamente neutra, o que dificultou a recuperação dos mesmos empregando

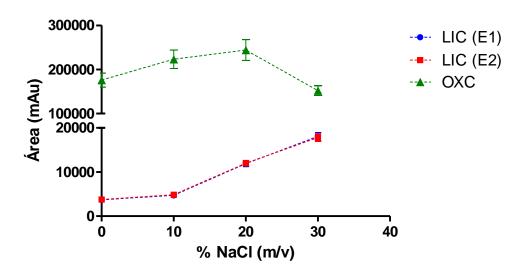
esta técnica. O ajuste do **pH da amostra** com adição de solução tampão pode melhorar a eficiência de extração do método e garantir que os analitos de interesse sejam extraídos. No intervalo de pH descrito para a fibra C18 as moléculas se encontram parcialmente protonadas, contudo, foi possível extrair estes analitos em meio de cultura e, portanto, a eficiência na extração da OXC e a LIC foi avaliada em um intervalo de pH de 3,0-9,0 empregando para tanto uma solução tampão fosfato 500 mmol L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 10. Como pode ser observado, houve um pequeno aumento na eficiência de extração dos analitos para valores de pH mais alcalinos. A melhor condição para extração da OXC e seu metabólito foi em pH 7,0, uma vez que as mudanças acima deste valor de pH não melhorou a eficiência de extração dos analitos. Como a OXC estará presente em grande quantidade no meio de biotransformação e o objetivo principal é extrair com maior eficiência o metabólito, foi definido pH 7,0 como pH ótimo para a extração. Além disso, como mencionado, a faixa de pH ideal de trabalho da fibra C18 é entre 1,0-9,0, portanto, realizando as extrações em pH 7,0, pode-se prolongar o tempo de uso da fibra, pois a mesma não estará sendo empregada em seu limite máximo estabelecido.



**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<sup>-1</sup> de cada analito. n = 3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.

iônica das mesmas. A maioria dos compostos orgânicos apresenta uma diminuição de solubilidade em soluções aquosas quando há um aumento da concentração salina, possibilitando uma melhora na eficiência da extração (KUDLEJOVA et al., 2007). Este efeito é chamado de efeito "salting out" e deve ser avaliado em SPME, uma vez que este efeito pode melhorar a recuperação do analito, melhorando a detectabilidade do método. O efeito da adição de cloreto de sódio na extração da OXC e LIC em meio de cultura Czapek foi estudado preparando-se amostras com concentrações de 0 - 30% (m/v) desse sal. Os estudos mostraram que a partir de 10% (m/v) de NaCl adicionado, a recuperação dos enantiômeros da LIC foi crescente (Figura 11) e para a OXC foi decrescente a partir de 20% (m/v) de NaCl. A concentração adequada para dar continuidade aos próximos experimentos seria então de 30% (m/v), preconizando-se a maior recuperação para os enantiômeros do metabólito uma

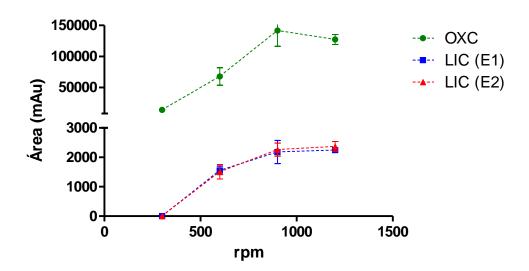
vez que este estará, muito provavelmente, presente em menor concentração no meio de biotransformação. Entretanto, foi escolhida a concentração de 20% (*m/v*), pois foi verificado durante os experimentos que a solução tampão utilizada na concentração de 500 mmol L<sup>-1</sup> dificultava a solubilização desse sal em porcentagem maior que 20%. Portanto, passou-se a utilizar a mesma solução tampão, porém na concentração de 250 mmol L<sup>-1</sup>. Mesmo diminuindo a concentração da solução tampão, a solubilização de 30% de NaCl foi dificultosa. Uma vez que a composição das matrizes de fungos estudadas é muito variável, acrescentando-se 20% (*m/v*) desse eletrólito no meio de cultura, a força iônica torna-se constante melhorando a reprodutibilidade no processo de SPME. Portanto, os próximos parâmetros avaliados foram realizados empregando-se 20% (*m/v*) de NaCl.



**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  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de cada analito. n = 3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.

A agitação é outro fator importante que pode afetar a recuperação dos analitos e também o tempo de extração. A agitação tem a capacidade de

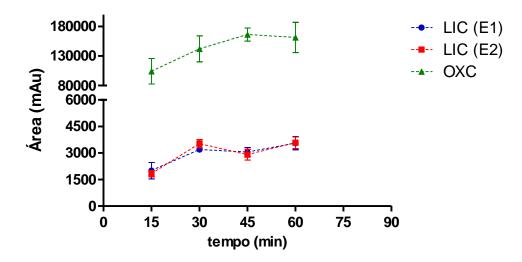
promover com maior facilidade a transferência de massa do analito presente na amostra para o polímero extrator. Dessa forma, o equilíbrio entre a concentração dos analitos na amostra e na fibra é atingido mais rapidamente e, consequentemente, o tempo de extração diminui. A eficiência da agitação na extração da OXC e LIC foi avaliada por agitação do frasco através do agitador orbital Vibrax®, com rotações variando de 300 - 1200 rpm, utilizando as condições pré-estabelecidas nos parâmetros anteriores. Os resultados deste procedimento estão demonstrados na **Figura 12**. Como pode ser observado, o equilíbrio de extração para os enantiômeros do metabólito e da OXC é atingido em 900 rpm. Assim, a agitação foi definida como 900 rpm para os demais experimentos.



**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<sup>-1</sup> + 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  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de cada analito. n=3.

O transporte de massa dos analitos da matriz para a fibra inicia-se no exato momento em que a fibra é exposta à matriz (RISTICEVIC et al., 2010). O

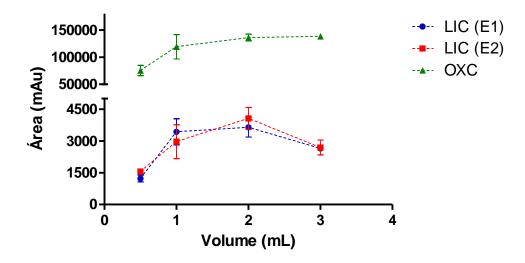
tempo de extração em SPME é o tempo necessário para que os analitos presentes na matriz entrem em equilíbrio com o revestimento da fibra. Assim, existe um tempo determinado no qual o equilíbrio é atingido e a extração dos analitos se torna constante. O tempo de extração na extração da OXC e LIC foi avaliado num intervalo de 15 a 60 minutos e os resultados foram expressos na Figura 13. Como pode ser observado, a quantidade extraída dos analitos aumenta com o aumento do tempo de extração. A partir de 30 e 45 minutos o equilíbrio é estabelecido para extração da LIC e OXC, respectivamente. Como o foco desse estudo é extração da LIC para os próximos experimentos passou-se a empregar 30 minutos como tempo de extração pois foi o máximo observado para a extração dos enantiômeros.



**Figura 13** – Efeito do tempo de extração na recuperação da OXC e dos enantiômeros de seu metabólito LIC em meio de cultura líquido 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 m $L^{-1}$  de cada analito. n = 3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.

O **volume da amostra** pode afetar a eficiência na extração dos analitos. É conhecido que a quantidade de analito extraído é independente do volume da amostra acima de um valor de volume crítico (RISTICEVIC et al., 2010), por isso,

deve ser explorado no processo de otimização. Assim, o volume de matriz foi avaliado em uma faixa de 0,5 - 3,0 mL. A eficiência da extração dos enantiômeros do metabólito LIC e da OXC com a variação do volume de extração esta demonstrada na **Figura 14.** Como pode ser observado não houve diferença significativa na extração da OXC a partir de 1,0 mL de meio de cultura, já, para os metabólitos, houve pequeno aumento na recuperação dos analitos com 2,0 mL de volume do meio de cultura. Portanto, a fim de obter uma amostra não muito diluída e que garanta que a viscosidade do meio de extração não seja muito elevada estabeleceu-se 2,0 mL de meio de cultura para a realização dos experimentos.



**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<sup>-1</sup> (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  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de cada analito. n = 3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.

As condições finais estabelecidas para SPME na análise dos enantiômeros da LIC e da OXC em meio de cultura liquido foram: 2,0 mL de meio de cultura Czapek acrescido de 2,0 mL de solução tampão fosfato (pH 7,0) 0,25 mol L-1 + 20% NaCl (*m/v*). Extração por 30 minutos a 25°C com agitação a 900

rpm; dessorção na fase móvel (hexano:etanol:isopropanol 80:10:10, v/v/v + 2% HAc) à temperatura ambiente por 5 minutos. Embora os valores de recuperação dos analitos (com base na área dos fármacos injetados diretamente, sem extração, na mesma concentração em que foram submetidos à SPME) fossem em torno 10% para os enantiômeros da LIC e 8% para a OXC, esta recuperação não foi reprodutível em experimentos repetidos posteriormente. Portanto, este método não foi escolhido devido aos valores baixos de recuperação obtidos que levariam a prejuízos na detectabilidade do método e, consequentemente, prejudicariam a análise do metabólito que estaria em baixas concentrações no estudo de biotransformação.

#### 4.3.2. HF-LPME

Para a otimização da extração dos analitos por HF-LPME do meio de cultura Czapek, o modo de três fases foi avaliado. Os seguintes parâmetros foram analisados: tipo de solvente orgânico, pH da fase doadora e composição da fase aceptora. Durante toda otimização, utilizou-se uma fibra de polipropileno cilíndrica oca de 15 cm de comprimento, agitação em 1500 rpm e temperatura de extração utilizada foi a temperatura ambiente. Nesse procedimento foi adicionado 20  $\mu$ L de cada analito estudado na concentração de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, em triplicata (n = 3).

Os solventes orgânicos avaliados foram: octanol, éter dibutílico, éter diexílico e acetato de butila. Os pH foram avaliados adicionando-se no frasco que continham as matrizes, diferentes soluções de tampão fosfato ou borato na concentração de 500 mmol L-1 (pH utilizados: 10,0; 12,0 e 14,0), ou então uma

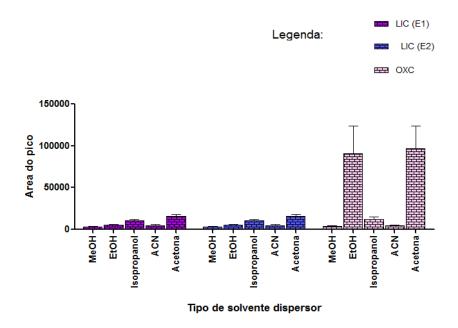
solução de NaOH 100 mmol L-1 até completar-se o volume final de 4 mL. Como fase aceptora foi empregado ácido clorídrico ou ácido acético nas concentrações de 50 e 100 mmol L-1. Os resultados obtidos nesta etapa não foram satisfatórios. Mesmo após várias tentativas, o emprego desta técnica miniaturizada não resultou em qualquer extração da OXC e seu metabólito do meio de cultura liquido Czapek. Provavelmente, o fato dos analitos terem características apolares, a extração foi dificultada pois os solventes impregnados nos poros da fibra devem ter afinidade pelos analitos de interesse, o que não foi o caso nesse estudo, pois os solventes utilizados tinham características mais polares.

#### 4.3.3. DLLME

Os principais parâmetros que influenciam a DLLME foram otimizados. Todo procedimento foi realizado adicionando 20 µL de cada analito estudado na concentração de 100 µg mL-1, em triplicata (n = 3). A extração foi realizada adicionando em cada tubo de extração, 2 mL do meio de cultura e 2 mL de NaOH 100 mmol L-1 de forma o pH final fosse superior a 13,0 a fim de manter os analitos na sua forma neutra, totalizando um volume final de 4 mL no tubo de extração. Os resultados obtidos forma expressos em forma de gráficos das áreas dos analitos obtidas frente à modificação realizada.

O primeiro parâmetro otimizado foi o **tipo de solvente dispersor**. Este solvente deve ser solúvel no solvente extrator e também na amostra, para permitir a dispersão dos analitos na fase orgânica, formando a solução turva conhecida como "ponto nuvem". A otimização do solvente dispersor foi feita utilizando-se, além das condições pré-estabelecidas acima para o meio Czapek, clorofórmio como solvente extrator (50 µL) e os solventes avaliados foram:

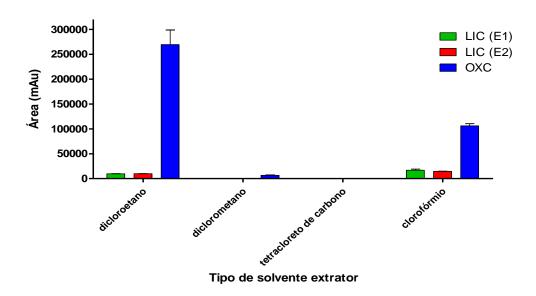
metanol, etanol, acetonitrila, acetona e isopropanol, adicionando 500 μL destes (**Figura 15**). Como pode ser observado na **Figura 15**, o melhor solvente dispersor para a extração dos analitos em meio de cultura liquido Czapek foi a acetona.



**Figura 15** – 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  $\mu$ L de solvente extrator clorofórmio e 500  $\mu$ L de cada solvente dispersor. n =3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.

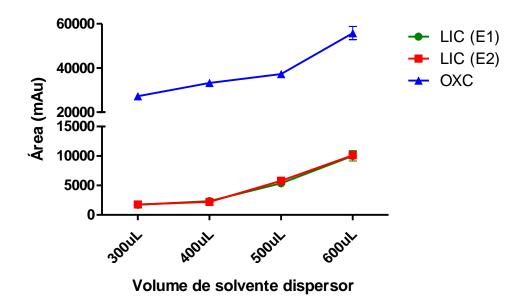
Da mesma forma, fixando agora a acetona como solvente dispersor em um volume de 500 μL, foi avaliado o tipo de solvente extrator. O solvente extrator deve possuir um valor de densidade maior que o da água, pois assim é possível manter os analitos extraídos na fase inferior e facilmente coletá-los após a centrifugação; também deve ser capaz de extrair os analitos de interesse além de apresentar baixa solubilidade em água (REZAEE et al., 2006). Foram avaliados os seguintes solventes extratores: tetracloreto de carbono, dicloroetano, diclorometano e clorofórmio empregando um volume de 50 μL de

cada. Como pode ser observado na **Figura 16**, clorofórmio foi o melhor solvente extrator para a recuperação dos metabólitos.



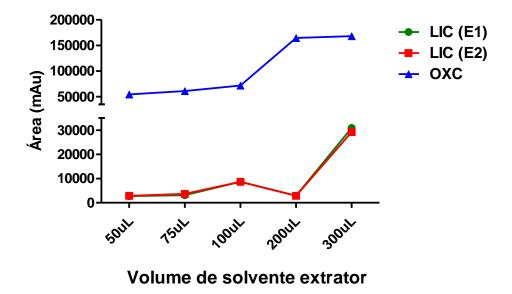
**Figura 16** – Efeito do solvente extrator na recuperação da OXC e dos enantiômeros da LIC de meio cultura Czapek. Volume da matriz: 2 mL de meio de cultura, 2 mL de NaOH 100 mmol  $L^{-1}$ , 500  $\mu$ L de solvente dispersor **acetona** e 50  $\mu$ L de cada solvente extrator. Extração em 25°C. n=3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.

Após a determinação do par de solventes (dispersor e extrator), o volume de cada um foi então otimizado, iniciando pelo **volume do solvente dispersor**. Para isto, utilizou-se 50 μL de clorofórmio e o volume de acetona foi avaliado no seguinte intervalo: 300 μL, 400 μL, 500 μL e 600 μL. O melhor resultado foi obtido com o uso de 600 μL de acetona (**Figura 17**). O aumento do volume do solvente dispersor leva a uma melhora da dispersão dos analitos na fase orgânica, o que facilita a formação do estado de turbidez, e, portanto, a extração. Contudo, esse processo continua até um determinado volume. A partir de então um aumento no volume do solvente dispersor leva a um prejuízo na solubilidade dos analitos na fase extratora prejudicando e diminuindo a extração (REZAEE et al., 2006), fato esse que não foi observado nesse estudo.



**Figura 17** – 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<sup>-1</sup>. Volume de solvente dispersor variável e 50  $\mu$ L de solvente extrator (clorofórmio). Temperatura de extração a 25°C, n = 3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.

Por último, o **volume de solvente extrator** foi otimizado variando o volume de clorofórmio no seguinte intervalo: 50 μL, 100 μL, 150 μL, 200 μL e 300 μL. O volume que apresentou uma melhor extração dos analitos foi o volume correspondente a 300 μL para a extração em meio Czapek **Figura 18**. Em DLLME, o volume do solvente extrator deve ser suficiente para extrair o analito e, sempre que possível, deve ser escolhido o menor volume obtendo-se assim um alto fator de enriquecimento com menor uso de solventes tóxicos (CALDAS et al., 2011).



**Figura 18** – 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  $\mu$ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. n=3. E1 = primeiro enantiômero a eluir, E2 = segundo enantiômero a eluir.

As condições finais estabelecidas para DLLME na análise dos enantiômeros do metabólito LIC e da OXC em meio de cultura foram: solvente dispersor acetona (600 μL) e solvente extrator o clorofórmio (300 μL). Matriz: 2 mL de meio de cultura Czapek acrescida de 2 mL de solução de NaOH 100 mmol L<sup>-1</sup>. Centrifugação durante 3 minutos a 1800 *x g* a uma temperatura de 20°C.

Os valores de recuperação estimados dos analitos, com base na área dos fármacos injetados diretamente, sem extração, na mesma concentração em que foram submetidos à DLLME, foram 27% para os enantiômeros da LIC e 23% para a OXC. Contudo, durante experimentos posteriores, dois problemas foram encontrados: (i) o surgimento de interferentes entre as replicatas, impossibilitando que este método de preparação de amostras fosse viável e também a (ii) falta de reprodutibilidade do método em experimentos posteriores, mesmo com o uso de padrão interno. Uma possível justificativa para a falta de reprodutibilidade é a grande quantidade de solventes utilizados no procedimento,

dificultando a formação do ponto nuvem e também evaporação dos solventes no momento da agitação por vórtex.

### 4.4. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Dado o insucesso das técnicas miniaturizadas em extrair os analitos OXC e LIC do meio de cultura liquido Czapek, optou-se por empregar a extração líquido-líquido (LLE) a fim de validar o método para posteriormente aplicar nos estudos enantiosseletivos de biotransformação da OXC empregando os fungos.

Alguns parâmetros da LLE foram otimizados, como: tipo de solvente extrator, tempo de extração, agitação do sistema, força iônica, quantidade de solvente extrator e quantidade de NaOH 100 mmol L-1 adicionada ao meio de cultura (com o intuito de deixar os analitos na forma neutra). Os solventes avaliados foram: hexano, acetato de etila e metil-tert-butil éter e o volume de solvente foi variado entre 2 a 6 mL. O tempo de extração e a agitação da amostra foi avaliado de 15 a 60 minutos e entre 300 a 1500 rpm, respectivamente. A quantidade de NaCl adicionado foi variado de 0 - 30% (m/v), e a quantidade de NaOH (100 mmol L<sup>-1</sup>) adicionada ao meio foi variada de 100 a 1000 μL. Resumidamente, a melhor condição obtida para LLE foi: 2 mL de meio Czapek alcalinizado com 500  $\mu$ L de NaOH 100 mmol L<sup>-1</sup> e adição de 20% NaCl (m/v). 5 mL de metil-tert-butil éter foi empregado como solvente extrator e os tubos foram agitados durante 30 minutos em agitador do tipo Vibrax® a 1000 rpm. Posteriormente, este tubo foi centrifugado durante 10 minutos a 10°C. Após este procedimento, 4 mL do sobrenadante foram coletados, transferidos para outro tubo de ensaio cônico e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido.

Posteriormente o resíduo foi solubilizado em 150 μL de água ultrapura, agitados em vórtex por 10 s e analisados nas condições descritas no **item 4.2**.

## 4.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DA OXC E ENANTIÔMEROS DA LIC EM MEIO DE CULTURA CZAPEK

O método foi validado utilizando a eletroforese capilar como técnica de separação pois na literatura não havia dados acerca da separação dos enantiômeros da LIC e de seu precursor, oxcarbazepina por EC. Além disso, a ausência de consumo de solventes orgânicos torna essa técnica ambientalmente amigável.

A validação da metodologia foi realizada empregando o método de padronização interna e o fármaco risperidona foi empregado como padrão interno (Figura 19).

Figura 19 – Estrutura química da risperidona, padrão interno utilizado na validação do método.

Os resultados obtidos da validação do método estão apresentados nas Tabelas seguintes. Os dados expostos na **Tabela 3** evidenciam uma linearidade satisfatória nos intervalos de concentrações avaliados, com coeficientes de correlação (*r*) > 0,995 para todos os analitos de interesse. O limite de quantificação foi de 75 ng para cada enantiômero por mL de meio de cultura e

de 1000 ng mL<sup>-1</sup> para a OXC com valores de ER(%) e DPR(%) menores que 10% (Tabela 3).

Tabela 3 - Limite de quantificação e linearidade do método

	Intervalo	•		ANOVA Lack of Fit		1.00	ED	DDD
Analitos	linear (ng mL <sup>-1</sup> )	Equação linearª	r <sup>b</sup>	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>p</i>	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	ER (%)	DPR (%)
(S)-(+)-Lic	75-900	y=0,0084x+0,0522	0,995	1,37	0,13	75	-5	3
( <i>R</i> )-(–)-Lic	75-900	y=0,0086x+0,0130	0,995	0,98	0,97	75	-5	2
OXC	1000-30000	y=0,0022x+0,2515	0,995	2,88	0,05	1000	3	1

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Cinco replicatas (*n*=5) para cada concentração

Os resultados de precisão e exatidão intra- e interensaio para cada enantiômero da LIC e para OXC estão resumidos nas **Tabelas 4 e 5**. Todos os resultados estão de acordo com as recomendações da ANVISA (2016). Os ensaios de estabilidade indicam que a OXC e seus metabólitos são estáveis após ciclos de congelamento/descongelamento e à temperatura ambiente com valores de DPR(%) e ER(%) inferiores a 15% (**Tabela 6**). A seletividade do método foi determinada analisando as amostras "branco" (meio cultura Czapek na ausência da OXC e com a presença de cada espécie de fungo avaliada). Este estudo mostrou que os fungos não apresentaram nenhum metabólito secundário no mesmo tempo de migração da OXC ou dos enantiômeros da LIC (**Figuras 20 e 21**).

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> r, coeficiente de correlação

 $F_{experimental} < F_{tabelado}$ ; valor- p > 0,05;  $F_{tabelado} = 2,85$  (6,14; 0,05).

Tabela 4 - Precisão e exatidão intraensaio para análise da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio de cultura líquido

Analitos	Concentração Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentração obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	DPR <sup>a</sup> (%)	ER <sup>b</sup> (%)	
	75	68,7	5	-9	
(S)-(+)-LIC	150	157,9	3	5	
	450	434,2	1	-4	
	675	575,1	11	-14	
( <i>R</i> )-(–)-LIC	75	68,5	10	-9	
	150	160,3	2	7	
	450	427,5	3	-5	
	675	582,2	9	-14	
OXC	1000	963,9	6	-4	
	3000	3261,4	8	9	
	15000	15191,1	5	1	
	22500	22816,1	9	2	

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> desvio-padrão relativo expresso em porcentagem <sup>b</sup> erro relativo expresso em porcentagem

Tabela 5 - Precisão e exatidão interensaio para análise da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio de cultura líquido

Analitos	Concentração Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentração obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	DPR <sup>a</sup> (%)	ER <sup>b</sup> (%)
	75	68,5	11	-9
	150	164,6	7	10
(S)-(+)-Lic	450	411,4	5	-9
	675	694,0	8	3
	75	68,7	10	-8
( <i>R</i> )-(–)-Lic	150	167,3	4	12
	450	412,2	13	-8
	675	698,6	8	4
	1000	940,1	2	-6
OXC	3000	3194,7	11	7
	15000	13854,9	6	-9
	22500	21594,5	8	-4

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> desvio-padrão relativo expresso em porcentagem <sup>b</sup> erro relativo expresso em porcentagem

Tabela 6 - Ensaio de estabilidade para análise da OXC e dos enantiômeros da LIC em meio de cultura líquido

Analitos	(S)-(+)-Lic		( <i>R</i> )-(–)-Lic		OXC	
Estabilidade	Св	CA	Св	CA	Св	CA
Ciclos de congelamento/descongelamento (n=5)						
Concentração obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	153,0	586,2	158,3	587,7	2932,3	19635,6
Precisão (DPR)ª	5	1	2	2	8	1
Exatidão (E, %) <sup>b</sup>	2	-13	6	-13	-2	-13
Estabilidade de bancada (n=5)						
Concentração obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	153,1	604,5	158,3	584,1	3228,3	25202,2
Precisão (DPR)ª	8	1	2	2	2	2
Exatidão (E, %)b	2	-11	6	-14	8	12

n = número de determinações

## 4.6. BIOTRANSFORMAÇÃO ESTEREOSSELETIVA DA OXC EMPREGANDO FUNGOS

Conforme proposto no projeto inicial, para o estudo de biotransformação, foram empregadas várias espécies de micro-organismos como "agentes catalisadores" totalizando doze espécies de diferentes fungos. As reações de biotransformação foram monitoradas durante 360 horas e a cada 120 hs foi coletada uma alíquota e armazenada até o momento da análise.

A reação de biotransformação da OXC e formação do metabólito LIC envolve a redução do grupo carbonil da OXC. Dessa forma, entre os fungos avaliados, somente duas espécies de fungos foram capazes de metabolizar estereosseletivamente a OXC em seu metabólito LIC, são elas: *Glomerella cingulata* (VA1) e *Beuveria bassiana* (ATCC 7159). Nessas duas espécies, houve a formação majoritária do enantiômero (*S*)-(+)-LIC. O aparecimento dos enantiômeros da LIC ocorreu a partir de 120 horas de incubação e foram observados até o final dos estudos. Os resultados obtidos no processo de

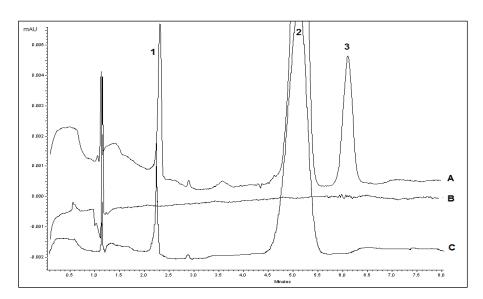
C<sub>B</sub> e C<sub>A =</sub> concentração baixa e concentração alta, respectivamente.

a desvio-padrão relativo expresso em porcentagem

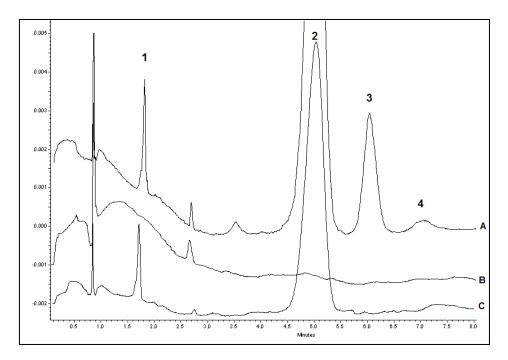
<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> erro relativo expresso em porcentagem

biotransformação (n=2, para cada espécie de fungo) foram expressos em termos de fração enantiomérica (fe). Como pode ser observado na **Figura 20**, o fungo VA1 foi capaz de biotransformar a OXC com 100% de fração enantiomérica para a formação do enantiômero (S)-(+)-LIC (**Tabela 7**). Este resultado foi observado em todas as amostras coletadas. Já o fungo *Beuveria bassiana*, que também foi capaz de biotransformar estereosseletivamente a OXC, formou os dois enantiômeros da LIC (**Figura 21**). Embora este fungo tenha formado preferencialmente o enantiômero (S)-(+)-LIC com ee = 79% (**Tabela 7**), também foi capaz de formar o enantiômero (R)-(-)-LIC.

Os resultados obtidos mostram que o fungo VA1 pode ser usado para a obtenção do metabólito (S)-(+)-LIC na sua forma enantiomérica pura, o enantiômero ativo da Licarbazepina.



**Figura 20** – Eletroferograma representativo após a biotransformação da OXC com o fungo VA1 após 360 h de incubação (A). Eletroferograma representativo do meio Czapek (controle) incubado com o fungo VA1 mostrando que o fungo não 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. Fonte: Bocato et al, Electrophoresis, v. 35, p. 2877-2884, 2014. Reproduzido com permissão da John Wiley and Sons (número de licença: 3887190841633).



**Figura 21** – Eletroferograma representativo após a biotransformação da OXC com o fungo *Beuveria bassiana* após 360 h de incubação (A). Eletroferograma representativo do meio Czapek (controle) incubado com o fungo *Beuveria bassiana* 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)-(-)-LIC. Fonte: Bocato et al, Electrophoresis, v. 35, p. 2877-2884, 2014. Reproduzido com permissão da John Wiley and Sons (número de licença: 3887190841633).

A **Tabela 7** mostra a fração enantiomérica para cada espécie de fungo e o tempo de incubação.

**Tabela 7** - Fração enantiomérica obtida para cada espécie de fungo. Bocato et al, Electrophoresis, v. 35, p. 2877-2884, 2014. Reproduzido com permissão da John Wiley and Sons (número de licença: 3887190841633).

	Glomerella cingulata (VA1) Beuveria ba			essiana ATCC 7159		
Horas	(S)-(+)-Lic	fe	(S)-(+)-Lic	( <i>R</i> )-(–)-Lic	ee	
	(ng mL <sup>-1</sup> )	(%)	(ng mL <sup>-1</sup> )	(ng mL <sup>-1</sup> )	(%)	
120	212,0	100	163,3	-	100	
240	666,6	100	499,0	-	100	
360	885,4	100	707,9	83,4	79	

# 5. 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.

CAPÍTULO 3

# **CAPÍTULO 3**

# Metabolismo in vitro da TBZ empregando microssomas hepático de humanos

### 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. OBJETIVO

#### **2.1. GERAL**

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar a eficiência das microtécnicas de preparação de amostras: SPME, HF-LPME e DLLME em extrair os analitos TBZ e diHTBZ do meio microssomal para posterior aplicação em estudos de metabolismo in vitro empregando microssomas hepático de humanos.

#### 2.2. ESPECÍFICO

Os objetivos específicos foram:

- i) Desenvolver um método enantiosseletivo para análise simultânea da TBZ e seus metabólitos diHTBZ empregando EC ou CLAE.
- ii) Avaliar a eficiência das microtécnicas de preparação de amostras: SPME, HF-LPME e DLLME em extrair os analitos TBZ e diHTBZ do meio microssomal.
- iii) Aplicar o método de análise desenvolvido e a técnica de preparação de amostras mais adequada nos estudos de metabolismo in vitro da TBZ empregando microssomas hepático de humanos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. EQUIPAMENTOS DE ANÁLISE E ACESSÓRIOS GERAIS

Para a otimização da separação da TBZ por CLAE foi empregado um equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por duas bombas LC 10AS, um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD 10A operando em 235 nm, um forno para coluna modelo CTO 10AS e um injetor Rheodyne (Cotati, CA, EUA) modelo 7125 com amostrador de 50 μL. Os dados foram monitorados usando uma controladora modelo SCL 10A (Shimadzu) e o software utilizado para aquisição dos dados foi o Class-VP também da Shimadzu.

Para a otimização da separação dos metabólitos da TBZ, *cis-* e *trans*-diHTBZ por EC, foi empregado um equipamento da marca Beckman Coulter, modelo P/ACE MDQ (Fullerton, CA, EUA), contendo um analisador de dados,

injetor automático e detector de arranjo de diodos. Para aquisição dos dados foi empregado o programa 32 Karat<sup>®</sup>, também da Beckman. Capilares de sílica fundida não revestidos da Polymicro (Phoenix, AZ, EUA) com 75 µm de d.i. com comprimentos efetivos variáveis foram empregados para a otimização da separação dos analitos.

No preparo das soluções-padrão empregou-se balança analítica Sartorius® AG Germany modelo CP225D (Santo André, SP, Brasil) e agitador de soluções modelo AP56 (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) que também foi utilizado para a homogeneização das amostras do processo de microextração. Para medida do pH das soluções-tampão foi utilizado um peagômetro Orion modelo 420A+ (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA). Um sistema Direct-Q 3 UV da Millipore (Bedford, MA, EUA) forneceu água purificada para o preparo das amostras analisadas por eletroforese capilar e também preparo das soluções-tampão.

Microponteiras da marca Sorenson Bioscience (Salt Lake City, UT, EUA) com 0,57 mm de diâmetro externo e 83 mm de comprimento foram usadas na extração por HF-LPME. As extrações foram feitas empregando uma membrana de polipropileno de 15 cm de comprimento com um diâmetro interno de 600 μm, espessura de 200 μm e poros de 0,2 μm (Q3/2 Accurel PP, Membrana, Alemanha). Foi utilizada também uma microsseringa com capacidade para 100 μL da marca Hamilton, modelo 702SNR (Bonaduz, Suíça) para introdução e retirada para fase aceptora do interior da fibra.

# 3.2. REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS, NO PREPARO DO MEIO MICROSSOMAL E NOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Soluções-padrão estoque de *rac*-TBZ, *rac-cis*-diHTBZ e *rac-trans*-diHTBZ (todos obtidos da Toronto Research Chemicals, Toronto, Canadá) foram preparadas numa concentração de 3000 µg mL-1 em metanol. Soluções de trabalho de *rac*-TBZ, de *rac-cis*-diHTBZ e *rac-trans*-diHTBZ foram obtidas por diluições apropriadas no mesmo solvente. *Rac*-mirtazapina (Oss, Holanda), foi utilizada como padrão interno (P.I.) na concentração de 100 µg mL-1. Todas estas soluções foram armazenadas a –20°C em tubos de vidro âmbar e protegidas da luz direta.

A solução tampão fosfato 500 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4 foi adquirida da Corning Life Sciences (Arizona, EUA) sendo diluída a uma concentração final de 100 mmol L<sup>-1</sup>. Os reagentes empregados para geração do cofator NADPH também foram obtidos da Corning Life Sciences e consistem em: solução A (NADP+ e glicose-6-fosfato) e solução B (glicose-6-fosfato desidrogenase). Microssomas hepático de humanos (HLMs) foi adquirido da Corning Life Sciences (Arizona, EUA). HLMs é composto por um *pool* de 50 doadores de ambos os sexos na concentração proteica de 20 mg mL<sup>-1</sup>.

Os inibidores específicos da CYP utilizados na determinação das isoformas responsáveis pelo metabolismo foram: sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4), ticlopidina (CYP2C19), α-naftoflavona (CYP1A2) e quinidina (CYP2D6) todos obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas e no procedimento de DLLME (grau CLAE) foram: metanol, isopropanol, diclorometano e acetona obtidos de Panreac (Barcelona, Espanha).

Os reagentes (grau analítico) foram: cloreto de sódio obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha), tris-hidroximetilaminometano e fosfato monossódico obtidos de JT Baker (Philipsburg, PA, EUA). Hidróxido de sódio obtido da Nuclear (Diadema, SP, Brasil) e ácido (Orto) fosfórico foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A  $\beta$ -ciclodextrina fosfatada sódica (P- $\beta$ -CD) (grau de substituição  $\sim$  2-6) foi adquirida da Cyclolab (Budapeste, Hungria); as ciclodextrinas: ciclodextrina- $\beta$ -sulfatada (S- $\beta$ -CD) (grau de substituição  $\sim$  5), (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina (2-OHprop- $\beta$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina (CM- $\beta$ -CD) (grau de substituição  $\sim$  3) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Todas as soluções empregadas nas análises por eletroforese capilar foram filtradas através de um filtro Millex-HV de 0,45 mm de filtro de discos de Millipore (Belford, MA, EUA).

#### 3.3. COLUNAS QUIRAIS E PROCEDIMENTO DE ANÁLISE POR CLAE

Para a separação dos enantiômeros da TBZ, oito tipos de colunas quirais foram avaliadas, dentre elas, as colunas derivadas de celulose: Chiralcel OD-H<sup>®</sup> (150 x 4,6 mm), composta de *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 μm de d.i.; Chiralcel OJ<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm), composta de *tris*(4-metilbenzoato) recobrindo partículas de sílica de 10 μm de d.i.; Coluna Lux 5μ Cellulose-2<sup>®</sup> (150 x 4,6 mm) derivada de monômeros de celulose (3-cloro-4-

metilfenilcarbamato) quimicamente ligados a partículas de sílica de 5 μm de d.i. e Coluna Chiralcel OD-R® (250 x 4,6 mm), composta de *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 μm de d.i.. As colunas derivadas de amilose foram: Chiralpak AD® (250 x 4,6 mm), constituída pelo derivado de amilose *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 μm de d.i.; Chiralpak AD-RH® (150 x 4,6 mm), constituída pelo derivado de amilose *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 μm de d.i.; Chiralpak AD-H® (150 x 4,6 mm), constituída pelo derivado de amilose *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 μm de d.i. e a coluna Lux 5μ Amylose-2® (150 x 4,6 mm) constituída pelo derivado de monômeros de amilose *tris*(5-cloro-2-metilfenilcarbamato) quimicamente ligados a partículas de sílica de 5 μm de d.i. As colunas Chiralpak e Chiralcel foram obtidas Chiral Technologies Inc. (Exton, PA, EUA) e as colunas Lux da Phenomenex (Torrance, CA, EUA).

Em todos os experimentos realizados foi empregada uma coluna de guarda C18 (4,6 x 12,5 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) com partículas de sílica de 5  $\mu$ m de d.i.

A avaliação da separação dos analitos foi realizada injetando as soluçõespadrão solubilizadas em 100 μL da fase móvel. O parâmetro usado para avaliação da separação foi a resolução (Rs), calculada segundo a **Equação 7** (capítulo 2) (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 2012)

A vazão da fase móvel empregada foi ajustada conforme a viscosidade da mesma, respeitando a pressão máxima permitida para cada tipo de coluna, resolução entre os analitos e tempo de análise. As análises foram efetuadas em 25°C.

#### 3.4. PROCEDIMENTO DE ANÁLISE POR EC

A avaliação da separação dos analitos por EC foi realizada injetando soluções-padrão (25 μL de cada analito em uma concentração de 100 μg mL<sup>-1</sup>) solubilizadas em 100 μL de água ultrapura. Da mesma forma que para a avaliação da separação quiral por CLAE, a resolução dos analitos foi calculada (conforme descrito na **Equação 7**, capítulo 2).

Em seu primeiro uso, um capilar de sílica fundida foi condicionado percolando por ele uma solução de NaOH 1,0 mol L-1 por 10 min, feito isso, utilizou-se uma lavagem com NaOH 100 mmol L-1 por mais 10 min. A cada início de utilização do equipamento, o capilar foi pré-condicionado percolando por ele uma solução de NaOH 100 mmol L<sup>-1</sup> por 10 min e posteriormente água ultrapura por mais 10 min. Entre as análises, o capilar foi pré-condicionado com NaOH 100 mmol L<sup>-1</sup> por 1 min, água ultrapura por 1 min e a solução eletrolítica de análise por 2 min. Terminadas as análises, o capilar foi novamente lavado com solução de NaOH 100 mmol L<sup>-1</sup> por 15 min e depois com água ultrapura por 15 min. Quando o capilar não era utilizado, ele foi preenchido com água e suas extremidades foram imersas em água. A avaliação de possíveis separações foi realizada em duplicata com solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L-1 pH 2,5 contendo 1,0% (para ciclodextrinas carregadas: P-β-CD e S-β-CD) ou 10 mmol L-1 (ciclodextrinas neutras: CM-β-CD, 2-OHprop-β-CD e β-CD). As injeções foram realizadas empregando uma pressão 0,5 psi por 10 s. O capilar e as amostras permaneceram na temperatura de 20° C.

#### 3.5. Preparo do Meio Microssomal

A partir do pool de microssomas hepático de humanos na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>, uma solução de HLMs suficiente para a realização dos experimentos e de concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> era preparada através de diluição em tampão fosfato pH 7,4, 500 mmol L<sup>-1</sup>. A partir desta solução, o meio microssomal era preparado. Este meio consistia em: 50 μL de HLMs, 10 μL da solução A do sistema de regeneração de NADPH, 2 μL da solução B do sistema de regeneração de NADPH, 133 μL de solução tampão fosfato pH 7,4 numa concentração de 100 mmol L<sup>-1</sup> e 5 μL da solução de TBZ (quando os experimentos de incubação com o fármaco eram realizados), totalizando um volume final de 200 μL.

No caso do preparo deste meio microssomal para os experimentos de extração (sem realizar os estudos de incubação), o sistema de regeneração NADPH (soluções A e B) e os 5 μL do fármaco não eram adicionados. Ao invés disso, eram adicionados 150 μL de solução tampão fosfato afim de totalizar os 200 μL finais de meio. Da mesma forma, os brancos utilizados entre as corridas analíticas também eram preparados sem a adição do fármaco e o sistema de soluções de regeneração.

#### 3.6. Programa Empregado na Determinação da Cinética enzimática

GraphPad Prism Versão 3.03 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para a determinação dos parâmetros enzimáticos das enzimas da CYP após metabolismo in vitro da TBZ.

#### 3.7. **SPME**

Os acessórios empregados no procedimento de extração por SPME foram: fibras de SPME C18 com espessura de 45 µm da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA); um agitador Vibrax modelo VRX (IKA®, Staufen, Alemanha) e também uma centrífuga CF-15 (Hitachi Koki®, Kyoto, Japão) para a centrifugação das amostras. Inicialmente, para avaliação do processo de extração, foram empregados 200 µL de meio microssomal (preparado conforme descrito no item 3.5), 2,8 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 na concentração de 500 mmol L-1 contendo 5 µL dos racematos da cis- e trans-diHTBZ na concentração de 100 µg mL-1 cada, totalizando um volume de 3 mL final. As fibras foram então mergulhadas nesta matriz e o frasco foi submetido à agitação no Vibrax a 1200 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, estas fibras foram recolhidas da amostra e submetidas ao processo de dessorção em 100 µL de água ultrapura e metanol na proporção de 90:10 (v/v).

#### **3.8. HF-LPME**

Nesse procedimento, o tubo de extração foi composto por 200  $\mu$ L de meio microssomal (preparado conforme descrito no item 3.5) e 2,8 mL de solução tampão fosfato pH 12,0 500 mmol L<sup>-1</sup> contendo 20  $\mu$ L de cada um dos racematos da diHTBZ, na concentração de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> cada, totalizando 3 mL de volume final.

### 3.9. **DLLME**

O procedimento de extração por DLLME foi otimizado empregando tubos de vidro cônicos de 10 mL. Para tanto, alíquotas de 200  $\mu$ L de meio microsomal

(preparado conforme item 3.5) foram enriquecidas com 5 μL das soluções de cada metabólito rac-cis- e  $rac\text{-}trans\text{-}diHTBZ}$  na concentração de 50 μg mL<sup>-1</sup>. Ainda nestes tubos, eram adicionados 800 μL de solução tampão fosfato pH 12,0 na concentração de 500 mmol L<sup>-1</sup>. Em seguida, uma mistura de solventes: 75 μL de diclorometano (solvente de extração) e 150 μL de acetona (solvente dispersante) foi injetado rapidamente nesses tubos cônicos para promover o "ponto nuvem". Imediatamente após esta etapa, os tubos eram agitados usando um agitador do tipo vórtex durante 10s. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Hitachi CF16RXII) durante 8 min a 1800 × g a 10 °C e, após sedimentação, o solvente de extração (50 μL) foi coletado. Em seguida, esse solvente foi transferido para um tubo cônico e este extrato era evaporado até à secura sob um fluxo de ar comprimido. O resíduo foi solubilizado em 100 μL de água ultrapura e injetado no equipamento.

### 3.10. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação do método para a análise dos metabólitos cis- e trans-diHTBZ foi realizada por padronização interna empregando o rac-mirtazapina como PI. A validação foi realizada em meio microssomal de acordo com as recomendações do guia da European Medicines Agency (EMA, 2011) para a análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos. O meio microssomal corresponde à solução de 50 μL de microssomas hepáticos na concentração proteica de 1 mg mL<sup>-1</sup> e 150 μL de solução tampão fosfato pH 7,4, 100 mmol L<sup>-1</sup> (conforme descrito no item 3.5). A linearidade do método foi realizada em

triplicata e os resultados foram ponderados utilizando o peso  $1/\chi$ . As curvas analíticas foram obtidas fortificando alíquotas de 200 µL de meio microssomal com 5 µL das soluções de trabalho da mistura racêmica dos metabólitos cis- e trans-diHTBZ nas concentrações de 0,29 - 19,57 µmol L-1 para cada estereisômero dos metabólitos diHTBZ.

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a concentração mais baixa dos metabólitos que pode ser determinada com exatidão (expressa pelo erro relativo em porcentagem, ER%) e precisão (expressa pelo desvio padrão relativo, DPR%) inferior a 20% (EMA, 2011) em cinco corridas analíticas (n = 5) e foi obtido fortificando o meio microssomal com 0,58 μmol L-1 da mistura racêmica dos metabólitos cis- e trans-diHTBZ, o que corresponde a uma concentração de 0,29 μmol L-1 para cada enantiômero.

A precisão e exatidão intraensaio e interensaio foram realizadas empregando 200  $\mu$ L de meio microssomal fortificado com os metabólitos cis- e trans-diHTBZ nas concentrações de 0,29, 0,59, 5,87 e 17,61  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> para cada estereisômero. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

Para avaliar a estabilidade dos metabólitos da TBZ, três experimentos distintos foram realizados: (i) estabilidade em bancada à temperatura ambiente (25 ± 2°C, durante 6 h), (ii) estabilidade nas condições de incubação (37°C, durante 15 min) e (iii) estabilidade no autoinjetor (25 ± 2°C, durante 24 h). Estes ensaios de estabilidade (n = 6) foram determinados empregando 200 μL de meio microssomal fortificados com soluções dos metabólitos cis- e trans-diHTBZ nas concentrações de 0,29, 0,59 e 17,61 μmol L-1 (valores correspondentes para cada estereisômero diHTBZ). As amostras foram consideradas estáveis se a

diferença na concentração obtida (representado pelo ER,%) fosse inferior a 15% em relação à concentração nominal. A seletividade do método foi avaliada através da análise do meio de incubação na ausência de rac-TBZ, seus metabólitos e o P.I. (n = 5) para avaliar a presença de picos no mesmo tempo de migração desses analitos.

# 3.11. PROCEDIMENTO DE INCUBAÇÃO PARA O ESTUDO DE METABOLISMO IN VITRO

O meio de incubação microssomal compreendeu inicialmente na adição de 5 μL da solução de substrato (TBZ), 133 μL de solução tampão fosfato 100 mmol L-1, pH 7,4, 10 μL da solução A de regeneração do sistema NADPH e 2 μL da solução B de regeneração do sistema NADPH. Esta mistura foi pré-incubada durante 5 min e, em seguida foi adicionado 50 μL de HLMs, resultando em um volume final do meio de incubação de 200 μL. A incubação foi realizada a 37°C em um banho sob agitação. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi interrompida e realizou-se a extração dos analitos. Controles foram realizados sem a adição do sistema de regeneração NADPH e sem a presença de microssomas. O metabolismo foi avaliado através da produção dos metabólitos *cis*- e *trans*-diHTBZ. Este procedimento de incubação foi adaptado do guia para teste com microssomas humanos da BD Gentest (BD Gentest®, 2013).

# 3.12. PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA DA TBZ

Previamente à determinação do perfil cinético da TBZ foram realizadas duas etapas a fim de obter os valores de tempo de incubação e concentração de

proteínas microssomais ideais capazes de manter as condições de velocidade inicial (V<sub>0</sub>) (condição onde a produção dos metabólitos é linear em relação ao tempo de incubação e a concentração de proteínas microssomais) (SEIBERT e TRACY, 2014). Estas condições otimizadas foram posteriormente empregadas na obtenção do perfil cinético das enzimas da CYP450 frente à TBZ.

Durante a etapa pré-cinética, a concentração de proteínas microssomais e o tempo de incubação foram avaliados a fim de determinar a faixa linear para formação dos metabólitos *cis*- e *trans*-diHTBZ. A concentração de proteína microssomal foi variada no intervalo 0,1 - 1,5 mg mL-¹ de proteínas microssomais (n = 3) e o tempo de incubação foi avaliado no intervalo de 0 - 60 min (n = 3). A concentração de *rac*-TBZ utilizada nesses experimentos foi de 6,15 μmol L-¹. Para os experimentos de concentração de proteínas microssomais e para o tempo de incubação foi empregada uma concentração de *rac*-TBZ de 6,15 μmol L-¹. Após determinadas as condições ótimas do metabolismo, uma ampla faixa de concentração de *rac*-TBZ (3,94 - 200 μmol L-¹) foi variada a fim de obter o perfil cinético.

# 3.13. DETERMINAÇÃO DA LIGAÇÃO À PROTEÍNA MICROSSOMAL E PLASMÁTICA

O estudo de ligação da TBZ às proteínas microssomais e plasmáticas foi realizado empregando o método de ultrafiltração (LLOYD, 2012). Alíquotas de 5 μL de *rac*-TBZ na concentração de 3,94 μmol L<sup>-1</sup> foram incubadas com HLMs (n = 4) a 37°C, conforme descrito na seção 3.12. O experimento foi realizado nas mesmas condições de V<sub>0</sub> determinadas na seção 3.12, exceto que não foi empregado o sistema de regeneração do NADPH. O meio microssomal foi

adicionado a um dispositivo de ultrafiltração (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter 30,000 molecular weight cut-off, Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) que apresenta um *cut-off* de 30000 Da, ideal para a retenção das proteínas microssomais e plasmáticas. A mistura foi centrifugada a 21800 *x g* por 30 min a 37°C. O filtrado obtido foi analisado por CLAE. Para o ensaio de ligação às proteínas plasmáticas foi empregado uma concentração proteica de 42 mg mL<sup>-1</sup>, correspondente a concentração presente no corpo humano (em média) (GOMES-GONZÁLEZ et al., 2015). Controles (n = 4) sem adição de microssomas ou plasma foram analisados a fim de comparação.

O percentual de ligação às proteínas foi obtido comparando-se os valores das áreas dos picos presentes no ultrafiltrado, considerando o ensaio sem a presença de proteínas (Área<sub>tampão</sub>) e o ensaio empregando a matriz proteica (Área<sub>matriz</sub>, de acordo com a **Equação 9** (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

% ligação mic = 
$$100 - \left(\frac{\acute{A}rea_{matriz}}{\acute{A}rea_{tampão}}\right) x 100$$
 (9)

Os valores da fração não-ligada (F<sub>livre</sub>) às proteínas, empregados nos cálculos para a predição de parâmetros in vivo, foi calculada de acordo com a **equação 10** (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

$$F_{livre} = \frac{\acute{A}rea_{matriz}}{\acute{A}rea_{tamp\~ao}} \tag{10}$$

# 3.14. EXTRAPOLAÇÃO IN VITRO-IN VIVO (EIVIV)

A utilidade da EIVIV tem sido descrita por diversos autores nos últimos anos (POULIN et al., 2012; WILK-ZASADNA et al., 2015; OBACH, 2011). Essa técnica reside especialmente na predição do clearance in vivo a partir de dados in vitro (CHEN et al., 2012). Inicialmente o clearance intrínseco (*CLint*) foi calculado a partir dos parâmetros cinético-enzimáticos de acordo com a **Equação 11** (POULIN et al., 2012)

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_M} \tag{11}$$

Nesta equação,  $V_{max}$  corresponde à velocidade máxima e  $K_m$  à concentração do substrato referente à metade da velocidade máxima.

O valor do *CL*<sub>int</sub> pode ser utilizado para a determinação do clearance in vivo (*CL*) (**Equação 12**), e assim, predizer a situação real de eliminação do fármaco do organismo (POULIN et al., 2012).

$$CL = \frac{\frac{Q.A.B.f_{up.CL_{int}}}{f_{umic}}}{Q + \frac{A.B.f_{up.CL_{int}}}{f_{umic}}}$$
(12)

Na **equação 12**, A é a quantidade em miligramas de microssoma por grama de fígado, B é a quantidade em gramas de fígado por kilograma de peso corporal; Q indica o fluxo sanguíneo no fígado,  $f_{up}$  é a fração livre do composto no plasma e  $f_{umic}$  corresponde à fração livre do composto na incubação microssomal (AUSTIN et al., 2005).

Além da determinação do clearance (*CL*), o clearance hepático (*CL<sub>H</sub>*) é outro parâmetro que pode ser predito considerando-se os fatores que afetam a eliminação do substrato; a predição do *CL<sub>H</sub>* é descrito pela **Equação 13** (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012):

$$CL_{H} = \frac{Q.fu_{p}.\frac{CL_{int}}{fu_{mic}}}{Q+fu_{p}.\frac{CL_{int}}{fu_{mic}}}$$
(13)

Outro parâmetro que pode ser deduzido empregando-se o valor de  $CL_H$  é a taxa de extração hepática (E) (**Equação 14**) (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). Esse parâmetro é influenciado pela atividade enzimática, pela fração do fármaco livre e pelo fluxo hepático; indica a fração do fármaco que é difundida pelas células hepáticas e afeta sua biodisponibilidade na corrente sanguínea.

$$E = \frac{CL_H}{Q} \tag{14}$$

### 3.15. ESTUDOS DE FENOTIPAGEM COM INIBIDORES QUÍMICOS DA CYP

Com o objetivo de determinar as isoformas da CYP450 responsáveis pela formação dos enantiômeros diHTBZ na presença dos microssomas hepáticos humanos, foram empregados inibidores químicos seletivos de algumas isoformas da CYP.

Estes experimentos foram conduzidos separadamente para cada inibidor seletivo (n = 5), sendo que os inibidores empregados foram: quinidina (CYP2D6), ticlopidina (CYP2C19), sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4) e  $\alpha$ -naftoflavona (CYP1A2) nas concentrações de 2, 10, 2, 2 e 1  $\mu$ M, respectivamente (BARTH et al., 2015). Neste experimento, rac-TBZ foi incubada em uma concentração de 3,94  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (valor próximo ao  $K_m$  obtido com o estudo cinético) concomitantemente com um inibidor específico da CYP presente em uma concentração final pré-determinada ao redor de seu valor de  $K_i$  ou  $IC_{50}$  (BJORNSSON et al., 2003). Em seguida foi adicionado o cofator NADPH e solução tampão fosfato pH 7,4 (100 mmol L<sup>-1</sup>) e a mistura foi então, pré-incubada

durante 5 min. A reação de metabolismo foi iniciada com a adição de HLMs na concentração proteica de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, em um volume final do meio de 400 μL. A mistura foi incubada a 37°C sob agitação durante 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 600 μL de solução tampão fosfato pH 12,0, 500 mmol L<sup>-1</sup>. Controles (n = 5) na ausência dos inibidores seletivos foram produzidos e a atividade enzimática remanescente das isoformas CYP foi calculada através da razão entre a área obtida com a amostra contendo o inibidor específico dividido pela área do controle. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade enzimática remanescente.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

# 4.1. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS METABÓLITOS DA TBZ

O procedimento de otimização para a separação simultânea dos enantiômeros da TBZ e dos estereoisômeros de seus metabólitos, *cis*- e *trans*-diHTBZ, foi realizado utilizando um capilar de sílica fundida com 75 μm de diâmetro interno. Inicialmente, os valores de pKa dos analitos foram considerados. A TBZ é uma molécula com característica básica e valor de pKa de 6,00 enquanto que os metabólitos apresentam um valor de pKa de 7,5 (SCHERMAN; HENRY, 1982). Estes dois compostos são bases fracas e uma estratégia de análise para a resolução de analitos com estas características é o emprego de diferentes ciclodextrinas (CDs) em pH ácido, conforme discutido no capitulo 2. Com base nisso, os mesmos parâmetros foram avaliados seguindo os mesmos critérios.

Primeiramente, para avaliar a separação dos analitos, foram empregadas diversas ciclodextrinas, que foram dissolvidas em uma solução tampão fosfato 50 mmol de pH de 2,5. Individualmente, as CDs neutras (β-CD, 2OHprop-β-CD e CM-β-CD) foram empregadas nas concentrações 10 mmol L-1, 10 mmol L-1 e 1% (m/v), respectivamente, e as CDs carregadas (S-β-CD e P-β-CD) foram empregadas na concentração de 1% (m/v). Nestes experimentos iniciais empregou-se um capilar de 40 cm de comprimento efetivo. A tensão aplicada foi de 10 kV em polaridade normal (quando CM-β-CD, CD-β e 2OHprop-β-CD foram usadas) ou reversa (quando S-β-CD ou P-β-CD) foram utilizadas. Dentre as CD avaliadas, apenas CM-β-CD foi capaz de separar ambos os metabólitos e seus estereisômeros nas condições empregadas. A migração da TBZ não foi observada qualquer condição empregada. Portanto, a otimização da separação por EC foi focada na análise dos enantiômeros de seus metabólitos. Isso não prejudica os estudos de cinética enzimática, pois nesses estudos os metabólitos do substrato é que devem ser monitorados e quantificados.

Em seguida foi avaliado o tipo de eletrólito de análise empregando solução tampão tris-fosfato e solução tampão fosfato na concentração de 50 mmol L-1, pH 2,5. A melhor resolução para todos os analitos e tempo de migração mai curto foi obtida com o emprego da solução tampão tris-fosfato. Depois de selecionar o tipo de solução tampão, a concentração do mesmo foi avaliada na faixa de 25 - 100 mmol L-1. A melhor condição foi obtida empregando a concentração 80 mmol L-1 de solução tampão tris-fosfato. Após a otimização do tipo de eletrólito de análise e sua concentração, a concentração de CD foi otimizada. O efeito da concentração de CM-β-CD sobre a separação

enantiosseletiva foi avaliada utilizando um intervalo de concentração de 0,5 - 2,0% (m/v) da ciclodextrina CM- $\beta$ -CD. O aumento da concentração de CD aumentou os tempos de migração e os valores de resolução de todos os analitos. O emprego de 1% de CM- $\beta$ -CD resultou em valores de resolução aceitáveis (Rs > 1,5), um valor de corrente de 70  $\mu$ A e o tempo de corrida foi menor de 15 minutos. Portanto, escolheu-se empregar CM- $\beta$ -CD na concentração de 1,0% (m/v) para os próximos experimentos.

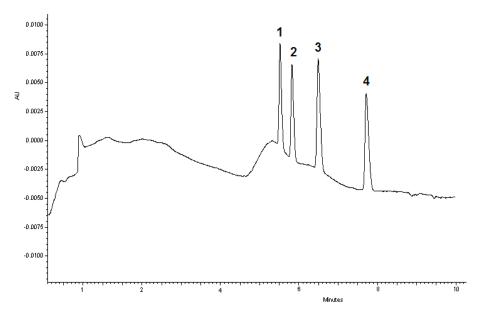
Outros parâmetros como a tensão aplicada (5 - 30 kV, polaridade normal), comprimento do capilar (redução para 20 cm) e a temperatura do capilar (10 - 25 °C) foram também otimizados. O melhor valor de resolução com um tempo de análise adequado foi obtido empregando +15 kV de tensão, 20 cm de comprimento efetivo e mantendo o capilar numa temperatura de 15 °C.

Portanto, as melhores condições eletroforéticas para a análise dos metabólitos quirais diHTBZ foram obtidas utilizando uma solução tampão trisfosfato (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 10 segundos. Sob estas condições as resoluções apropriadas foram obtidas em um tempo de análise menor de 8 minutos (**Figura 22**).

Como pode ser observado, para avaliar as condições de separação dos racematos diHTBZ por EC, foi empregado o mesmo raciocínio anterior do capítulo 2 para a OXC e seu metabólito. Isto se deve ao fato de, primeiramente iniciarmos a avaliação com todas as ciclodextrinas possíveis empregando

solução tampão em pH ácido (por se tratar de analitos básicos), após a escolha da ciclodextrina empregada os ajustes posteriores foram feitos com base nas mesmas necessidades encontradas no método do capítulo 2, como, por exemplo, redução da corrente observada, no tempo de migração, e no alargamento dos picos. Assim, devido aos sucessos de otimização apresentados no capítulo anterior, os ajustes finos foram realizados. Porém, é importante ressaltar que os métodos são bem distintos, coincidindo somente no valor do pH do eletrólito e comprimento de capilar empregado.

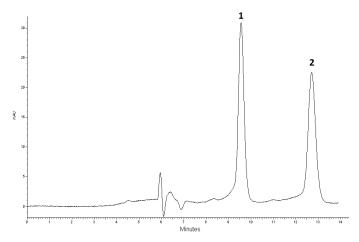
A ordem de migração dos enantiômeros dos estereoisômeros diHTBZ não puderam ser determinadas devido à ausência dos enantiômeros puros para serem comprados e também devido à impossibilidade de separação dos enantiômeros destes metabólitos por CLAE nas condições oferecidas pelo nosso laboratório. Portanto, os enantiômeros dos isômeros *cis-* e *trans-*diHTBZ foram nomeados de acordo com seus tempos de migração. Onde, E1 corresponde ao primeiro enantiômero a migrar e E2 corresponde ao segundo.



**Figura 22 -** Eletroferograma correspondente a separação dos metabólitos diHTBZ, picos **1 e 2** correspondem aos enantiômeros da *trans*-diHTBZ e picos **3 e 4** correspondem aos enantiômeros da *cis*-diHTBZ.

# 4.2. SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA TBZ POR CLAE

A separação enantiosseletiva da TBZ ainda não foi relatada e a separação dos metabólitos diHTBZ foi relatada apenas uma única vez na literatura. Este método emprega a coluna quiral Chirex 3014® e como fase móvel uma mistura de hexano: 1,2-dicloroetano: etanol: ácido trifluoroacético (60:30:9:5:0,5, v/v/v/v) (BOLDT et al., 2009). Portanto, colunas com as fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos foram avaliadas na separação da TBZ e seus metabólitos. Em todas as condições avaliadas não foi possível realizar a separação dos estereoisômeros dos metabólitos da TBZ, somente os enantiômeros da TBZ puderam ser resolvidos. A melhor separação foi obtida empregando uma coluna Chiralcel OJ utilizando e metanol: isopropanol (90:10, v/v) como fase móvel a uma vazão de 0,5 mL min-1 e temperatura de 25°C (Figura 23). Apesar do insucesso na separação dos enantiômeros dos metabólitos da TBZ, essa condição obtida permitiu estudo de ligação às proteínas plasmáticas e determinação da fração livre de TBZ nos estudos de ligação às proteínas plasmáticas e microssomais.



**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<sup>-1</sup> e temperatura de 25°C.

# 4.3. OTIMIZAÇÃO DA SPME E HF-LPME

Embora os procedimentos de otimização da extração por SPME e HF-LPME tenham sido descritos para avaliação desta etapa do projeto, os mesmos não foram demonstrados devido a diversos problemas apresentados durante a tentativa de extração dos analitos de interesse do meio microssomal empregando estas técnicas. Os problemas enfrentados empregando a SPME foram o inchaço e ressecamento do recobrimento polimérico da fibra quando exposta diretamente no meio empregado; quanto à HF-LPME houve formação de espuma no tubo contendo a amostra, dificultando a extração dos analitos. Sendo assim, optou-se por dar continuidade a avaliação das microtécnicas empregando a DLLME.

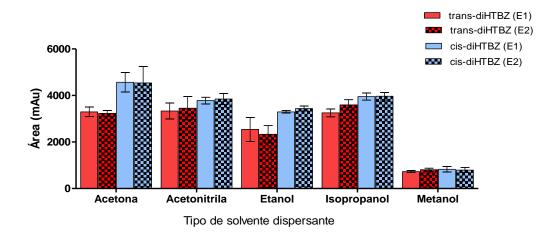
# 4.4. OTIMIZAÇÃO DA DLLME

Para efetuar a otimização da DLLME, foram empregados 200 μL de meio microssomal (conforme descrito no item 3.5) e 50 μg mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero do metabólito.

Assim, os parâmetros analisados no procedimento da DLLME foram: tipo de solvente extrator, tipo de solvente dispersante, volume de solvente extrator, volume de solvente dispersante e tempo de agitação da amostra em vórtex (DLLME assistida). Todos os procedimentos de otimização foram realizados triplicata (n = 3).

Uma vez que os metabólitos da TBZ possuem pKa em torno de 7,5, iniciou-se a otimização da extração mantendo a amostra a um pH elevado para assegurar a não-protonação dos analitos. Assim, adicionou-se 800 μL de solução tampão fosfato 500 mmol L-1 pH 12,0 aos 200 μL de meio microssomal.

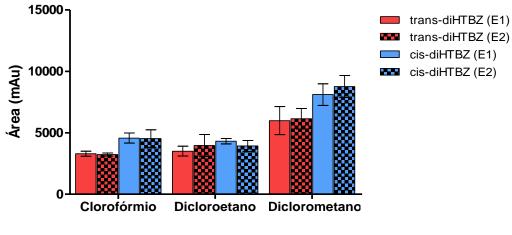
Feito isso, o primeiro parâmetro da DLLME avaliado foi o tipo de solvente dispersante. A escolha de solvente dispersante centra-se na sua afinidade tanto para a fase aquosa quanto na fase orgânica, de modo a aumentar a área superficial do solvente extrator através da formação do ponto nuvem no tubo contendo a amostra. Assim, foi definido inicialmente 50 μL como volume de solvente extrator (clorofórmio) e 100 μL como o volume de solvente dispersante (variado). Foram avaliados cinco tipos de solventes dispersantes: acetona, isopropanol, etanol, acetonitrila e metanol. Como pode ser observado na **Figura 24**, o melhor tipo de solvente dispersante na extração dos metabólitos da TBZ foi a acetona e este solvente foi então, empregado nos procedimentos posteriores.



**Figura 24** – Efeito do solvente dispersor na extração dos estereisômeros 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<sup>-1</sup>. Solvente extrator: clorofórmio (50 μL). Solvente dispersor: 100 μL de cada solvente dispersor. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

Em DLLME são geralmente utilizados solventes extratores mais densos do que a fase aquosa de modo que este solvente extrator se acumule na parte

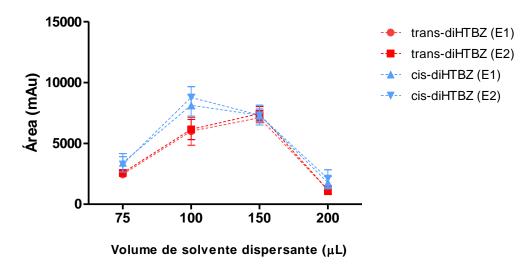
inferior do tubo de amostra após a centrifugação. Os solventes mais utilizados para este fim são os solventes clorados. Portanto, o tipo de solvente extrator foi avaliado empregando inicialmente 50 μL dos solventes clorados: clorofórmio, diclorometano e dicloroetano. A **Figura 25** mostra que a melhor condição obtida neste procedimento foi utilizando diclorometano como solvente extrator.



#### Tipo de solvente extrator

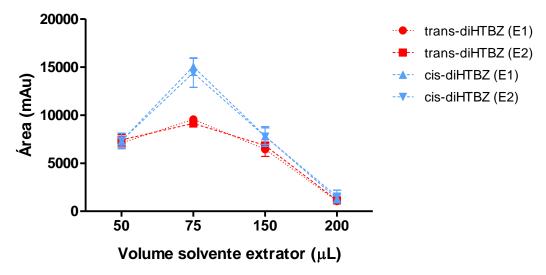
**Figura 25** – Efeito do tipo de solvente extrator na recuperação dos estereisômeros da diHTBZ em meio microssomal. Volume da matriz: 200 μL do meio microssomal, 800 μL de solução tampão fosfato pH 12, 500 mmol L<sup>-1</sup>. Solvente dispersor: acetona (100 μL) e 50 μL de cada solvente extrator. Extração em 25°C. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

Uma vez que foi obtida a melhor condição de mistura dos solventes, o passo seguinte foi encontrar qual a melhor quantidade destes solventes para a obtenção de uma melhor recuperação desses analitos. Assim, em primeiro lugar, foi variado o volume do solvente dispersante. O volume de solvente dispersante (acetona) foi avaliado no seguinte intervalo: 75, 100, 150 e 200  $\mu$ L mantendo o solvente extrator em um volume constante de 50  $\mu$ L. Como pode ser observado na **Figura 26** o melhor volume de solvente dispersante foi obtido empregando 150  $\mu$ L de acetona. A próxima etapa foi avaliar o volume de solvente extrator.



**Figura 26** – Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos estereisômeros da diHTBZ em meio microssomal. Volume da matriz: 200 μL do meio microssomal, 800 μL de solução tampão fosfato pH 12, 500 mmol L<sup>-1</sup>. Volume de solvente dispersor variável e 50 μL de solvente extrator (diclorometano). Temperatura de extração em 25°C. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

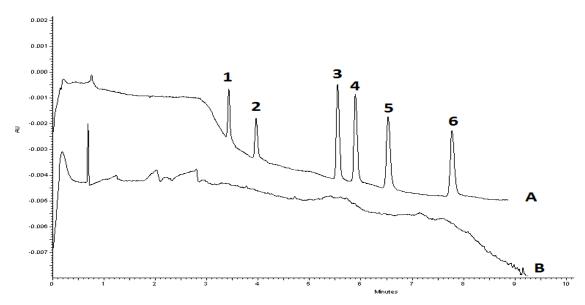
A avaliação do volume do solvente extrator foi realizada utilizando um volume constante de 150  $\mu$ L de acetona (dispersante), sendo os seguintes volumes de diclorometano avaliados: 50, 75, 100 e 200  $\mu$ L. O melhor resultado foi obtido com 75  $\mu$ L de diclorometano, conforme pode ser observado na **Figura** 27. Por conseguinte, nos procedimentos posteriores foram utilizados 150  $\mu$ L de acetona e 75  $\mu$ L de diclorometano como solvente dispersor e extrator, respectivamente.



**Figura 27** – Efeito do volume de solvente extrator na recuperação dos estereisômeros da diHTBZ em meio microssomal. Volume da matriz: 200 μL do meio microssomal, 800 μL de solução tampão fosfato pH 12, 500 mmol L<sup>-1</sup>, 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. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharnaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

Finalmente, foi avaliado o tempo de agitação da amostra em vórtex (DLLME assistida) (LI et al., 2015). Para realizar isso, foi utilizado um dispositivo vórtex manual. Após a formação do ponto nuvem, a amostra foi agitada durante 0, 5, 10, 20 e 30 segundos e, em seguida, analisada. Observou-se que, após 10 s de agitação, houve um aumento significativo na recuperação dos analitos (dados não mostrados). Longos períodos de tempo não alteraram significativamente os valores de recuperação. Portanto, 10 segundos foi escolhido como tempo de agitação.

Portanto, após a otimização da DLLME, a seguinte condição foi definida: solvente extrator: diclorometano (75 μL); solvente dispersor: acetona (150μL); agitação no vórtex por 10 s após a formação do ponto nuvem. A **Figura 28 A** mostra um eletroferograma da melhor condição de DLLME obtida para análise dos enantiômeros da diHTBZ e a **Figura 28 B** mostra um eletroferograma do branco de meio microssomal após o procedimento da DLLME.



**Figura 28 - A)** Eletroferograma representativo da análise dos estereisômeros do diHTBZ após a otimização da DLLME. Os picos 1) e 2) representam os enantiômeros do padrão interno (mirtazapina); 3) e 4) representam os enantiômeros  $\it trans$ -diHTBZ, 5) e 6) representam os enantiômeros  $\it cis$ -diHTBZ. **B)** Eletroferograma do branco de meio microssomal após DLLME. Condições de análise descrita na Figura 23. Condições de extração: solvente extrator: diclorometano (75  $\mu$ L); solvente dispersor: acetona (150 $\mu$ L); agitação no vórtex por 10 s após a formação do ponto nuvem. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

### 4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 0,29 - 19,57 µmol L-1 para cada estereisômero dos metabólitos com valores de coeficiente de correlação maiores que 0,99 e erro relativo para cada ponto inferior a 15% (**Tabela 8**). O limite de quantificação foi de 0,29 µmol L-1 para cada estereisômero dos metabólitos com ER% e DPR% inferiores a 12%. A seletividade do método foi assegurada por meio da análise de brancos de meio microssomal (**Figura 28 B**). Como pode ser observado, não há interferentes nos tempos de migração do padrão interno ou dos enantiômeros dos metabólitos.

**Tabela 8 -** Linearidade do método desenvolvido para análise da trans-diHTBZ e da cis-diHTBZ em meio microssomal. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

Analitos	Concentração (μmol L <sup>-1</sup> )	Equação linear	r <sup>a</sup>
Trans-diHTBZ (E1)	0,29 – 19,57	y = 0.7849x - 0.0925	0,9981
Trans-diHTBZ (E2)	0,29 – 19,57	y = 0,7792x + 0,0151	0,9970
Cis-diHTBZ (E1)	0,29 – 19,57	y = 0.4179x + 0.8779	0,9957
Cis-diHTBZ (E2)	0,29 – 19,57	y = 0.3699x + 0.0487	0,9955

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Coeficiente de correlação.

Os resultados de precisão e exatidão intraensaio e interensaio estão apresentados na **Tabela 9 e 10**, respectivamente. Estes resultados mostram que o método proposto apresenta precisão e exatidão adequada considerando os critérios de aceitabilidade adotados.

**Tabela 9 -** Precisão e exatidão intraensaio para o método desenvolvido para análise da trans-diHTBZ e da cis-diHTBZ em meio microssomal. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

Analitos	Concentração nominal (μmol L <sup>-1</sup> )	Concentração obtida (μmol L <sup>-1</sup> )	Precisão (DPR%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
	0,39	0,36	8	_7,7
Trans-	0,59	0,63	5	6,8
diHTBZ (E1)	5,87	5,60	2	-4,6
	17,61	18,38	1	4,4
	0,39	0,36	7	_7,7
Trans-	0,59	0,57	4	-3,2
diHTBZ (E2)	5,87	5,95	5	1,4
	17,61	18,9	1	7,3
	0,39	0,38	8	-2,6
Cis-diHTBZ	0,59	0,60	5	1,7
(E1)	5,87	5,92	1	0,9
	17,61	17,24	5	-2,1
	0,39	0,36	7	_7,7
Cis-diHTBZ	0,59	0,64	2	8,5
(E2)	5,87	5,42	8	-7,6
	17,61	16,64	7	-5,5

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Desvio padrão relativo

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Erro relativo

**Tabela 10 -** Precisão e exatidão interensaio para o método desenvolvido para análise da trans-diHTBZ e da cis-diHTBZ em meio microssomal. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

Analitos	Concentração nominal (μmol L <sup>-1</sup> )	Concentração obtida (μmol L <sup>-1</sup> )	Precisão (DPR%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
	0,39	0,34	10	-12,8
Trans-	0,59	0,53	7	-10,3
diHTBZ (E1)	5,87	5,77	3	-1,7
	17,61	17,82	2	1,2
	0,39	0,34	8	-12,8
Trans-	0,59	0,57	4	-3,4
diHTBZ (E2)	5,87	5,69	3	-3,1
	17,61	17,89	2	1,6
Cis-diHTBZ	0,39	0,37	9	-5,1
	0,59	0,64	7	8,5
(E1)	5,87	5,56	5	-5,3
	17,61	17,44	3	-1,0
	0,39	0,35	6	_10,3
Cis-diHTBZ	0,59	0,59	2	0,0
(E2)	5,87	5,75	5	-2,0
	17,61	19,12	3	8,6

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Desvio Padrão relativo

Os ensaios de estabilidade mostraram que os metabólitos diHTBZ permaneceram estáveis durante a realização do experimento (estabilidade de bancada), nas condições de biotransformação e no injetor automático do equipamento (**Tabela 11**).

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Erro relativo

**Tabela 11-** Estabilidade da trans-diHTBZ e da cis-diHTBZ em meio microssomal. . Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

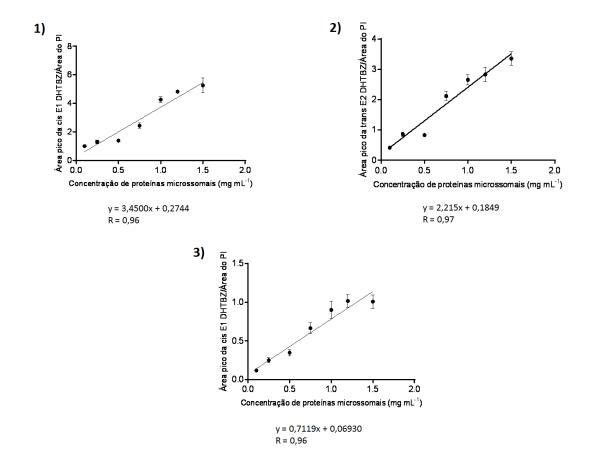
Analitos		-diHTBZ E1)		-diHTBZ E2)		HTBZ (1)		IiHTBZ E2)
Estabilidade no autoinjetor								
Concentração obtida (μmol L <sup>-1</sup> )	0,62	17,90	0,62	18,13	0,52	18,95	0,61	17,87
Precisão (DPR%) <sup>a</sup>	7	14	9	10	6	12	13	9
Exatidão (ER%) <sup>b</sup>	5,1	1,7	5,1	3,0	-11,8	7,6	3,4	1,5
			Estabilidad	de de bancada				
Concentração obtida (µmol L-1)	0,52	17,11	0,59	16,84	0,59	16,31	0,59	15,26
Precisão (DPR%) <sup>a</sup>	1	5	8	7	10	11	8	8
Exatidão (ER%) <sup>b</sup>	-11,8	-2,9	0,0	-4,4	0,0	-7,4	-1,7	-13,3
			Condições	de incubação				
Concentração obtida (µmol L-1)	0,59	18,75	0,59	17,22	0,56	17,17	0,56	16,50
Precisão (DPR%) <sup>a</sup>	9	9	9	7	8	9	6	9
Exatidão (ER%) <sup>b</sup>	0,0	6,5	0,0	-2,2	-5,1	-2,5	-5,1	-6,3

a Desvio padrão relativo
 b Erro relativo

# 4.6. METABOLISMO ENANTIOSSELETIVO IN VITRO DA TBZ E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ENZIMÁTICOS

Na determinação do perfil cinético das enzimas microssomais frente à TBZ, primeiramente, foi determinado uma região linear de concentração de proteínas e do tempo de incubação para a formação dos metabólitos (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). O estudo foi realizado monitorando-se a produção dos metabólitos através do método desenvolvido por EC, a fim de obter a contribuição enantiosseletiva de cada composto no perfil cinético da TBZ. Inúmeros trabalhos têm demonstrado a importância da estereosseletividade no metabolismo de compostos quirais (TRACY et al., 1999) (ABELO et al., 2000) (LEE et al., 2006).

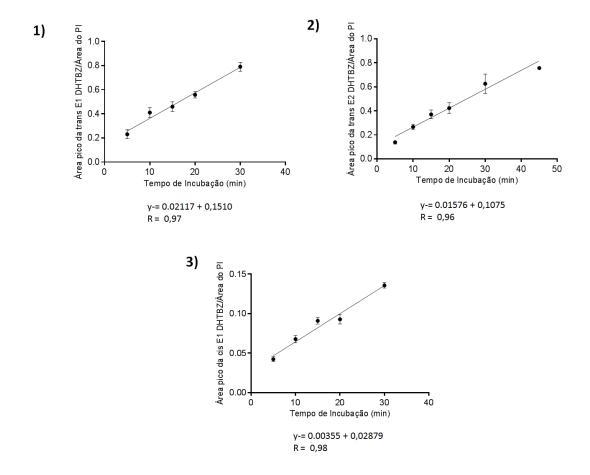
A primeira condição avaliada foi a influência da variação da concentração das proteínas microssomais na formação dos metabólitos. Foi empregado o seguinte intervalo de concentração de microssomas: 0,10 - 1,50 mg de proteínas por mL de meio microssomal. Os resultados obtidos estão demonstrados na (Figura 29)



**Figura 29 -** Efeito da variação da quantidade de proteínas na formação da diHTBZ. Concentrações do *rac*-TBZ utilizadas nos gráficos 6,15  $\mu$ M. **1)** os gráficos correspondentes à formação do enantiômero *trans*-diHtBZ (E1), 2) ao enantiômero *trans*-diHTBZ (E2) e 3) ao enantiômero *cis*-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.

A partir destes gráficos que apresentaram um comportamento linear na faixa estudada foi possível determinar a concentração de proteínas microssomais que atendeu as condições de  $V_0$ , a qual correspondeu a 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.

O segundo parâmetro avaliado foi a influência da variação do tempo de incubação na produção da diHTBZ (**Figura 30**). Os tempos avaliados foram: 0-60 min.

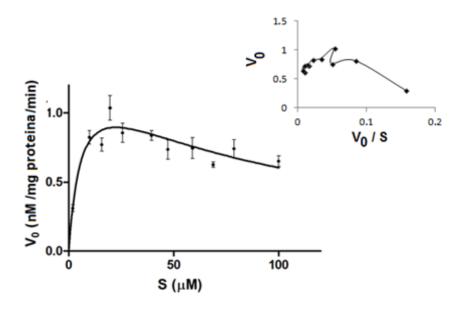


**Figura 30** - Efeito da variação do tempo de incubação na produção de diHTBZ. Concentração de *rac*-TBZ 6,15 μM. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Concentração de proteínas microssomais de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. sendo **1)** o gráfico correspondente à formação do enantiômero *trans*-diHtBZ (E1), **2)** ao enantiômero *trans*-diHTBZ (E2) e **3)** ao enantiômero *cis*-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 triplicata.

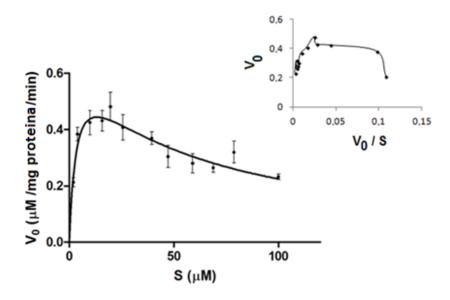
Dentro da faixa linear obtida (r = 0,97), o tempo de incubação que correspondeu a uma produção mínima, mas quantificável de diHTBZ que foi de 15 min.

As condições de concentração de proteínas microssomais de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e tempo de incubação de 15 min foram empregadas na determinação dos parâmetros enzimáticos das enzimas da CYP450 após incubada com a TBZ. Para tanto, um gráfico de V<sub>0</sub> (nmol mg proteína<sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>) *versus* concentração do substrato (μmol L<sup>-1</sup>) foi construído. O resultado foi obtido variando-se a

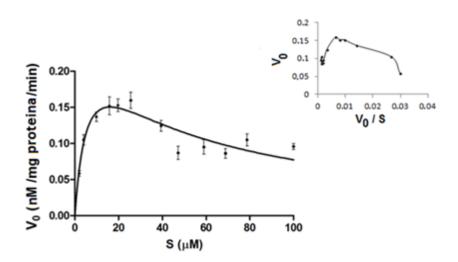
concentração de *rac*-TBZ de 3,94 a 200 µmol L<sup>-1</sup>. A análise dos gráficos indicou um perfil cinético de inibição pelo substrato (**Figuras 31 - 33**). Além dos gráficos de V<sub>o</sub> *versus* concentração, foi também construído os gráficos de Eadie-Hofstee (V<sub>o</sub> *versus* V<sub>o</sub>/[S]) para confirmar o perfil da cinética obtido. Em cinéticas onde há um perfil de inibição pelo subtrato no gráfico de Eadie-Hofstee é observado um aumento da velocidade até atingir um platô o qual depois tende a zero, conforme obervado nas **menores**, dentro das **Figuras 31 a 33**.



**Figura 31 -** Perfil cinético das enzimas microssomais frente à *rac*-TBZ obtido pelo monitoramento da formação da *trans*-diHTBZ (E1) (**A**). Gráfico de inibição pelo substrato e gráfico de Eadie-Hofstee (gráfico menor). As condições de metabolismo foram descritas na seção 3.2.4. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).



**Figura 32-** Perfil cinético das enzimas microssomais frente à *rac*-TBZ obtido pelo monitoramento da formação da *trans*-diHTBZ (E2). Gráfico de inibição pelo substrato e gráfico de Eadie-Hofstee (gráfico menor). As condições de metabolismo foram descritas na seção 3.2.4. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).



**Figura 33-** Perfil cinético das enzimas microssomais frente à *rac*-TBZ obtido pelo monitoramento da formação da *cis*-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. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

Devido à baixa produção, os parâmetros cinéticos do enantiômero cisdiHTBZ (E2) não pode ser determinado. A cinética atípica observada pelos
gráficos não-hiperbólicos obtidos constituem um caso de alosterismo que é
relativamente comum na descrição das enzimas da CYP (ATKINS, 2005). A
inibição pelo substrato é observada quando há redução na velocidade da reação
em altas concentrações de substrato. O mecanismo é descrito por um modelo
com dois sítios em que há a presença de um sítio favorável à reação, enquanto
o outro é menos favorecido ou não produtivo (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012)
(HUTZLER; TRACY, 2002). A **Equação 15** descreve este perfil cinético
(SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

$$Vo = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i}}$$
 (15)

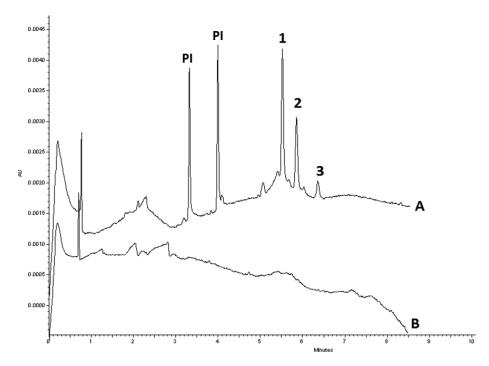
*V*<sub>0</sub> corresponde à velocidade inicial, *V*<sub>max</sub> corresponde à velocidade máxima, *K*<sub>m</sub> indica a concentração do substrato obtida com a metade da velocidade máxima, [S] refere-se à concentração do substrato, enquanto *K*<sub>i</sub> descreve a constante de dissociação no equilibro para a ligação do substrato no sitio inibitório da enzima. A partir disso, é possível predizer que a TBZ é metabolizada em diHTBZ predominantemente por uma isoforma da CYP que contenham dois ou mais sítios ativos (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). O perfil obtido com o gráfico de Eadie-Hofstee confirmou a inibição pelo substrato com a produção de um "gancho" no quadrante superior (HUTZLER; TRACY, 2002).

O estudo in vitro demonstrou que o metabolismo pelos microssomas hepático de humanos foi diastereosseletivo e enantiosseletivo, sendo que apenas três isômeros dos metabólitos diHTBZ foram produzidos, sendo dois na

configuração *trans*- e o terceiro na configuração *cis*- **(Figura 34)**. Além disso, os parâmetros cinéticos para cada enantiômero dos diastereoisômeros diHTBZ foram diferentes, confirmando a estereosseletividade no processo **(Tabela 12)**.

**Tabela 12-** Parâmetros enzimáticos obtidos para cada enantiômero dos diastereoisômeros dos metabólitos da TBZ.

Metabólito	$K_m$ (µmol L <sup>-1</sup> )	K <sub>i</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (nmol mg proteína <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
trans-diHTBZ (E1)	6,26 ± 2,33	80,07 ± 25,95	1,40 ± 0,20
trans-diHTBZ (E2)	$3,45 \pm 1,06$	50,73 ± 13,19	$0,68 \pm 0,08$
cis-diHTBZ (E1)	$6,04 \pm 1,60$	42,93 ± 10,42	$0.26 \pm 0.03$



**Figura 34 - A)** Eletroferograma representativo para análise dos estereisômeros 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) *cis*-diHTBZ(E1). B) Eletroferograma do branco de microssoma humano. Condições de extração descrita na Figura 29. Condições de análise descrita na Figura 22.

O  $K_m$  obtido pelo monitoramento da trans-diHTBZ (E1) e da cis-diHTBZ (E1) foi aproximadamente o dobro daquele obtido com a trans-diHTBZ (E2), indicando que as enzimas microssomais apresentam uma maior afinidade para a produção do último metabólito [trans-diHTBZ (E2)] a partir da TBZ. Os valores de  $V_{max}$  indicam que a ordem decrescente da velocidade enzimática atingida pela TBZ de acordo com cada metabólito é o seguinte: trans-diHTBZ (E1) > trans-diHTBZ (E2) > trans-diHTBZ (E2) > trans-diHTBZ (E1). A obtenção desses parâmetros enzimáticos foi importante para determinação do clearance intrínseco e posterior predição de alguns parâmetros in vivo, conforme apresentado nos parágrafos seguintes.

### 4.7. LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS MICROSSOMAIS E PLASMÁTICAS

No estudo de ligação às proteínas microssomais foram empregadas as condições de  $V_0$  no momento da incubação; portanto a concentração de proteínas microssomais empregada foi de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e o tempo de incubação foi de 15 minutos. Após a etapa de incubação, o meio foi adicionado ao dispositivo de ultrafiltração.

A porcentagem de ligação às proteínas microssomais e plasmáticas foi de 16% e 90%, respectivamente. Dessa forma, a fração livre microssomal (f<sub>mic</sub>) e a fração livre plasmática (f<sub>up</sub>) foi, respectivamente, 0,84 e 0,10.

Um estudo farmacocinético em humanos demonstrou uma taxa de ligação da TBZ às proteínas plasmáticas de 83-88% (ROBERTS et al., 1986), estes valores foram semelhantes ao encontrado no presente trabalho, evidenciando a eficiência do ensaio de ultrafiltração na determinação da ligação às proteínas.

Além disso, Jankovic e Clarence-Smith (2014) relataram uma faixa de ligação in vitro às proteínas plasmáticas de 82 a 85% para a TBZ.

### 4.8. EXTRAPOLAÇÃO ÎN VITRO-ÎN VIVO (EIVIV)

A área da farmacologia clínica visa melhorar o cuidado aos pacientes através do uso de medicamentos efetivos e em uma dosagem apropriada, levando em consideração os pacientes individualmente. Existem variáveis interindividuais que podem afetar a concentração do fármaco dentro do organismo, tais como peso corporal, funções metabólicas, administração concomitante com outros medicamentos e o genótipo de certas enzimas e transportadores relevantes na eliminação do fármaco (YEO et al., 2013). Neste contexto, verifica-se um crescimento acelerado no desenvolvimento da extrapolação in vitro-in vivo, primeiramente devido a disponibilidade e facilidade no uso dos sistemas in vitro que agem como substitutos eficientes na pesquisa para reações in vivo e, também, porque os estudos in vitro permitem um melhor entendimento de variações interindividuais, tais como diferenças fisiológicas e no genótipo (JAMEI et al., 2009) (YEO et al., 2013).

As ferramentas necessárias para a predição dos parâmetros farmacocinéticos são o cálculo do clearance intrínseco, a partir dos dados cinético-enzimáticos obtidos e a fração da substância não ligada às proteínas plasmáticas e microssomais. Além disso, é necessária uma extrapolação do conteúdo enzimático na fração microssomal para a situação real in vivo. No presente trabalho assumiu-se o valor de 40 miligramas de microssomas por grama de fígado e 20 gramas de fígado por kilograma de peso corporal,

considerando-se um adulto de peso médio de 70 kg e que possui um fluxo sanguíneo médio hepático de 20 mL/min/kg (AUSTIN et al., 2005) (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012) (OBACH, 1999). Os parâmetros farmacocinéticos preditos para a TBZ estão descritos na **Tabela 13**.

**Tabela 13 -** Parâmetros farmacocinéticos preditos para a TBZ calculados a partir dos dados obtidos monitorando-se os estereisômeros da diHTBZ no estudo de metabolismo in vitro com microssomas hepáticos humanos.

Analitos	Clearance Intrínseco ( <i>CL<sub>int</sub></i> ) (µL min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	Clearance ( <i>CL</i> ) <sup>c</sup> (mL min <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> )	Clearance Hepático (CL <sub>H</sub> ) (mL min <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> )	Taxa de Extração Hepática ( <i>E</i> )
trans-diHTBZ (E1)	223	19,9	16,1	0,8
trans-diHTBZ (E2)	5073	19,9	19,8	1,0
cis-diHTBZ (E1)	25,0	19,9	11,8	0,6

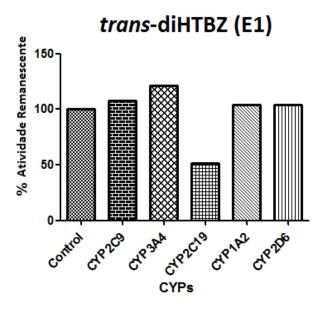
O clearance predito (CL) sugere que o metabolismo no fígado corresponde à principal rota de eliminação da TBZ, este dado é suportado por trabalhos presentes na literatura (MEHVAR et al., 1987) (ROBERTS et al., 1986). A taxa de extração hepática descreve um extenso metabolismo de primeira passagem, demonstrando a importância desta etapa farmacocinética para prover o metabólito farmacologicamente ativo.

Uma vez que há uma diferença significante na atividade farmacológica dos enantiômeros da TBZ (KILBOURN et al., 1995), é necessário verificar a disposição destes compostos no organismo, com o objetivo de compreender a eficácia na administração da TBZ. A predição in vivo a partir de estudo enantiosseletivo de metabolismo in vitro não tem sido muito reportado na literatura, apesar do conhecimento de que, em diversos casos, a atividade farmacológica é favorecida por um dos estereisômeros formados (TESTA, 2015) (TESTA; MAYER, 2003). S-verapamil, que é metabolizado preferencialmente

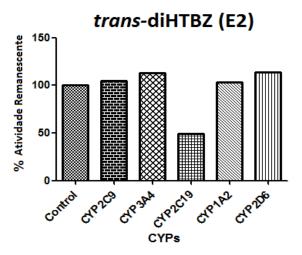
pelo fígado, constitui o principal enantiômero responsável pelo bloqueio do canal de cálcio. Kroemer et al. (1992) mediu a extensão da estereosseletividade do verapamil através de estudo in vitro, entretanto, os dados obtidos com a extrapolação foram fortemente sub-estimados, quando comparados com os dados in vivo (KROEMER et al., 1992). Takahashi et al. (1999) após comparar os dados in vitro e in vivo, observou que o derivado barbitúrico bucolome induz mudanças na farmacocinética da S-varfarina no sentido de produzir preferencialmente o enantiômero mais ativo, entretanto, não observou-se mudanças significativas na farmacodinâmica da S-varfarina, substância mais farmacologicamente ativa (TAKAHASHI et al., 1999).

# 4.9. DETERMINAÇÃO DAS ISOFORMAS DA CYP RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DOS ESTEROISÔMEROS DA DIHTBZ

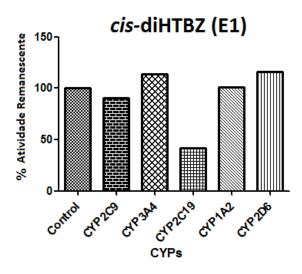
Com o objetivo de determinar a participação das isoformas da CYP na produção dos estereisômeros da diHTBZ a partir da TBZ, um ensaio empregando inibidores seletivos de cada isoforma foi realizado (**Figuras 35 a 37**). A formação dos estereoisômeros da diHTBZ foi catalisada principalmente pela CYP2C19. Alguns trabalhos relatam a formação da diHTBZ à enzima carbonil redutase, encontrada no fígado (CHARLAB; ZHANG, 2013) (JANKOVIC; CLARENCE-SMITH, 2011).



**Figura 35 -** Efeito da inibição das principais isoformas da CYP com inibidores químicos seletivos sobre o metabolismo da TBZ, monitorado pela formação de *trans*-diHTBZ (E1) em microssomas hepático humanos. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).



**Figura 36-** Efeito da inibição das principais isoformas da CYP com inibidores químicos seletivos sobre o metabolismo da TBZ, monitorado pela formação de *trans*-diHTBZ (E2) em microssomas hepático humanos. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).



**Figura 37 -** Efeito da inibição das principais isoformas da CYP com inibidores químicos seletivos sobre o metabolismo da TBZ, monitorado pela formação de *cis*-diHTBZ (E1) em microssomas hepático humanos. Fonte: Bocato et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.028. Reproduzido com permissão da Elsevier B.V. (número de licença: 3901931042384).

O presente trabalho demonstra, pela primeira vez, a contribuição de uma isoforma da CYP na catálise da TBZ, sendo que a CYP2C19 está envolvida na produção tanto da forma *cis*- quanto da forma *trans*- do metabólito. Considerando-se que a carbonil redutase é encontrada na fração citosólica no fígado, esta enzima não interferiu na obtenção dos dados empregando-se a fração microssomal (FORREST; GONZALEZ, 2000). A diHTBZ é posteriormente metabolizada pela CYP2D6, que corresponde à principal isoforma envolvida na eliminação desta substância na forma de um metabólito O-desalquil. A CYP1A2 apresenta uma minoritária contribuição na eliminação da diHTBZ (JANKOVIC; CLARENCE-SMITH, 2011). Assim a rota de eliminação hepática da TBZ pode ser atualizada como demonstrada na **Figura 38**.

Figura 38 - Enzimas envolvidas na rota de eliminação da TBZ pelo fígado. Fonte: autoria própria

O fato da TBZ ser metabolizada pela CYP2C19 corrobora com o perfil cinético obtido com os microssomas hepáticos humanos. A inibição pelo substrato é possível em enzimas que possuem dois ou mais sítios ativos, no qual o primeiro tem mantido a sua atividade, enquanto o segundo tem a atividade reduzida ou trata-se de um sítio não-funcional.

Uma vez que o aumento na exposição à diHTBZ tem sido atribuído a alguns efeitos adversos, tais como depressão, suicídio e prolongamento do intervalo QT, alguns trabalhos tem evidenciado a influência do genótipo da CYP2D6 na eliminação da TBZ, pois ela é a principal via de metabolização da diHTBZ (CHARLAB E ZHANG, 2013). Existem 4 genótipos para a CYP2D6, os metabolizadores pobres, os intermediários, os extensos e os ultrarrápidos. Mehana et al. (2013) avaliou a influência destes genótipos sobre a resposta da clínica à TBZ, no entanto, não foi verificada uma relação significante do perfil genotípico com a atividade farmacológica (MEHANNA et al., 2013). No entanto, o FDA recomenda um teste de genotipagem da CYP2D6 para pacientes com uma prescrição de TBZ acima de 50 mg por dia (MEHANNA et al., 2013). A própria bula do medicamento referência, Xenazine®, recomenda uma dose máxima de 25 mg por dia para metabolizadores pobres da CYP2D6, diferindo da

dose usual prescrita para metabolizadores extensos e intermediários, que é de 50 mg/dia (FDA, 2011) (CONRADO et al., 2013). Além disso, a bula fornece precauções ao uso concomitante da tetrabenazina e inibidores da CYP2D6, tais como fluoxetina e paroxetina; no entanto, não apresenta informações sobre possíveis interações com a CYP2C19. Uma vez inibida a CYP2C19, o metabólito ativo pode ser produzido deficientemente, não alcançando o nível terapêutico desejado. No entanto, estudos no sentido de visualizar o impacto da inibição da CYP2C19 sobre o metabolismo da TBZ ainda não foram realizados. Por outro lado, há a possibilidade de inibição da CYP2C19 pela própria TBZ, uma vez que foi observado um perfil cinético de inibição pelo substrato, o que pode resultar em interações medicamentosas indesejáveis ao ser coadministrado com fármacos que utilizam a CYP2C19 como via de eliminação.

A CYP2C19, assim como a CYP2D6, apresenta diferença na atividade catalítica entre os diversos genótipos (SCOTT et al., 2011). O alelo não-funcional mais comum é a CYP2C19\*2, que apresenta uma frequência de aproximadamente 15% em caucasianos e africanos e 29 a 35% em asiáticos (SCOTT et al., 2011). Sendo o gene da CYP2C19 considerado altamente polimórfico, é necessário um estudo mais aprofundado do impacto do genótipo na eliminação de fármacos metabolizados por tal isoforma, incluindo-se a TBZ.

#### 5. 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.

CAPÍTULO 4

## **CAPÍTULO 4**

# <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.

#### 2. OBJETIVO

### **2.1. GERAL**

O objetivo geral desta etapa do trabalho foi avaliar a eficiência das microtécnicas de preparação de amostras: SPME, HF-LPME e DLLME em extrair os analitos TBZ e diHTBZ do meio de cultura liquido para posterior aplicação em estudos de biotransformação da TBZ por fungos.

#### 2.2. ESPECÍFICO

Os objetivos específicos foram:

iv) Avaliar a eficiência das microtécnicas de preparação de amostras: SPME, HF-LPME e DLLME em extrair os analitos TBZ e diHTBZ do meio de cultura liquido Czapek. v) Aplicar o método de análise por EC desenvolvido no capítulo 3 e a técnica de preparação de amostras mais adequada nos estudos de biotransformação da TBZ empregando fungos como agentes catalisadores.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. EQUIPAMENTOS DE ANÁLISE E ACESSÓRIOS GERAIS

Na separação dos metabólitos da TBZ *cis-* e *trans-*diHTBZ por EC foi empregado um equipamento da marca Beckman Coulter, modelo P/ACE MDQ (Fullerton, CA, EUA), contendo um analisador de dados, injetor automático e detector de arranjo de diodos. Para aquisição dos dados foi empregado o programa 32 Karat<sup>®</sup>, também da Beckman. Capilar de sílica fundida não revestido da Polymicro (Phoenix, AZ, EUA) com 75 μm de d.i. e 20 cm de comprimento efetivo foi empregado para a análise dos analitos.

No preparo das soluções-padrão empregou-se balança analítica Sartorius<sup>®</sup> AG Germany modelo CP225D (Santo André, SP, Brasil) e agitador de soluções modelo AP56 (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) que também foi utilizado para a homogeneização das amostras do processo de microextração. Para medida do pH das soluções-tampão foi utilizado um peagômetro Orion modelo 420A+ (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA). Um sistema Direct-Q 3 UV da Millipore (Bedford, MA, EUA) forneceu água purificada para o preparo das amostras analisadas por eletroforese capilar e também preparo das soluções-tampão.

Microponteiras da marca Sorenson Bioscience (Salt Lake City, UT, EUA) com 0,57 mm de diâmetro externo e 83 mm de comprimento foram usadas na

extração por HF-LPME. As extrações foram feitas empregando uma membrana de 15 cm de comprimento com um diâmetro interno de 600 µm, espessura de 200 µm e poros de 0,2 µm (Q3/2 Accurel PP, Membrana, Alemanha). Foi utilizada também uma microsseringa com capacidade para 100 µL da marca Hamilton, modelo 702SNR (Bonaduz, Suíça) para introdução e retirada para fase aceptora do interior da fibra.

# 3.2. SOLUÇÕES-PADRÃO E REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO E NAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

Soluções padrão estoque de *rac*-TBZ, *rac-cis*-diHTBZ e *rac-trans*-diHTBZ (todos obtidos da Toronto Research Chemicals, Toronto, Canadá) foram preparadas numa concentração de 2000 μg mL-1 em metanol. Soluções de trabalho de *rac*-TBZ, de *rac-cis*-diHTBZ e *rac-trans*-diHTBZ foram obtidas por diluições apropriadas no mesmo solvente. *Rac*-mirtazapina (Oss, Holanda), foi utilizada como padrão interno (PI) na concentração de 100 μg mL-1. Todas estas soluções foram armazenadas a –20°C em tubos de vidro âmbar e protegidas da luz direta. Estas soluções foram utilizadas nos procedimentos de extração avaliados.

Os solventes utilizados no procedimento de DLLME (grau CLAE) foram: metanol, isopropanol, etanol, acetonitrila, dicloroetano, diclorometano, clorofórmio e acetona obtidos de Panreac (Barcelona, Espanha).

Os reagentes (grau analítico) foram: cloreto de sódio obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha), *tris-*hidroximetilaminometano e fosfato monossódico obtidos de JT Baker (Philipsburg, PA, EUA). Hidróxido de sódio obtido da Nuclear (Diadema, SP, Brasil) e ácido (*Orto*) fosfórico foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro,

RJ, Brasil). A carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina (CM- $\beta$ -CD) (grau de substituição  $\sim$  3) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Todas as soluções empregadas nas análises por eletroforese capilar foram filtradas através de um filtro Millex-HV de 0,45 mm de filtro de discos de Millipore (Belford, MA, EUA).

### 3.3. PROCEDIMENTO DE ANÁLISE POR EC

As condições eletroforéticas para a análise dos metabólitos quirais diHTBZ foi solução tampão tris-fosfato (pH 2,5) 80 mmol L-1 contendo CM-β-CD 1% (m/v) e comprimento efetivo do capilar de 20 cm. A temperatura e tensão capilar foram mantidas constantes em +15 kV e 15°C, respectivamente. As amostras foram injetadas por injeção hidrodinâmica aplicando uma pressão de 0,5 psi por 8 segundos.

# 3.4. Preparo dos Meios de cultura: pda, malte e czapek; fungos utilizados e procedimento de biotransformação

Para o preparo do meio de cultura PDA foi utilizado o reagente *Potato Dextrose Agar* da Acumedia (Lansing, Michigan, EUA) na concentração de 39 g L<sup>-1</sup>. Após a pesagem deste reagente, completou-se o Erlenmeyer com quantidade necessária de água ultrapura para tantos quantos forem o número de placas de Petri a serem utilizadas nesta primeira etapa. Para o cálculo das quantidades, toma-se como necessário, cerca de 15 mL de meio para cada placa de Petri. Por fim, essa mistura é esterilizada em autoclave por cerca de 30 minutos, e, na capela de fluxo laminar, distribui-se 15 mL do meio em cada placa.

Para o meio Malte (pré-fermentativo) foram utilizados os reagentes: triptona (5,0 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (3,0 g L<sup>-1</sup>) e extrato de malte (10 g L<sup>-1</sup>) todos da Acumedia (Lansing, Michigan, EUA) e dextrose (10 g L<sup>-1</sup>) da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, EUA) que foram previamente pesados e transferidos para um béquer. Posteriormente é adicionado água ultrapura no volume desejado desde que as concentrações em massa permaneçam as mesmas. Tal mistura gera uma solução líquida de pH próximo a 7,0 que é, então, corrigido para pH 6,2 utilizando-se ácido clorídrico 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, esse meio é também esterilizado em autoclave da mesma forma que para o meio PDA.

Para o preparo do meio de cultura líquido Czapek modificado foram utilizados os reagentes: sacarose (3%) da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, EUA); cloreto de potássio (0,05%), sulfato de magnésio heptaidratado (0,05%), fosfato de potássio (0,1%), sulfato de ferro heptaidratado (0,001%) todos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e, nitrato de sódio (0,2%) da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Em seguida, adiciona-se água ultrapura no volume desejado desde que as concentrações em massa permaneçam as mesmas. A mistura gera uma solução líquida de pH próximo de 8,0 que deve ser corrigido para pH 5,0 utilizando-se HCl 1,0 mol L-1. Da mesma forma que para os outros meios de cultura, esta mistura foi esterilizada em autoclave.

No desenvolvimento do processo de biotransformação da TBZ foram utilizadas várias espécies de fungos: *Glomerella cingulata* (VA1) e *Chaetomium globosum* (VR10). Esses fungos endofíticos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Monica T. Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de

Ribeirão Preto. Os fungos foram cedidos na forma de "plugs de agar" e foram mantidos em meio de glicerol:água (8:2, v/v) a –20°C.

Os fungos *Cunninghamella elegans* (ATCC 8688-A), *Cunninghamella echinulata* (ATCC 10028-B) e *Beuveria bassiana* (ATCC 7159) foram adquiridos da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Universidade Boulevard, Manassas, VA, EUA).

O fungo *Mucor rouxii* foi cedido por cortesia do Dr. C. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, ARS, USDA, Peoria, IL, EUA) e pertence à coleção de culturas de fungos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. O micro-organismo foi conservado em uma suspensão de sílica gel (6-12 mesh, grade 40, dessecante ativo) na temperatura de 4°C e em "*slants*" constituídos por 0,4% de aveia e 1,8% de ágar (p/v). Esse micro-organismo está sob responsabilidade da Profa. Dra. Niege A. J. C. Furtado, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

No procedimento de biotransformação, inicialmente, empregando placas de Petri contendo o meio de cultura PDA, são empregados 3 repiques de fungos para cada espécie de fungo em estudo, em duplicata, e incubados a 30° C. Em seguida, após o crescimento dos fungos sobre a placa, três discos de 0,5 cm do meio de cultura com os fungos foram retirados com o auxílio de um tubo de transferência (*transfer tube*) e inoculados assepticamente em 10 mL de meio préfermentativo malte e em seguida colocados sob agitação de 120 rpm a uma temperatura de 30° C por 10 dias para o crescimento dos fungos. Na etapa seguinte, a massa micelial formada foi transferida assepticamente para 100 mL de meio Czapek juntamente com 3 mg do *rac*-TBZ. A incubação (30° C, 120 rpm)

foi realizada por 10 dias sendo que a cada 48 horas foi coletada uma alíquota de 4 mL do fluído da cultura assepticamente e armazenado a –20°C até o momento da análise.

Paralelamente aos estudos de biotransformação foram realizados controles contendo: (i) somente o meio de cultura e o fármaco, (ii) somente o meio de cultura e o fungo sem o fármaco.

### 3.5. SPME

Os acessórios empregados no procedimento de extração por SPME foram: fibras de SPME C18 com espessura de 45 µm da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA); um agitador Vibrax modelo VRX (IKA®, Staufen, Alemanha) e também uma centrífuga CF-15 (Hitachi Koki®, Kyoto, Japão) para a centrifugação das amostras. Inicialmente, para avaliação do processo de extração, foram empregados 2 mL de meio de cultura Czapek, 2 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 na concentração de 500 mmol L-1 contendo 20 µL dos racematos da *cis*- e *trans*-diHTBZ na concentração de 100 µg mL-1 cada, totalizando um volume de 4 mL final. As fibras foram então mergulhadas nesta matriz e o frasco foi submetido à agitação no Vibrax a 1200 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, estas fibras foram recolhidas da amostra e submetidas ao processo de dessorção em 100 µL de água ultrapura e metanol na proporção de 90:10 (*v/v*).

### 3.6. HF-LPME

Microponteiras da marca Sorenson Bioscience (Salt Lake City, UT, EUA) com 0,57 mm de diâmetro externo e 83 mm de comprimento foram usadas para

a extração por HF-LPME. As extrações foram realizadas empregando uma membrana de 15 cm de comprimento com um diâmetro interno de 600 μm, espessura de 200 μm e tamanho de poros de 0,2 μm (Q3/2 Accurel PP, Membrana, Alemanha). Foi utilizada também uma microsseringa com capacidade para 100 μL da marca Hamilton, modelo 702SNR (Reno, NV, EUA) para a introdução e retirada para fase aceptora do interior da fibra. O tubo de extração era composto por 2 mL de meio de cultura Czapek e 2 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 100 mmol L<sup>-1</sup> contendo 20 μL dos racematos da diHTBZ, em concentração de 100 μg mL<sup>-1</sup> cada, totalizando 4 mL de volume final. Os parâmetros avaliados na tentativa da extração foram: tipo de solvente orgânico, pH da fase doadora e composição da fase aceptora. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em temperatura ambiente (25°C).

#### **3.7. DLLME**

Para o preparo da amostra empregando a DLLME foi utilizado uma microsseringa de 1 mL obtida da Hamilton<sup>®</sup> (Bonaduz, Suíça) e tubos cônicos transparentes com capacidade de 8 mL. As amostras foram agitadas em um vórtex da marca Phoenix e centrifugadas em uma centrífuga Himac CF16RXII. Os solventes (grau CLAE) utilizados na otimização da DLLME foram: acetonitrila, metanol, etanol, diclorometano, clorofórmio e 1,1-dicloroetano. O preparo de amostra foi realizado empregando 1 mL de meio de cultura líquido e 1 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 numa concentração de 500 mmol L-1, totalizando um volume de 2 mL. Nesse procedimento foi adicionado 20 μL de cada um dos metabólitos diHTBZ estudados, a uma concentração de 100 μg mL-1, os estudos foram realizados em triplicata (n = 3).

### 3.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação foi realizada segundo o guia da *European Medicines Agency* (EMA, 2011) para análise de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas.

A linearidade foi avaliada em quintuplicata. Alíquotas de diHTBZ foram adicionadas em 1 mL de meio de cultura liquido Czapek nas concentrações de 37,5; 75; 250; 375; 500; 750 e 1000 ng mL-1 para cada estereisômero. O coeficiente de correlação (r) foi determinado pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados obtidos foram ponderados empregando o peso  $1/\chi^2$ . O limite de quantificação (LQ) foi definido como a concentração mais baixa dos metabólitos que pode ser determinada com exatidão (expressa pelo erro relativo em porcentagem, ER%) e precisão (expressa pelo desvio padrão relativo, DPR%) inferior a 20% (EMA, 2011) em cinco corridas analíticas (n = 5) e foi obtido fortificando o meio de cultura líquido Czapek com 37,5 ng mL-1 de cada enantiômero dos metabólitos cis- e trans-diHTBZ.

A precisão e exatidão foi determinada fortificando 1 mL de meio de cultura liquido Czapek com os metabólitos nas concentrações equivalente ao LQ, baixa, média e alta (37,5; 75,0; 375 e 500 ng mL-1) para cada estereisômero dos metabólitos da diHTBZ. A precisão do método foi expressa como desvio padrão relativo (DPR,%) e a exatidão como erro relativo (ER, %). As amostras foram consideradas aprovadas se os valores obtidos para a exatidão e a precisão fossem inferiores a 20% para o LQ e inferiores a 15% para as demais concentrações analisadas. A precisão/exatidão intraensaio foi realizada no mesmo dia enquanto que a precisão/exatidão interensaio foi determinada em três dias consecutivos de análise. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (n=5).

A estabilidade dos analitos foi avaliada após ciclos de congelamento e descongelamento e sob bancada por 8 horas. Para tanto, 1 mL de meio de cultura liquido Czapek foi fortificado na concentração baixa (37,5 ng mL-1 para cada enantiômero da diHTBZ) e na concentração alta (500 ng mL-1 para cada enantiômero da diHTBZ). As amostras foram consideradas estáveis se a porcentagem de degradação dos analitos estive inferior a 15%, determinados com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia da análise.

A seletividade do método também foi avaliada através da análise do meio de cultura Czapek na ausência da TBZ, contendo somente a espécie de fungo utilizada na biotransformação.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. SEPARAÇÃO DOS METABÓLITOS DIHTBZ POR EC

A separação dos estereisômeros dos metabólitos da diHTBZ por EC empregada nesta etapa está descrita na seção 3.3.

# 4.2. AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS NA EXTRAÇÃO DA DIHTBZ DE MEIO LIQUIDO CZAPEK

#### 4.2.1. SPME

Nesses estudos, a extração foi realizada utilizando frascos de 4 mL acrescido de 2 mL de meio de cultura e 2,0 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L-1 pH 7,0. Todo procedimento foi realizado adicionando 20 µL de cada analito estudado na concentração de 100 µg mL-1, em triplicata (n=3). Nas condições descritas não foi possível extrair os analitos de interesse do meio de

cultura. Um dos fatores prováveis para a não possibilidade de extração empregando esta técnica é o fato de os metabólitos não estarem na forma neutra neste pH, e valores maiores de pH do meio acarretariam em danos às fibras C18 utilizadas, uma vez que estas atendem à faixa de pH meio entre 3,0 a 9,0.

### 4.2.2. HF-LPME

Para a otimização da extração dos analitos por HF-LPME do meio de cultura liquido Czapek, o modo de três fases foi avaliado. Durante toda otimização, utilizou-se uma fibra de polipropileno cilíndrica oca de 15 cm de comprimento, agitação em 1500 rpm e temperatura de extração de 25 $^{\circ}$  C. Nesse procedimento foi adicionado 20  $\mu$ L de cada um dos metabólitos diHTBZ estudados, a uma concentração de 100  $\mu$ g mL $^{-1}$ , os estudos foram realizados em triplicata (n = 3).

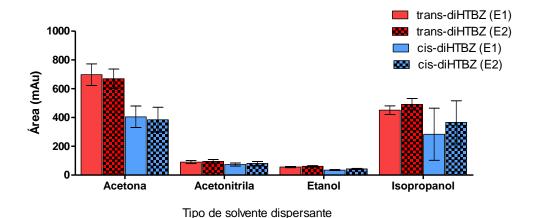
Os solventes orgânicos avaliados foram: octanol, éter dibutílico, éter diexílico e acetato de butila. Os pH's foram avaliados adicionando-se no frasco que continham as matrizes, diferentes soluções de tampão fosfato ou borato na concentração de 500 mmol L-1 (pH's utilizados: 10,0; 12,0 e 14,0), até completarse o volume final de 4 mL. Como fase aceptora foi empregado ácido clorídrico ou ácido acético nas concentrações de 50 e 100 mmol L-1. Os resultados obtidos nesta etapa não foram satisfatórios. Mesmo após várias tentativas, o emprego desta técnica miniaturizada não resultou em qualquer extração dos analitos de interesse em meio Czapek. Neste caso, acredita-se que pela característica mais apolar dos analitos, os solventes utilizados para impregnar os poros das fibras

cujas características são bem polares não tiveram afinidade suficiente para garantir a difusão dos metabólitos diHTBZ para o lúmen da fibra.

### 4.2.3. DLLME

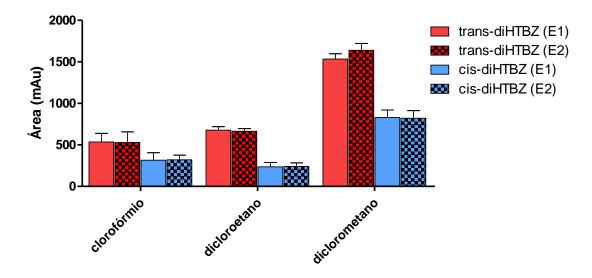
Os principais parâmetros que influenciam a DLLME foram otimizados com base no sucesso obtido na extração dos analitos de interesse conforme reportado no capítulo 3. Para tanto, inicialmente, adicionou-se 20 µL de cada *rac*-diHTBZ, numa concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup>, em triplicata (n = 3) aos tubos de extração contendo 1 mL de meio Czapek e 1 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 na concentração de 500 mmol L<sup>-1</sup>, totalizando um volume final de 2 mL no tubo de extração. Os resultados obtidos foram expressos em forma de gráficos das áreas dos analitos obtidas frente à modificação realizada.

O primeiro parâmetro otimizado foi o **tipo de solvente dispersor**. Como já descrito no capítulo anterior (capítulo 3), a importância deste solvente nesta técnica é fundamentada pela dispersão dos analitos na fase orgânica e transferência de massa dos mesmos para esta fase. Esta etapa foi otimizada empregando-se inicialmente clorofórmio como solvente extrator (50 μL) e os solventes dispersantes avaliados foram: metanol, etanol, acetonitrila, acetona e isopropanol, adicionando 200 μL destes. Como pode ser observado na **Figura 39**, embora o perfil dos solventes dispersantes tenha sido bem diferente ao empregar as matrizes de meio de cultura e meio microssomal, o melhor solvente dispersor para a extração dos analitos em meio de cultura liquido Czapek foi a acetona. Este mesmo resultado foi obtido empregando o meio microssomal (capítulo 3). O metanol não foi eficiente na extração dos analitos empregando esta matriz.



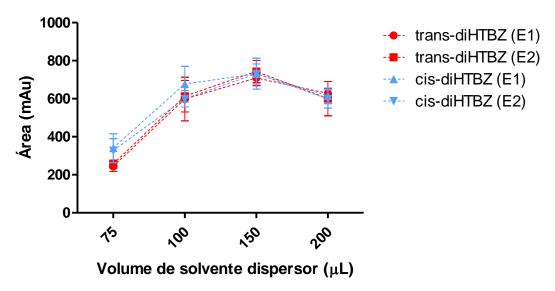
**Figura 39** – Efeito do solvente dispersor na recuperação dos estereisômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura liquido Czapek. Temperatura de extração 25°C. Volume da matriz: 1 mL do meio de cultura e 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L-1 (pH 7,0). 50  $\mu$ L de solvente extrator clorofórmio e 200  $\mu$ L de cada solvente dispersor. n =3. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar.

Fixando agora a acetona como solvente dispersor em um volume de 200 μL, foi avaliado o tipo de solvente extrator. Como já descrito nos capítulos anteriores, a escolha do solvente extrator recai sobre a melhor extração obtida na menor quantidade possível deste solvente, uma vez que seu volume pode afetar a dispersão da fase orgânica no meio. Foram avaliados os seguintes solventes extratores: dicloroetano, diclorometano e clorofórmio empregando um volume de 50 μL de cada. A **Figura 40** demonstra que o diclorometano foi o melhor solvente extrator para a recuperação dos metabólitos assim como também ocorreu no meio microssomal.



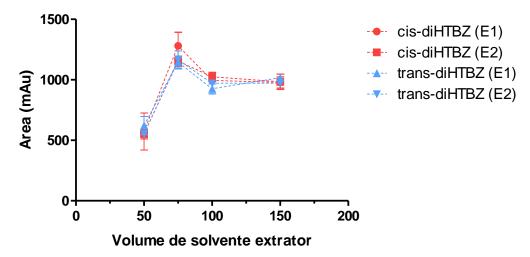
**Figura 40** – Efeito do solvente extrator na recuperação dos estereoisômeros dos metabólitos diHTBZ em meio cultura liquido Czapek. Volume da matriz: 1 mL de meio de cultura, 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), 200  $\mu$ L de solvente dispersor **acetona** e 50  $\mu$ L de cada solvente extrator. Extração em 25°C. n=3. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar.

Terminada a determinação do par de solventes (dispersor e extrator), avaliouse o volume dos mesmos, iniciando pelo **volume do solvente dispersor**. Para isto, utilizou-se 50 μL de diclorometano e o volume de acetona foi avaliado no seguinte intervalo: 75 μL, 100 μL, 150 μL e 200 μL. O melhor resultado foi obtido com o uso de 150 μL de acetona (**Figura 41**). Mais uma vez, os resultados obtidos são muito próximos para os resultados obtidos com a matriz de meio microssomal no capítulo 3. Da mesma forma, um aumento do volume do solvente dispersor leva a uma melhora da dispersão dos analitos na fase orgânica, o que facilita a formação do estado de turbidez, e, portanto, a extração. Contudo, esse processo continua até um determinado volume. A partir de então um aumento no volume do solvente dispersor leva a um prejuízo na solubilidade dos analitos na fase extratora prejudicando e diminuindo a extração (REZAEE et al., 2006), como pode ser observado a partir de 150 μL de volume de solvente dispersor empregado.



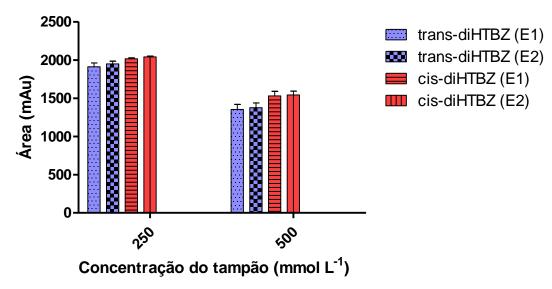
**Figura 41** – Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos estereisômeros dos metabólitos da diHTBZ em meio cultura liquido Czapek. Volume da matriz: meio de cultura 1 mL e 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol  $L^{-1}$  (pH 7,0). Volume de solvente dispersor variável e 50  $\mu$ L de solvente extrator (diclorometano). Temperatura de extração a 25°C, n = 3. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar.

Por último, o **volume de solvente extrator** foi otimizado variando o volume de diclorometano no seguinte intervalo: 50 μL, 75 μL, 100 μL e 150 μL. O volume que apresentou uma melhor extração dos analitos foi o volume correspondente a 75 μL para a extração em meio Czapek **Figura 42**. Como já relatado anteriormente, o volume do solvente extrator em DLLME, deve ser suficiente para extrair o analito e, sempre que possível, deve ser escolhido o menor volume obtendo-se assim um alto fator de enriquecimento com menor uso de solventes tóxicos (CALDAS et al., 2011).



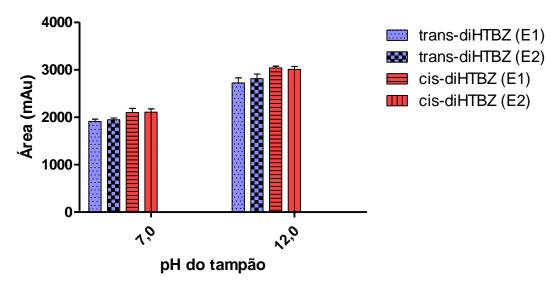
**Figura 42** – Efeito do volume de solvente extrator na recuperação dos estereisômeros dos metabólitos diHTBZ em meio cultura de cultura liquido Czapek. Volume da matriz: meio de cultura 1 mL crescido de 1 mL de solução tampão fosfato 500 mmol L $^{-1}$  (pH 7,0) volume de solvente dispersor 150  $\mu$ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. n=3. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar.

Após avaliar os tipos e os volumes dos solventes extrator e dispersor, verificou-se que as áreas dos analitos eram bem baixas se considerássemos a concentração empregada neste procedimento de extração, portanto, optou-se por avaliar a concentração e o pH do meio empregado a fim de obter melhores recuperações dos analitos. O próximo parâmetro que foi avaliado foi a concentração da solução tampão empregado que, além da concentração de 500 mmol L-1, foi avaliado na concentração de 250 mmol L-1 (solução tampão fosfato pH 7,0). Observou-se uma recuperação significativa dos analitos de interesse, portanto, foi escolhido o tampão de menor concentração para os próximos experimentos (**Figura 43**). Isso pode ter ocorrido possivelmente devido ao fato da alta concentração iônica impedir uma boa dispersão dos solventes na matriz.



**Figura 43** – Efeito da concentração da solução tampão na recuperação dos estereisômeros 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  $\mu$ L e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. n = 3. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar.

Em seguida, avaliou-se também o pH da solução tampão empregada, uma vez que em pH 7,0 utilizado inicialmente os analitos de interesse não estavam completamente neutros no meio de cultura, fazendo com que a extração seja menos favorecida. Portanto, foi avaliado solução tampão fosfato pH 12,0 na concentração de 250 mmol L-1 que resultou, mais uma vez, na melhoria da extração dos analitos (**Figura 44**).



**Figura 44** – Efeito do pH da solução tampão na recuperação dos estereisômeros 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 µL e volume de solvente extrator variável. Extração a 25°C. n=3. E1 = primeiro enantiômero a migrar, E2 = segundo enantiômero a migrar.

As condições finais estabelecidas para DLLME na análise dos enantiômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura foram: solvente dispersor acetona (150 μL) e solvente extrator diclorometano (75 μL). Matriz: 1 mL de meio de cultura Czapek acrescida de 1 mL de solução tampão fosfato pH 12,0 na concentração de 250 mmol L-1. Centrifugação durante 3 minutos a 1800 x g a uma temperatura de 10°C. A **Figura 45** representa o eletroferograma obtido após esta condição otimizada da extração.

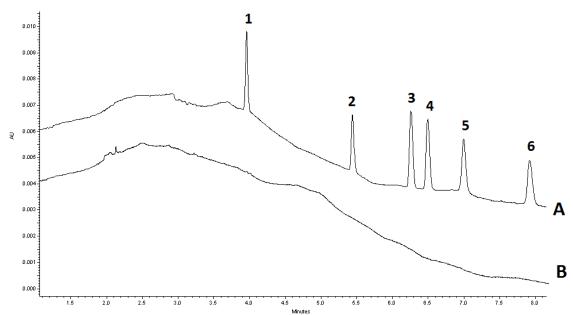


Figura 45 – A) Eletroferograma representativo para análise dos estereisômeros da diHTBZ após a otimização do procedimento de DLLME em meio de cultura liquido Czapek. Condições de análise: solução tampão tris-fosfato (pH 2,5) 80 mmol L-1 contendo CM-β-CD 1% (m/v) e 20 cm de comprimento efetivo do capilar. 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 8 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.

# 4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DOS ESTEREOISÔMEROS DOS METABÓLITOS DIHTBZ EM MEIO DE CULTURA CZAPEK

O método foi validado utilizando a eletroforese capilar como técnica de separação empregando as condições de separação descritas na seção 3.3.

A validação foi realizada empregando o método de padronização interna e o fármaco *rac*-mirtazapina foi utilizado como P.I. Este mesmo padrão interno foi escolhido pois ao realizar a extração por DLLME descrita no **item 4.2.3** deste capítulo, uma recuperação reprodutível foi observada.

Os resultados obtidos da validação do método estão apresentados nas Tabelas seguintes. Os dados expostos na **Tabela 14** evidenciam uma linearidade satisfatória nos intervalos de concentrações avaliados, com coeficientes de correlação acima de (*r*) > 0,997 para todos os analitos de interesse. O limite de quantificação foi de 37,5 ng mL<sup>-1</sup> para cada estereisômero dos metabólitos diHTBZ por mL de meio de cultura com valores de ER(%) e DPR(%) menores que 11% (Tabela 14).

**Tabela 14** - Limite de quantificação e linearidade do método para análise dos estereoisômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido

Analitos	Intervalo linear (ng mL <sup>-1</sup> )	Equação linear <sup>a</sup>	r <sup>b</sup>	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	ER° (%)	DPR <sup>d</sup> (%)
trans-diHTBZ (E1)	37,5-1000	y=0,0392x-0,0414	0,998	37,5	-9	5
trans-diHTBZ (E2)	37,5-1000	y=0,0387x-0,0315	0,998	37,5	-10	6
cis-diHTBZ (E1)	37,5-1000	y=0,0326x-0,0434	0,997	37,5	4	2
cis-diHTBZ (E2)	37,5-1000	y=0,0302x-0,0322	0,997	37,5	9	6

a cinco replicatas (n=5) para cada concentração

Os resultados de precisão e exatidão intra- e interensaio para cada estereisômero dos metabólitos da diHTBZ estão resumidos nas **Tabelas 15 e 16**. Todos os resultados estão de acordo com as recomendações do guia da EMA (2011). Os ensaios de estabilidade indicam os metabólitos são estáveis após ciclos de congelamento/descongelamento e à temperatura ambiente com valores de DPR(%) e ER(%) inferiores a 15% (**Tabela 17**). A seletividade do método foi determinada analisando as amostras "branco" (meio cultura Czapek na ausência da TBZ e com a presença de cada espécie de fungo avaliada). Este estudo mostrou que os fungos não apresentaram nenhum metabólito secundário no mesmo tempo de migração dos enantiômeros da diHTBZ. (**Figuras 46- 49**).

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> r, coeficiente de correlação

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> desvio padrão relativo expresso em porcentagem

d erro relativo expresso em porcentagem

**Tabela 15** - Precisão e exatidão intraensaio para análise dos estereisômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido

Analitos	Concentração Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentração obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	DPR <sup>a</sup> (%)	ER <sup>b</sup> (%)
	37,5	37,9	8	1
trans-diHTBZ (E1)	75	70,0	11	<b>-7</b>
	375	380,5	5	2
	500	537,6	10	8
trans-diHTBZ (E2)	37,5	36,4	7	-3
	75	65,2	12	-13
	375	390,2	4	5
	500	542,3	11	9
	37,5	36,1	13	-4
cis-diHTBZ (E1)	75	72,9	7	-3
	375	413,2	5	10
	500	488,2	5	-2
	37,5	38,2	7	2
cis-diHTBZ (E2)	75	67,2	5	-10
	375	396,8	5	6
	500	493,3	7	-1

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> desvio padrão relativo expresso em porcentagem <sup>b</sup> erro relativo expresso em porcentagem

**Tabela 16 -** Precisão e exatidão interensaio para análise dos estereisômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido

Analitos	Concentração Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentração obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	DPR <sup>a</sup> (%)	ER <sup>b</sup> (%)
	37,5	38,1	9	2
	75	67,8	9	-11
trans-diHTBZ (E1)	375	387,8	3	3
	500	559,8	5	12
trans-diHTBZ (E2)	37,5	32,5	8	-13
	75	67,9	13	-9
	375	396,8	3	6
	500	543,7	12	9
	37,5	35,4	14	-6
cis-diHTBZ (E1)	75	64,8	8	-14
	375	419,6	4	12
	500	478,1	3	-4
cis-diHTBZ (E2)	37,5	38,4	7	3
	75	69,9	5	-7
	375	402,9	4	7
	500	489,8	8	-2

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> desvio-padrão relativo expresso em porcentagem <sup>b</sup> erro relativo expresso em porcentagem

Tabela 17 - Ensaio de estabilidade para análise dos estereisômeros dos metabólitos diHTBZ em meio de cultura líquido

Analitos	trans-diHTBZ (E1)		<i>trans</i> -diH	trans-diHTBZ (E2)		cis-diHTBZ (E1)		cis-diHTBZ (E2)	
Estabilidade	Св	CA	Св	CA	Св	CA	Св	CA	
Ciclos de congelamento/descongelamento ( <i>n</i> =5)									
Concentração obtida (ng mL <sup>-1</sup> )	68,5	495,0	70,0	518,0	66,0	545,0	67,0	563,0	
Precisão (DPR)ª	14	13	2	14	14	12	12	13	
Exatidão (ER, %)b	-9	-1	-7	4	-12	9	-11	9	
Estabilidade de bancada (n=5)									
Concentração obtida (ng mL-1)	68,0	567,0	71,3	541,1	68,3	528,0	68,0	538,1	
Precisão (DPR) <sup>a</sup>	12	6	14	8	14	11	13	8	
Exatidão (ER, %)b	-9	13	-5	8	-6	6	3	8	

n = número de determinações

C<sub>B</sub> e C<sub>A =</sub> concentração baixa e concentração alta, respectivamente.

<sup>a</sup> desvio padrão relativo expresso em porcentagem

<sup>b</sup> erro relativo expresso em porcentagem

## 4.4. BIOTRANSFORMAÇÃO ESTEREOSSELETIVA DA TBZ EMPREGANDO FUNGOS

Várias espécies de micro-organismos foram empregadas nesta etapa. No total, foram empregadas seis espécies de diferentes fungos. As reações de biotransformação foram monitoradas durante 240 horas e a cada 48 hs foi coletada uma alíquota e armazenada até o momento da análise.

A reação de biotransformação da TBZ e formação dos metabólitos diHTBZ envolve a redução do grupo carbonil da TBZ. Das seis espécies de fungos avaliadas, exceto o fungo Cunninghamella echinulata (ATCC 10028B), todas foram capazes de metabolizar o fármaco TBZ. Sendo que somente uma espécie, o fungo Cunninghamella elegans (ATCC 8688A) não apresentou enantiosseletividade na produção dos metabólitos trans- e cis- diHTBZ, porém apresentou diastereosseletividade, formando majoritariamente o metabólito trans-diHTBZ (Figura 46). O fungo Chaetomiun globusum (VR10) também metabolizou diastereoisomericamente ambos metabólitos diHTBZ, porém foi enantiosseletivo somente na produção da cis-diHTBZ (Figura 47). E, por fim, as espécies Glomerella cingulata (VA1), Mucor rouxii, e Beuveria bassiana (ATCC 7159), metabolizaram diastereo e enantiosseletivamente ambos metabólitos da diHTBZ, sendo que o último apresentou outros metabólitos que não foram identificados e foram interferentes na quantificação dos demais estereoisômeros dos metabólitos da diHTBZ (Figura 48). As duas espécies, Glomerella cingulata (VA1) e *Mucor rouxii*, possuíram um perfil de metabolização bem semelhante, com prioridade na formação dos enantiômeros (E1) dos metabólitos trans- e cisdiHTBZ, portanto, apenas o eletroferograma do *Mucor rouxii* foi demonstrado

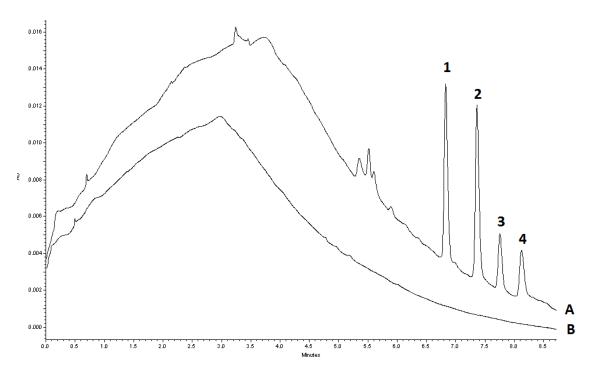
(Figura 49). Todas as espécies demonstraram formação dos metabólitos a partir de 120 horas de incubação, que foram observados até o final dos estudos. Observou-se, nos eletroferogramas para cada espécie de fungo, pequenas variações dos tempos de migração de todos os analitos. Isso pode ser explicado devido ao fato de cada matriz de espécie de fungo possuir composição variada e que, possivelmente no processo de extração por DLLME, acarretou em possíveis resíduos da matriz. Sendo a técnica de eletroforese capilar bastante sensível a pequenas variações da composição iônica do eletrólito, estes atrasos nos tempos de migração dos analitos podem desta forma ser justificados.

Para uma melhor visualização das análises dos perfis da biotransformação de cada espécie, as figuras foram demonstradas após o procedimento de extração por DLLME, na ausência do padrão interno, afim de apresentar os picos produzidos, sendo estes provenientes dos metabólitos formado e outros picos de prováveis metabólitos não-identificados ou componentes endógenos de algumas espécies.

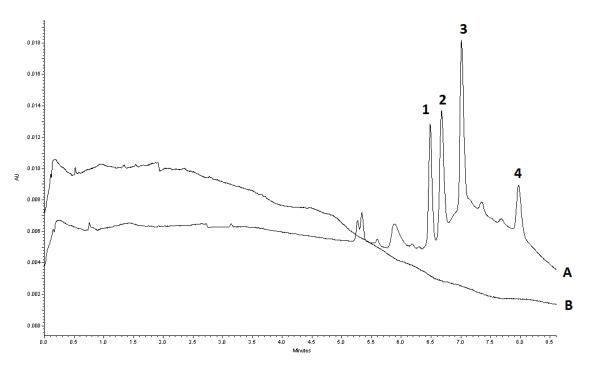
A validação do método analítico foi iniciada durante o período de incubação do fármaco e a curva analítica foi idealizada fazendo uma estimativa de que, se houvesse formação dos metabólitos, estes corresponderiam entre 3 a 65% de biotransformação. Entretanto, após o método validado e a análise dos fungos, observou-se uma metabolização superior aos resultados esperados extrapolando o limite superior de quantificação, sendo assim, os resultados demonstrados nas figuras abaixo não foram quantificados nesse momento.

Por fim, embora não totalmente concluída esta etapa do estudo, foi possível demonstrar que os resultados obtidos para algumas espécies de fungos podem ser promissores na produção dos enantiômeros isolados da diHTBZ afim

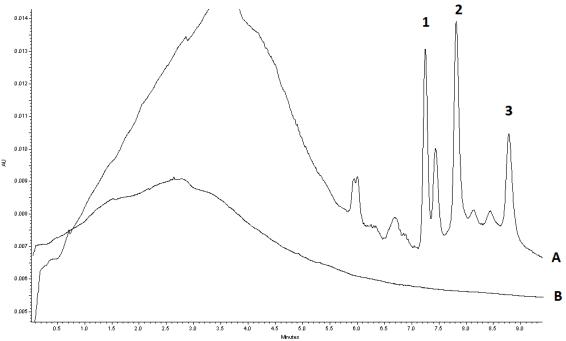
de proporcionar futuros estudos mais aprofundados destes metabólitos isoladamente, uma vez que há poucos relatos de estudos dos metabólitos da TBZ na literatura.



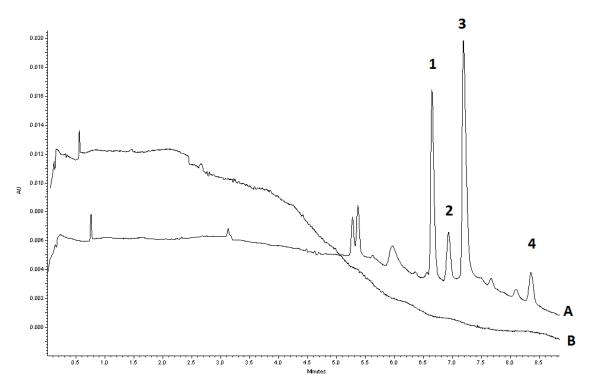
**Figura 46** – Eletroferograma representativo após a biotransformação da TBZ com o fungo *Cunninghamella elegans* (ATCC 8688A) após 240 h de incubação. **(A)** Eletroferograma representativo no tempo 240 hs de incubação **(B)** Eletroferograma representativo do meio Czapek (controle) incubado com a 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).



**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-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)** cis-diHTBZ(E1). Os outros picos de possíveis metabólitos ou componentes endógenos não foram identificados.



**Figura 49** – Eletroferograma representativo após a biotransformação da TBZ com o fungo *Mucor rouxii* 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).

## 5. 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. no. 899**, de 29 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**, 5<sup>th</sup> 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 (fup/fumic) 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<sup>™</sup>) 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 1<sup>st</sup> 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,** 1<sup>st</sup> 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 Biothecnology**, 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. **Jounal 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 vitroto-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.