

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo  
fexofenadina**

Gisele Maria Metta

Ribeirão Preto  
2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo  
fexofenadina**

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

**Orientada:** Gisele Maria Metta

**Orientador:** Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

\*Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 06/12/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP\*.

Ribeirão Preto  
2013

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.

Metta, Gisele Maria

Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo fexofenadina. Ribeirão Preto, 2013.

116 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: De Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes

1.Análise enantiosseletiva. 2.Biotransformação. 3.CLAE.  
4. Fexofenadina. 5.Técnicas miniaturizadas de extração

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Gisele Maria Metta

Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo fexofenadina

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

Área de Concentração: Medicamentos e  
Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo  
Moraes de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Aos meus pais Luiz Carlos e Cleide,

por serem a luz do meu caminho e a razão do meu viver;

Ao meu irmão Eduardo e minha cunhada Gisele,

Pelo carinho, ajuda e incentivo;

E ao meu noivo Rafael,

Pelo amor, respeito e compreensão;

### **OFEREÇO**

À todos os meus familiares, professores e aos amigos do laboratório, por fazerem

parte da minha vida;

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida, pela saúde, pelos amigos e pela maravilhosa família que tenho, por tudo o que conquistei com o apoio deles, pelas dificuldades encontradas e superadas, bem como pelos momentos alegres que vivo.*

*Aos meus pais Luiz Carlos e Cleide, por tudo que me ensinaram, pelo apoio em todos os momentos, pelo amor incondicional, pela minha vida, pela educação que me deram. São a razão do meu viver, do meu lutar, de superar todos os obstáculos. Amo e admiro muito vocês!*

*Ao meu irmão Eduardo e à minha cunhada Gisele, pela ajuda em todos os momentos, pelo carinho, pelo incentivo, pelo amor, pela amizade, enfim, obrigada por tudo! Amo vocês!*

*Ao meu noivo Rafael, pelo amor, pela amizade, pela compreensão, pelo apoio em minhas decisões, pelo respeito, pelos 10 anos ao seu lado, pelos lindos momentos que tem me proporcionado. Ao meu eterno amor e amigo, agradeço por tudo. Eu te amo muito!*

*Enfim, à toda a minha família, Baggio e Metta, por estarem do meu lado sempre, pela motivação, pelas alegrias, pelos almoços em família, pelas reuniões, pela palavra amiga, por acreditarem em mim, quando nem eu mesma mais acreditava. Obrigada por tudo!*

*Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira por ser meu orientador, pelos inúmeros ensinamentos, pelas lições de vida, pelo apoio nas dificuldades que encontrei, pela imensa compreensão, pelo respeito e pela paciência. Muito obrigada por tudo e desculpa pelos meus erros!*

*À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Química e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade de desenvolver este projeto. Finalmente, realizo mais um sonho em minha vida, em estudar na USP de Ribeirão Preto.*

*Aos colegas pós-graduandos do LABMETS, Bruno, Daniel, Fernanda, Marcela, Mariana, Nayara, Liana, Lídia, Lucas Bolzon, Lucas Maciel, Simone, Viviane.*

*Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial, à Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato e à Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, em disponibilizar a utilização dos seus laboratórios.*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Física e Química, especialmente ao Prof. Dr. Bruno Spinoza de Martinis, Profa. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade, Profa. Dra. Yassuko Iamamoto, Profa. Dra. Laura Tiemi Okano em permitir a utilização do seu laboratório para realizar parte dos meus experimentos.*

*Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação.*

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro e bolsa de estudos.*

*À Comissão de aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (Capes) pela bolsa de mestrado.*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e pela bolsa de mestrado (processo nº 2011/15419-1).*

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”*

*José de Alencar*



## RESUMO

METTA, G. M. **Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo fexofenadina.** 2013. 116f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A fexofenadina (FEX) tem sido o fármaco de primeira escolha no tratamento sintomático de manifestações alérgicas, por ser um anti-histamínico dos receptores H1 de 2ª geração não sedativo. É o metabólito ativo e quiral da terfenadina (TERF), medicamento cuja produção e comercialização foram suspensas em função dos eventos adversos apresentados. Fungos têm se apresentado como uma alternativa promissora na produção de compostos com atividade biológica. Dessa forma, o objetivo desse projeto foi avaliar a capacidade de fungos em biotransformar enantiosseletivamente a terfenadina em seu metabólito ativo, a fexofenadina empregando fungos como agentes catalisadores. Para a análise enantiosseletiva da fexofenadina foi desenvolvido um método de separação cromatográfica empregando a coluna quiral Lux<sup>®</sup> cellulose-1, fase móvel constituída de água: metanol (35:65, v/v) + 0,3% trietilamina + 0,4% ácido acético, vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, com detecção em 220nm. Duas microtécnicas de preparação de amostras foram avaliadas na extração dos analitos do meio de cultura: a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME). Entre essas, a DLLME foi a microtécnica de escolha, pois forneceu melhores resultados tais como, maior valor de recuperação, cromatogramas sem picos de possíveis interferentes, maior rapidez e facilidade de preparação das amostras. As condições otimizadas da DLLME foram: clorofórmio (300 µL) como solvente extrator, isopropanol (300 µL) como solvente dispersor. Após a formação do ponto nuvem, as amostras foram submetidas à agitação por vórtex durante 15 segundos e centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm. As recuperações foram de 43% para ambos enantiômeros. O método se mostrou linear na faixa de concentração 2.0 - 15.0 µg mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero da FEX (r > 0,990). O limite de quantificação foi de 2 µg mL<sup>-1</sup> para os enantiômeros da FEX. Dentre os sete fungos estudados (*Papulaspora immersa* Hotson SS13, *Penicillium crustosum* VR4, *Mucor rouxii*, *Nigrospora sphaerica* SS67, *Fusarium oxysporum* SS50, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B) somente o fungo *Fusarium oxysporum* SS50 e *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A apresentaram potencial para biotransformação da terfenadina em fexofenadina nas condições de incubação empregadas nesse trabalho.

Palavras-chave: Análise enantiosseletiva, Biotransformação, CLAE, DLLME, Fexofenadina, HF-LPME.

## ABSTRACT

METTA, G. M. **Evaluation of fungi in obtaining chiral active metabolite fexofenadine.** 2013. 116f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Fexofenadine (FEX) has been the drug of choice for the symptomatic treatment of allergic manifestations, being an antihistamine H1 receptor 2<sup>nd</sup> generation non-sedating. It is the active and chiral metabolite of terfenadine (TERF), a drug whose production and marketing was suspended as a result of adverse events. Fungi have been presented as a promising alternative for the production of compounds with biological activity. Thus, the goal of this project was to evaluate the ability of fungi to biotransform asymmetric terfenadine to its active metabolite, fexofenadine using fungi as agents catalysts. For enantioselective analysis of fexofenadine a method for chromatographic separation was developed employing a chiral column Lux<sup>®</sup> cellulose -1, mobile phase water : methanol (35:65,v/v) + 0.3% triethylamine + 0.4% acetic acid, flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>, with detection at 220nm. Two sample preparation microtechnology were evaluated in the extraction of analytes from the culture medium: the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and hollow fiber liquid phase microextraction (HF- LPME). Between the two, the DLLME was the microtechnic chosen because it provided better results such as higher recovery values, chromatograms with no possible interfering peaks, greater speed and ease of sample preparation. The optimized conditions of DLLME were: chloroform (300 µL) as extractor solvent, isopropanol (300 µL) as disperser solvent. After the formation of the cloud point, the samples were subjected to agitation by vortexing for 15 seconds and centrifuging for 10 minutes at 3000 rpm. The recoveries were 43 % for both enantiomers. The method was linear in the concentration range from 2.0 -15.0 µg mL<sup>-1</sup> for each enantiomer of FEX (r > 0.990). The limit of quantification was 2 µg mL<sup>-1</sup> for the enantiomers of FEX. Among the seven fungi studied (*Papulaspora immersa* Hotson SS13, *Penicillium crustosum* VR4, *Mucor rouxii*, *Nigrospora sphaerica* SS67, *Fusarium oxysporum* SS50, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B), only the fungi *Fusarium oxysporum* SS50 e *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A showed potential for biotransformation of terfenadine in fexofenadine in the incubation conditions employed in this work.

Keywords: Biotransformation, DLLME, Enantioselective analysis, Fexofenadine, HF-LPME, HPLC.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática dos enantiômeros, empregando o ácido láctico como exemplo. Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. .... 1
- Figura 2.** Estruturas químicas da terfenadina e fexofenadina. \*Centro quiral (YAO e SRINIVAS, 2012). .... 3
- Figura 3.** Representação do modelo de “interação de três pontos”. Adaptado de LOURENÇO et al., 2010. .... 6
- Figura 4.** Estruturas tridimensionais do 3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose e amilose. Adaptado de OKAMOTO e IKAI, 2008. .... 8
- Figura 5.** Esquema de extração DLLME. Adaptado de ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011. .... 15
- Figura 6.** Frequência de artigos publicados com as principais técnicas de microextração por solventes, entre 2010 e 2012. DLLME - microextração líquido-líquido dispersiva, HFME - microextração com fibra oca, SDME/HS-SDME - microextração em gota suspensa, LLME/LLLME - microextração líquido-líquido / microextração líquido-líquido-líquido. Adaptado de KOCUROVÁ et al., 2012. .... 17
- Figura 7.** Esquema de HF-LPME (MAGALHÃES et al., 2009). .... 18
- Figura 8.** Esquema dos modos de extração na HF-LPME. Adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2008. .... 19
- Figura 9.** Esquema das configurações para HF-LPME. Adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2008. .... 20
- Figura 10.** Foto mostrando fibra de polipropileno cilíndrica oca, com as microponteiras da marca Sorenson Bioscience (EUA). .... 27
- Figura 11.** Representação esquemática das etapas de *Screening* e otimização. .... 31

- Figura 12.** Foto mostrando a transferências dos “*plugs*” do meio de cultura com o fungo para o meio de malte.....46
- Figura 13.** Foto mostrando a incubação dos fungos em meio de malte por 5 dias...46
- Figura 14.** Foto mostrando a incubação dos fungos em meio Czapek por 15 dias. .47
- Figura 15.** Cromatograma mostrando a separação parcial dos enantiômeros da fexofenadina (15 min) pela coluna Chiralpak AD<sup>®</sup>. Linha preta refere-se à fexofenadina na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> e a linha vermelha refere-se à fexofenadina na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Fase móvel: acetonitrila:etanol (50:50, v/v) + 0,1% de ácido acético glacial + 0,1% de trietilamina; vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura de análise 21 (±2) °C. Detecção em 220 nm. ....51
- Figura 16.** Cromatograma obtido pela coluna Chiralpak<sup>®</sup> AD-RH. Linha preta refere-se à fexofenadina na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> e a linha vermelha refere-se à fexofenadina na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Fase móvel: acetonitrila:etanol (50:50, v/v) + 0,1% de ácido acético glacial; vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura de análise 21 (± 2) °C. Detecção em 220 nm. Tempo de retenção ≈ 4 min. ....52
- Figura 17.** Cromatograma da separação dos enantiômeros da fexofenadina empregando a coluna quiral Lux<sup>®</sup> cellulose-1. Fase móvel: água: metanol (35:65, v/v) + 0,3% trietilamina + 0,4% ácido acético; vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>; temperatura de análise 21 (±2) °C com detecção em 220 nm. (1) (-)-Fexofenadina e (2) (+)-Fexofenadina. ....53
- Figura 18.** Cromatograma da possível separação dos enantiômeros da terfenadina empregando a coluna quiral Lux<sup>®</sup> cellulose-1. Fase móvel: água: metanol (35:65, v/v) + 0,3% trietilamina e 0,4% ácido acético; vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>; temperatura de análise 21 (± 2) °C com detecção em 220 nm. Possíveis enantiômeros da terfenadina (1 e 2).....54
- Figura 19.** Espectro de absorção com luz circularmente polarizada para os enantiômeros FEX. Linha azul, primeiro pico a eluir da coluna, (-)-fexofenadina. Linha vermelha, segundo pico a eluir no da coluna, (+)-fexofenadina. ....56

**Figura 20.** Otimização do pH da amostra na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração - volume do solvente extrator (diclorometano): 200 µL; volume do solvente dispersor (etanol): 400 µL; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C. ....58

**Figura 21.** Otimização do solvente extrator na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração - volume do solvente extrator: 200 µL; volume do solvente dispersor (etanol): 400 µL; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C. Não houve extração com tetracloreto de carbono (não representado). ....59

**Figura 22.** Otimização do solvente dispersor na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Extração eficiente representada pela área dos picos. Condições de extração - volume do solvente extrator (clorofórmio): 200 µL; volume do solvente dispersor: 400 µL; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C. ....60

**Figura 23.** Otimização do volume de solvente extrator na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração - solvente extrator: clorofórmio; volume do solvente dispersor (isopropanol): 400 µL; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C. ....61

**Figura 24.** Otimização do volume de solvente dispersor na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração - volume de solvente extrator (clorofórmio): 300 µL; solvente dispersor: isopropanol; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C. ....61

**Figura 25.** Otimização do tempo de agitação na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração – volume de solvente extrator (clorofórmio): 300 µL; volume de solvente dispersor (isopropanol): 300 µL; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C. ....63

**Figura 26.** Cromatograma após extração por DLLME para análise da fexofenadina nas condições otimizadas. A) Branco do meio de cultura líquido Czapek após DLLME, B) Amostra de fexofenadina após extração por DLLME. (1)-(-)-fexofenadina, (2)-(+)-fexofenadina. Condições de análise descritas na Figura 17....64

**Figura 27.** Otimização do tipo de solvente orgânico na extração por HF-LPME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência da extração representada pela área dos picos. Condições de extração – solução aceptora: HCl 50mM; tempo de extração: 50 minutos; sem adição de sal; pH da amostra 5,0, volume da amostra 1 mL. Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno 15 cm de comprimento com 600 µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm. ....66

**Figura 28.** Otimização do tempo de extração na extração por HF-LPME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração – solvente orgânico: n-octanol; solução aceptora: HCl 50mM; sem adição de sal; pH da amostra 5,0, volume da amostra 1 mL. Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno 15 cm de comprimento com 600 µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm. ....67

**Figura 29.** Otimização da composição e concentração da solução aceptora na extração por HF-LPME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração – solvente orgânico: n-octanol; tempo de extração: 70 minutos; sem adição de sal; pH da amostra 5,0, volume da amostra 1 mL. Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno 15 cm de comprimento com 600µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm.....68

- Figura 30.** Otimização da adição de cloreto de sódio na extração por HF-LPME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração – solvente orgânico: n-octanol; tempo de extração: 70 minutos; solução aceptora: AcCOOH 50mM; pH da amostra 5,0, volume da amostra 1 mL. Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno 15 cm de comprimento com 600 µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm.....69
- Figura 31.** Estruturas químicas da FEX (A) e RISP (B). .....71
- Figura 32.** Cromatogramas representativos dos enantiômeros da FEX em meio de cultura Czapek após extração DLLME. (A) Meio de cultura Czapek fortificado com (1) padrão interno (70 µg mL<sup>-1</sup>), (2) (-)-Fexofenadina e (3) (+)-Fexofenadina (concentração de 12 µg mL<sup>-1</sup> para cada enantiômero). (B) Meio de cultura Czapek sem adição dos analitos. Condições de análise descritas na Figura 17. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3. ....75
- Figura 33.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Papulaspora immersa* Hotson SS13. Condições de análise descritas na Figura 17. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3. ....76
- Figura 34.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Mucor rouxii*. Condições de análise descritas na Figura 17. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3. ....76
- Figura 35.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Fusarium oxysporum* SS50. Condições de análise descritas na Figura 17. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3. ....77
- Figura 36.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A. Condições de análise descritas na Figura 17. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3.....77
- Figura 37.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B. Condições de análise descritas na Figura 17. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3.....78

**Figura 38.** Foto mostrando as placas de 96 poços com os fungos, após incubação.

.....80

**Figura 39.** (A) Linha azul corresponde ao cromatograma do branco do fungo da espécie *Fusarium oxysporum* SS50, B) Linha vermelha corresponde ao cromatograma da análise do meio de biotransformação do fungo da espécie *Fusarium oxysporum* SS50 após o décimo quinto dia de incubação. Condições de análise descritas na Figura 17. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3. (1) Risperidona, (2) (-)-fexofenadina. A seta indica o interferente. ....82

**Figura 40.** (A) Linha azul corresponde ao cromatograma do branco do fungo da espécie *Cunninghamella echinulata var. elegans* ATCC 8688A, B) Linha vermelha corresponde ao cromatograma da análise do meio de biotransformação do fungo da espécie *Cunninghamella echinulata var. elegans* ATCC 8688A após o décimo quinto dia de incubação. Condições de análise descritas na Figura 17. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3. (1) Risperidona, (2) (+)-fexofenadina....82



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista de colunas quirais baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente. Adaptado de DE FREITAS, 2009. (BONATO et al., 2005; ALI et al., 2006; ZHANG et al., 2006; IKAI et al., 2008;)	10
<b>Tabela 2.</b> Lista de colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos disponíveis comercialmente. Adaptado de BOCATO, 2012 (LOURENÇO et al., 2010; BARTH, 2012).	12
<b>Tabela 3.</b> Estudos de biotransformação enantiosseletiva com fungos.	22
<b>Tabela 4.</b> Esquema do método de microdiluição em microplaca para cultura fúngica.	43
<b>Tabela 5.</b> Comparação das metodologias desenvolvidas para separação dos enantiômeros da fexofenadina.	55
<b>Tabela 6.</b> Principais diferenças entre as microtécnicas de extração DLLME e HF-LPME.	70
<b>Tabela 7.</b> Linearidade do método para análise dos analitos em meio de cultura líquido Czapek e em pool de fungos.	72
<b>Tabela 8.</b> Recuperação do método de DLLME para análise dos enantiômeros da fexofenadina.	73
<b>Tabela 9.</b> Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva da fexofenadina.	73
<b>Tabela 10.</b> Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da fexofenadina em meio Czapek.	74
<b>Tabela 11.</b> Estabilidade dos enantiômeros da fexofenadina nos ciclos congelamento/descongelamento, bancada por 6 horas e autoinjeter por 24 horas em meio de cultura líquido Czapek.	79

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AcCOOH	Ácido acético
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDA	Batata dextrose ágar
EC	Eletroforese capilar
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C <sub>0</sub>	Concentração inicial
C <sub>sed</sub>	Concentração da fase sedimentada
CV%	Coefficiente de variação percentual
CYP	Citocromo
DEA	Dietilamina
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
DPR %	Desvio padrão relativo
E%	Erro relativo
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEQ	Fase estacionária quiral
FEX	Fexofenadina
HCl	Ácido clorídrico
HF-LPME	Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca
K <sub>D</sub>	Coefficiente de distribuição
LLE	Extração líquido-líquido
Log P	Coefficiente de partição
LIQ	Limite de quantificação
MIC'	Concentração inibitória mínima
MeOH	Metanol
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
FN	Fase normal

PI	Padrão interno
PO	Polar orgânico
FR	Fase reversa
Rs	Resolução
SBSE	Microextração sortiva em barras de agitação
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
TEA	Trietilamina
TERF	Terfenadina
TFA	Ácido trifluoracético
$t_R$	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
$W_b$	Largura da base do pico cromatográfico

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1.FÁRMACOS QUIRAIS .....	1
1.2.TERFENADINA E FEXOFENADINA.....	3
1.2.1. Análise enantiosseletiva da terfenadina e fexofenadina.....	4
1.3.ANÁLISE DE ENANTIÔMEROS POR CLAE .....	5
1.3.1.Fases estacionárias quirais.....	7
1.3.1.1. Fases estacionárias derivadas de polissacarídeos .....	7
1.3.1.2. Fases derivadas de antibióticos macrocíclicos.....	11
1.3.2.Modos de eluição: Normal, Reverso e Polar Orgânico.....	12
1.4. MICROTÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	13
1.4.1. DLLME .....	14
1.4.2. HF-LPME.....	17
1.5.BIOTRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR FUNGOS .....	20
1.5.1. A enantiosseletividade e a biotransformação por fungos .....	21
2. OBJETIVOS .....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. MATERIAIS .....	25
3.1.1. Reagentes e Solventes .....	25
3.1.1.1. Separação cromatográfica .....	25
3.1.1.2. Técnicas miniaturizadas de preparação de amostras .....	25
3.1.1.3. Estudo de biotransformação.....	26
3.1.2. Equipamentos e Acessórios.....	26
3.1.2.1. Sistema cromatográfico.....	26
3.1.2.2. Equipamentos e materiais utilizados na DLLME e HF-LPME.....	26
3.1.2.3. Equipamento empregados nos estudos de biotransformação.....	27
3.1.3. Colunas quirais e coluna de guarda .....	28
3.1.4. Soluções padrão da Terfenadina, Fexofenadina e Padrão interno .....	29

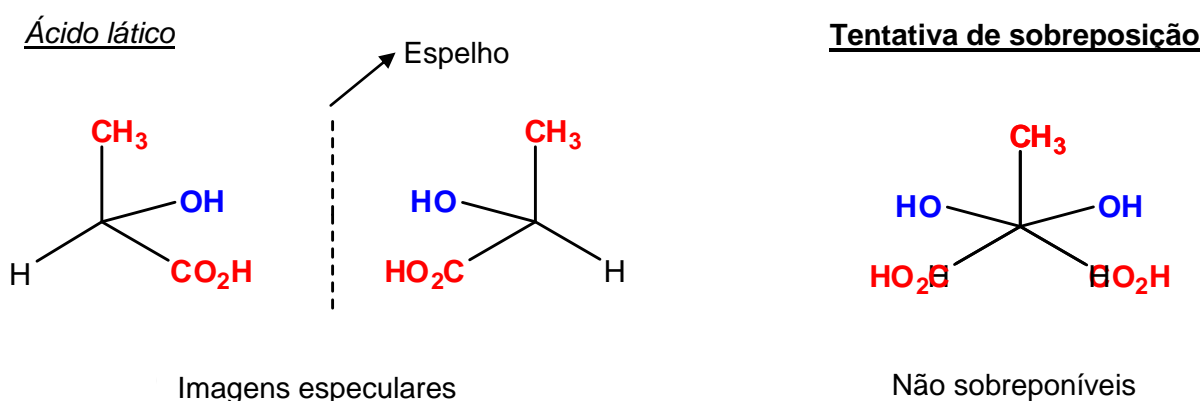
3.2. MÉTODOS .....	30
3.2.1. Preparação das Fases Móveis .....	30
3.2.2. Preparo da solução de fosfato de sódio .....	30
3.2.3. Avaliação da separação quiral por CLAE .....	30
3.3. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DOS ANALITOS EM MEIO DE CULTURA EMPREGANDO A DLLME E HF-LPME .....	32
3.3.1. DLLME .....	32
3.3.2. HF-LPME.....	33
3.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	33
3.4.1. Soluções-padrão empregadas na validação do método.....	33
3.4.2. Parâmetros avaliados na validação do método.....	34
3.4.3. Curva analítica e Linearidade.....	34
3.4.3.1. Limite de quantificação (LIQ).....	35
3.4.4. Seletividade.....	35
3.4.5. Recuperação .....	35
3.4.6. Precisão e exatidão .....	36
3.4.7. Estabilidade.....	37
3.4.7.1. Ciclo de congelamento e descongelamento.....	37
3.4.7.2. Bancada por 6 horas .....	38
3.4.7.3. Autoinjeter por 24 horas .....	38
3.5. ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO .....	38
3.5.1. Fungos .....	38
3.5.2. Preparo do meio de cultura BDA.....	39
3.5.3. Preparo do meio de cultura de malte.....	40
3.5.4. Preparo do meio de cultura líquido Czapek.....	40
3.5.5. Preparo da matriz pool de fungos .....	41
3.5.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	41
3.5.6.1. Preparação da placa .....	41
3.5.6.2. Preparação do inóculo.....	42
3.5.7. Procedimento de biotransformação da terfenadina.....	45
3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ÓPTICA DOS ENANTIÔMEROS DA FEX POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO QUIRAL DA FEXOFENADINA POR CLAE ....	49

4.1.1. Coluna Chiralpak AD® .....	50
4.1.2. Coluna Chiralpak® AD-RH.....	51
4.1.3 . Lux® cellulose-1.....	52
4.1.3.1. Separação da terfenadina .....	54
4.1.3.2. Comparação da separação enantiosseletiva da FEX.....	55
4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ÓPTICA DOS ENANTIÔMEROS DA FEX POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	56
4.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA DLLME .....	57
4.3.1. Otimização do pH de extração .....	57
4.3.2. Otimização do solvente extrator .....	58
4.3.3. Otimização do solvente dispersor .....	59
4.3.4. Otimização do volume do solvente extrator e dispersor .....	60
4.3.5. DLLME assistida .....	62
4.3.6. Otimização da adição de cloreto de sódio.....	63
4.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA HF-LPME .....	65
4.4.1. Otimização do tipo de solvente orgânico.....	65
4.4.2. Otimização do tempo de extração.....	66
4.4.3. Otimização da composição e concentração da fase aceptora .....	67
4.4.4. Otimização da adição de cloreto de sódio.....	68
4.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	71
4.5.1. Linearidade.....	72
4.5.2. Recuperação .....	73
4.5.3. Limite de Quantificação .....	73
4.5.4. Precisão e Exatidão .....	74
4.5.5. Seletividade.....	75
4.5.6. Estabilidade.....	78
4.6. TESTE MIC .....	79
4.7.APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO NA BIOTRANSFORMAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DA TERFENADINA POR FUNGOS.....	81
4.7.1. <i>Fusarium oxysporum</i> SS50 .....	81
4.7.2. <i>Cunninghamella echinulata</i> var. <i>elegans</i> ATCC 8688A.....	82
5. CONCLUSÕES .....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. FÁRMACOS QUIRAIS

Muitos medicamentos são comercializados atualmente como mistura racêmica ou racemato, formado por iguais proporções de enantiômeros. Esses são isômeros, cujas imagens especulares não são sobreponíveis (**Figura 1**) e são considerados compostos quirais por possuírem um ou mais centros assimétricos em sua estrutura química (BONATO et al., 2005; OKAMOTO e IKAI, 2008; MORI, 2011). As macromoléculas biológicas, como nucleotídeos de DNA, RNA e alguns aminoácidos são exemplos de compostos quirais, evidenciando que a quiralidade está inclusive presente no nosso organismo (SOLOMONS e FRYHLE, 2000; BORGES, 2006).



**Figura 1.** Representação esquemática dos enantiômeros, empregando o ácido láctico como exemplo. Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA.

Apesar dos enantiômeros serem compostos que possuem as mesmas propriedades físico-químicas (tais como: índice de refração, solubilidade, ponto de fusão e ponto de ebulição), em um ambiente quiral, esses compostos podem apresentar comportamentos distintos que permite interações enantiosseletivas com macromoléculas biológicas, como por exemplo, enzimas e receptores. Além disso, diferem-se quanto: i) à capacidade de desviarem o plano da luz polarizada e ii) em sua estrutura tridimensional (MISLANOVÁ e HUTTA, 2003; BONATO et al., 2005; OKAMOTO e IKAI, 2008; MORI, 2011; BOCATO, 2012).

Ou seja, os enantiômeros de um fármaco podem apresentar diferenças farmacológicas entre si, “seja na farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), seja na sua farmacodinâmica (interação dos enantiômeros com os sítios alvos de ação)” (NATARAJAN e BASAK, 2011; BOCATO, 2012).

Com base no exposto acima, é imprescindível que seja feito um estudo farmacológico mais aprofundado com esses medicamentos quirais, já que as diferenças na farmacodinâmica de dois enantiômeros podem ser qualitativas (quando eles possuem atividades biológicas distintas) e quantitativas (quando um dos enantiômeros é mais ativo que o outro). Assim, classifica-se como eutômero, o enantiômero farmacologicamente mais ativo ou com maior afinidade, e distômero, aquele menos ativo ou com menor afinidade (BONATO et al., 2005; BORGES, 2006; NATARAJAN e BASAK, 2011).

Frente a esses aspectos, algumas mudanças ocorreram na legislação referente ao desenvolvimento de fármacos, sendo que órgãos regulamentadores internacionais, como o FDA (“*Food and Drug Administration*”), tornaram as legislações mais rigorosas tanto no desenvolvimento de fármacos quirais, como no seu controle de qualidade (SILVA JUNIOR et al., 2006; SMITH, 2009; BOCATO, 2012).

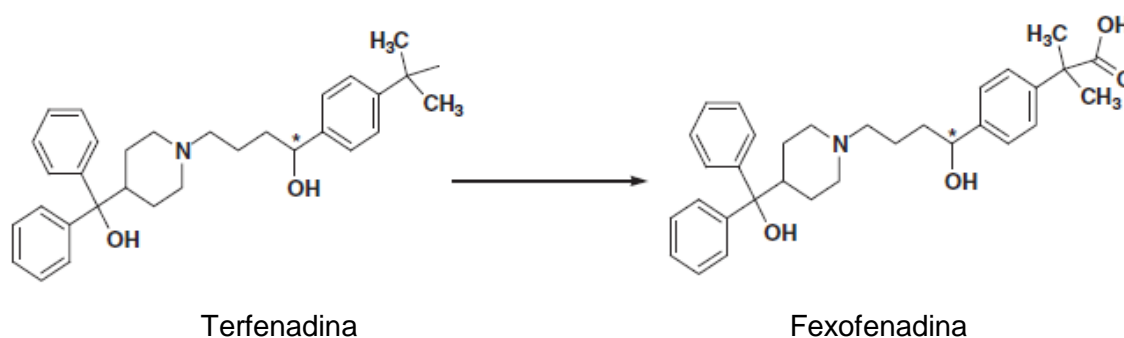
Além disso, as indústrias farmacêuticas adotaram uma estratégia denominada “*chiral switch*”, que visa à produção de medicamentos na forma de enantiômeros puros a partir dos fármacos quirais já comercializados, contribuindo para o aumento do número desses fármacos no mercado (AGRANAT et al., 2002; CANER et al., 2004; IZAKE, 2007; BOCATO, 2012).

Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas analíticas que possibilitem a análise, discriminação e quantificação dos enantiômeros, vem ganhando destaque, especialmente no desenvolvimento de novos medicamentos (BONATO et al., 2005; BOCATO, 2012).



## 1.2. TERFENADINA E FEXOFENADINA

Lançado em 1982 como o primeiro antagonista de 2ª geração dos receptores histamínicos H1 não sedativo, a terfenadina (TERF) representou um grande avanço no tratamento de reações alérgicas, pois não causava sonolência como os demais representantes. Após administração por via oral, a terfenadina é rapidamente biotransformada em um derivado de álcool pela oxidação dependente do citocromo P450 3A4 e, posteriormente, em uma etapa independente do citocromo, convertida em fexofenadina (FEX), seu metabólito farmacologicamente ativo e não tóxico (**Figura 2**) (PAAKKARI, 2002; CAMELO-NUNES, 2006; YAO e SRINIVAS, 2012).



**Figura 2.** Estruturas químicas da terfenadina e fexofenadina. \*Centro quiral (YAO e SRINIVAS, 2012).

Em Julho de 2000, os medicamentos (Seldane<sup>®</sup>, Triludan<sup>®</sup> e outros) que continham a terfenadina em sua composição tiveram sua fabricação, distribuição, comercialização/venda e dispensação suspensas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução RDC nº 67, uma vez que estudos científicos comprovaram o risco desse medicamento em causar arritmia cardíaca quando administrado junto com antibióticos, e em pacientes com grave doença hepática (FERREIRA et al., 2009; ANVISA, 2013).

O primeiro relato de cardiotoxicidade foi em 1989, devido à administração concomitante da terfenadina com medicamentos que bloqueiam a atividade do citocromo P450 isoforma 3A4, o que acarretou, portanto, em uma alteração na biodisponibilidade do anti-histamínico. Entretanto, a terfenadina não oferece risco de toxicidade quando em monoterapia, apenas em casos de overdose (PAAKKARI, 2002).

Desde então, a fexofenadina, um anti-histamínico de 2ª geração não sedativo, tem sido o fármaco de primeira escolha no tratamento sintomático de manifestações alérgicas, já que, além de atuar como um antagonista seletivo nos receptores periféricos H1 da histamina, possui outras vantagens, como: ação rápida e eficaz, boa tolerabilidade (DE OLIVEIRA, 2006), ser de longa duração, possuir propriedades anti-inflamatórias, não apresentar efeitos cardiotoxicos (HARAGUCHI e CARVALHO, 2002), ser fracamente metabolizado e possuir propriedades farmacocinéticas que permitam sua utilização em dose única diária (CAMELO-NUNES, 2006). Devido sua polaridade, é incapaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, e, portanto, causar distúrbios sedativos como sonolência (DE OLIVEIRA, 2006).

O efeito não sedativo da fexofenadina pode ser atribuído a algumas características que esta molécula possui, como: i) ser hidrofílica, ii) ter propriedades anfóteras ( $pK_{a1} = 4,43 \pm 0,10$  e  $pK_{a2} = 9,42 \pm 0,10$ ) e iii) um moderado valor de log P ( $3,73 \pm 0,43$ ) (SCIFINDER WEB, *Scifinder scholar* da ACD/Labs, Toronto, ON, Canadá, versão 2007).

Atualmente, a fexofenadina é disponível comercialmente na forma de cloridrato, como uma mistura racêmica dos dois isômeros farmacologicamente ativos, podendo ser encontrada com o nome comercial de Allegra<sup>®</sup>, fabricado pela Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.

### 1.2.1. Análise enantiosseletiva da terfenadina e fexofenadina

Algumas metodologias empregando CLAE foram desenvolvidas para a análise da terfenadina, e principalmente da fexofenadina, porém, não há nenhum relato na literatura que descreva a análise enantiosseletiva da fexofenadina em meio de cultura ou em processos de biotransformação.

MIURA et al. (2007) desenvolveram uma metodologia para a separação e quantificação dos enantiômeros da fexofenadina em plasma humano. Nesse método os autores empregaram a coluna quiral CD-Ph (250 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta por 0,5%  $KH_2PO_4$  (pH 3,5):acetonitrila na proporção (65:35, v/v), e uma vazão de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . A extração em fase sólida (SPE) foi a técnica de preparo de amostra empregada e resultou em recuperações de aproximadamente 70%. Apesar do tempo total de análise ter sido de aproximadamente 60 minutos, os

enantiômeros da fexofenadina foram separados de maneira satisfatória, sem a presença de picos dos possíveis interferentes da amostra biológica.

Quanto ao composto terfenadina, a coluna quiral Chiralcel OD<sup>®</sup> (250 mm x 4.6 mm) e eluição no modo fase normal produziram resultados satisfatórios para a separação dos enantiômeros da mistura racêmica. Porém, essa mesma coluna não apresentou a mesma eficiência para a separação da fexofenadina, de modo que, para uma boa resolução, o metabólito ativo necessitou sofrer uma reação de derivatização com diazometano (RUSTICHELLI et al., 2004).

### 1.3. ANÁLISE DE ENANTIÔMEROS POR CLAE

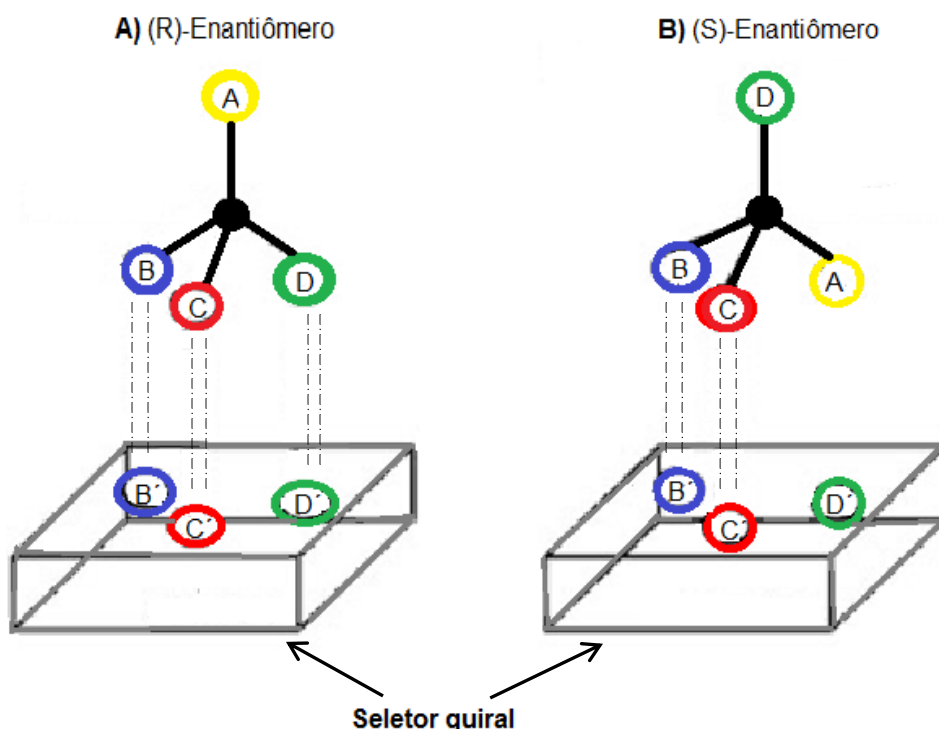
A separação enantiomérica por CLAE vem sendo muito utilizada devido à robustez, facilidade operacional e versatilidade desta técnica. Estas separações podem ser feitas a partir de métodos diretos ou indiretos de análise. Apesar do seu atual desuso, o método indireto consiste no emprego de reagentes de derivatização quiral, formação de diastereoisômeros e separação em coluna convencional, por exemplo, C18. Dentre as desvantagens desse tipo de método, destacam-se: existência de uma etapa adicional devido à reação de derivatização, rigorosidade quanto à pureza óptica do reagente de derivatização quiral e controle quanto a não ocorrência de racemização durante a reação (LAMMERHOFER, 2010; QIU et al., 2011).

O método direto de separação de enantiômeros é baseado na formação de complexos diastereoisoméricos transitórios, havendo duas possibilidades: i) na própria fase estacionária (colunas com Fase Estacionária Quiral - FEQs), formada por moléculas opticamente ativas, ou ii) na fase móvel, com a adição de seletos quirais. Sendo que, esta segunda forma, apesar de representar a maneira mais fácil e fornecer bons resultados na maioria dos casos, nem sempre é uma ferramenta praticável, e, além disso, possui um custo elevado devido o preço desses seletos quirais adicionados à fase móvel (LAMMERHOFER, 2010; QIU et al., 2011).

A separação baseada na formação de complexos diastereoisoméricos na fase estacionária é simples e reproduzível, uma vez que os polímeros opticamente ativos estão recobertos ou ligados a um suporte (normalmente de sílica) que confere uma grande resistência química e mecânica a essas fases.

O modelo de interação mais aceito para explicar o mecanismo de reconhecimento quiral é o modelo de "interação de três pontos", que ocorre entre os enantiômeros e o seletor quiral (**Figura 3**) (LAMMERHOFER, 2010; LOURENÇO et al., 2010).

Segundo DALGLIESH (1952), “ são necessárias três interações simultâneas entre um dos enantiômeros e o seletor quiral, sendo que pelo menos uma delas deve ser dependente da estereoquímica do analito. Além disso, as interações devem ser de sítios distintos tanto no enantiômero quanto no seletor quiral. O outro enantiômero interage somente com dois sítios do seletor quiral” (LOURENÇO et al., 2010). Inicialmente, esse modelo considerava que apenas as interações atrativas eram as responsáveis pela discriminação quiral, porém, atualmente, considera-se que as interações repulsivas também participam do mecanismo de resolução enantiomérica (LOURENÇO et al., 2010).



**Figura 3.** Representação do modelo de “interação de três pontos”. Adaptado de LOURENÇO et al., 2010.

### 1.3.1. Fases estacionárias quirais

Os seletores quirais das FEQs são vários, dentre eles: ciclodextrinas, polissacarídeos, antibióticos macrocíclicos, proteínas, fase quiral  $\pi$ -doadora e  $\pi$ -aceptora (tipo Pirkle), éteres de coroa, polímeros sintéticos (LAMMERHOFER, 2010; KALÍKOVÁ et al., 2012).

Entretanto, as FEQs mais frequentemente utilizadas na resolução de enantiômeros são as baseadas em polissacarídeos, em proteínas e antibióticos macrocíclicos (LAMMERHOFER, 2010; BOCATO, 2012). Serão discutidas apenas as FEQs que foram avaliadas durante o desenvolvimento deste projeto: i) baseadas em polissacarídeos e ii) baseadas em antibióticos macrocíclicos.

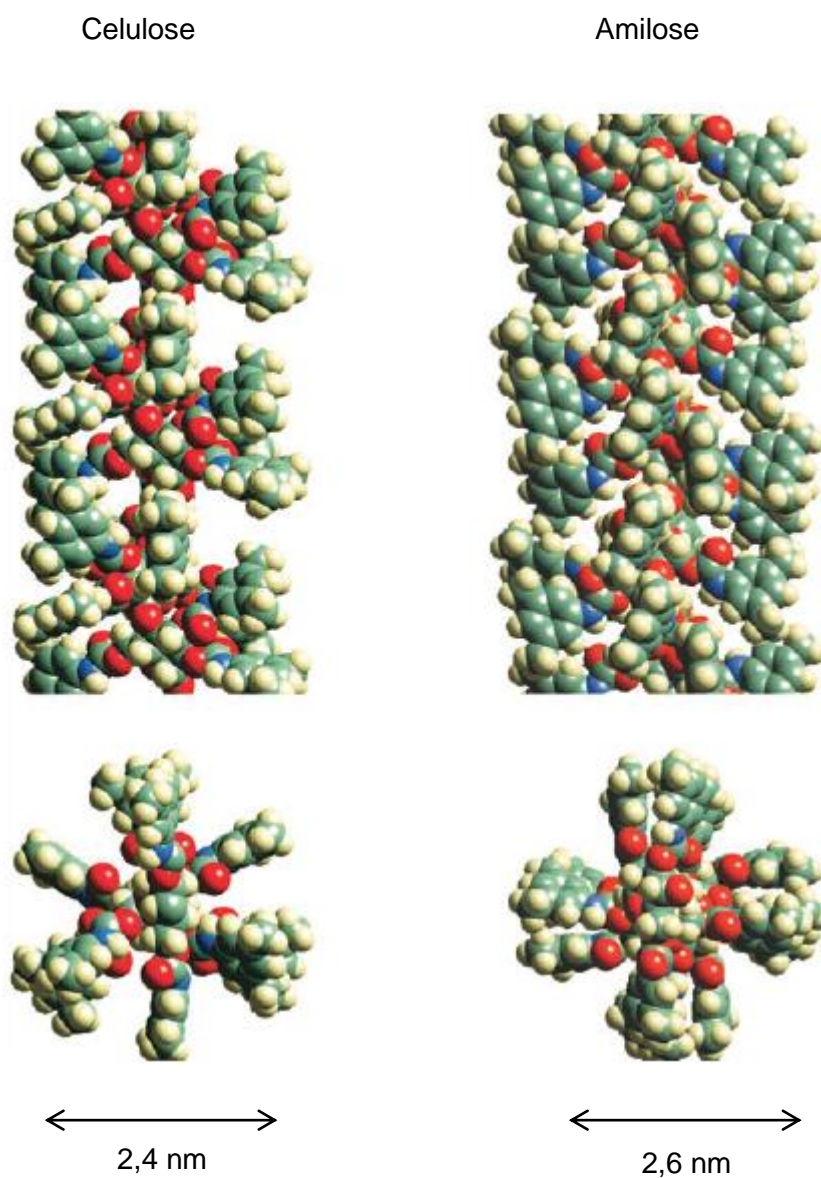
#### 1.3.1.1. Fases estacionárias derivadas de polissacarídeos

Dados estatísticos relatam que mais de 90% das análises quirais em CLAE são realizadas empregando FEQs baseadas em polissacarídeos. A celulose e a amilose são polissacarídeos helicoidais encontrados em grande quantidade na natureza, sendo que eles, na sua forma *in natura*, possuem uma limitada capacidade de reconhecimento quiral (BORGES, 2006; OKAMOTO e IKAI, 2008; QIU et al., 2011; BOCATO, 2012).

Por serem facilmente convertidos, esses polímeros podem sofrer reações de derivatização, que permite um aumento na sua estabilidade mecânica, bem como um incremento na sua capacidade de reconhecimento quiral pela criação de novos sítios de interação (YASHIMA, 2001; BONATO et al., 2005; QIU et al., 2011; BARTH, 2012; BOCATO, 2012).

Assim, as FEQs derivadas de polissacarídeos são as mais utilizadas e consideradas como as mais importantes para separações quirais, tanto em escala analítica com preparativa, pois apresentam estabilidade, versatilidade, alto poder de resolução, durabilidade e eficiência (OKAMOTO e KAIDA, 1994; BORGES, 2006; WARD, 2006; OKAMOTO e IKAI, 2008; PATAJ et al., 2010; QIU et al., 2011; BARTH, 2012).

As diferenças entre as FEQs derivadas de celulose e amilose devem-se à conformação helicoidal 3/2 da cadeia da celulose e conformação 4/1 da cadeia da amilose (**Figura 4**) (BARGMANN-LEYDER et al.,1995; BORGES, 2006; OKAMOTO e IKAI, 2008).



**Figura 4.** Estruturas tridimensionais do 3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose e amilose. Adaptado de OKAMOTO e IKAI, 2008.

O reconhecimento quiral entre os enantiômeros e a FEQ depende de alguns fatores, como: tipo de polissacarídeo empregado (se celulose ou amilose), da constituição da fase móvel, do modo de eluição empregado e da presença ou não de aditivos ácidos e/ou básicos na fase móvel (LAMMERHOFER, 2010; BOCATO, 2012). Os derivados de celulose e amilose, por possuírem uma estrutura no formato de “calha” helicoidal - com os grupos carbamatos e benzoatos localizados no seu interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente - permitem que os enantiômeros se encaixem nessas cavidades (BONATO et al., 2005; LAMMERHOFER, 2010) e por mecanismos de inclusão, podem ser separados.

Outro fator que contribui de forma significativa para o mecanismo de interação são as interações intermoleculares, representadas pelas ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações  $\pi$ - $\pi$  (LAMMERHOFER, 2010; BOCATO, 2012). A **Tabela 1** reúne exemplos de colunas baseadas em derivados de polissacarídeos (celulose e amilose) disponíveis comercialmente.

As colunas com FEQ derivadas de polissacarídeos podem ser empregadas em qualquer um dos modos de eluição, porém, deve haver um pré-condicionamento da mesma antes da conversão para outro modo de eluição (CASS et al., 2000; QIU et al., 2011; BOCATO, 2012) evitando assim possíveis danos à FEQs.

**Tabela 1.** Lista de colunas quirais baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente. Adaptado de DE FREITAS, 2009. (BONATO et al., 2005; ALI et al., 2006; ZHANG et al., 2006; IKAI et al., 2008).

Polissacarídeo	Derivado	Nome Comercial	
<i>Recobertas</i>			
<b>Celulose</b>	Tribenzoato	Chiralcel <sup>®</sup> OB Chiralcel <sup>®</sup> OB-H	
	Tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	Chiralcel <sup>®</sup> OD Chiralcel <sup>®</sup> OD-H Chiralcel <sup>®</sup> OD-R Chiralcel <sup>®</sup> OD-RH Lux <sup>®</sup> cellulose-1	
	Tris (4-metilbenzoato)	Chiralcel <sup>®</sup> OJ Chiralcel <sup>®</sup> OJ-H Chiralcel <sup>®</sup> OJ-RH Lux <sup>®</sup> cellulose-3	
	Tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato)	Chiralcel <sup>®</sup> OZ Chiralcel <sup>®</sup> OZ-H Lux <sup>®</sup> cellulose-2	
	Tris (4-cloro-3-metilfenilcarbamato)	Chiralcel <sup>®</sup> OX-H Lux <sup>®</sup> cellulose-4	
	4-metilfenilcarbamato	Chiralcel <sup>®</sup> OG	
	4-clorofenilcarbamato	Chiralcel <sup>®</sup> OF	
	Tricinimato	Chiralcel <sup>®</sup> OK	
	Triacetato	Chiralcel <sup>®</sup> AO	
	Microcristalina triacetato	Chiralcel <sup>®</sup> CA-1	
	Fenil carbamato	Chiralcel <sup>®</sup> OC	
	<i>Imobilizadas</i>		
	Tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	Chiralpak <sup>®</sup> IB Chiralpak <sup>®</sup> IB-H	
	Tris (3,5 diclorofenilcarbamato)	Chiralpak <sup>®</sup> IC Chiralpak <sup>®</sup> IC-H	
	<i>Recobertas</i>		
<b>Amilose</b>	Tris (3,5-dimetilfenil carbamato)	Chiralpak <sup>®</sup> AD Chiralpak <sup>®</sup> AD-H Chiralpak <sup>®</sup> AD-RH	
	Tris [(S)-1-feniletilcarbamato]	Chiralpak <sup>®</sup> AS Chiralpak <sup>®</sup> AS-H Chiralpak <sup>®</sup> AS-RH	
	Tris (5-cloro-2-metilfenilcarbamato)	Chiralpak <sup>®</sup> AY-H Lux <sup>®</sup> Amilose-2	
	<i>Imobilizadas</i>		
Tris (3,5-dimetilfenil carbamato)	Chiralpak <sup>®</sup> IA Chiralpak <sup>®</sup> IA-H		

“R” refere-se ao uso da coluna em fase reversa; “H” refere-se ao tamanho da partícula de sílica de 5 µm.



### 1.3.1.2. Fases derivadas de antibióticos macrocíclicos

Introduzidas por ARMSTRONG et al. (1994), as FEQs derivadas de antibióticos macrocíclicos são sintetizadas pela imobilização covalente de glicopeptídeos macrocíclicos como a vancomicina, rifamicina B, teicoplanina, tiostreptona, ristocetina A e outros a um suporte de sílica (LOURENÇO et al., 2010; BOCATO, 2012).

Os antibióticos macrocíclicos, além de possuírem diversas cavidades quirais, também apresentam diferentes tipos de grupos funcionais (tanto de caráter ácido, básico ou neutro) em sua estrutura, permitindo dessa forma, a ocorrência de várias interações, como por exemplo, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações  $\pi$ - $\pi$ , interações estéricas, interações eletrostáticas e formação de complexos de inclusão (ARMSTRONG et al., 1994; ILISZ et al., 2006; ILISZ et al., 2009; BOCATO, 2012). A variedade de interações permite que essas FEQs sejam uma alternativa para a separação de enantiômeros de muitos fármacos quirais (WARD e FARRIS, 2001; BARTH, 2012).

Como exemplo, pode-se citar a coluna Chirobiotic V<sup>®</sup>, cujo antibiótico macrocíclico presente em sua constituição é a vancomicina. Ela possui 18 centros quirais, 3 cavidades macrocíclicas contendo 5 anéis aromáticos e 2 cadeias laterais; uma delas e um carboidrato e a outra, um N-metil aminoácido. Em sua estrutura está presente também diversos grupos funcionais como 9 grupos hidroxila, 2 grupos amino, 7 grupos amida e 2 átomos de cloro substituintes de anéis aromáticos. As condições da fase móvel empregada determinará o tipo de interação que pode ocorrer (ARMSTRONG et al., 1994; ILISZ et al., 2006; ILISZ et al., 2009; LOURENÇO et al., 2010; BOCATO, 2012).

Alta estabilidade mecânica, possibilidade do uso nos três modos de eluição e alta capacidade de amostra (uso em escala preparativa) são algumas das vantagens que estas FEQs apresentam (WARD e FARRIS, 2001; BOCATO, 2012).

A **Tabela 2** mostra a principais FEQ baseadas em antibióticos macrocíclicos, suas dimensões e seletor quiral presente.

**Tabela 2.** Lista de colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos disponíveis comercialmente. Adaptado de BOCATO, 2012 (LOURENÇO et al., 2010; BARTH, 2012).

Seletor quiral	Nome comercial	Tamanho do poro	Tamanho da partícula
<b>Chirobiotic T</b>	Teicoplanina	100 Å	5 µm
<b>Chirobiotic T2</b>	Teicoplanina	200 Å	5 µm
<b>Chirobiotic TAG</b>	Teicoplanina aglicona	100 Å	5 µm
<b>Chirobiotic V</b>	Vancomicina	100 Å	5 µm
<b>Chirobiotic V2</b>	Vancomicina	200 Å	5 µm
<b>Chirobiotic R</b>	Ristocetina A	100 Å	5 µm

### 1.3.2. Modos de eluição: Normal, Reverso e Polar Orgânico

Para a cromatografia líquida quiral, 3 modos de eluição podem ser empregados, sendo estes: i) modo normal (FN), ii) modo reverso (FR) e iii) modo polar-orgânico (PO), que permitem a separação de compostos quirais com as mais diversas características, tanto em escala analítica como preparativa (TACHIBANA e OHNISHI, 2001; MATTHIJS et al., 2006<sup>1</sup>; MATTHIJS et al., 2006<sup>2</sup>).

Para a seleção da fase móvel, o solvente deve cumprir alguns critérios, como por exemplo: i) possuir elevado grau de pureza, ii) capacidade de dissolução da amostra sem a sua decomposição, iii) não degradar os componentes da fase estacionária, iv) possuir baixa viscosidade e baixo ponto de ebulição, v) compatibilidade com o detector a ser utilizado e vi) possuir boa miscibilidade com outros solventes (COLLINS et al., 2010).

O modo fase normal caracteriza-se pelo uso de fase móvel constituída pela mistura de alcano (hexano) e álcool (isopropanol ou etanol), as quais podem ter a adição de pequenas quantidades de um ácido orgânico (ácido trifluoracético, TFA) ou de uma base orgânica (dietilamina, DEA) (OKAMOTO e YASHIMA, 1998; BONATO et al., 2005). A adição de aditivos ácidos e/ou básicos tem como principal finalidade diminuir a interação dos analitos ácidos e básicos com os grupamentos silanóis livres presentes na sílica (BONATO et al., 2005).

No modo fase reversa, as fases móveis são compostas principalmente por uma solução aquosa e por um solvente orgânico polar miscível, como metanol ou acetonitrila. Esses são os modificadores orgânicos mais empregados neste modo, pois apresentam baixa viscosidade e baixa absorção no UV (TACHIBANA e OHNISHI, 2001). Recorre-se ao emprego de solução tampão quando se deseja controlar o pH ou força iônica da fase móvel (BONATO et al., 2005).

Já no modo polar orgânico (PO), apenas solventes orgânicos polares são empregados como fase móvel, tais como acetonitrila, metanol e outros (etanol, propanol, butanol ou suas misturas) (TACHIBANA e OHNISHI, 2001; MATTHIJS et al., 2006<sup>2</sup>). Esse modo de eluição é um ponto atrativo para separações em escala preparativa e é considerado com um modo alternativo para separações quirais (BONATO et al., 2005).

#### **1.4. MICROTÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS**

As amostras biológicas - plasma, soro, sangue total, urina e meios de cultura - são caracterizadas como matrizes complexas, pois, além de conterem o analito propriamente dito, apresentam em sua composição uma grande variedade de compostos orgânicos - proteínas, sais, ácidos, bases e outros - que podem interferir na eficiência da extração do analito (QUEIROZ e LANÇAS, 2005; DE OLIVEIRA et al., 2008; BOCATO, 2012).

Dessa forma, um fator crítico na análise dessas matrizes diz respeito a uma preparação prévia da amostra, por meio do emprego de técnicas eficazes de extração e isolamento dos analitos de interesse (QUEIROZ e LANÇAS, 2005; REZAEI et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2008; OJEDA e ROJAS, 2009; REZAEI et al., 2010; ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011; BOCATO, 2012); ou seja, o pré-tratamento da amostra é a primeira etapa, e possivelmente a mais importante na análise (ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011).

A justificativa para tal etapa fundamenta-se nos seguintes aspectos, conforme destacado por QUEIROZ et al. (2001) e DE OLIVEIRA et al. (2008): i) necessidade de eliminar possíveis interferentes das amostras, como as proteínas, uma vez que as mesmas podem prejudicar o processo cromatográfico ou eletroforético e ii) concentrar o analito de interesse, que muitas vezes encontra-se no nível de traço.

Diversas técnicas de preparação de amostras podem ser empregadas, entre essas, destacam-se: i) a extração líquido-líquido (LLE) e ii) a extração em fase sólida (SPE). Contudo, essas técnicas apresentam como principal desvantagem o alto consumo de solvente orgânico durante o preparo da amostra. Dessa forma, na tentativa de diminuir o consumo de solventes orgânicos, diversas técnicas miniaturizadas de preparação de amostras vêm sendo desenvolvidas, como por exemplo: a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME); a microextração em fase sólida (SPME), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), a microextração sortiva em barras de agitação (SBSE) e outras (DE OLIVEIRA et al., 2008; BOCATO, 2012).

Estas microtécnicas de extração, além de serem altamente seletivas, são compatíveis com a maioria dos sistemas de análise e algumas, passíveis de automação (por exemplo, SPME e HF-LPME). Nessas técnicas empregam-se quantidades mínimas de solventes orgânicos, contribuindo assim para a baixa geração de resíduos químicos (WILLE e LAMBERT, 2007; DE OLIVEIRA et al., 2008; VUCKOVIC et al., 2010<sup>1</sup>; VUCKOVIC et al., 2010<sup>2</sup>; BOCATO, 2012).

Dentre as citadas acima, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME – *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas hidrofóbicas ocas (HF-LPME – *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*) vêm se destacando. E nesse projeto, com o objetivo de empregar uma técnica com mínima geração de resíduo químico, ambas as técnicas foram avaliadas com fins comparativos para a preparação de amostras.

#### **1.4.1. DLLME**

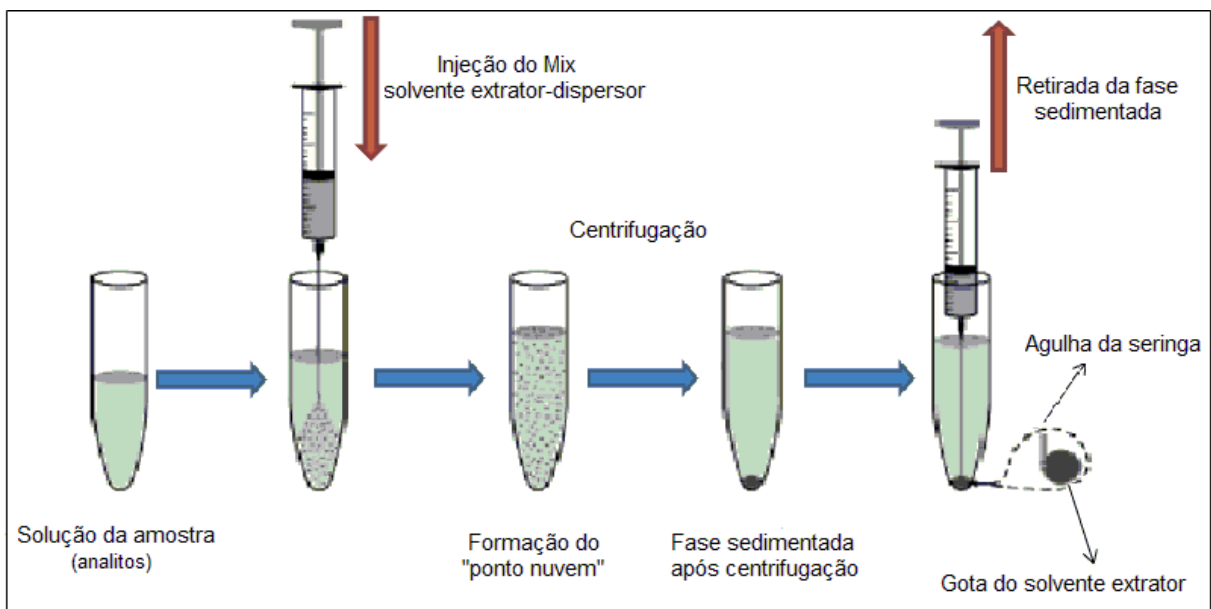
A DLLME é uma técnica rápida, barata, simples, com um alto fator de enriquecimento, baixo consumo de amostra e, que tem se tornado um método de preparo de amostra muito popular e muito atraente do ponto de vista ambiental (REZAEI et al., 2006; EBRAHIMZADEH et al., 2009; OJEDA e ROJAS, 2009; ZANG et al., 2009; REZAEI et al., 2010; ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011; KOKOSA, 2013).

Desenvolvida por Rezaei e colaboradores em 2006, a DLLME é a miniaturização da extração líquido-líquido (LLE), que tem como princípio o equilíbrio

do processo de distribuição do analito entre a solução da amostra e o solvente extrator com o auxílio de um solvente dispersor (ZANG et al., 2009; REZAEI et al., 2010; ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011).

Esta é uma microtécnica de extração aplicável para analitos de alta ou moderada lipofilicidade ( $K > 500$ ), sendo que o coeficiente de distribuição ( $K_D$ ) é definido como a razão entre a concentração do analito no solvente extrator e na solução aquosa. Com relação à analitos com características ácidos ou básicas, o coeficiente de distribuição pode ser aumentado através do controle do valor do pH da solução da amostra, fazendo com que estes analitos se encontrem no estado não ionizado (ZANG et al., 2009; FORTES, 2013).

A **Figura 5** esquematiza as etapas da extração envolvidas nesta técnica. Elas compreendem: i) aplicação da amostra no tubo de ensaio de vidro com fundo cônico; ii) injeção rápida da mistura apropriada de solvente extrator e dispersor na solução aquosa que contém o analito de interesse; iii) formação do ponto nuvem; iv) centrifugação da mistura e v) sedimentação do solvente contendo os analitos de interesse e retirada desse sedimento para posterior análise (EBRAHIMZADEH et al., 2009; ZANG et al., 2009; REZAEI et al., 2010).



**Figura 5.** Esquema de extração DLLME. Adaptado de ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011.

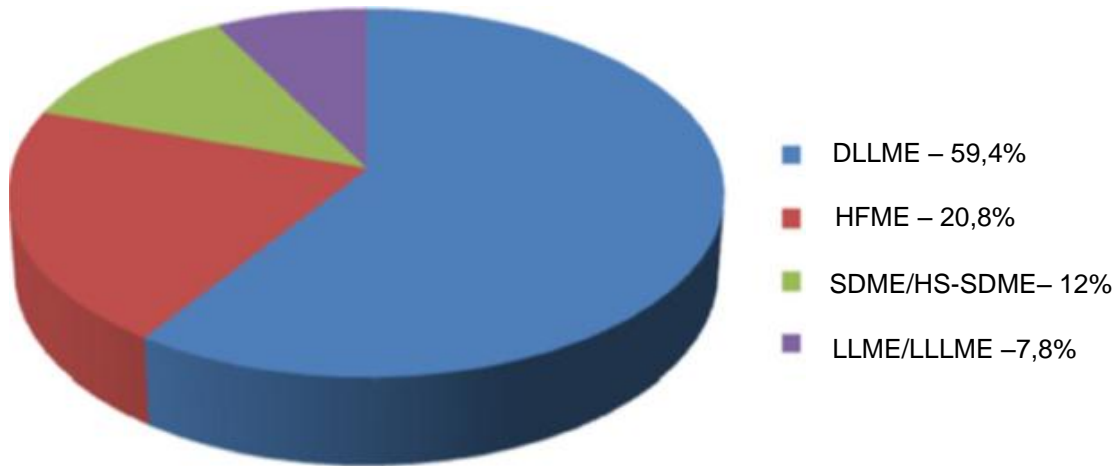
Vale destacar que a turbulência (ponto nuvem), produzida pela injeção rápida da mistura de solventes na fase aquosa contendo o analito, permite a formação de pequenas gotículas (aumento considerável da área de superfície), que rapidamente atingem o estado de equilíbrio e conferem a esta técnica a sua principal vantagem: tempo de extração muito curto, ou seja, a extração é tempo-independente (REZAEI et al., 2006; EBRAHIMZADEH et al., 2009; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011).

Com relação aos solventes empregados, o solvente extrator deve possuir algumas características, como: ser imiscível em água, possuir densidade maior que a água, ser facilmente volatilizável, ter capacidade de extração do composto de interesse e uma boa compatibilidade com o sistema cromatográfico. Os solventes usualmente selecionados como extratores são: clorofórmio, tetracloreto de carbono, diclorometano, clorobenzeno e dicloroetano (REZAEI et al., 2010; ANDRUCH et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2012).

Já o solvente dispersor, deve possuir uma boa miscibilidade tanto na fase extratora, como na fase aquosa e também ser facilmente volatilizável (REZAEI et al., 2006; OJEDA e ROJAS, 2009; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011; ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011). Os solventes usualmente selecionados como dispersores são: acetonitrila, acetona, isopropanol, metanol e etanol. Porém, a escolha do solvente extrator é o parâmetro mais importante neste tipo de extração (REZAEI et al., 2006; OJEDA e ROJAS, 2009; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011).

Na DLLME, os fatores que afetam a eficiência da extração são: i) tipo de solvente extrator, ii) tipo de solvente dispersor, iii) volume do solvente extrator, iv) volume do solvente dispersor, v) tempo de extração, vi) agitação da amostra e vii) pH (REZAEI et al., 2006; OJEDA e ROJAS, 2009; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011; ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011). Dessa forma, esses fatores devem ser otimizados durante o desenvolvimento da metodologia analítica.

Dentre as várias técnicas miniaturizadas de preparação de amostras, a DLLME rapidamente destacou-se e está relatada em um grande número de publicações em artigos e revisões, conforme **Figura 6** (KOCUROVÁ et al., 2012; FORTES, 2013).



**Figura 6.** Frequência de artigos publicados com as principais técnicas de microextração por solventes, entre 2010 e 2012. DLLME - microextração líquido-líquido dispersiva, HFME - microextração com fibra oca, SDME/HS-SDME - microextração em gota suspensa, LLME/LLLME - microextração líquido-líquido / microextração líquido-líquido-líquido. Adaptado de KOCUROVÁ et al., 2012.

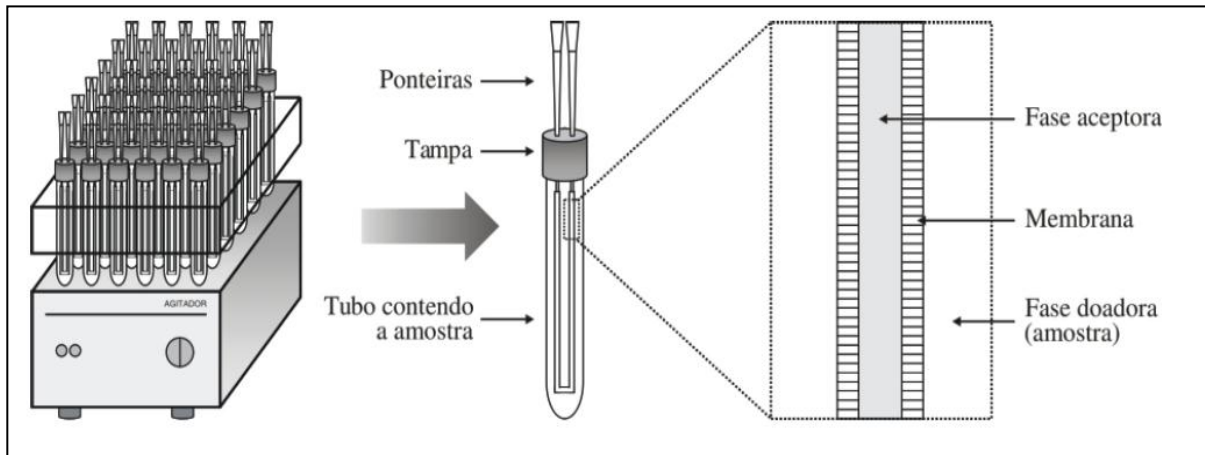
#### 1.4.2. HF-LPME

Introduzida em 1999 por Pedersen-Bjegaard e Rasmussen, a HF-LPME (ou microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas) pode ser considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes, unindo conceitos de extração com membranas e a extração líquido-líquido (PEDERSEN-BJEGAARD e RASMUSSEN, 1999; BARTH, 2012).

A HF-LPME é uma técnica que utiliza uma membrana capilar, cilíndrica, oca, de polipropileno (mais comum), de aspecto poroso e de natureza hidrofóbica. Nessa técnica, os poros da membrana são impregnados com um solvente orgânico hidrofóbico e o interior da mesma (lúmen) é preenchido com microlitros de uma fase acceptora (PEDERSEN-BJEGAARD e RASMUSSEN, 1999; PSILLAKIS e KALOGERAKIS, 2003; DE OLIVEIRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009).

Ponteiras ou microsseringas são conectadas às extremidades da membrana, com o objetivo de injetar e retirar a fase acceptora do sistema. A membrana, por atuar como uma barreira entre as fases doadora (amostra) e acceptora permite que seja realizada agitação, sem prejuízo da fase acceptora (**Figura 7**). Portanto, nessa técnica, os analitos presentes na fase doadora passam através dos poros da membrana hidrofóbica e atingem a fase acceptora. Nessa fase os analitos são concentrados e as proteínas e outros interferentes são impedidos de atingirem essa

fase. Após um período pré-definido, a fase aceitadora é coletada e então analisada (DE OLIVEIRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009).



**Figura 7.** Esquema de HF-LPME (MAGALHÃES et al., 2009).

Dentre as vantagens desta técnica, destacam-se: i) baixo custo por unidade de extração, ii) baixo consumo de solvente orgânico, iii) compatibilidade com uma grande variedade de amostras biológicas, iv) fornece recuperações de média a elevada, v) alto enriquecimento dos analitos e vi) simplicidade. Devido ao baixo custo das membranas, nessa técnica é possível a troca da membrana após cada extração (evita problemas de efeito memória) e o processamento das amostras em paralelo pode ser realizado, acarretando em uma redução no tempo total de análise (PEDERSEN-BJEGAARD e RASMUSSEN, 1999; PSILLAKIS e KALOGERAKIS, 2003; DE OLIVEIRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009; BARTH, 2012).

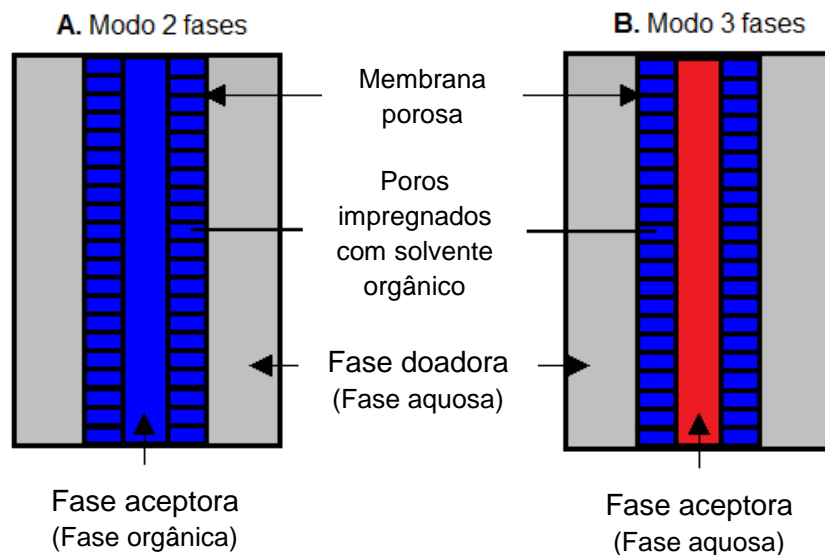
Existem 2 modos de extração na HF-LPME: o modo de duas ou três fases (**Figura 8**), o qual é selecionado de acordo com as características físico-química do analito de interesse. No modo duas fases, o analito é extraído da fase doadora (amostra aquosa) para a fase aceitadora (solvente orgânico) através desse solvente (imiscível em água) que está imobilizado nos poros da membrana e também presente no lúmen da mesma (PSILLAKIS e KALOGERAKIS, 2003; BARTH, 2012). Já no modo três fases, o analito é extraído a partir de uma solução aquosa (fase doadora) através do solvente orgânico que está imobilizado nos poros da membrana (fase orgânica) para uma solução aquosa (fase aceitadora) presente no lúmen da membrana que possui um pH oposto ao da fase doadora. Ou seja, esse modo de extração é útil para analitos com caráter ácido ou básico. Neste modo, a fase



orgânica impregnada nos poros da membrana funciona como uma barreira, não permitindo que as fases doadora e aceptora (ambas aquosas) se misturem (PSILLAKIS e KALOGERAKIS, 2003; BARTH, 2012).

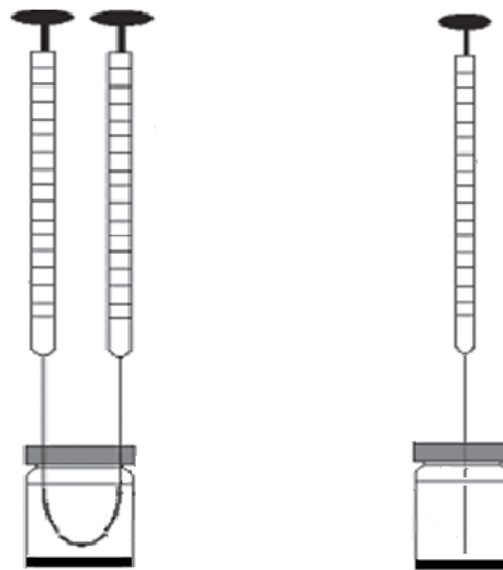
Para ambos os modos, o pH da fase doadora deve ser ajustado, de forma a manter o analito na sua forma não ionizada enquanto estiver na fase doadora (para permitir a extração) (PSILLAKIS e KALOGERAKIS, 2003; BARTH, 2012).

Alguns parâmetros devem ser otimizados durante o desenvolvimento do método por HF-LPME, tais como: pH da fase doadora (amostra aquosa), tipo de solvente orgânico, composição e concentração da fase aceptora, tempo de extração e força iônica da amostra (“*salting out*”) (PSILLAKIS e KALOGERAKIS, 2003; BARTH, 2012).



**Figura 8.** Esquema dos modos de extração na HF-LPME. Adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2008.

Além disso, a HF-LPME pode ser executada em duas configurações principais: configuração em “U” (mais empregada) que utiliza duas microseringas (ou ponteiras) conectadas a membrana e configuração tipo “haste” (“rod like”), que utiliza somente uma microseringa tanto para injetar como para coletar a fase aceptora (**Figura 9**) (DE OLIVEIRA et al., 2008; BARTH, 2012).



A. Configuração em "U"

B. Configuração tipo "haste"

**Figura 9.** Esquema das configurações para HF-LPME. Adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2008.

### 1.5. BIOTRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR FUNGOS

A biotransformação e a biocatálise são ferramentas muito importantes na área de síntese orgânica, especialmente no que se refere à produção de metabólitos de alguns xenobióticos, bem como para a síntese de moléculas quirais e também produtos aquirais (OUARRADI et al., 2010).

O processo de biotransformação por micro-organismos constitui uma alternativa muito importante como modelo para o estudo do metabolismo de medicamentos e são empregados em processos sintéticos industriais com propósitos farmacêuticos (COSTA et al., 2008). Algumas indústrias, como BASF, DSM, Eli Lilly, Bristol-Myers Squibb e Yamasa, além de terem inserido a biocatálise na sua linha de produção, têm investido no desenvolvimento desta importante ferramenta de obtenção de produtos químicos (DE OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009).

“Na medicina, o propósito do emprego de micro-organismos para gerar novos fármacos é fascinante e baseia-se na capacidade dos micro-organismos em metabolizar fármacos similarmente ao sistema dos mamíferos como, por exemplo, reproduzir a ação de enzimas do citocromo P450 e, assim, produzir metabólitos semelhantes ao encontrado em mamíferos e que muitas vezes apresentam atividade

farmacológica. Além disso, a assimetria desse meio é favorável à biotransformação estereosseletiva de substratos, levando a possibilidade de produção de metabólitos na sua forma enantiomericamente pura” (ASHA e VIDYAVATHI, 2009; BOCATO, 2012).

O uso de micro-organismos fornece muitas vantagens, dentre elas: simplicidade, facilidade, baixo custo e possibilidade de isolamento de novos compostos químicos (ASHA e VIDYAVATHI, 2009). Porém, uma das maiores vantagens da utilização de sistemas empregando micro-organismos é que o processo biotecnológico é dirigido por enzimas, que por serem enantiosseletivas e régio específicas, em função de sua natureza quiral, diferenciam-se da síntese química convencional (JUNIOR e PASTORE, 2007). Neste contexto, as reações enzimáticas ocupam uma posição de merecido destaque, já que as enzimas têm a capacidade de atuar em temperaturas mais amenas, em condições neutras e aquosas, e permitem um elevado número de ciclos catalíticos. Ainda, muitas delas conseguem realizar processos de catálise de substratos em produtos que dificilmente são obtidos pela síntese química convencional (DE OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009)

### **1.5.1. A enantiosseletividade e a biotransformação por fungos**

Diversos micro-organismos com potencial para biotransformação têm sido encontrados por meio de "screenings", e os fungos, são particularmente interessantes por permitir enantiosseletividade ao processo (COSTA et al., 2008).

Algumas espécies do gênero *Cunninghamella* são exemplo de fungos filamentosos capazes de metabolizar uma grande variedade de xenobióticos de maneira enantiosseletiva, semelhante ao que ocorre nos sistemas dos mamíferos (DAVIS, 1988; COSTA et al., 2008; BOCATO, 2012).

Os fungos endofíticos representam outra classe de fungos promissores neste ramo, principalmente por serem pouco explorados e presentes em grande abundância no Brasil. Possuem essa denominação (endofíticos), pois se encontram presentes em plantas, em várias partes dela, vivendo em situação de mutualismo (MACIÁ-VICENTE et al., 2008; BOCATO, 2012).

Conforme resultados apresentados pelo nosso grupo de pesquisa, DE JESUS

et al. (2011) realizaram um estudo em que o fungo *Mucor rouxii* foi capaz de metabolizar o fármaco risperidona em seu metabólito ativo 9-hidroxisperidona (9-RispOH) enantiosseletivamente. CARRÃO et al. (2011) desenvolveram um método para a determinação do metabólito ativo albendazol sulfóxido (ricobendazol), que foi obtido pela biotransformação enantiosseletiva realizada pelo fungo endofítico *Penicillium crustosum* VR4, a partir do fármaco albendazol; BOCATO et al. (2012) realizaram um estudo em que o fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A foi capaz de biotransformar enantiosseletivamente a risperidona nos seus metabólitos, (+)-9-RispOH e (-)-9-RispOH. Além disso, existem diversos outros estudos mostrando a capacidade de fungos em metabolizar enantiosseletivamente diversos substratos com diferentes propriedades físico-químicas, conforme apresentado na **Tabela 3** (BORGES et al., 2011; BARTH et al., 2012; BARTH et al., 2010; HILÁRIO et al., 2012).

**Tabela 3.** Estudos de biotransformação enantiosseletiva com fungos.

Analito	Metabólito	Fungo	Referência
<b>Donepezila</b>	5-O-desmetil donepezila (5-ODD) e, 6-O-desmetil donepezila (6-ODD)	<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 e <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 10028B	BARTH et al., 2012
<b>Risperidona</b>	(+)-9-RispOH e (-)-9-RispOH	<i>Cunninghamella echinulata</i> var. <i>elegans</i> ATCC 8688A	BOCATO et al., 2012
<b>Albendazol</b>	Albendazol sulfóxido	<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason SS67, <i>Pestalotiopsis foedans</i> VR8, <i>Papulaspora immersa</i> Hotson SS13	HILÁRIO et al., 2012
<b>Omeprazol</b>	5-Hidroxiomeprazol e Omeprazol sulfona	<i>Chaetomium globosum</i> VR10, <i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason SS67	BORGES et al., 2011
<b>Albendazol</b>	Albendazol sulfóxido	<i>Penicillium crustosum</i> VR4	CARRÃO et al., 2011
<b>Risperidona</b>	9-hidroxisperidona	<i>Mucor rouxii</i>	DE JESUS et al., 2011
<b>Midodrina</b>	(-)-Desglímidodrina e (+)-Desglímidodrina	<i>Phomopsis</i> sp. TD2	BARTH et al., 2010

Com relação à biotransformação da terfenadina, há relatos na literatura de que alguns micro-organismos foram potencialmente capazes de catalisar a oxidação multi etapas da terfenadina e seus análogos. MAZIER et al. (2004) e MAZIER et al. (2007) observaram que as peptonas de soja, em meio de cultura contendo a bactéria *Streptomyces platensis*, foram capazes de induzir uma atividade oxidativa na biotransformação da terfenadina em fexofenadina; também relataram que o fungo *Absidia corymbifera* é bastante promissor neste processo. OUARRADI et al. (2010) verificaram que a bactéria *Streptomyces platensis*, em meio de cultura enriquecido com peptonas de soja conseguiu transformar a terfenadina (fármaco precursor) em fexofenadina (metabólito ativo), por meio de 3 etapas de oxidação - hidroxilação do grupo metila, seguida pela oxidação do álcool correspondente no aldeído e, finalmente, a oxidação do aldeído em ácido carboxílico. Contudo, nenhum desses trabalhos refere-se ao estudo de biotransformação enantiosseletiva da terfenadina por fungos, como este propõe.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo desse projeto é avaliar a capacidade de fungos em biotransformar enantiosseletivamente a terfenadina em seu metabólito ativo, a fexofenadina.

Para isso, foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- I. Desenvolvimento de um método cromatográfico para análise enantiosseletiva da fexofenadina por CLAE;
- II. Desenvolvimento e otimização das microtécnicas de preparação de amostra – DLLME e HF-LPME, para extração da fexofenadina do meio de cultura;
- III. Estudo de biotransformação empregando os fungos: *Chaetomium globosum* VR10, *Aspergillus fumigatus* VR12, *Glomerella cingulata* VA1, *Papulaspora immersa* Hotson SS13, *Penicillium crustosum* VR4, *Mucor rouxii*, *Nigrospora sphaerica* SS67, *Fusarium oxysporum* SS50, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B;
- IV. Validação do método para análise da fexofenadina em meio de cultura;
- V. Aplicação do método validado em estudos de biotransformação enantiosseletiva com fungos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. Reagentes e Solventes

###### 3.1.1.1. Separação cromatográfica

Na etapa de separação cromatográfica, os seguintes solventes orgânicos foram avaliados (grau cromatografia): acetonitrila, etanol e metanol, do fabricante J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Os aditivos empregados na fase móvel foram: ácido acético e ácido trifluoracético de Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), trietilamina e dietilamina do J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), todos grau cromatografia. A água utilizada na preparação da fase móvel foi purificada pelo sistema Milli-Q Plus da Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA).

###### 3.1.1.2. Técnicas miniaturizadas de preparação de amostras

Na técnica de extração DLLME e HF-LPME, os solventes avaliados foram (grau cromatografia e grau P.A): clorofórmio, metanol, etanol, isopropanol (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), tetracloreto de carbono (Synth, Diadema, SP, Brasil), diclorometano (Macron Chemicals, Phillipsburg, EUA), acetona (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), acetonitrila (Panreac, Barcelona, Espanha), n-octanol (St. Louis, MO, EUA), éter diexílico, éter dibutílico (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e tolueno (F. Maia, Cotia, SP, Brasil). O reagente empregado para a preparação da solução de fosfato de sódio foi fosfato de sódio monobásico anidro (Synth, Diadema, SP, Brasil); cloreto de sódio (J.T. Baker, Edo de México, México) foi empregado para avaliar o efeito “*salting out*”. Ácido clorídrico (Cinética, Londrina, PR, Brasil) e ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram empregados na constituição da fase aceptora da HF-LPME.

### 3.1.1.3. Estudo de biotransformação

Na preparação dos meios de cultura foram empregados os seguintes reagentes: ágar dextrose batata, triptona, extrato de levedura, extrato de malte (Lansing, MI, EUA) e dextrose (Diadema, SP, Brasil). Sacarose, nitrato de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil), fosfato de potássio dibásico (J.T.Baker, Edo de México, México), sulfato de magnésio heptaidratado (Mallinckrodt Chemicals, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão), cloreto de potássio (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, MO, USA), sulfato de ferro heptaidratado da Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

## 3.1.2. Equipamentos e Acessórios

### 3.1.2.1. Sistema cromatográfico

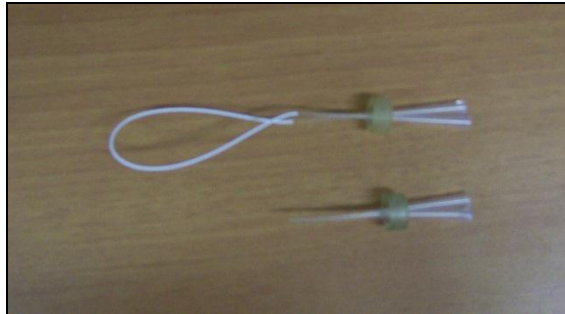
O sistema cromatográfico usado foi um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de bomba LC-20AT, degaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, injetor com amostrador de 50 µL SIL-10AF, um detector de arranjo de diodo SPD-M20A operando no intervalo entre 190 a 800 nm, uma controladora CBM-20A, e forno para coluna modelo CTO-20A. As injeções foram realizadas automaticamente. O programa empregado na aquisição dos dados foi o Software LC solution também da Shimadzu (Kyoto, Japão).

### 3.1.2.2. Equipamentos e materiais utilizados na DLLME e HF-LPME

O peagômetro utilizado nas aferições de pH da solução de fosfato de sódio foi o Quimis, modelo Q400AS (Diadema, SP, Brasil). Um sistema de purificação de água, Milli-Q Plus da Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA) forneceu água do tipo I. Foi utilizado também um agitador de tubos tipo vórtex da marca Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil) para a homogeneização das amostras. Para a centrifugação, uma centrífuga da marca Hitachi (Tóquio, Japão), modelo CF16RXII foi empregada. Para o processo de microextração líquido-líquido dispersiva foi utilizada uma microseringa com capacidade para 1000 µL, da marca Hamilton, modelo 1001 LTN (Reno, NV, EUA).



Para o processo de HF-LPME foi utilizado um agitador orbital compacto VXR Basic da marca IKA (Staufen, EUA) e microponteiras da marca Sorenson Bioscience (Salt Lake City, UT, EUA) com 0,57 mm de diâmetro externo e 83 mm de comprimento. As extrações foram feitas empregando uma fibra de polipropileno cilíndrica oca de 15 cm de comprimento com um diâmetro interno de 600  $\mu\text{m}$ , espessura de 200  $\mu\text{m}$  e poros de 0,2  $\mu\text{m}$  (Q3/2 Accurel PP, Membrana, Wuppertal, Alemanha) (**Figura 10**). Foi utilizada também uma microsseringa com capacidade para 50  $\mu\text{L}$  da marca Hamilton, modelo 702SNR (Reno, NV, EUA) para retirada da fase aceptora.



**Figura 10.** Foto mostrando fibra de polipropileno cilíndrica oca, com as microponteiras da marca Sorenson Bioscience (EUA).

### 3.1.2.3. Equipamento empregados nos estudos de biotransformação

No estudo de biotransformação foi utilizada uma capela de fluxo laminar vertical da marca Pachane, modelo PCR T2 Eco (Piracicaba, SP, Brasil) uma estufa bacteriológica da marca Solab, modelo SL 101 (Piracicaba, SP, Brasil), uma incubadora refrigerada tipo “*shaker*” de bancada da marca Cientec, modelo CT 712RN (Piracicaba, SP, Brasil) e uma autoclave vertical Phoenix<sup>®</sup> modelo AV 75 (Araraquara, SP, Brasil).

### 3.1.3. Colunas quirais e coluna de guarda

As colunas quirais avaliadas na resolução da FEX foram:

- 1) Chiralcel<sup>®</sup> OD-H (4,6 mm x 15 cm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- 2) Chiralcel<sup>®</sup> OJ (4,6 mm x 25 cm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado de celulose tris (4-metilbenzoato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.
- 3) Chiralpak<sup>®</sup> AS (4,6 mm x 25 cm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado de amilose tris [(S)-1-feniletilcarbamato] recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.
- 4) Chiralpak<sup>®</sup> AD (4,6 mm x 25 cm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.
- 5) Chiralpak<sup>®</sup> AD-RH (4,6 mm x 15 cm, Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- 6) Chirobiotic<sup>®</sup> V (4,6 mm x 15 cm, Astec, Advanced Separation Technologies Inc., Whippany, NJ, EUA) constituída de vancomicina ligada a partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- 7) Lux<sup>®</sup> cellulose-2 (150 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA) constituída pelo derivado de celulose tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- 8) Lux<sup>®</sup> cellulose-1 (150 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA) constituída pelo derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

Acoplada às colunas quirais foi utilizada uma coluna de guarda C18 da marca Agilent (4,6 mm x 12,5 mm, Santa Clara, CA, EUA), constituída de partículas de 5 µm de diâmetro de sílica modificada com grupos octadecil.

#### **3.1.4. Soluções padrão da Terfenadina, Fexofenadina e Padrão interno**

A terfenadina foi obtida da TRC (Toronto Research Chemicals Inc., Toronto, Canadá), enquanto que o seu metabólito, a fexofenadina (FEX), foi obtido da United Standard Pharmacopeia (Rockville, MD, EUA). Soluções foram preparadas, separadamente, em metanol, nas concentrações de 1 mg mL<sup>-1</sup> para a terfenadina e 0,1 mg mL<sup>-1</sup> para a fexofenadina. As duas soluções foram armazenadas em frascos âmbar, recobertas por papel alumínio e estocadas a -20°C. Essas soluções foram utilizadas na otimização das condições da separação cromatográfica, bem como na otimização das duas microtécnicas de extração.

Como não foi possível a separação da terfenadina nas condições de análise, conforme será descrito na seção 4.1.3.1., apenas soluções da fexofenadina foram preparadas para a sequência dos estudos.

As soluções do metabólito (FEX) foram preparadas em metanol, no intervalo de concentrações de 4 µg mL<sup>-1</sup> a 30 µg mL<sup>-1</sup>, a partir de uma solução estoque na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Todas essas soluções foram utilizadas para a validação da metodologia analítica.

A risperidona, adquirido de Toronto Research Chemicals® (Toronto, Canadá) foi utilizada como padrão interno (P.I.). Para tanto, foi preparada uma solução em metanol na concentração de 70 µg mL<sup>-1</sup>, a partir de uma solução estoque de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram armazenadas em tubos “falcon” e estocadas a -20°C.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Preparação das Fases Móveis

Tanto no modo polar orgânico (avaliado inicialmente), como no modo fase reversa, os componentes da fase móvel (se ACN, EtOH, MeOH ou H<sub>2</sub>O) foram preparados por misturas simples, com posterior homogeneização. Os aditivos, como ácido acético e trietilamina, foram adicionados diretamente na fase móvel, com o objetivo de melhorar a simetria dos picos e a enantioseletividade e permitir, portanto, melhores separações e uma maior eficiência (MATTHIJS et al., 2006<sup>1</sup>; MATTHIJS et al., 2006<sup>2</sup>).

### 3.2.2. Preparo da solução de fosfato de sódio

A solução de fosfato de sódio empregada para o processo de microextração foi preparada na concentração desejada e o pH foi ajustado com adição de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

### 3.2.3. Avaliação da separação quiral por CLAE

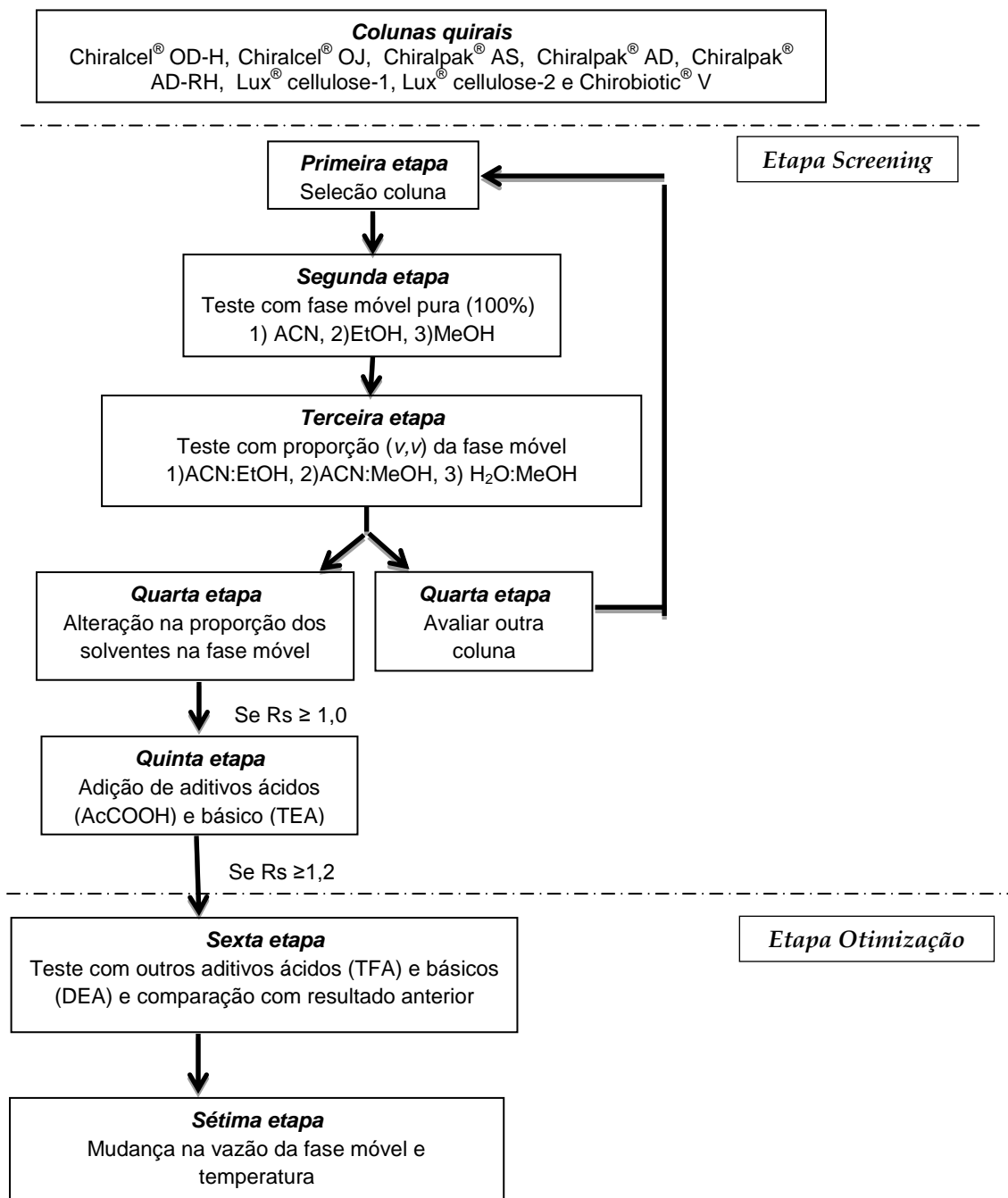
O parâmetro cromatográfico avaliado para determinação das condições de separação foi a resolução ( $R_s$ ), que pode ser calculada segundo a **Equação 1** (SNYDER et al., 2010).

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (1)$$

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

A vazão foi ajustada conforme a viscosidade da fase móvel a fim de que a pressão máxima permitida para cada tipo de coluna fosse respeitada. As análises foram efetuadas a 21 ( $\pm 2$ ) °C.

A **Figura 11** mostra um fluxograma empregado na otimização da separação quiral da FEX.



**Figura 11.** Representação esquemática das etapas de *Screening* e otimização.

### 3.3. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DOS ANALITOS EM MEIO DE CULTURA EMPREGANDO A DLLME E HF-LPME

#### 3.3.1. DLLME

Para otimização da DLLME, as análises foram realizadas fortificando-se 1 mL de meio de cultura líquido Czapek com 50 µL das soluções-padrão de FEX na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup>. Em paralelo, 1 mL de meio de cultura líquido isento do fármaco também foi processado sob as mesmas condições de análise, para verificar a presença de interferentes da matriz.

Os parâmetros avaliados na DLLME foram: i) tipo de solvente extrator (clorofórmio, diclorometano, dicloroetano e tetracloreto de carbono), ii) tipo de solvente dispersor (etanol, metanol, isopropanol, acetona e acetonitrila), iii) volume do solvente extrator (100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL e 600 µL cada), iv) volume do solvente dispersor (100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL e 600 µL cada), v) DLLME assistida: a) sem vórtex, b) com 15 segundos no vórtex, c) com 30 segundos no vórtex e d) com 30 segundos no vórtex seguido de 5 minutos de ultrassom, vi) pH da amostra (pH 4,5; 5,0 e 5,5) e vii) efeito “*salting-out*” (0%, 2%, 4%, 6% e 8% NaCl). Após extração, o extrato foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e posteriormente ressuspendido em 200 µL da fase móvel e então injetado no sistema cromatográfico.

Cada um dos testes foi realizado em quintuplicata. Os dados obtidos foram tratados no programa GraphPrism versão 5.0, relacionando a área dos picos *versus* o parâmetro avaliado.

### 3.3.2. HF-LPME

Além da técnica de extração descrita acima, outra microtécnica também foi avaliada para fins comparativos – a HF-LPME, no modo 3 fases (DE OLIVEIRA et al., 2008), por ser o modo mais apropriado de acordo com as características físico-químicas do analito.

Para otimização da HF-LPME, as análises foram realizadas fortificando-se 1 mL de meio de cultura líquido Czapek com 50 µL das soluções-padrão de FEX na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Em paralelo, 1 mL de meio de cultura líquido isento do fármaco também foi processado sob as mesmas condições de análise, para verificar a presença de interferentes da matriz

Os parâmetros avaliados foram: i) tipo de solvente orgânico (éter diexílico, n-octanol, tolueno e éter dibutílico), ii) tempo de extração (10, 30, 50, 70 e 90 minutos), iii) efeito “*salting-out*” (0%, 10%, 20% e 30% NaCl) e iv) composição da fase aceptora (HCl e AcCOOH 25 mM, 50 mM e 100 mM, cada). Cada teste foi realizado em quintuplicata. Após extração, o extrato foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e posteriormente ressuspendido em 200 µL da fase móvel e então injetado no sistema cromatográfico.

Os dados obtidos foram tratados no programa GraphPrism versão 5.0, relacionando a área dos picos *versus* o parâmetro avaliado.

## 3.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

### 3.4.1. Soluções-padrão empregadas na validação do método

As soluções-padrão de fexofenadina utilizadas na validação do método cromatográfico foram preparadas em metanol, nas concentrações de 4 µg mL<sup>-1</sup>, 7,5 µg mL<sup>-1</sup>, 12 µg mL<sup>-1</sup>, 16 µg mL<sup>-1</sup>, 24 µg mL<sup>-1</sup> e 30 µg mL<sup>-1</sup>, representando os 6 pontos da curva analítica. A risperidona, usada como padrão interno, foi preparada na concentração de 70 µg mL<sup>-1</sup>. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz.

### 3.4.2. Parâmetros avaliados na validação do método

Para análise de fármacos em fluidos biológicos, segundo recomendações de guias oficiais como ANVISA (2012), a validação do método deve constar da avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação, seletividade e estabilidade.

A padronização interna é frequentemente utilizada em análises cromatográficas, e, portanto, para a análise da fexofenadina em meio de cultura empregando a microtécnica de extração DLLME, a risperidona foi utilizada como padrão interno (P.I.).

### 3.4.3. Curva analítica e Linearidade

Na validação da metodologia analítica, a linearidade é o primeiro parâmetro a ser feito, e foi determinada pela análise de 6 soluções de diferentes concentrações ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para cada enantiômero), abrangendo a faixa de concentração de interesse de trabalho. Embora a otimização completa da DLLME tenha sido realizada em meio de cultura líquido Czapek, sabe-se que após a biotransformação, o meio contendo os fungos pode apresentar características diferentes quanto à viscosidade, devido à possível formação de metabólitos secundários e, portanto, afetar o processo de microextração líquido-líquido dispersiva. Assim, as curvas analíticas foram construídas em 2 tipos de matrizes diferentes: i) meio de cultura líquido Czapek e ii) uma associação de fungos (pool de fungos), que foi preparado na ausência dos analitos (descrito na seção 3.5.5).

A linearidade do método foi realizada em quintuplicata ( $n = 5$ ) e os resultados foram ponderados empregando o peso  $1/X$ . Duas curvas analíticas foram construídas, sendo que em cada uma delas, 1 mL do meio (se meio de cultura líquido Czapek ou pool de fungos) foi fortificado com 50  $\mu\text{L}$  de cada uma das 6 soluções-padrão de fexofenadina e com 50  $\mu\text{L}$  da risperidona (P.I.) na concentração de  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Esse parâmetro foi determinado pela avaliação do coeficiente de correlação ( $r$ ), pela falta de ajuste (*“lack of fit”*) e pela análise estatística de variância.



O programa estatístico MINITAB Release versão 14.1 (State College, PA, EUA) foi utilizado para os cálculos estatísticos. Além disso, a inclinação (*slope*) das diferentes curvas analíticas, preparadas em meio de cultura Czapek e pool de fungos foram analisadas e comparadas.

#### 3.4.3.1. Limite de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação é definido como a menor concentração de enantiômeros que pode ser quantificado com precisão (representado pelo desvio padrão relativo - RSD%) e com exatidão (representada pelo erro relativo – E%), inferiores a 20%, conforme recomendado pela ANVISA (2012).

O LIQ foi determinado fortificando 1 mL de meio de cultura líquido Czapek ( $n = 5$ ) com  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada enantiômero da FEX, e analisadas com base em uma curva analítica preparada simultaneamente.

#### 3.4.4. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise de meio de cultura líquido Czapek estéril e meio de cultura líquido Czapek estéril incubado com os fungos estudados na ausência da terfenadina.

#### 3.4.5. Recuperação

A recuperação é a medida da eficiência no processo de extração utilizado. A recuperação dos analitos no método DLLME foi avaliada empregando a **Equação 2**:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração calculada}}{\text{Concentração nominal}} \times 100 \quad (2)$$

A “concentração calculada” na equação acima é a concentração das amostras que foram submetidas ao processo de extração por DLLME e a “concentração nominal” corresponde aos dados resultantes da análise direta das mesmas soluções-padrão sem passar pelo processo de extração.

Na determinação da recuperação absoluta do procedimento de extração, alíquotas de 1 mL de meio de cultura líquido Czapek foram fortificadas com fexofenadina nas concentrações de 3,75 µg mL<sup>-1</sup> (CB), 8 µg mL<sup>-1</sup> (CM) e 12 µg mL<sup>-1</sup> (CA) para cada enantiômero ( $n = 3$ ) do metabólito e submetidas ao procedimento de DLLME. As áreas destas amostras foram comparadas com áreas obtidas por injeção direta de soluções-padrão, contendo a mesma quantidade de cada composto. A recuperação foi expressa como porcentagem (%) da quantidade extraída.

#### 3.4.6. Precisão e exatidão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade de várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. As medidas devem ser simultâneas (precisão intraensaios) e também efetuadas em dias diferentes (precisão interensaios). Esse parâmetro é avaliado pela estimativa do desvio padrão relativo (%RSD) de acordo com a **Equação 3**:

$$RSD\% = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100 \quad (3)$$

A exatidão é a diferença entre o valor nominal presente na amostra e o valor obtido na análise. É avaliada pelo afastamento entre os valores esperado e obtido (Erro Padrão Relativo, EPR), e pode ser representada pela **Equação 4**:

$$EPR = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100 \quad (4)$$

A precisão e exatidão intraensaio foram avaliadas analisando-se frações ( $n = 5$ ) de 1 mL de meio de cultura líquido Czapek, fortificadas nas concentrações de 3,75 µg mL<sup>-1</sup> (CB), 8 µg mL<sup>-1</sup> (CM) e 12 µg mL<sup>-1</sup> (CA) para análise de cada enantiômero da FEX. Neste experimento, todas as frações foram analisadas no mesmo dia.

A precisão e exatidão interensaio foram avaliadas fortificando amostras de 1 mL de meio de cultura líquido Czapek com fexofenadina nas mesmas concentrações descritas para análise intraensaio ( $n=5$ ) durante 3 dias consecutivos.

Os resultados obtidos foram expressos como coeficiente de variação percentual (CV%) para a determinação da precisão e como erro relativo (E%) para a determinação da exatidão do método.

### 3.4.7. Estabilidade

A estabilidade da fexofenadina no meio de cultura foi avaliada de três formas: i) estabilidade em ciclos de congelamento/descongelamento, ii) estabilidade em curto prazo (bancada) e iii) estabilidade de autoinjeter.

#### 3.4.7.1. Ciclo de congelamento e descongelamento

Para determinar a estabilidade das amostras sob ciclos de congelamento/descongelamento, três alíquotas ( $n = 3$ ) de amostras preparadas em 1 mL de meio de cultura líquido Czapek nas concentrações de  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$  (baixa) e  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  (alta) de cada enantiômero da fexofenadina foram armazenadas a temperatura de  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h e descongeladas após este período a temperatura ambiente. No momento em que estas amostras encontraram-se completamente descongeladas, as mesmas foram recongeladas a temperatura de  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12h. Este ciclo de congelamento/descongelamento foi repetido por mais duas vezes e ao final do terceiro ciclo as amostras foram analisadas. As amostras submetidas a este procedimento foram quantificadas empregando uma curva analítica recém-preparada. Foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram valores de erro relativo (E%) inferior a  $\pm 15\%$  e coeficiente de variação (CV%) inferiores a 15%.

#### 3.4.7.2. Bancada por 6 horas

Na determinação da estabilidade a temperatura ambiente por período de 6 h, três alíquotas ( $n = 3$ ) de amostras preparadas em 1 mL de meio de cultura líquido Czapek nas concentrações de  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$  (baixa) e  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  (alta) de cada enantiômero da fexofenadina foram mantidas a temperatura ambiente ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por 6 h. Após este período, as amostras foram analisadas. As amostras submetidas a este procedimento foram quantificadas empregando uma curva analítica recém-preparada. Foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram valores de erro relativo (E%) inferior a  $\pm 15\%$  e coeficiente de variação (CV%) inferiores a 15%.

#### 3.4.7.3. Autoinjeter por 24 horas

Para avaliar a estabilidade das amostras processadas e mantidas por 24 horas no autoinjeter, três alíquotas ( $n = 3$ ) foram preparadas em 1 mL de meio de cultura líquido Czapek nas concentrações de  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$  (baixa) e  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  (alta) de cada enantiômero da fexofenadina. Estas amostras foram extraídas e acondicionadas nos recipientes do autoinjeter a temperatura ambiente. Após 24 horas essas amostras foram analisadas. As amostras submetidas a este procedimento foram quantificadas empregando uma curva analítica recém-preparada. Foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram valores de erro relativo (E%) inferior a  $\pm 15\%$  e coeficiente de variação (CV%) inferiores a 15%.

### 3.5. ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

#### 3.5.1. Fungos

Conforme citado anteriormente, os fungos estudados foram: *Chaetomium globosum* VR10, *Aspergillus fumigatus* VR12, *Glomerella cingulata* VA1, *Papulaspora immersa* Hotson SS13, *Penicillium crustosum* VR4, *Mucor rouxii*, *Nigrospora sphaerica* SS67, *Fusarium oxysporum* SS50, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B.

Os fungos endofíticos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Mônica T. Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sendo que os fungos *Nigrospora sphaerica* SS67, *Papulaspora immersa* Hotson SS13 e *Fusarium oxysporum* SS50 foram previamente isolados como endofíticos da planta *Smallanthus sonchifolius* (GALLO et al., 2009); os fungos *Penicillium crustosum* VR4, *Chaetomium globosum* VR10 e *Aspergillus fumigatus* VR12 foram isolados de *Viguiera robusta*, enquanto que o fungo *Glomerella cingulata* VA1 foi isolado de *Viguiera arenaria*.

O fungo *Mucor rouxii* NRRL 1894 foi obtido como uma cortesia do Dr. C.W. Hesseltine (*Northern Utilization Research and Development Division*, ARS, USDA, Peoria, IL, EUA) e pertencente à coleção de culturas de fungos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os fungos *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B foram adquiridos da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, USA).

Os fungos foram cedidos na forma de “*plugs* de ágar” e, são mantidos em discos de meio BDA, com 0,5 cm de diâmetro, imersos em solução estéril de glicerol:água (8:2, v/v) a -20°C. Estão estocados no “Laboratório de Química de Micro-organismos”-FCFRP/USP, Brasil.

Os estudos de biotransformação com fungos baseiam-se em três etapas: i) incubação das espécies de fungos em meio sólido para seu crescimento em placa; ii) transferência de três “*plugs*” do fungo do meio sólido para um meio líquido rico em nutrientes (meio de malte) e iii) transferência da massa micelial formada na etapa anterior para um segundo meio líquido (Czapek) juntamente com o fármaco em estudo.

### **3.5.2. Preparo do meio de cultura BDA**

O meio de cultura Batata (Potato) Dextrose Ágar, BDA, é o meio sólido utilizado para a primeira etapa do crescimento dos fungos. Esse meio é composto de BDA na concentração de 39 g L<sup>-1</sup> e, após a pesagem, completa-se com quantidade necessária de água ultra-pura para tantos quantos forem o número de placas de Petri a serem utilizadas nesta primeira etapa. São necessários 15 mL de meio para

cada placa de Petri. Por fim, essa mistura é esterilizada em autoclave por cerca de 30 minutos para posterior distribuição do meio em cada placa.

### **3.5.3. Preparo do meio de cultura de malte**

O meio de cultura de malte é o meio líquido pré-fermentativo, utilizado na segunda etapa do estudo, momento em que os fungos crescem e ganham massa. O meio de malte é preparado fazendo-se uma mistura dos reagentes: extrato de malte, dextrose, triptona de soja e extrato de levedura nas concentrações de  $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  e  $3,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, e 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 de 7 que é corrigido para pH 6,2 utilizando-se ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, esse meio é também esterilizado em autoclave da mesma forma que para o meio BDA.

### **3.5.4. Preparo do meio de cultura líquido Czapek**

O meio de cultura Czapek é o meio utilizado na terceira etapa do processo, onde os fungos serão mantidos por determinado número de dias juntamente com o fármaco empregado no estudo de biotransformação. Foi também, o meio empregado para todo o processo de validação deste trabalho. O meio Czapek é preparado fazendo-se uma mistura em massa dos reagentes: sacarose,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$  e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nas porcentagens de 3%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,05% e 0,001%, respectivamente. 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 que deve ser corrigido para pH 5,0 utilizando-se  $\text{HCl}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Da mesma forma que para os outros meios de cultura, esta mistura é esterilizada em autoclave.

### 3.5.5. Preparo da matriz pool de fungos

Este meio de pool de fungos foi utilizado para verificar se havia efeito da matriz em etapas de otimização do procedimento de extração e na validação do método. É um meio que se faz uma mistura contendo mais de uma espécie de fungos cultivados sem adição do fármaco, e é preparado da mesma maneira que foi apresentado na terceira etapa do processo de biotransformação.

Os fungos constituintes do pool são *Mucor rouxii*, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A, *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B, *Papulaspora immersa* Hotson SS13 e *Fusarium oxysporum* SS50.

### 3.5.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

O teste de MIC foi realizado por microdiluição e os fungos avaliados foram *Mucor rouxii*, *Fusarium oxysporum* SS50, *Nigrospora sphaerica* SS67, *Papulaspora immersa* Hotson SS13, *Penicillium crustosum* VR4, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B, ou seja, apenas os fungos que cresceram na primeira etapa de biotransformação.

#### 3.5.6.1. Preparação da placa

Todo o material foi autoclavado; foi preparada uma solução do fármaco na concentração desejada ( $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) da seguinte maneira: foi pipetado  $560 \mu\text{L}$  de uma solução de TERF a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , colocado sob fluxo de ar comprimido e ressuspenso em  $700 \mu\text{L}$  de meio Czapek. Em seguida, foi adicionado  $100 \mu\text{L}$  de meio Czapek (M) em cada poço onde será feito o teste com o fármaco (posições na placa: 1A - F; 3A - F; 5A - F; 7A - F; 9A - F) e também nos poços onde será feito o controle de esterilidade do meio com o fármaco (posições na placa: 12A - E); foi pipetado  $180 \mu\text{L}$  de meio Czapek onde será feito o controle de crescimento do fungo sem o fármaco (posições na placa: 1G-H; 3G-H; 5G-H; 7GH; 9G-H).

Após, foi pipetado  $200 \mu\text{L}$  de meio Czapek no poço onde será feito o controle de esterilidade do meio (12G-H); foi colocado  $100 \mu\text{L}$  da solução do fármaco ( $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no poço 1A, foi misturado com a própria ponteira da micropipeta,

aspirando cinco vezes, e então foi coletado 100  $\mu$ L dessa mistura e colocada no poço 1B, para fazer a diluição pela metade, assim sucessivamente até o poço 1F.

Do poço 1F, foi coletado 100  $\mu$ L e colocado onde será feito o controle de esterilidade do meio com o fármaco 12A, sendo que cada coluna corresponde a cada um dos fungos avaliados. Os procedimentos descritos foram feitos também para as colunas 3, 5, 7 e 9, e também o controle de esterilidade na coluna 12 (1F→12A) (3F→12B) (5F→12C) (7F→12D) (9F→12E); foi adicionado 80  $\mu$ L de meio Czapek em cada poço onde será feito o teste do fármaco com o fungo (1A – F; 3A – F, 5A – F, 7A – F, 9A –F). Todas estas etapas estão representadas na **Tabela 4**.

#### 3.5.6.2. Preparação do inóculo

Com uma placa de Petri com o fungo crescido, foi adicionado bem lentamente 5 mL de meio Czapek autoclavado, raspou-se toda superfície do fungo com a ponteira e então foi coletado o máximo possível desse meio contaminado e transferido para outra placa de Petri.

Deste meio contaminado (I), foi colocado 20  $\mu$ L em cada poço onde será feito o teste (1A – F; 3A – F, 5A – F, 7A – F, 9A –F) e também nos poços de controle de crescimento do fungo (1G-H; 3G-H; 5G-H; 7G-H; 9G-H). A placa de MIC foi fechada, embrulhada com papel filme, foram feitos pequenos furos na parte inferior para oxigenação e a placa foi guardada na estufa a 30°C pelo mesmo tempo que será feito o estudo de biotransformação.



**Tabela 4.** Esquema do método de microdiluição em microplaca para cultura fúngica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL		100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL		100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL		100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL		100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL			100µL M + 100µL F1
<b>B</b>	100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL		100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL		100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL		100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL		100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL			100µL M + 100µL F3
<b>C</b>	100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL		100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL		100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL		100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL		100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL			100µL M + 100µL F5
<b>D</b>	100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL		100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL		100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL		100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL		100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL			100µL M + 100µL F7
<b>E</b>	100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL		100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL		100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL		100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL		100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL			100µL M + 100µL F9
<b>F</b>	100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL		100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL		100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL		100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL		100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL			
<b>G</b>	180µL M + 20µL I		180µL M + 20µL I		180µL M + 20µL I		180µL M + 20µL I		180µL M + 20µL I			200µL M
<b>H</b>	180µL M + 20µL I		180µL M + 20µL I		180µL M + 20µL I		180µL M + 20µL I		180µL M + 20µL I			200µL M
	MUCOR TERF		SS50 TERF		SS67 TERF		SS13 TERF		VR4 TERF			
	1	2	3	4	5	6	7	8		10	11	12
<b>A</b>	100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL		100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL		100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL		100µL M 100µL S + 80µL M 20µL I  200µg/mL					100µL M + 100µL F1

<b>B</b>	100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL	100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL	100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL	100µL M 100µL A1 + 80µL M 20µL I  100µg/mL					100µL M + 100µL F3
<b>C</b>	100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL	100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL	100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL	100µL M 100µL B1 + 80µL M 20µL I  50µg/mL					100µL M + 100µL F5
<b>D</b>	100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL	100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL	100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL	100µL M 100µL C1 + 80µL M 20µL I  25µg/mL					100µL M + 100µL F7
<b>E</b>	100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL	100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL	100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL	100µL M 100µL D1 + 80µL M 20µL I  12,5µg/mL					100µL M + 100µL F9
<b>F</b>	100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL	100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL	100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL	100µL M 100µL E1 + 80µL M 20µL I  6,25µg/mL					
<b>G</b>	180µL M + 20µL I	180µL M + 20µL I	180µL M + 20µL I	180µL M + 20µL I					200µL M
<b>H</b>	180µL M + 20µL I	180µL M + 20µL I	180µL M + 20µL I	180µL M + 20µL I					200µL M
	8688A TERF	8688A MONE	10028B TERF	10028B MONE					

M = Meio Czapek; S = Solução de TERF a 800 µg mL<sup>-1</sup>; I = Meio de cultura contendo o fungo

### 3.5.7. Procedimento de biotransformação da terfenadina

Os “*plugs*”, em ágar dos fungos cedidos, foram transferidos, em triplicata, para placas de Petri asséptica contendo o meio de cultura BDA com auxílio de uma alça de platina esterilizada, em capela de fluxo laminar.

Eles foram incubados a 30° C por 7 dias - *Chaetomium globosum* VR10, *Aspergillus fumigatus* VR12 e *Glomerella cingulata* VA1; por 5 dias - *Papulaspora immersa* Hotson SS13 e *Penicillium crustosum* VR4; e por 3 dias – fungos *Mucor rouxii*, *Nigrospora sphaerica* SS67, *Fusarium oxysporum* SS50, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B. Cada espécie de fungo foi cultivada em triplicata de forma a monitorar possíveis contaminações.

As placas de Petri foram vedadas com PVC e, então, colocadas em estufa, a uma temperatura de 30°C, de acordo com os dias necessários para que cada espécie de fungo crescesse uniformemente nas placas (conforme detalhado acima)

Em seguida, após o crescimento dos fungos sobre a placa, três discos (“*plugs*”) de 0,5 cm de diâmetro deste meio de cultura contendo os micélios foram retirados com o auxílio do tubo de transferência (Fischer®) (**Figura 12**) e inoculados assepticamente em 15 mL de meio pré-fermentativo de malte e colocados sob agitação no agitador orbital tipo “*shaker*” a 125 rpm a uma temperatura de 30° C por 5 dias para o crescimento dos fungos (**Figura 13**). Nessa etapa, quase todo o meio de malte foi consumido pelo micro-organismo.



**Figura 12.** Foto mostrando a transferências dos “plugs” do meio de cultura com o fungo para o meio de malte.



**Figura 13.** Foto mostrando a incubação dos fungos em meio de malte por 5 dias.

Na terceira etapa do procedimento, a massa micelial formada na etapa anterior foi transferida assepticamente, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, para 100 mL de meio fermentativo Czapek. Após a transferência dos fungos para este meio, foram adicionados 5 mg de terfenadina dissolvida no próprio meio Czapek em três replicatas (triplicata da amostra), enquanto que a quarta replicata foi mantida como “branco”, sem a presença do fármaco.

A incubação (30° C, 125 rpm) foi feita no agitador orbital tipo “*shaker*” (**Figura 14**) por 15 dias, e 5 coletas foram realizadas durante esse período, sendo elas: D0 (dia de troca dos fungos do meio de malte para o meio Czapek), D3 (terceiro dia), D6 (sexto dia), D10 (décimo dia) e D15 (último dia de incubação). Em cada um dos dias citados, foi coletada uma alíquota de 4 mL do fluido da cultura assepticamente e armazenado a -20° C até o momento da análise.

As alíquotas foram submetidas à extração e posteriormente analisadas. Durante todo procedimento foram realizados controles da seguinte forma: i) meio de cultura Czapek + fungo, sem a terfenadina, ii) meio de cultura Czapek com o fármaco, sem o fungo.



**Figura 14.** Foto mostrando a incubação dos fungos em meio Czapek por 15 dias.

Todo o procedimento foi realizado utilizando capela de fluxo laminar e para todas as espécies de fungos as etapas foram feitas da mesma forma e em triplicata. Os resultados positivos para a formação dos enantiômeros foram demonstrados em resultados e discussão e o excesso enantiomérico foi calculado pela **Equação 5**:

$$ee = \frac{(A - B)}{(A + B)} \times 100 \quad (5)$$

Onde, A é o enantiômero em maior concentração e B, o enantiômero em menor concentração.

### 3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ÓPTICA DOS ENANTIÔMEROS DA FEX POR DICROÍSMO CIRCULAR

O Dicroísmo Circular (DC) é uma técnica que mede a absorbância diferencial entre duas rotações de luz circularmente polarizada por uma molécula assimétrica (centro quiral), e este teste foi realizado após a otimização da condição de separação da FEX por CLAE.

Para tal, 50  $\mu\text{L}$  de FEX a  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi acrescentado em tubo de ensaio e colocado sob fluxo de ar comprimido, sendo que este procedimento foi repetido por mais nove vezes. Em seguida, a mistura racêmica da FEX foi ressuspensa na própria fase móvel e injetada nas condições cromatográficas estabelecidas por este projeto. Os eluatos correspondentes de cada enantiômero foram coletados separadamente e as frações obtidas ( $\sim 3 \text{ mL}$  de cada enantiômero) foram diretamente analisadas pelo DC.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO QUIRAL DA FEXOFENADINA POR CLAE

A proposta inicial do projeto era obter a separação dos enantiômeros da terfenadina e da fexofenadina nas mesmas condições cromatográficas, porém, o tempo de retenção da terfenadina, em todas as condições testadas, foi muito alto ( $\pm$  50 minutos).

Como o foco do estudo é determinar a presença da fexofenadina após biotransformação da terfenadina por fungos, a separação cromatográfica da terfenadina não será abordada, e, portanto, apenas serão descritos os experimentos realizados com o metabólito ativo.

Na otimização da separação quiral da fexofenadina por CLAE, oito colunas foram avaliadas, sendo que sete delas (Chiralcel<sup>®</sup> OD-H, Chiralcel<sup>®</sup> OJ, Chiralpak<sup>®</sup> AS, Chiralpak<sup>®</sup> AD, Chiralpak<sup>®</sup> AD-RH, Lux<sup>®</sup> cellulose-1 e Lux<sup>®</sup> cellulose-2) possuem fase estacionária quiral (FEQ) baseada em polissacarídeos, e a outra coluna (Chirobiotic<sup>®</sup> V) possui como FEQ o antibiótico macrocíclico vancomicina. Todas as oito colunas foram avaliadas no modo polar orgânico. As colunas Lux<sup>®</sup> cellulose-1 e Lux<sup>®</sup> cellulose-2 foram também avaliadas no modo fase reversa.

Uma estratégia adotada no projeto foi a etapa de *screening* (**Figura 11**), que consiste na avaliação dos solventes polares orgânicos (acetonitrila, etanol e metanol) e/ou água como fase móvel nas seguintes condições: fase móvel composta somente pelo solvente puro (100%), em combinações (proporção 50:50, v/v) e na presença de aditivos ácidos (ácido acético glacial ou ácido trifluoracético) e/ou básicos (triethylamina ou dietilamina). Na coluna a ser avaliada, a primeira condição a ser testada foi a utilização de acetonitrila (ACN), etanol (EtOH) e metanol (MeOH), respectivamente, na sua forma pura (100%). Em seguida, foi feita a combinação destes solventes (v/v), ou seja, foi avaliada acetonitrila:etanol (v/v) e depois acetonitrila: metanol (v/v). Após uma análise dos cromatogramas obtidos em cada uma das condições, selecionou-se aquele que evidenciou um início de separação dos enantiômeros (MATTHIJS et al., 2006<sup>1</sup>, MATTHIJS et al., 2006<sup>2</sup>).

Quando a  $R_s \geq 1,0$ , o passo seguinte foi recorrer aos modificadores orgânicos ácidos e/ou básicos, com o intuito de melhorar a enantioseletividade dos analitos e permitir, portanto, melhores separações e uma maior eficiência (MATTHIJS et al., 2006<sup>1</sup>, MATTHIJS et al., 2006<sup>2</sup>).

Todas as colunas quirais acima listadas foram submetidas por esta análise com o intuito de identificar a condição (coluna quiral e fase móvel) ideal para a separação dos enantiômeros da fexofenadina.

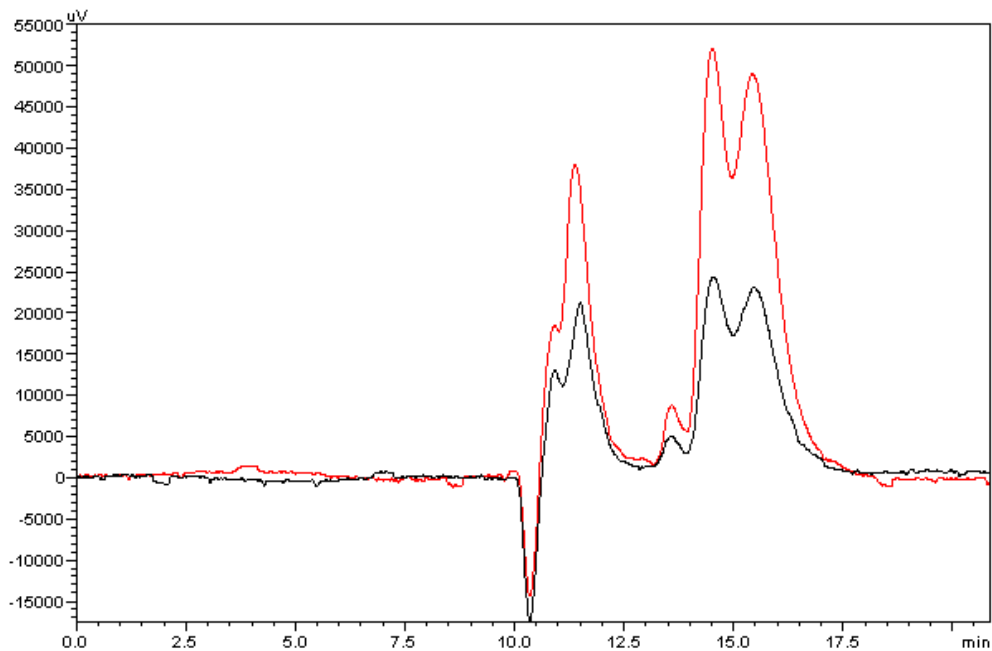
Entre todas as colunas avaliadas, somente as colunas Chiralpak AD<sup>®</sup> e Lux<sup>®</sup> cellulose-1 apresentaram potencial para separação dos enantiômeros da FEX, conforme detalhado nos itens a seguir.

#### 4.1.1. Coluna Chiralpak AD<sup>®</sup>

A Chiralpak AD<sup>®</sup>, cuja FEQ é constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato), é uma coluna que possui uma alta estabilidade, bem como uma grande capacidade de discriminação e resolução de variados compostos quirais. Nela, a capacidade de separação dos enantiômeros é muito influenciada pela natureza e posição dos substituintes nos grupos fenil, de modo que os enantiômeros podem interagir com os grupos -NH, e C=O da fase estacionária, além de interações dipolo-dipolo com o grupo C=O (LOURENÇO et al., 2010).

De todas as condições avaliadas, aquela que resultou em um princípio de separação dos enantiômeros da fexofenadina foi: fase móvel composta por acetonitrila:etanol (50:50, v/v) + 0,1% de ácido acético glacial + 0,1% de trietilamina, a uma vazão de 0,3 mL min<sup>-1</sup>, com temperatura de análise de 21 (±2) °C, representada pela **Figura 15**.





**Figura 15.** Cromatograma mostrando a separação parcial dos enantiômeros da fexofenadina (15 min) pela coluna Chiralpak AD<sup>®</sup>. Linha preta refere-se à fexofenadina na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> e a linha vermelha refere-se à fexofenadina na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Fase móvel: acetonitrila:etanol (50:50, v/v) + 0,1% de ácido acético glacial + 0,1% de trietilamina; vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura de análise 21 (±2) °C. Detecção em 220 nm.

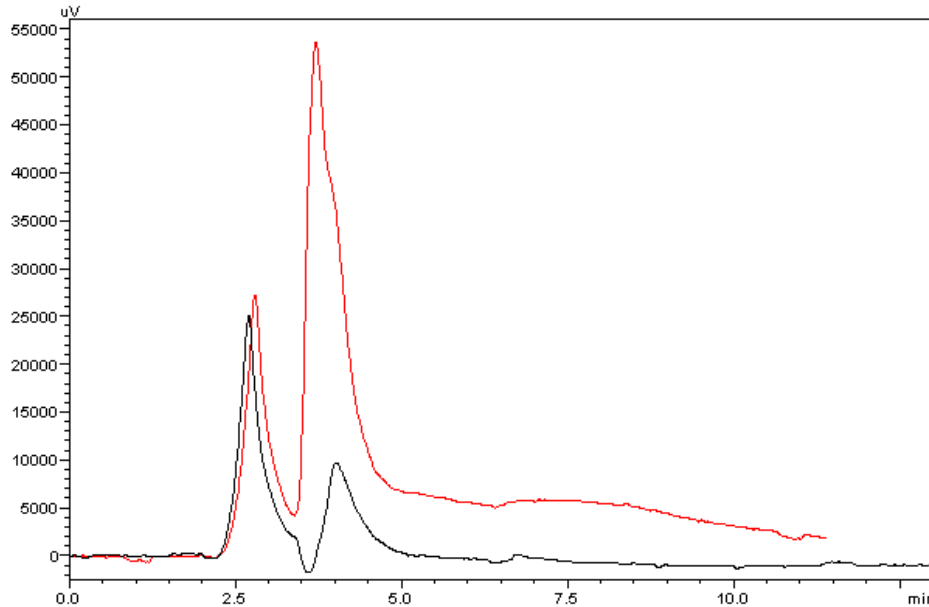
#### 4.1.2. Coluna Chiralpak<sup>®</sup> AD-RH

Segundo BONATO et al. (2005), a coluna Chiralpak<sup>®</sup> AD-RH possui como FEQ o derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) como seletor quiral, semelhante a coluna discutida anteriormente.

Apesar de possuir as mesmas características que a coluna Chiralpak AD<sup>®</sup>, ela apresenta algumas diferenças, sendo elas: i) seu uso preferencial no modo fase reverso (justificativa pela letra **R** - Chiralpak<sup>®</sup> AD-RH), cuja fase móvel apresenta água em sua composição (TACHIBANA e OHNISHI, 2001) e ii) menor tamanho da partícula de sílica (5 µm) (justificativa pela letra **H** - Chiralpak<sup>®</sup> AD-RH), o que confere à esta coluna uma melhor eficiência, teoricamente, em comparação com a Chiralpak<sup>®</sup> AD (GRITTI e GUIOCHON, 2012) quando é considerado o mesmo comprimento das colunas.

Nesta coluna, em todas as condições avaliadas, nenhuma delas demonstrou um princípio de separação dos enantiômeros da fexofenadina. O cromatograma abaixo (**Figura 16**) refere-se à análise da fexofenadina nas seguintes condições:

acetonitrila:etanol (50:50, v/v) + 0.1% de ácido acético glacial; vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>.  
 Temperatura de análise 21 (± 2) °C.



**Figura 16.** Cromatograma obtido pela coluna Chiralpak® AD-RH. Linha preta refere-se à fexofenadina na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> e a linha vermelha refere-se à fexofenadina na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Fase móvel: acetonitrila:etanol (50:50, v/v) + 0,1% de ácido acético glacial; vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura de análise 21 (± 2) °C. Detecção em 220 nm. Tempo de retenção ≈ 4 min.

#### 4.1.3 . Lux® cellulose-1

A fase estacionária quiral (FEQ) da coluna Lux® cellulose-1 é composta por um derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato), sendo que o mecanismo de reconhecimento quiral provavelmente ocorre devido os derivados de celulose possuir uma estrutura no formato de “calha” helicoidal, com os grupos carbamatos localizados no seu interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente (BONATO et al., 2005).

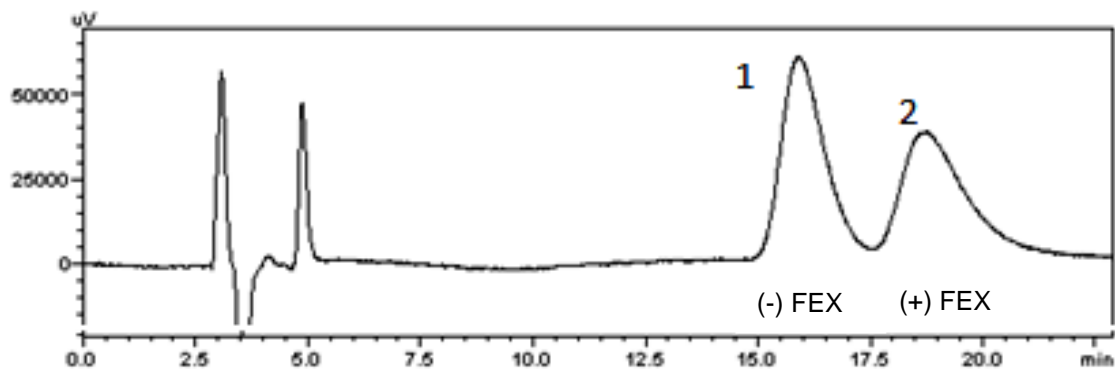
Esta coluna possui um mecanismo de reconhecimento quiral semelhante à coluna Chiralcel® OD-H, uma vez que o seletor quiral delas é o mesmo, ou seja, o derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato).

Apesar de ambas terem sido avaliadas sob as mesmas condições, a diferença no desempenho delas pode ser atribuída aos seguintes aspectos:  
 i) diferentes fabricantes (Phenomenex® – Lux® cellulose-1 e Daicel® – Chiralcel®

OD-H) e ii) tempo de vida das colunas (coluna Lux<sup>®</sup> cellulose-1 foi comprada recentemente enquanto a coluna Chiralcel<sup>®</sup> OD-H tem mais de 10 anos de uso).

Entre todas as colunas e condições avaliadas (conforme fluxograma representado na **Figura 11**), os enantiômeros da FEX foram separados apenas pela coluna Lux<sup>®</sup> cellulose-1.

A separação dos enantiômeros da fexofenadina foi obtida empregando como fase móvel água: metanol (35:65, v/v) + 0,3% trietilamina e 0,4% ácido acético. A vazão empregada foi de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 220 nm. Nessas condições o tempo de análise foi inferior a 20 minutos, com uma resolução entre os enantiômeros de 1,4, conforme cromatograma abaixo (**Figura 17**). Devido à separação obtida nessas condições cromatográficas, a coluna Chiralcel<sup>®</sup> OD-H foi avaliada empregando essa fase móvel; contudo a separação não foi possível.

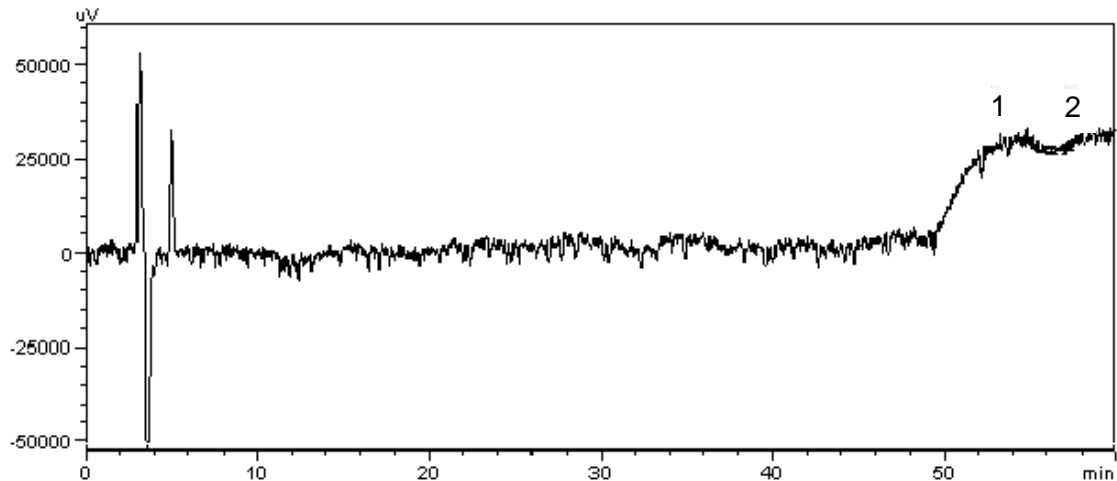


**Figura 17.** Cromatograma da separação dos enantiômeros da fexofenadina empregando a coluna quiral Lux<sup>®</sup> cellulose-1. Fase móvel: água: metanol (35:65, v/v) + 0,3% trietilamina + 0,4% ácido acético; vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>; temperatura de análise 21 (±2) °C com detecção em 220 nm. (1) (-)-Fexofenadina e (2) (+)-Fexofenadina.

Esse resultado condiz com os estudos previamente feitos por PENG et al. (2010), que obtiveram a separação da terfenadina (fármaco precursor da fexofenadina) com as colunas Lux<sup>®</sup> cellulose-1 e Lux<sup>®</sup> cellulose-2, no modo fase reversa. O mecanismo de separação pode ser atribuído à estrutura linear da celulose que possui sulcos e cavidades que permitem interações estéricas, e, além disso, os constituintes desse seletor quiral oferecem locais para a ocorrência de ligações de hidrogênio e interações π-π (OKAMOTO e IKAI, 2008; LAMMERHOFER, 2010; SCRIBA, 2012).

#### 4.1.3.1. Separação da terfenadina

A **Figura 18** refere-se ao cromatograma da terfenadina nas condições de análise acima descrita, ou seja, fase móvel constituída por água: metanol (35:65, v/v) + 0.3% trietilamina + 0.4% ácido acético; vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>; temperatura de análise 21 (± 2)°C com detecção em 220 nm.



**Figura 18.** Cromatograma da possível separação dos enantiômeros da terfenadina empregando a coluna quiral Lux<sup>®</sup> cellulose-1. Fase móvel: água: metanol (35:65, v/v) + 0,3% trietilamina e 0,4% ácido acético; vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>; temperatura de análise 21 (± 2) °C com detecção em 220 nm. Possíveis enantiômeros da terfenadina (1 e 2).

Como pode ser observado, além da resolução dos enantiômeros não serem aceitáveis, o tempo de retenção deles é muito elevado (acima de 50 minutos). Dessa forma, a separação cromatográfica da terfenadina não será abordada, já que o foco do estudo é determinar a presença da fexofenadina (metabólito) após biotransformação.

#### 4.1.3.2. Comparação da separação enantiosseletiva da FEX

Existem alguns trabalhos na literatura sobre a separação dos enantiômeros da fexofenadina, conforme apresentado na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Comparação das metodologias desenvolvidas para separação dos enantiômeros da fexofenadina.

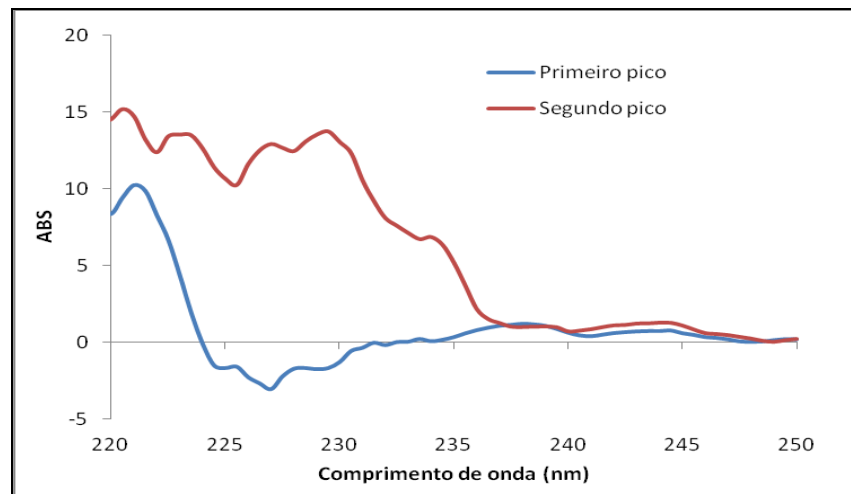
	MIURA et al., 2007	RUSTICHELLI et al., 2004	Trabalho proposto
<b>Coluna empregada</b>	Quiral CD-Ph	Chiralcel OD <sup>®</sup>	Lux <sup>®</sup> cellulose-1
<b>Fase móvel</b>	0,5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3,5):ACN (65:35, v/v)	IPA:n-hexano(3:97, v/v) + 0,02% DEA	Água: MeOH (35:65, v/v) + 0,3% TEA e 0,4% AcCOOH
<b>Vazão</b>	0,5 ml min <sup>-1</sup>	0,5 ml min <sup>-1</sup>	0,5 ml min <sup>-1</sup>
<b>Modo de eluição</b>	Fase normal	Fase normal	Fase reversa
<b>Reação de derivatização</b>	Não	Sim	Não
<b>Tempo de análise</b>	60 min	40 min	20 min
<b>Matriz</b>	Plasma	Comprimidos	Meio de cultura

Como pode ser verificado pelas informações contidas na **Tabela 5**, este projeto de pesquisa apresenta algumas vantagens em relação aos trabalhos já presentes na literatura quanto à análise enantiosseletiva da fexofenadina por CLAE, tais como:

- ✓ Modo de eluição fase reversa, com emprego de água como um dos solventes constituintes da fase móvel;
- ✓ Não necessita de reação de derivatização (etapa adicional);
- ✓ Menor tempo de análise da FEX já relatado.

## 4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ÓPTICA DOS ENANTIÔMEROS DA FEX POR DICROÍSMO CIRCULAR

Os espectros obtidos pelo DC dos enantiômeros da FEX estão representados na **Figura 19**, sendo que o enantiômero 1, o primeiro pico a eluir da coluna apresentou um efeito cotton negativo no intervalo entre 225 a 235 nm, sendo portanto nomeado como (-)-fexofenadina. Já o enantiômero 2, o segundo pico a eluir da coluna apresentou um efeito cotton positivo no intervalo entre 225 a 235 nm, sendo portanto nomeado como (+)-fexofenadina.



**Figura 19.** Espectro de absorção com luz circularmente polarizada para os enantiômeros FEX. Linha azul, primeiro pico a eluir da coluna, (-)-fexofenadina. Linha vermelha, segundo pico a eluir no da coluna, (+)-fexofenadina.

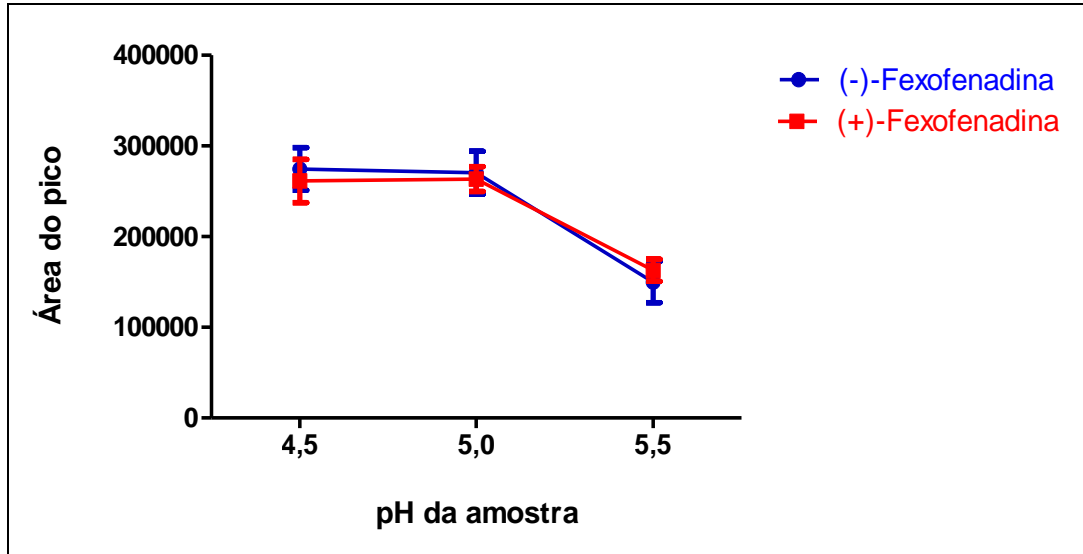
### 4.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA DLLME

Terminada a etapa de otimização da resolução enantiosseletiva da FEX, foi dado início à otimização da técnica de preparação da amostra. Nesses experimentos foi empregado 1 mL de meio de cultura líquido Czapek fortificado com 50 µL da solução padrão de fexofenadina na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup>. O pH do meio foi controlado com adição de 1 mL de solução de fosfato de sódio 0,25 M pH 5,0. Após o processo de extração, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 10°C e o extrato foi ressuspendido em 200 µL da fase móvel. Todo procedimento de DLLME foi realizado em quintuplicata.

#### 4.3.1. Otimização do pH de extração

Segundo um trabalho realizado por MIKUS et al. (2005), a determinação da fexofenadina em comprimidos por meio da técnica de eletroforese capilar foi possível em alguns valores de pH (pH 3,2 e 9,0), exceto em pH 5,2, já que nesta faixa, a fexofenadina - um composto de natureza zwitteriônica - encontrava-se na forma neutra. Com base nos resultados obtidos acima, foi possível encontrar o valor (pH 5,2) em que fexofenadina esteja neutra, e portanto, permita a ocorrência da extração, ou seja, o processo de transferência do analito da solução da amostra (fase aquosa) para a fase orgânica (ZANG et al., 2009; REZAEI et al., 2010; ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011; CAMPONE et al., 2012).

Sendo assim, a primeira etapa foi fixar, de forma aleatória, um solvente extrator e o seu volume (200 µL de diclorometano) e um solvente dispersor e seu volume (400 µL de etanol), para que posteriormente fossem avaliadas 3 valores de pH (4,5, 5,0 e 5,5), usando solução de fosfato de sódio. Como pode ser observado na **Figura 20**, o melhor pH para a extração da fexofenadina foi 5,0, corroborando dessa forma com o trabalho de MIKUS et al. (2005), sobre a neutralidade desse analito em pH 5,0.



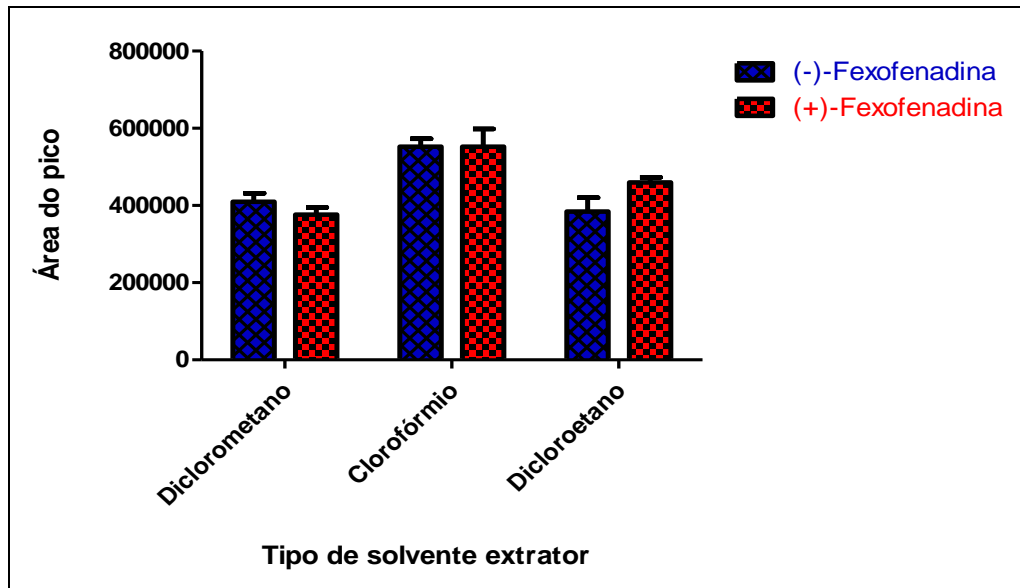
**Figura 20.** Otimização do pH da amostra na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração - volume do solvente extrator (diclorometano): 200  $\mu\text{L}$ ; volume do solvente dispersor (etanol): 400  $\mu\text{L}$ ; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C.

#### 4.3.2. Otimização do solvente extrator

Com relação aos solventes empregados, o solvente extrator deve possuir algumas características, como: ser imiscível em água, possuir densidade maior que a água, ser facilmente volatilizável, ter capacidade de extração do composto de interesse e uma boa compatibilidade com o sistema cromatográfico (REZAEI et al., 2006; OJEDA e ROJAS, 2009; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011; ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011). Ele representa o parâmetro mais importante neste tipo de extração (REZAEI et al., 2006; OJEDA e ROJAS, 2009; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011).

Foi mantido como solvente dispersor o etanol (400  $\mu\text{L}$ ), e foram avaliados os solventes extratores: clorofórmio, diclorometano, dicloroetano e tetracloreto de carbono (200  $\mu\text{L}$  de cada um deles), no melhor valor de pH obtido (pH 5,0) anteriormente. Como pode ser observado na **Figura 21**, o melhor solvente extrator foi clorofórmio. Não foi possível a extração com tetracloreto de carbono.



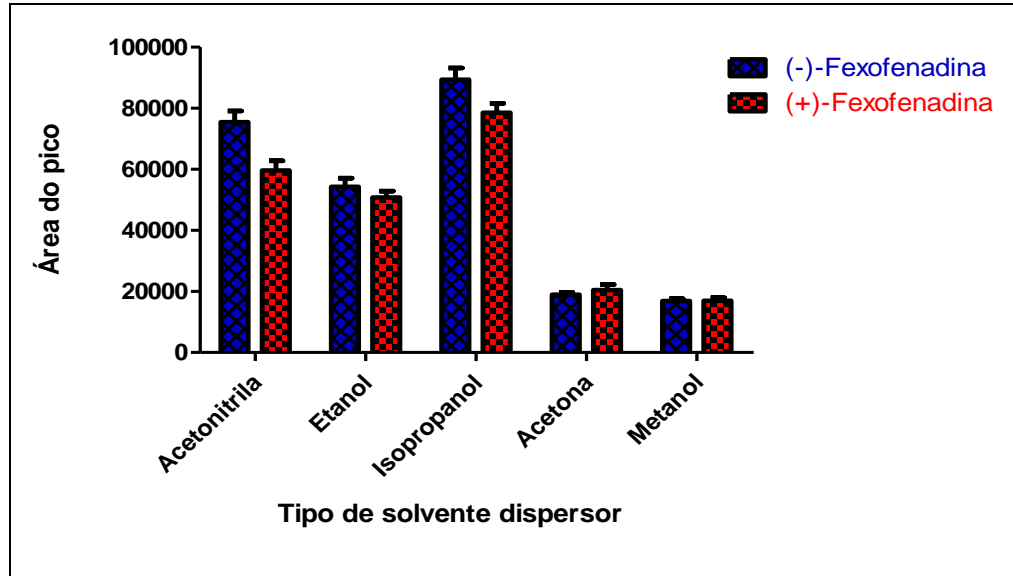


**Figura 21.** Otimização do solvente extrator na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração - volume do solvente extrator: 200  $\mu$ L; volume do solvente dispersor (etanol): 400  $\mu$ L; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C. Não houve extração com tetracloreto de carbono (não representado).

#### 4.3.3. Otimização do solvente dispersor

Com relação ao solvente dispersor, o mesmo deve possuir uma boa miscibilidade tanto na fase extratora, como na fase aquosa e também ser facilmente volatilizável (REZAEI et al., 2006; OJEDA e ROJAS, 2009; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011; ZGOLA-GRZESKOWIAK e GRZESKOWIAK, 2011). Esse solvente é responsável por permitir a formação do ponto nuvem e pela sedimentação da fase extratora (REZAEI et al., 2009).

Com base no experimento anterior, clorofórmio foi escolhido como o melhor solvente extrator e manteve-se o seu volume de 200  $\mu$ L, para que fossem avaliados os seguintes solventes dispersores: metanol, etanol, acetona, acetonitrila e isopropanol (400  $\mu$ L de cada um deles). Como pode ser observado na **Figura 22**, o melhor solvente dispersor foi isopropanol.



**Figura 22.** Otimização do solvente dispersor na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Extração eficiente representada pela área dos picos. Condições de extração - volume do solvente extrator (clorofórmio): 200  $\mu$ L; volume do solvente dispersor: 400  $\mu$ L; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C.

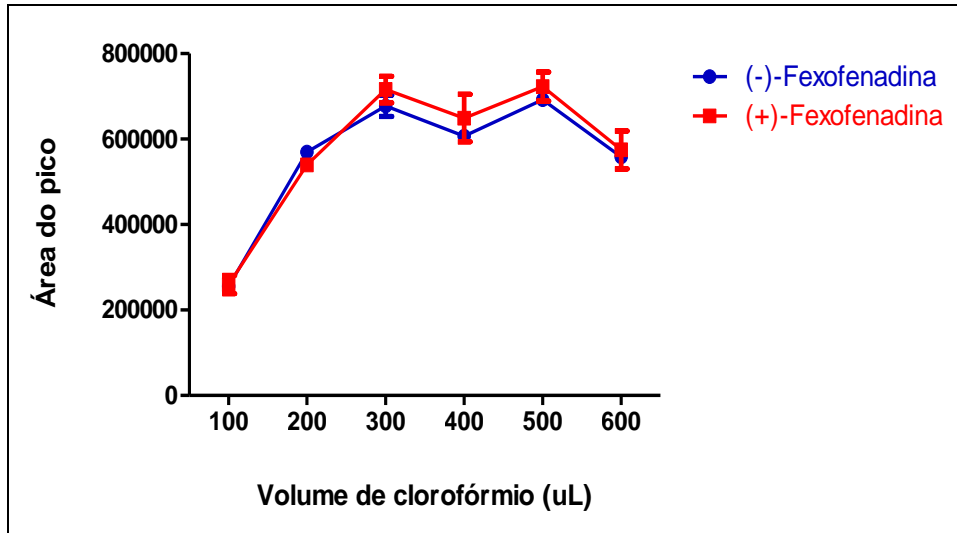
#### 4.3.4. Otimização do volume do solvente extrator e dispersor

Concluída as etapas de escolha dos solventes extrator e dispersor, a etapa seguinte foi a otimização do volume dos solventes extrator e dispersor. Na otimização do volume do solvente extrator (clorofórmio), fixou-se 400  $\mu$ L do solvente dispersor (isopropanol), e variou-se o volume do clorofórmio, realizando os testes com: 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 300  $\mu$ L, 400  $\mu$ L, 500  $\mu$ L e 600  $\mu$ L. O melhor resultado foi obtido empregando 300  $\mu$ L clorofórmio (**Figura 23**).

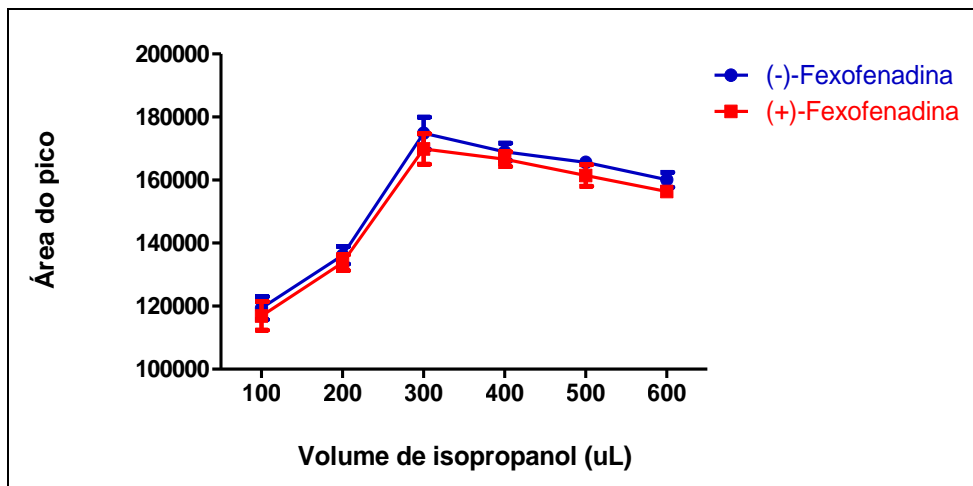
O volume do solvente extrator está relacionado ao fator de enriquecimento da amostra ( $FE = C_{sed}/C_0$ , sendo que FE: Fator de enriquecimento,  $C_{sed}$ : Concentração da fase sedimentada,  $C_0$ : Concentração dos analitos na fase aquosa), sendo que, à medida que o volume deste solvente aumenta, o volume da fase sedimentada após a centrifugação também aumenta, diminuindo a concentração do analito na fase sedimentada e portanto, ocasionando uma diminuição do FE (REZAEI et al., 2006; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011).

Na otimização do volume do solvente dispersor (isopropanol), fixou-se 300  $\mu$ L do solvente extrator (clorofórmio), e variou-se o volume do isopropanol, de modo

semelhante ao descrito acima. O melhor resultado foi com 300  $\mu\text{L}$  isopropanol (**Figura 24**). O volume do solvente dispersor afeta diretamente na formação do ponto nuvem e na polaridade da matriz aquosa, e, portanto, na eficiência da extração (REZAAE et al., 2010).



**Figura 23.** Otimização do volume de solvente extrator na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração - solvente extrator: clorofórmio; volume do solvente dispersor (isopropanol): 400  $\mu\text{L}$ ; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C.



**Figura 24.** Otimização do volume de solvente dispersor na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração - volume de solvente extrator (clorofórmio): 300  $\mu\text{L}$ ; solvente dispersor: isopropanol; tempo de agitação: 30 segundos vórtex; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C.

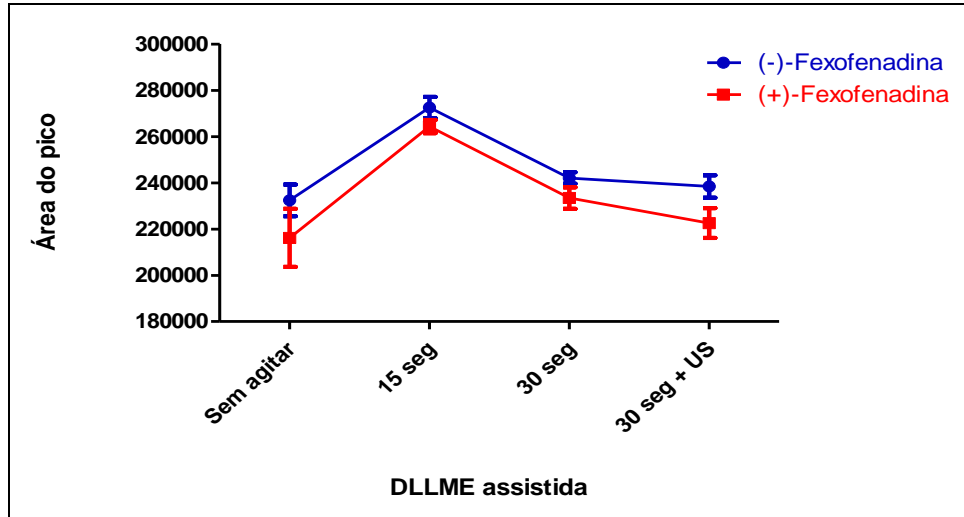
#### 4.3.5. DLLME assistida

Pelo fato da DLLME ser um processo de equilíbrio, sua eficiência depende da transferência de massa do analito da fase aquosa para a fase orgânica. Nesta técnica, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes dispersor e extrator na matriz e a centrifugação da amostra (REZAEI et al., 2006; FORTES, 2013). Contudo a DLLME é considerada uma técnica tempo independente, pois a formação do ponto nuvem leva a extração quase que instantânea dos analitos. Porém, alguns autores verificaram que o auxílio de agitação (empregando vórtex ou ultrassom) após a formação do ponto nuvem levou a uma melhora na quantidade extraída. Essa estratégia vem sendo chamada de DLLME assistida (FORTES et al., 2013). Dessa forma, foi avaliado o uso de agitação no vórtex e ultrassom, logo após a adição dos solventes extrator e dispersor na amostra, ou seja, imediatamente posterior à formação do ponto nuvem. Para isso, os seguintes testes foram realizados: a) sem agitação no vórtex (somente o ponto nuvem), b) com 15 segundos no vórtex, c) com 30 segundos no vórtex e d) com 30 segundos no vórtex seguido de 5 minutos de banho ultrassom.

Como pode ser observada na **Figura 25**, a melhor condição foi no tempo de 15 segundos, ou seja, a combinação da formação do ponto nuvem com agitação no vórtex por 15 segundos é mais eficiente para a extração da FEX do que as demais condições avaliadas.

Isso pode ser explicado por alguns motivos: i) 15 seg vórtex versus sem agitação: a agitação rápida pelo vórtex permite a formação de gotas finas do clorofórmio, que podem ser benéficas para a dispersão eficaz destas gotículas no interior da solução aquosa (DARIAS et al., 2010; SHI e LEE, 2010; FORTES, 2013) e assim, um aumento de transferência de massa e eficiência de extração pode ser alcançado; ii) 15 seg vórtex versus 30 seg vórtex: após a formação do ponto nuvem, a área de superfície de contato entre o solvente extrator e a fase aquosa é infinitamente grande, de modo que a transferência dos analitos da solução aquosa para a fase extratora é muito rápida (REZAEI et al., 2006; REZAEI et al., 2010; MENG et al., 2011), além de que a eficiência da extração é afetada em pequena extensão pelo tempo de agitação (MENG et al., 2011; YE et al., 2012); iii) 15 seg vórtex versus 30 seg vórtex + 5 min ultrassom: os efeitos mecânicos e térmicos do ultrassom podem resultar na perda de solvente extrator, pela sua volatilização

(CARRO et al., 2012) e por isso, o uso do banho ultrassom não melhorou a recuperação da extração da FEX.



**Figura 25.** Otimização do tempo de agitação na extração por DLLME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração – volume de solvente extrator (clorofórmio): 300  $\mu$ L; volume de solvente dispersor (isopropanol): 300  $\mu$ L; volume da amostra: 1 mL; pH da amostra 5,0 e 10 min de centrifugação a 3000 rpm a 10°C.

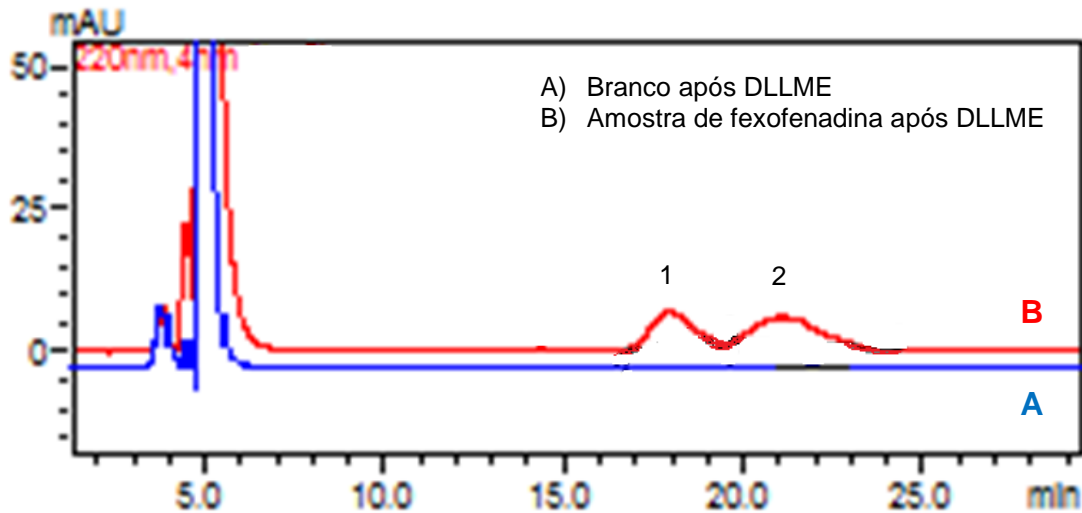
#### 4.3.6. Otimização da adição de cloreto de sódio

A adição de um sal solúvel na amostra diminui a solubilidade do analito alvo em solução aquosa, aumenta sua partição na fase orgânica, e, portanto, favorece a extração (MUDIAM et al., 2012). Dessa forma, o efeito “*salting out*” também foi testado, a fim de verificar se a adição de um sal inerte poderia contribuir no aumento da eficiência da extração, e para isso, diferentes quantidades de NaCl 0-8% (*m/v*) foram adicionadas à amostra, mantendo as demais condições constantes. A adição de sal não influenciou na extração dos analitos (resultados não apresentados).

A condição final para a extração da fexofenadina por DLLME foi:

- ✓ Solvente extrator: 300  $\mu$ L de clorofórmio,
- ✓ Solvente dispersor: 300  $\mu$ L de isopropanol,
- ✓ Tempo de agitação: 15 segundos

A **Figura 26** mostra um cromatograma nas melhores condições estabelecidas por DLLME após extração dos analitos do meio de cultura Czapek.



**Figura 26.** Cromatograma após extração por DLLME para análise da fexofenadina nas condições otimizadas. A) Branco do meio de cultura líquido Czapek após DLLME, B) Amostra de fexofenadina após extração por DLLME. (1)-(-)-fexofenadina, (2)-(+)-fexofenadina. Condições de análise descritas na **Figura 17**.

Deve ser destacado que o tempo de retenção dos enantiômeros da FEX apresentou uma ligeira mudança em relação ao apresentado na **Figura 17**. Esse fato deve-se a alteração da temperatura de análise durante os procedimentos de otimização da separação cromatográfica e otimização da técnica de preparação da amostra. Devido uma quebra no ar condicionado do laboratório, o controle da temperatura ficou prejudicado, interferindo, dessa forma, na resolução dos enantiômeros.

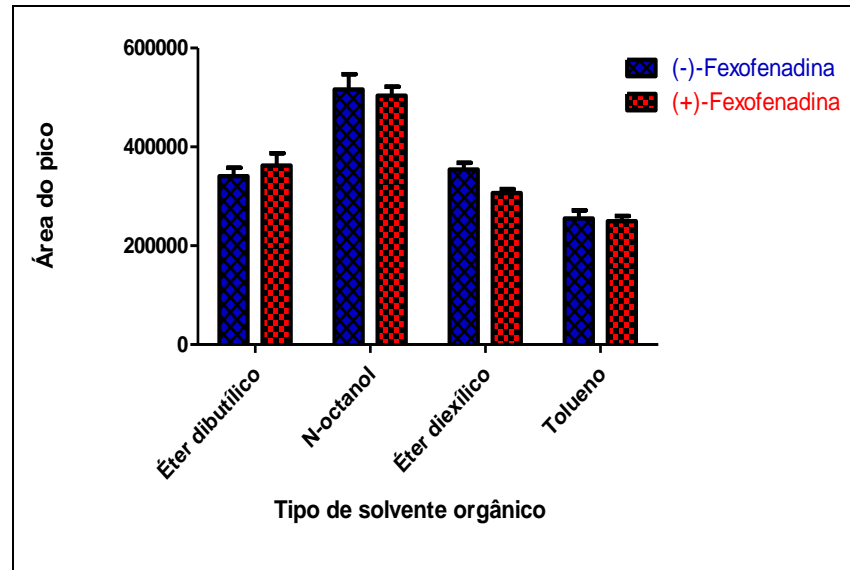
#### 4.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA HF-LPME

Nesses experimentos foi empregado 1 mL de meio de cultura líquido Czapek fortificado com 50 µL da solução padrão de fexofenadina na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. O pH do meio foi controlado com adição de 3 mL de solução de fosfato de sódio 0,25 M pH 5,0. As amostras foram agitadas a 1500 rpm no agitador orbital de tubos (Vibrax<sup>®</sup>) e o extrato foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e posteriormente ressuspensionado em 200 µL da fase móvel. Todo procedimento de HF-LPME foi realizado em quintuplicata. Devido as propriedades anfóteras da fexofenadina (pKa = 4,43 ± 0,10 e 9,42 ± 0,10) foi avaliado a HF-LPME no modo três fases, mantendo a fase doadora em pH 5,0 (pH neutro para fexofenadina) e uma fase aceptora ácida (pH 3,0). Para o desenvolvimento do método em três fases, os parâmetros avaliados foram: i) tipo de solvente orgânico (fase extratora), ii) tempo de extração, iii) composição da fase aceptora e iv) adição de cloreto de sódio na fase doadora.

##### 4.4.1. Otimização do tipo de solvente orgânico

A seleção do solvente orgânico é uma etapa fundamental na otimização em HF-LPME. Este solvente deve ter baixa solubilidade ou ser insolúvel em água, para que a fase orgânica não se dissolva na fase doadora aquosa; deve ter baixa volatilidade, para que não haja perda da fase orgânica durante a extração; deve, também, ser compatível com a membrana capilar utilizada (no caso, polipropileno); bem como, de fácil impregnação nos poros da mesma; e ainda, a solubilidade dos analitos no solvente deve ser maior do que na fase doadora e menor do que na fase aceptora, no caso de sistemas de três fases, que foi o modo empregado (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Foi mantido como solução aceptora HCl 50mM, e tempo de agitação de 50 minutos. A fase doadora foi mantida sem adição de sal. Os solventes orgânicos avaliados foram: éter diexílico, n-octanol, tolueno e éter dibutílico, sendo que todos foram impregnados na fibra por 10 segundos, e depois, o excesso foi removido em ultrassom por mais 10 segundos. Como pode ser observado na **Figura 27**, o melhor solvente orgânico foi o n-octanol.

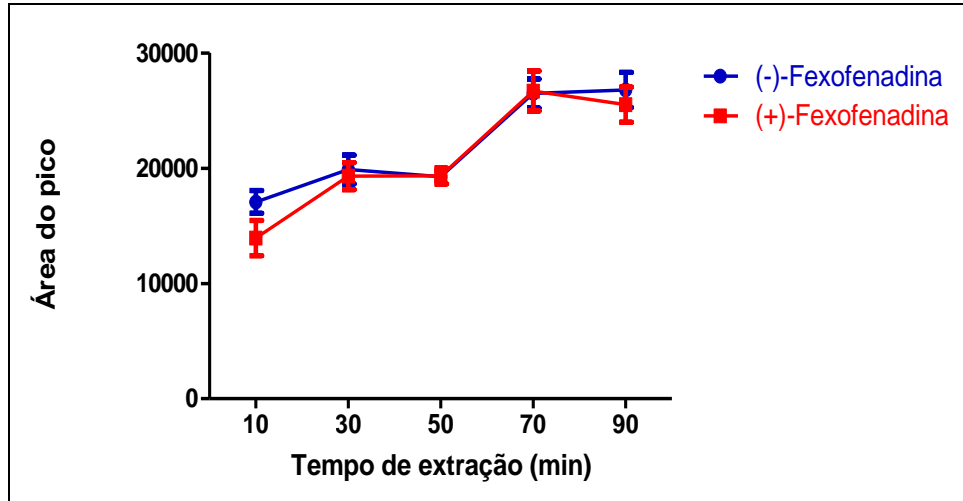


**Figura 27.** Otimização do tipo de solvente orgânico na extração por HF-LPME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência da extração representada pela área dos picos. Condições de extração – solução aceptora: HCl 50mM; tempo de extração: 50 minutos; sem adição de sal; pH da amostra 5,0, volume da amostra 1 mL. Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno 15 cm de comprimento com 600 µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm.

#### 4.4.2. Otimização do tempo de extração

A HF-LPME é um processo de equilíbrio, portanto sua eficiência de extração depende da transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica e desta para a fase aceptora. Assim, a recuperação do analito aumenta com o tempo até que o equilíbrio seja atingido (LEE et al., 2008). Com base no teste anterior, manteve-se solução aceptora ácida de HCl 50mM, sem adição de sal e n-octanol como solvente orgânico (melhor resultado), para que fosse avaliado o tempo de extração (de 10 a 90 min). Como pode ser observado na **Figura 28**, a partir de 70 minutos o sistema alcança o equilíbrio, sendo dessa forma, desnecessário um maior aumento no tempo de extração.



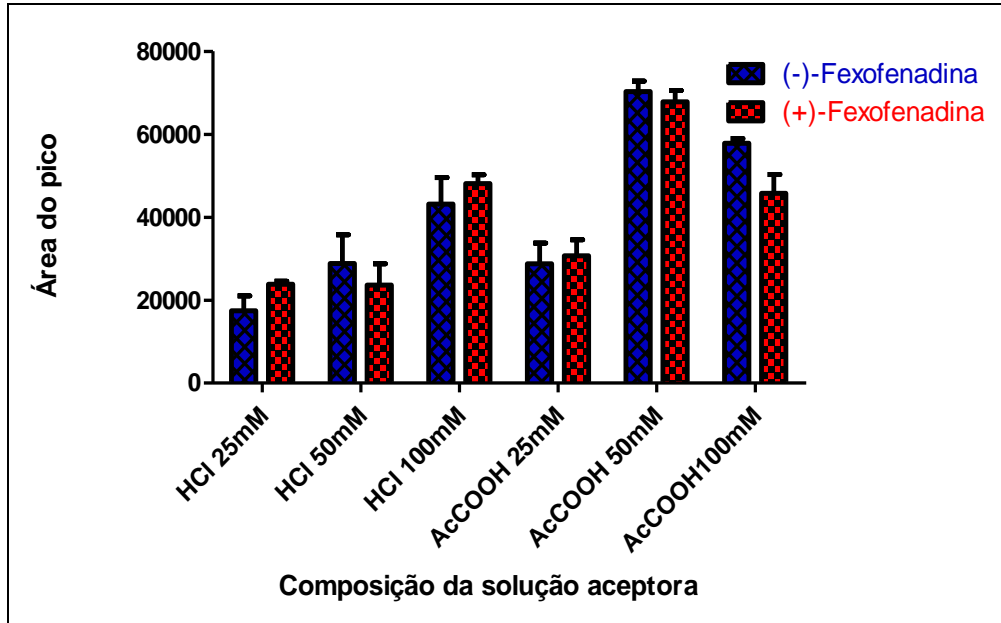


**Figura 28.** Otimização do tempo de extração na extração por HF-LPME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração – solvente orgânico: n-octanol; solução aceptora: HCl 50mM; sem adição de sal; pH da amostra 5,0, volume da amostra 1 mL. Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno 15 cm de comprimento com 600 µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm.

#### 4.4.3. Otimização da composição e concentração da fase aceptora

Na fase doadora, o metabólito deve estar na sua forma neutra (pH 5,0 - no caso da fexofenadina, conforme teste realizado anteriormente na extração DLLME), para então ser extraído pelo solvente orgânico, impregnado na fibra, e então para a fase aceptora aquosa, cujo pH deve ser ácido para que o analito permaneça na forma ionizada e não retorne para o solvente orgânico e para a fase doadora (MAGALHÃES et al., 2009).

Manteve-se n-octanol com solvente orgânico, sem adição de sal e 70 minutos de extração (melhor resultado) e variou-se a composição e concentração da fase aceptora. Foram avaliadas soluções de HCl e AcCOOH, ambos nas concentrações de 25 mM, 50 mM e 100 mM, todos ajustados a pH 3,0. Como pode ser observado na **Figura 29**, a melhor solução aceptora foi AcCOOH 50 mM.



**Figura 29.** Otimização da composição e concentração da solução acceptora na extração por HF-LPME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração – solvente orgânico: n-octanol; tempo de extração: 70 minutos; sem adição de sal; pH da amostra 5,0, volume da amostra 1 mL. Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno 15 cm de comprimento com 600µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm.

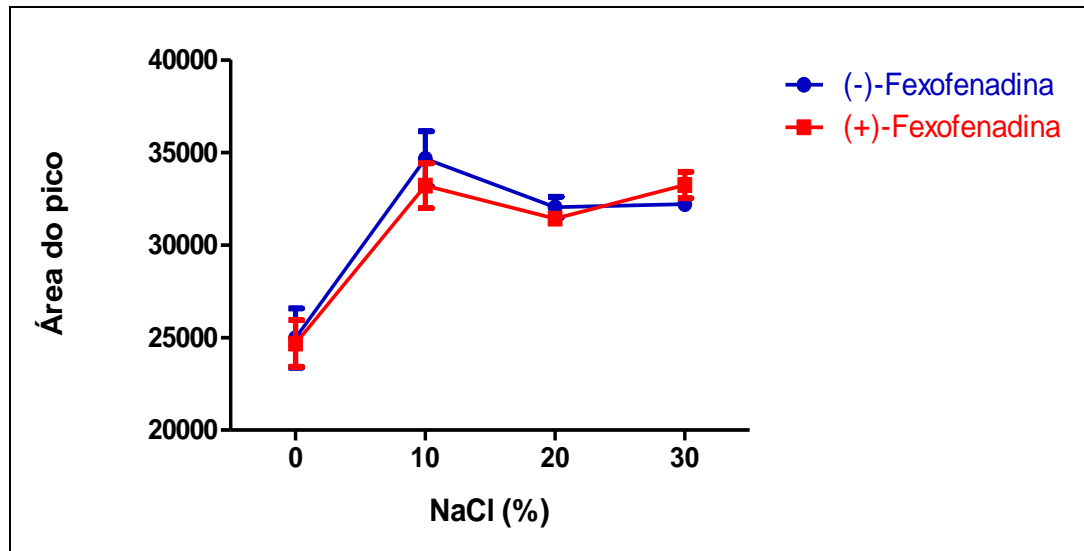
#### 4.4.4. Otimização da adição de cloreto de sódio

Pode-se aumentar a eficiência da extração, adicionando um sal inerte na fase doadora. Isso ocorre devido ao efeito “*salting out*”. Nesse processo, as moléculas de água da fase doadora passam a hidratar também os íons do sal adicionado; então, reduz a solubilidade do analito na solução aquosa por mecanismos de competição, e assim facilita a difusão do analito para a fase extratora (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Com esse objetivo, foi adicionado NaCl variando sua concentração de 0 a 30% (*m/v*), fixando os demais parâmetros e escolhendo AcCOOH 50mM como fase acceptora. Como pode ser observado na **Figura 30**, a melhor concentração foi com 10% de NaCl.

A adição de maiores quantidades de sal na matriz - 20 e 30% (*m/v*) NaCl - influenciou negativamente na recuperação por 2 motivos: i) a interação ocorrida entre as moléculas do analito e os íons adicionados pode reduzir a difusão do analito para a fase extratora e ii) ocorre um aumento na viscosidade da matriz, que também

pode reduzir a mobilidade dos analitos e prejudicar a extração (DE OLIVEIRA et al., 2008).



**Figura 30.** Otimização da adição de cloreto de sódio na extração por HF-LPME dos enantiômeros da fexofenadina em meio de cultura líquido Czapek. Eficiência de extração representada pela área dos picos. Condições de extração – solvente orgânico: n-octanol; tempo de extração: 70 minutos; solução aceitadora: AcCOOH 50mM; pH da amostra 5,0, volume da amostra 1 mL. Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno 15 cm de comprimento com 600 µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm.

A condição final da extração da fexofenadina por HF-LPME ficou;

- ✓ Fase doadora: 50 µL fexofenadina, 1 mL do meio de cultura Czapek e 3 mL de solução de fosfato de sódio 0,25 M (pH = 5,0);
- ✓ Solvente orgânico: n-octanol;
- ✓ Tempo de extração: 70 minutos;
- ✓ Fase aceitadora: solução aquosa de AcCOOH 50 mM (pH 3,0);
- ✓ Adição de sal: 10%.

Duas microtécnicas de extração foram avaliadas quanto à sua capacidade de isolamento e pré-concentração da FEX dos demais componentes do meio de cultura, conforme descrito acima. A **Tabela 6** contém as principais diferenças entre ambas as técnicas e conseqüentemente, suas vantagens.

**Tabela 6.** Principais diferenças entre as microtécnicas de extração DLLME e HF-LPME.

Comparação dos pontos principais	DLLME	HF-LPME
Tempo dependente	Não	Sim
Uso de fibra de polipropileno	Não	Sim
Uso de centrífuga	Sim	Não
Uso de agitador orbital	Não	Sim
Etapa de impregnação do solvente orgânico na fibra	Não	Sim
Etapa de preparação da solução aceptora	Não	Sim
Etapa de adição da solução aceptora no interior da fibra	Não	Sim
Praticidade	Sim	Não
Recuperação absoluta aproximada da FEX	45 %	5%
Tempo estimado para extração de 36 amostras	45 min	70 min

Comparando as informações da **Tabela 6**, a DLLME foi a microtécnica de extração de escolha, pelos seguintes motivos:

- ✓ Vantagens destacadas em vermelho na **Tabela 6**;
- ✓ Maiores valores de recuperação ( $\approx 45\%$  versus  $\approx 5\%$ ) para a extração da FEX do meio de cultura;
- ✓ Maior rapidez e
- ✓ Facilidade de preparação das amostras.

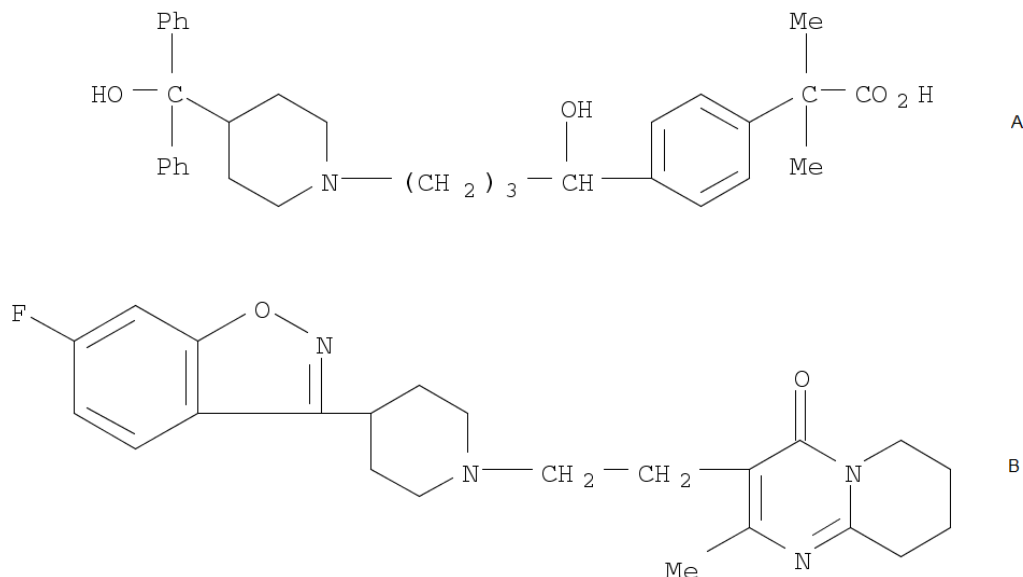
#### 4.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação da metodologia analítica foi realizada em meio de cultura líquido Czapek, empregando a microtécnica de extração DLLME.

Como não há um guia que recomende a análise de fármacos e metabólitos em meio de cultura líquido, optou-se por seguir o mais próximo possível, as recomendações do FDA e ANVISA (FDA, 2001; ANVISA, 2012) para análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos. Esta escolha foi devido à complexidade do meio de cultura líquido.

Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação, seletividade, estabilidade. A validação do método foi realizada por padronização interna empregando o fármaco risperidona (**Figura 31-B**) como padrão interno.

A risperidona, apesar de ter estrutura química diferente da fexofenadina, suas propriedades físico-químicas, tais como  $\log P$  ( $2,67 \pm 0,40$ ) e  $pK_a$  ( $8,07 \pm 0,10$ ) são semelhantes as da FEX ( $\log P$   $3,73 \pm 0,43$  e  $pK_{a1}$   $4,43 \pm 0,10$ ,  $pK_{a2}$   $9,42 \pm 0,10$ ) (**Figura 31-A**).



**Figura 31.** Estruturas químicas da FEX (A) e RISP (B).

#### 4.5.1. Linearidade

A linearidade do método foi realizada pela regressão linear, através da representação gráfica da razão área dos picos dos analitos e padrão interno *versus* a concentração do analito. O método apresentou-se linear (peso 1/X), para ambas as curvas analíticas (**Tabela 7**), no intervalo de concentrações de 2 µg mL<sup>-1</sup> a 15 µg mL<sup>-1</sup> para cada um dos enantiômeros da FEX com coeficiente de correlação maior do que 0,99 e erro relativo para cada ponto da curva analítica inferior a 15%. Além disso, as curvas analíticas construídas foram submetidas à análise estatística empregando a ANOVA e a validade das curvas foi demonstrada. A análise da inclinação (*slope*) das curvas analíticas foi realizada para avaliar a influência de diferentes tipos de matrizes no processo de preparação de amostras, DLLME. Dessa forma curvas analíticas foram preparadas em duas diferentes matrizes, uma em meio de cultura líquido Czapek e outra em um pool de fungos. Como pode ser observado na **Tabela 7**, as curvas analíticas apresentaram valores de coeficiente angulares semelhantes o que indica que as diferentes matrizes sofreram a mesma influência no processo de extração por DLLME (BOCATO et al., 2012; FORTES, 2013).

**Tabela 7.** Linearidade do método para análise dos analitos em meio de cultura líquido Czapek e em pool de fungos.

Analitos	Tipo de matriz	Concentração (µg mL <sup>-1</sup> )	Equação linear <sup>a</sup>	r <sup>b</sup>	Razão dos slopes	ANOVA <i>lack-of-fit</i>	
						F	p
(-)-FEX	Pool de fungos	2,00-15,00	y= 0,002118x+0,068047	0,992	0,998	4,79	0,056
(-)-FEX	Meio Czapek	2,00-15,00	y= 0,001992x+0,042816	0,994		2,68	0,056
(+)-FEX	Pool de fungos	2,00-15,00	y= 0,001444x+0,131541	0,991	0,998	3,90	0,593
(+)-FEX	Meio Czapek	2,00-15,00	y= 0,001790x+0,025914	0,993		2,89	0,054

<sup>a</sup> Cinco replicatas ( $n = 5$ ) para cada concentração.

<sup>b</sup> coeficiente de correlação.

#### 4.5.2. Recuperação

As recuperações médias para ambos enantiômeros da FEX foram de 43%, com um desvio padrão relativo inferior a 5% (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Recuperação do método de DLLME para análise dos enantiômeros da fexofenadina.

Concentração <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	(-)-Fexofenadina		(+) -Fexofenadina	
	Recuperação (%)	CV (%) <sup>b</sup>	Recuperação (%)	CV (%) <sup>b</sup>
CB	37	4	40	5
CM	44	3	40	5
CA	49	2	47	1

<sup>a</sup>As concentrações da fexofenadina avaliadas na recuperação foram (CB) concentração baixa  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; (CM) concentração média  $8,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e (CA) concentração alta  $12,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.5.3. Limite de Quantificação

Nas condições descritas, o limite de quantificação (LIQ) do método para os enantiômeros da fexofenadina foi de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os valores de precisão (representado pelo CV,%) e exatidão (representado pelo E,%) foram inferiores a 20% (ANVISA, 2012) e são apresentados na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva da fexofenadina.

Analitos	Concentração nominal ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração analisada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	E (%) <sup>b</sup>	CV (%) <sup>c</sup>
(-)-Fexofenadina	2,00	2,10	5	6
(+)-Fexofenadina	2,00	2,10	5	7

<sup>a</sup> Limite de quantificação,  $n = 5$ ; <sup>b</sup> E, erro relativo do limite de quantificação; <sup>c</sup> CV (%), coeficiente de variação percentual do limite de quantificação.

#### 4.5.4. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão são medidas de confiabilidade dos resultados analíticos obtidos, sendo que a precisão é o parâmetro que demonstra o quão próximo estão os resultados obtidos de amostras independentes e, a exatidão, demonstra a concordância do resultado obtido e o valor real (CASSIANO et al., 2009; BOCATO, 2012). Para avaliar a precisão e exatidão intraensaio foram utilizadas alíquotas de meio de cultura líquido Czapek fortificadas com as concentrações do limite inferior de quantificação, baixa, média e alta da fexofenadina, em cinco replicatas. As mesmas três concentrações foram avaliadas para a determinação da precisão e exatidão interensaios, durante três dias consecutivos.

A **Tabela 10** apresenta os valores de precisão (DPR,%) e exatidão (ER,%) intra- e interensaio dos enantiômeros da fexofenadina, sendo que os resultados de coeficiente de variação e erro relativo estão de acordo com os guias de validação para métodos bioanalíticos (FDA, 2001; ANVISA, 2012), mantendo-se inferior a 15%.

**Tabela 10.** Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da fexofenadina em meio Czapek.

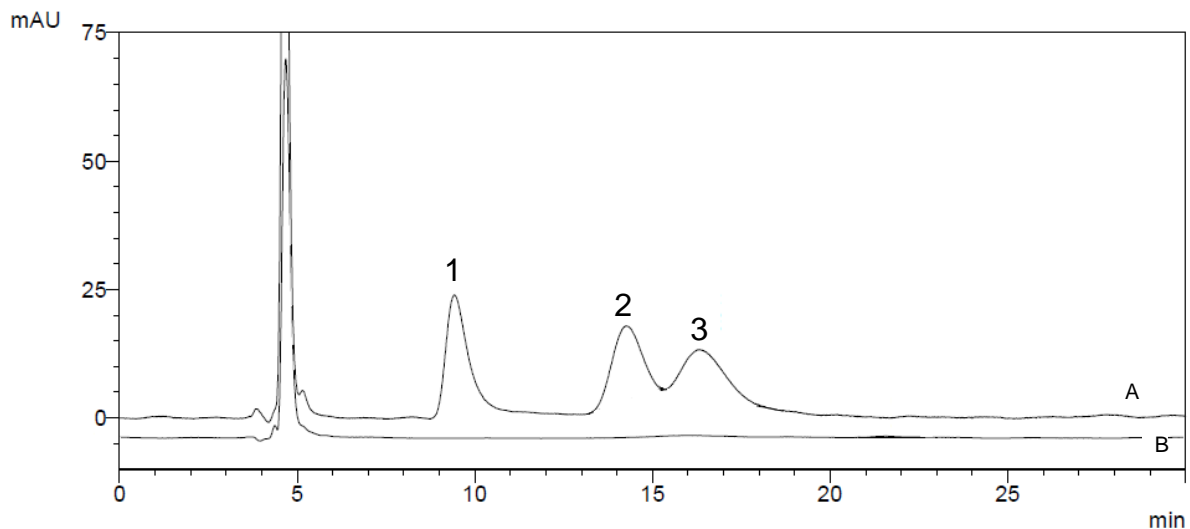
Analitos	Concentração teórica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Intraensaio ( $n = 5$ ) <sup>a</sup>			Interensaio ( $n = 3$ ) <sup>b</sup>		
		Concentração obtida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DPR <sup>c</sup> (%)	ER <sup>d</sup> (%)	Concentração obtida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DPR <sup>c</sup> (%)	ER <sup>d</sup> (%)
(-)-FEX	2,00	2,03	5	1,5	2,06	2	3,0
	3,75	3,83	3	2,1	3,75	3	0,0
	8,00	7,88	6	-1,5	7,92	1	-1,0
	12,00	12,69	2	5,8	12,76	1	6,3
(+)FEX	2,00	2,04	11	2,0	2,03	2	1,5
	3,75	3,59	5	-4,3	3,67	6	-2,1
	8,00	8,05	7	0,7	8,02	1	0,3
	12,00	12,59	5	5,0	12,60	1	5,0

<sup>a</sup> número de determinações; <sup>b</sup> número de dias; <sup>c</sup> porcentagem de desvio padrão relativo; <sup>d</sup> porcentagem de erro relativo.



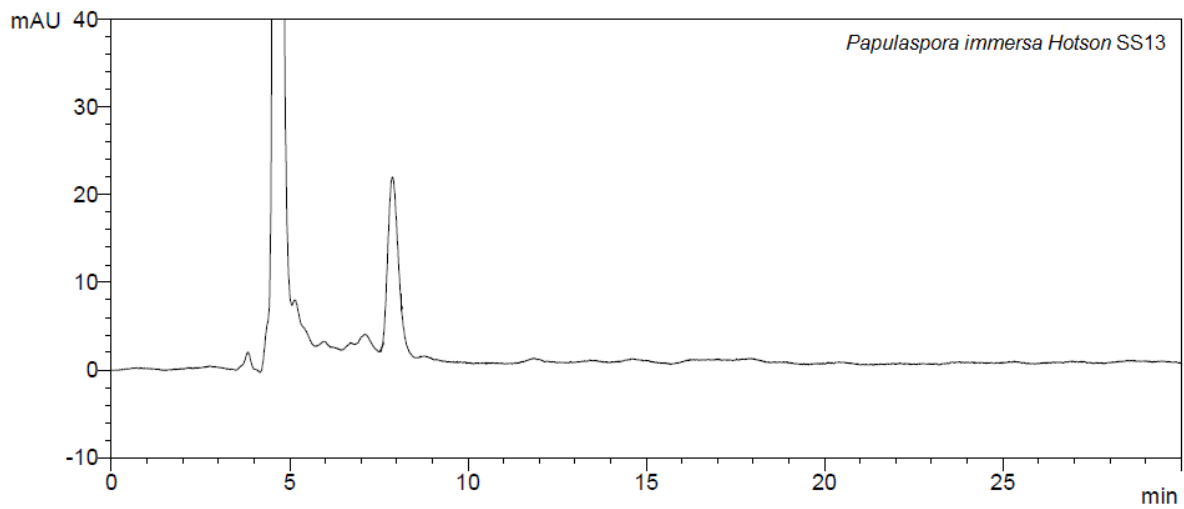
#### 4.5.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da análise de amostras extraídas de meio de cultura Czapek sem adição dos analitos, amostras de meio de cultura Czapek fortificadas com os enantiômeros da fexofenadina e amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos empregados nos estudos de biotransformação. Os cromatogramas referentes à análise do meio de cultura fortificado com os enantiômeros da fexofenadina e meio de cultura sem a presença dos analitos são apresentados na **Figura 32**.

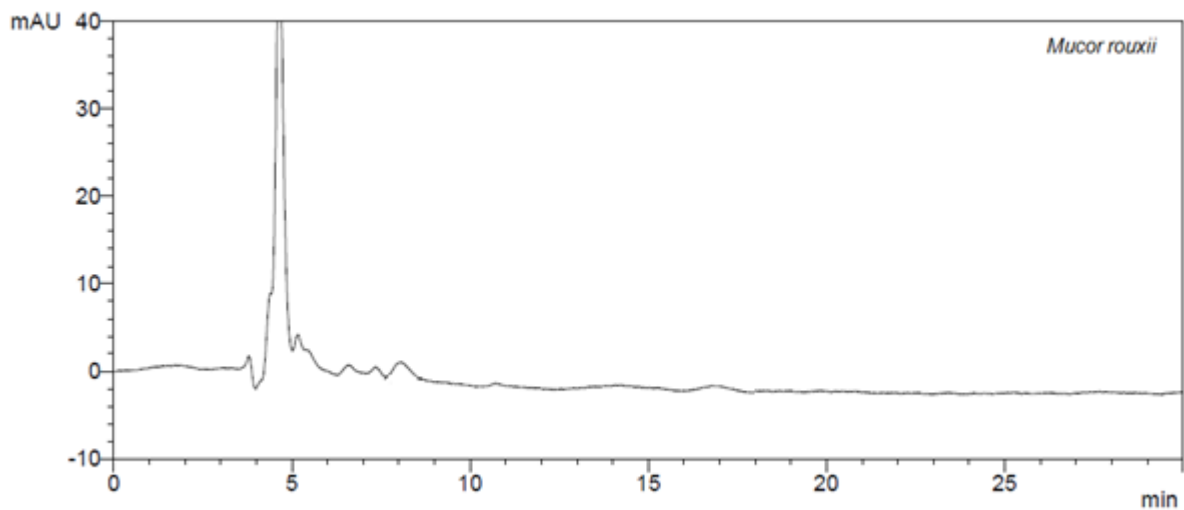


**Figura 32.** Cromatogramas representativos dos enantiômeros da FEX em meio de cultura Czapek após extração DLLME. (A) Meio de cultura Czapek fortificado com (1) padrão interno ( $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), (2) (-)-Fexofenadina e (3) (+)-Fexofenadina (concentração de  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  para cada enantiômero). (B) Meio de cultura Czapek sem adição dos analitos. Condições de análise descritas na **Figura 17**. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3.

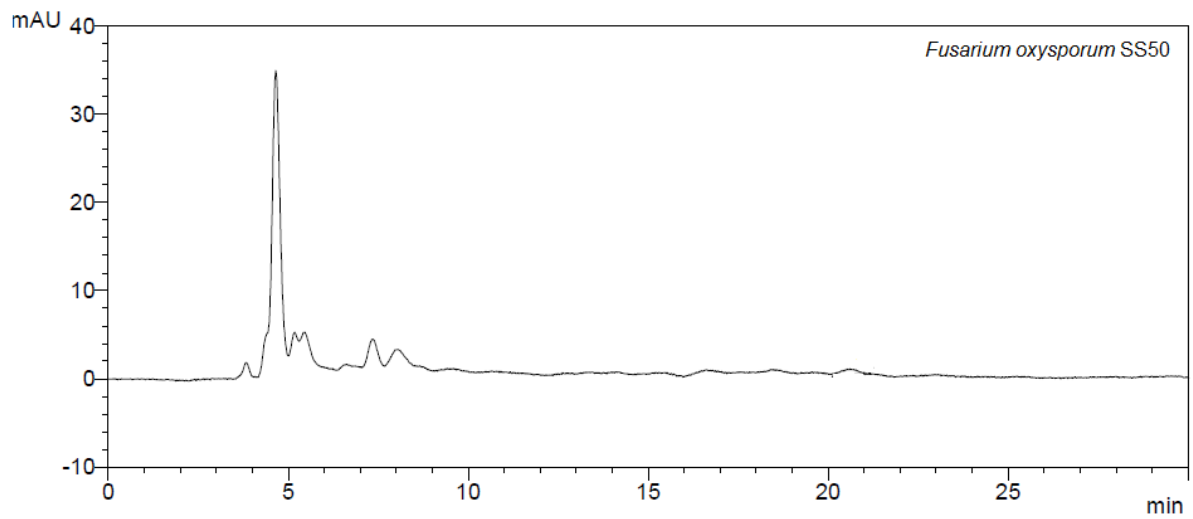
Na avaliação da seletividade, os fungos *Papulaspora immersa* Hotson SS13, *Mucor rouxii*, *Fusarium oxysporum* SS50, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B não produziram qualquer metabólito secundário próximo ao tempo de retenção dos enantiômeros da FEX (**Figura 33**, **Figura 34**, **Figura 35**, **Figura 36** e **Figura 37**), e o meio de cultura líquido Czapek não apresentou nenhum pico interferente (**Figura 32-B**).



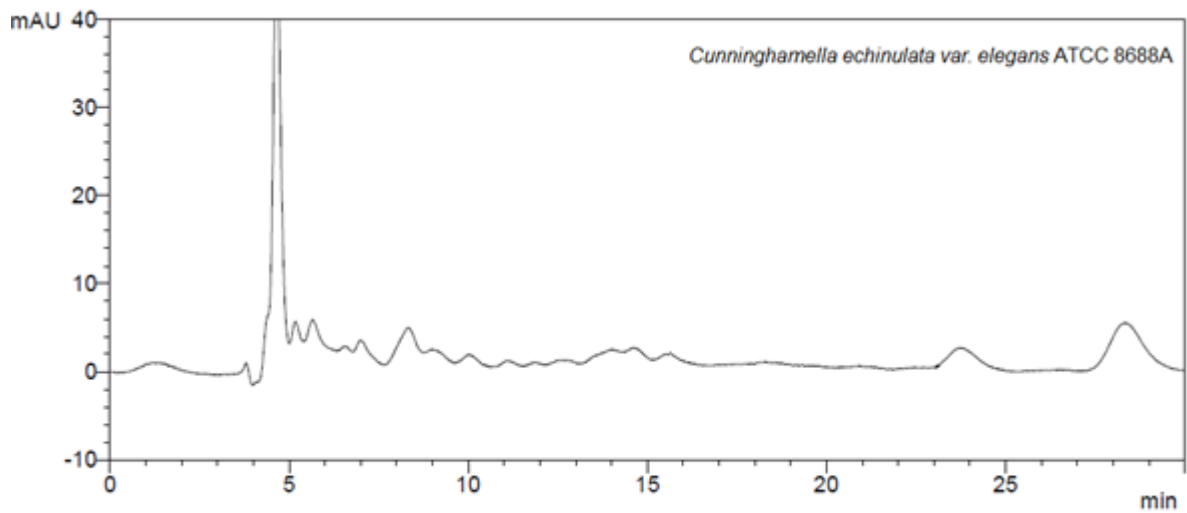
**Figura 33.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Papulaspora immersa* Hotson SS13. Condições de análise descritas na **Figura 17**. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3.



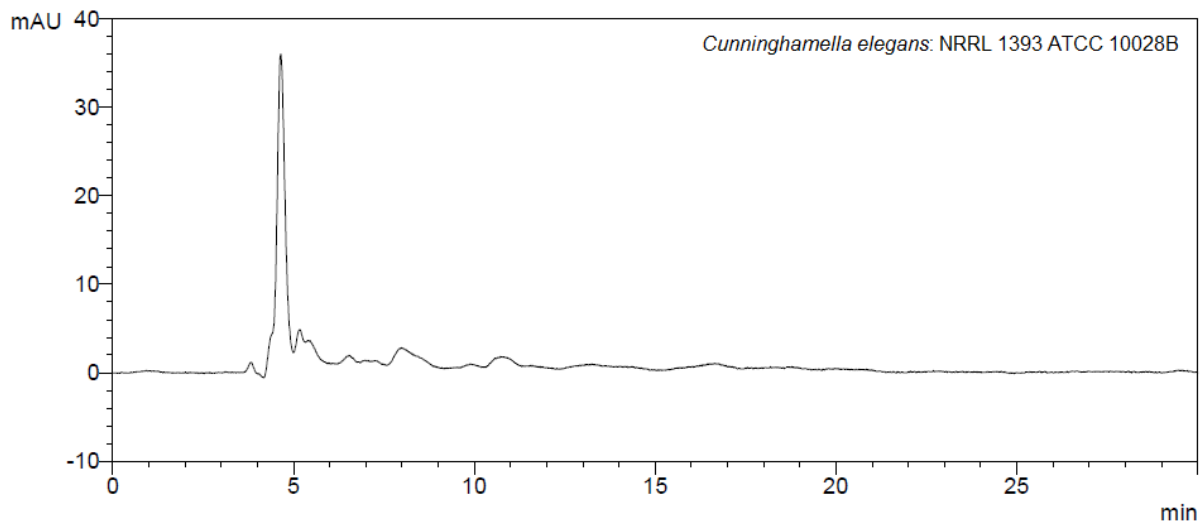
**Figura 34.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Mucor rouxii*. Condições de análise descritas na **Figura 17**. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3.



**Figura 35.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Fusarium oxysporum* SS50. Condições de análise descritas na **Figura 17**. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3.



**Figura 36.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A. Condições de análise descritas na **Figura 17**. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3.



**Figura 37.** Cromatograma relativo ao branco do fungo da espécie *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B. Condições de análise descritas na **Figura 17**. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3.

#### 4.5.6. Estabilidade

A estabilidade dos enantiômeros da fexofenadina foi avaliada durante ciclos congelamento e descongelamento, em temperatura ambiente (bancada) por 6 horas e por 24 horas no autoinjeter. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas, pois não foi observada degradação superior a 15%, avaliado através do E%, em relação à curva analítica recém-preparada simultaneamente, como pode ser observado na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Estabilidade dos enantiômeros da fexofenadina nos ciclos congelamento/descongelamento, bancada por 6 horas e autoinjeter por 24 horas em meio de cultura líquido Czapek.

Estabilidade	(-)-Fexofenadina		(+) -Fexofenadina	
<b>Ciclos congelamento e descongelamento</b>				
Concentração obtida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	3,70 <sup>c)</sup>	12,13 <sup>d)</sup>	3,34 <sup>c)</sup>	11,57 <sup>d)</sup>
Precisão (DPR) <sup>a)</sup>	11	4	7	10
Exatidão (ER, %) <sup>b)</sup>	-1,3	1,1	-11,0	-3,6
<b>Bancada por 6 hs</b>				
Concentração obtida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	3,87 <sup>c)</sup>	12,50 <sup>d)</sup>	4,21 <sup>c)</sup>	11,46 <sup>d)</sup>
Precisão (DPR) <sup>a)</sup>	7	4	7	4
Exatidão (ER, %) <sup>b)</sup>	3,2	4,2	12,2	-4,5
<b>Autoinjeter por 24 hs</b>				
Concentração obtida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	4,06 <sup>c)</sup>	13,60 <sup>d)</sup>	4,25 <sup>c)</sup>	13,37 <sup>d)</sup>
Precisão (DPR) <sup>a)</sup>	13	2	11	13
Exatidão (ER, %) <sup>b)</sup>	8,2	13,3	13,4	11,4

<sup>a)</sup> Expresso como coeficiente de variação percentual, CV; <sup>b)</sup> Expresso como erro relativo porcentual.

<sup>c)</sup> Concentração baixa =  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , <sup>d)</sup> concentração alta  $12,00 \mu\text{g mL}^{-1}$

#### 4.6. TESTE MIC

O ensaio MIC foi realizado com o objetivo de verificar qual a concentração máxima de fármaco que poderia ser adicionado no meio de biotransformação, sem que prejudicasse o crescimento dos fungos. Isso porque, no estudo piloto de biotransformação, foi adicionado 3 mg de TERF, porém sem o conhecimento se essa quantia pudesse interferir no crescimento dos fungos. Além disso, a pequena quantia de TERF adicionada ao meio dificultou a determinação de pequenas quantias de fexofenadina, que porventura fosse formada. Assim, antes do estudo completo de biotransformação, este ensaio foi feito para definir qual seria a nova quantidade de TERF a ser adicionado ao meio, sem que pudesse causar prejuízo ao crescimento dos fungos.

A **Figura 38** apresenta a foto das 2 placas que foram empregadas para o teste de MIC, e observa-se que houve crescimento dos fungos a partir do poço B, ou seja, em altas concentrações de TERF no meio ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e assim, foi adicionado 5 mg de TERF em 100 mL de meio Czapek ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Figura 38.** Foto mostrando as placas de 96 poços com os fungos, após incubação.

## 4.7. APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO NA BIOTRANSFORMAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DA TERFENADINA POR FUNGOS

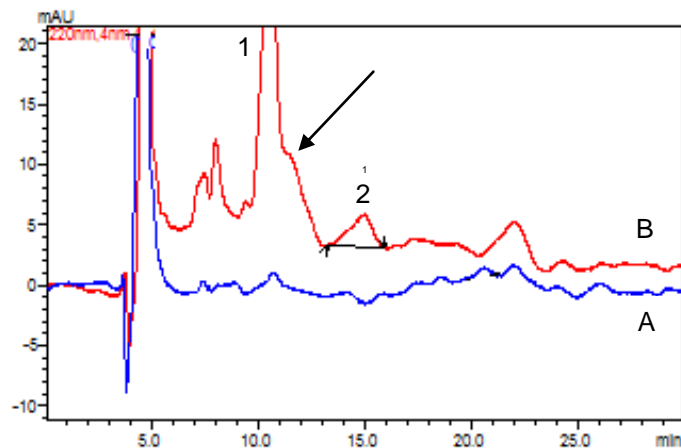
Sob as mesmas condições de incubação, conforme descrito na seção 3.5., sete fungos foram avaliados quanto à possível biotransformação da terfenadina (TERF) no seu respectivo metabólito, a fexofenadina (FEX).

As reações de biotransformação pelos fungos *Papulaspora immersa* Hotson SS13, *Penicillium crustosum* VR4, *Mucor rouxii*, *Nigrospora sphaerica* SS67, *Fusarium oxysporum* SS50, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B foram acompanhadas diariamente, durante 15 dias (360 horas). Alíquotas das amostras (4 mL) foram coletadas nos seguintes dias D0, D3, D6, D10 e D15. As amostras foram coletadas, extraídas por DLLME (conforme otimização descrita na seção 4.3) e analisadas pelo método validado em CLAE (conforme descrito na seção 4.5).

Dentre os sete fungos avaliados, somente os fungos *Fusarium oxysporum* SS50 e *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A apresentaram capacidade de biotransformar a terfenadina nas condições de incubação descrita nesse trabalho. A biotransformação pelo fungo *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B apresentou interferentes nos tempos de retenção dos analitos, sendo impossível inferir se houve ou não produção da fexofenadina por esse fungo.

### 4.7.1. *Fusarium oxysporum* SS50

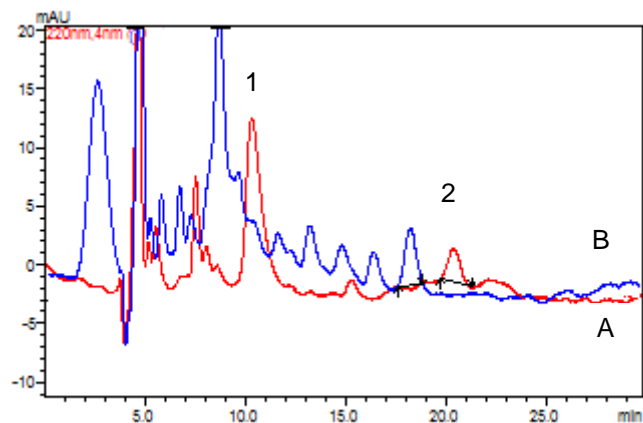
O fungo *Fusarium oxysporum* SS50 apresentou capacidade em biotransformar enantiosseletivamente a TERF no enantiômero (-) da FEX, sendo que a presença do enantiômero (-) ocorre em todo o período de incubação, exceto no primeiro dia (D0). A **Figura 39** representa o cromatograma após 360 horas de incubação. Não foi possível quantificar a quantidade formada, pois como pode ser observado no cromatograma, existe um interferente co-eluído com o padrão interno. Esse interferente não aparece nas amostras controle, o que indica ser um possível produto de elicitação devido à presença do fármaco no meio (DAAYF et al., 2003).



**Figura 39.** (A) Linha azul corresponde ao cromatograma do branco do fungo da espécie *Fusarium oxysporum* SS50, B) Linha vermelha corresponde ao cromatograma da análise do meio de biotransformação do fungo da espécie *Fusarium oxysporum* SS50 após o décimo quinto dia de incubação. Condições de análise descritas na **Figura 17**. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3. (1) Risperidona, (2) (-)-fexofenadina. A seta indica o interferente.

#### 4.7.2. *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A

A biotransformação da TERF em FEX pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A resultou na formação do enantiômero 2 FEX de 72 horas a 360 horas, sendo o resultado apresentado na **Figura 40**. A concentração aproximada observada foi de  $8,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 40.** (A) Linha azul corresponde ao cromatograma do branco do fungo da espécie *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A, B) Linha vermelha corresponde ao cromatograma da análise do meio de biotransformação do fungo da espécie *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A após o décimo quinto dia de incubação. Condições de análise descritas na **Figura 17**. Condições de extração por DLLME descritas no item 4.3. (1) Risperidona, (2) (+)-fexofenadina.



## 5. CONCLUSÕES

A separação dos enantiômeros da fexofenadina foi possível com a seguinte condição: coluna quiral Lux<sup>®</sup> cellulose-1, fase móvel constituída por água: metanol (35:65, v/v), 0,3% trietilamina e 0,4% ácido acético, empregando uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, com detecção em 220 nm. Tal feito representa o primeiro relato na literatura sobre a separação dos enantiômeros da fexofenadina por CLAE com uma coluna quiral a base de polissacarídeo (Lux<sup>®</sup> cellulose-1) e também a mais rápida já descrita (20 minutos), diferentemente do trabalho realizado por MIURA et al. (2007), cujo tempo de análise foi de aproximadamente 60 minutos.

Dentre as 2 técnicas de extração avaliadas, ambas demonstraram ser promissoras na etapa de preparação de amostras biológicas complexas, como o meio de cultura, porém a DLLME apresentou melhores resultados para a extração da fexofenadina, em comparação com a HF-LPME, já que a primeira técnica forneceu maiores valores de recuperação ( $\approx 45\%$  DLLME *versus*  $\approx 5\%$  HF-LPME), maior rapidez e facilidade na preparação das amostras. Apesar da DLLME ter proporcionado um maior valor de recuperação em relação a HF-LPME, essa quantia recuperada influenciou diretamente no limite de quantificação do método, não sendo possível atingir um limite baixo o suficiente que proporcionasse uma quantificação de pequenas quantias de fexofenadina, que porventura, fosse formada no processo de biotransformação.

Em relação ao estudo de biotransformação, somente o fungo *Fusarium oxysporum* SS50 e *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A apresentaram potencial para biotransformação da terfenadina em fexofenadina nas condições de incubação empregadas nesse trabalho. Mudanças nas condições de biotransformação como: aumento no tempo de incubação, troca de fonte de carbono do meio e aumento da agitação do meio de cultura (favorecendo uma melhor aeração) podem favorecer a biotransformação da fexofenadina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL, J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v.1, p.753-768, 2002.

ALI, I.; KUMERER, K.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Mechanistic Principles in Chiral Separations Using Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 63, n. 7/8, p. 295-307, 2006.

ANDRUCH, V.; ACEBAL, C.C.; ŠKRLÍKOVÁ, J.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P.; BALOGH, I.S.; BILLES, F.; KOCÚROVÁ, L. Automated on-line dispersive liquid-liquid microextraction based on a sequential injection system. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 100, p.77-82, 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/terfenadina.htm>> Acesso em: 10 fev. 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 06 de março de 2013.

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

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

BARGMANN-LEYDER, N.; TAMBUTÉ, A.; CAUDE, M. A comparison of LC and SFC for cellulose and amylose-derived chiral stationary phases. **Chirality**, Malden, v.7, p.311-325, 1995.

BARTH, T.; PUPO, M.T.; BORGES, K.B.; OKANO, L.T.; BONATO, P.S. Stereoselective determination of midodrine and desglymidodrine in culture medium: application to a biotransformation study employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, Malden, v.31, p.1512-1528, 2010.

BARTH, T.; CONTI, R.; PUPO, M.T.; OKANO, L.T.; BONATO, P.S. Chiral HPLC analysis of donepezil, 5-O-desmethyl donepezil and 6-O-desmethyl donepezil in culture medium: application to fungal biotransformation studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Washington, v.404, p.257-266, 2012.

BARTH, T. Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos [tese de doutorado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2012.

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

BOCATO, M.Z. Avaliação de modelos microbiológicos e modelos biomiméticos no metabolismo estereosseletivo da risperidona por cromatografia líquida de alta eficiência [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2012.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; DE GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.4, p.683-691, 2005.

BORGES, K.B. Análise estereosseletiva da tioridazina e seus principais metabólitos: um estudo cinético de biotransformação empregando fungos [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

BORGES, K.B.; DURAN-PATRON, R.; SÁNCHEZ, A.J.M.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S.; COLLADO, I.G. Fast HPLC analysis of omeprazole, 5-hydroxyomeprazole and omeprazole sulfone in liquid culture medium using a monolithic column for application in biotransformation studies with fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.22, n.6, p.1140-1149, 2011.

CAMELO-NUNES, I.C. Novos anti-histamínicos: uma visão crítica. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v.82, n.5, p.S173-S180, 2006.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A.L.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. pH-controlled dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 754, p. 61– 66, 2012.

CANER, H.; GRONER, E.; LEVY, I. Trends in the development of chiral drugs. **Drug Discovery Today**, Oxon, v.9, n.3, p. 105-110, 2004.

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

CARRO, A.M.; FERNÁNDEZ, S.; RACAMONDE, I.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, D.; GONZÁLEZ, P.; LORENZO, R.A. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with programmed temperature vaporization-large volume injection-gas chromatography-tandem mass spectrometry for multiclass pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1253, p. 134-143, 2012.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; CASSIANO, N. The use of a polysaccharidebased column on multimodal elution. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v.23, p.1029-1038, 2000.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n.4, p. 1021-1030, 2009.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. 3ª ed., Campinas, Editora Unicamp, Inc., cap. IX, p.289-293, 2010.

COSTA, E.M.M.B.; PIMENTA, F.C.; LUZ, W.C.; DE OLIVEIRA, V. Selection of filamentous fungi of the *Beauveria* genus able to metabolize quercetin like mammalian cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.2, p.405-408, 2008.

DAAYF, F.; EL BELLAJ, M.; EL HASSNI, M.; J'AITI, F.; EL HADRAMI, I. Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture medium. **Environmental and Experimental Botany**, v.49, p. 41-47, 2003.

DALGLIESH, C.E. The Optical Resolution of Aromatic Amino-acids on Paper Chromatograms. **Journal of the Chemical Society**, p.3940-3942, 1952.

DARIAS, J.L.; HERNÁNDEZ, M.G.; PINO, V.; AFONSO A.M. Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, p. 1611-1618, 2010.

DAVIS, P.J. Microbial models of mammalian drug metabolism. **Developments in Industrial Microbiology**, Washington, v.29, p.197-291, 1988.

DE FREITAS, A.F. Caracterização e aplicação da fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2009.

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

DE OLIVEIRA, D.C. Desenvolvimento e Validação de métodos para avaliação de cloridrato de Fexofenadina [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2006.

DE OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHAES, I.R.S.; 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.637-644, 2008.

DE OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n. 3, p. 742-756, 2009.

EBRAHIMZADEH, H.; YAMINI, Y.; KAMAREI, F. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography for the analysis of nitroaromatic compounds in water. **Talanta**, Amsterdam, v.79, n.5, p.1472-1477, 2009.

FDA – Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, 2001.

FERREIRA, F.G.; POLLI, M.C.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRACETO, L.F. Fármacos: Do desenvolvimento à retirada do mercado. **Revista Eletrônica de Farmácia**, São Paulo, v.VI, n.1, p.14-24, 2009.

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

FORTES, S.S. Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da Hidroxizina e obtenção do metabólito quiral e ativo Cetirizina [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2013.

GALLO, M.B.C.; CHAGAS, F.O.; ALMEIDA, M.O.; MACEDO, C.C.; CAVALCANTI, B.C.; BARROS, F.W.A.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; BASTOS, J.K.; PUPO, M.T. Endophytic fungi found in association with *Smilax sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, v. 49, p. 142-151, 2009.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1221, p.1-7, 2012.

HARAGUCHI, T.; CARVALHO, P.B. Fexofenadina, novo anti-histamínico H1 da terceira geração. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v.59, p.647-650, 2002.

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

IKAI, T.; YAMAMOTO, C.; KAMIGAITO, M.; OKAMOTO, Y. Immobilized-type chiral packing materials for HPLC based on polysaccharide derivatives. **Journal of Chromatography B**, Malden, v.875, p. 2–11, 2008.

ILISZ, I.; BERKECZ, R.; PETER, A. HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v.29, p.1305-1321, 2006.

ILISZ, I.; BERKECZ, R.; PETER, A. Retention mechanism of HPLC enantioseparations on macrocyclic glycopeptides-based chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1216, p.1845-1860, 2009.

IZAKE, E.L. Chiral Discrimination and stereoselective analysis of drugs: An Overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Queensland, v.96, n.7, p.1659-1676, 2007.

JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Biotransformação de Limoneno: Uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, São Paulo, v.30, p.382-387, 2007.

KALÍKOVÁ, K.; RIESOVÁ, M.; TESAŘOVÁ, E. Recent chiral selectors for separation in HPLC and CE. **Central European Journal of Chemistry**, v.10, n. 3, p.450-471, 2012.

KOCÚROVÁ L.; BALOGH, I.S.; ŠANDREJOVÁ, J.; KOCÚROVÁ, V.A.L. Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 102, p. 11–17, 2012.

KOKOSA, J.M. Advances in solvent microextraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v. 43, p.1-13, 2013.

LAMMERHOFER, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1217, n. 6, p. 814-856, 2010.

LEE, J.; LEE, H.K.; RASMUNSEN, K.E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.624, p.253-268, 2008.

LOURENÇO, T.C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.10, p. 2155-2164, 2010.

MACIÁ-VICENTE, J.G.; JANSSON, H.B.; ABDULLAH, S.K.; DESCALS, E.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L.V. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environment with special reference to *Fusarium* ssp. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Ecology**, London, v.66, p.90-105, 2008.

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**, v.1, p.11-17, 2009.

MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y.V. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar organic solvent chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1111, n.1, p. 48-61, 2006<sup>1</sup>.

MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y.V. Chiral separation strategy in polar organic solvent chromatography and performance comparison with normal-phase liquid and supercritical fluid chromatography. **Journal of Separation Science**, v.29, n.10, p. 1353-1362, 2006<sup>2</sup>.

MAZIER, C.; JAOUEN, M.; SARI, M.A.; BUISSON, D. Microbial oxidation of terfenadine and ebastine into fexofenadine and carebastine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Paris, v.14, p.5423-5426, 2004.

MAZIER, C.; LOMBARD, M.; SARI, M.A.; BUISSON, D. Oxidation of terfenadine by *Streptomyces platensis*: Influence of culture medium on metabolite formation. **Biocatalysis and Biotransformation**, Paris, v.25, n.5, p.401-407, 2007.

MENG, L.; WANG, B.; LUO, F.; SHEN, G.; WANG, Z.; GUO, M. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples. **Forensic Science International**, Clare, v.209, p.42-47, 2011.

MIKUS, P.; VALÁSKOVÁ, I.; HAVRÁNEK, E. Determination of fexofenadine in tablets by capillary electrophoresis in free solution and in solution with cyclodextrins as analyte carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Bratislava, v.31, p.795-801, 2005.

MISLANOVÁ, C.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.797, p. 91-109, 2003.

MIURA, M.; UNO, T.; TATEISHI, T.; SUZUKI, T. Determination of fexofenadine enantiomers in human plasma with high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.43, p.741-745, 2007.

MORI, K. Bioactive natural products and chirality. **Chirality**, New York, v.23, n.6, p.442-462, 2011.

MUDIAM, M.K.R.; JAIN, R.; MAURYA, S.K.; KHAN, H.A.; BANDYOPADHYAY, S.; MURTHY, R.C. Low density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-electron capture detection for the determination of cypermethrin in tissues and blood of cypermethrin treated rats. **Journal of Chromatography B**, Malden, v.895-896, p.65-70, 2012.

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, n.7, p.771-787, 2011.

OJEDA, C.B.; ROJAS, F.S. Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure: A Review. **Chromatographia**, Heidelberg, v.69, p.1149-1159, 2009.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamate and benzoates as chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 666, p.403-419, 1994.



OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharides derivatives for chromatography separation of enantiomers. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v.37, n. 8, p.1020-1043, 1998.

OKAMOTO, Y.; IKAI, T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. **Chemical Society Reviews**, v.37, p.2593-2608, 2008.

OUARRADI, A.; LOMBARD, M.; BUISSON, D. Biooxidation of methyl group: Part 2. Evidences for the involvement of cytochromes P450 in microbial multistep oxidation of terfenadine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Paris, v.67, p. 172-178, 2010.

PAAKKARI, I. Cardiotoxicity of new antihistamines and cisapride. **Toxicology Letters**, v.127, p.279-284, 2002.

PATAJ, Z.; ILISZ, I.; BERKECZ, R.; FORRÓ, E.; FÜLÖP, F.; PÉTER, A. Comparison of Separation Performances of Amylose- and Cellulose-Based Stationary Phases in the High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of Stereoisomers of  $\beta$ -Lactams. **Chirality**, Malden, v. 22, p. 120–128, 2010.

PEDERSEN-BJEGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-Liquid-Liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v.71, p.2650-2656, 1999.

PENG, L.; JAYAPALAN, S.; CHANKVETADZE, B.; FARKAS, T. Reversed-phase chiral HPLC and LC/MS analysis with tris (chloromethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose and amylose as chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1217, p.6942-6955, 2010.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v.22, n.10, 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.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Análise de fármacos em material biológico: Acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p.880-886, 2005.

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

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; ESRAFILI, A.; SHAMSIPUR, M. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1216, p.1511-1514, 2009.

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

RODRÍGUEZ, D.A.; BLANCO, C.C.; CAMPAÑA, A.M.G. Dispersive liquid-liquid microextraction prior to field-amplified sample injection for the sensitive analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, phencyclidine and lysergic acid diethylamide by capillary electrophoresis in human urine. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1267, p. 189-197, 2012.

RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, M.C.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, G. Enantioselective Analyses of Antihistaminic Drugs by High-Performance Liquid Chromatography. **Chromatographia**, Heidelberg, v.60, n. 1/2, p.99-103, 2004.

SCIFINDER WEB. Disponível em: <http://scifinder.cas.org>. Acesso em: 14 nov. 2011.

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

SHI, Z.G.; LEE, K. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with Dispersive  $\mu$ -Solid-Phase Extraction for the Fast Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Water Samples. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 1540-1545, 2010.

SILVA JUNIOR, I.J.; VEREDAS, V.; SANTOS, M.A.G.; SANTANA, C.C. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantioméricas puras ou enriquecidas em larga escala. **Química Nova**, São Paulo, v.29, p.1027-1037, 2006.

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.; DOLAN, J.W. Introduction to modern liquid chromatography. 3<sup>a</sup> Ed. **John Wiley & Sons**. p.681-715, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/quiral.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2013.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Organic Chemistry. 7 ed., New York, Jonh Wiley & Sons, Inc., cap. 5, p.184-210, 2000.

TACHIBANA, K.; OHNISH, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.906, p.127-154, 2001.

VUCKOVIC, D.; CUDJOE, E.; MUSTEATA, F.M.; PAWLISZYN, J. Automated solid phase microextraction and thin-film microextraction for hig-throughput analysis of biological fluids and ligand-receptor binding studies. **Nature protocols**, v.5, p.140-161, 2010<sup>1</sup>.

VUCKOVIC, D.; ZHANG, X.; CUDJOE, E.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction in bioanalysis: new devices and directions. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam v.1217, p.4041-4060, 2010<sup>2</sup>.

WARD, T.J.; FARRIS, A.B. Chiral separations using macrocyclic antibiotics: a review. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 906, p. 73-89, 2001.

WARD, T.J. Chiral separations. **Analytical Chemistry**, Washington, v.78, p.3947-3956, 2006.

WILLE, S.M.R.; LAMBERT, W.E.E. Recent developments in extraction procedures relevant to analytical toxicology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Washington, v.388, p.1381-1391, 2007.

YAO, M.; SRINIVAS, N.R. Quantification of fexofenadine in biological matrices: a review of bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v.26, p.942-961, 2012.

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.906, p.105-125, 2001.

YE, C.L.; LIU, Q.L.; WANG, Z.K.; FAN, J. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of three triazole derivatives in environmental water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Oxon, v. 20, p. 1176-1186, 2012.

ZANG, X.H.; WU, K.H.; ZHANG, M.Y.; XI, G.H.; WANG, Z. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, China, v.37, n.2, p.161–168, 2009.

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

ZHANG, T.; NGUYEN, D.; FRANCO, P.; MURAKAMI, T.; OHNISHI, A.; KUROSAWA, H. Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on silica: A new chiral stationary phase for the analysis of enantiomers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 557, p. 221–228, 2006.