

**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**

Á 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

## LISTA DE TABELAS

- 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;)..... 10
- Tabela 2.** Lista de colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos disponíveis comercialmente. Adaptado de BOCATO, 2012 (LOURENÇO et al., 2010; BARTH, 2012)..... 12
- Tabela 3.** Estudos de biotransformação enantiosseletiva com fungos. ....22

**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

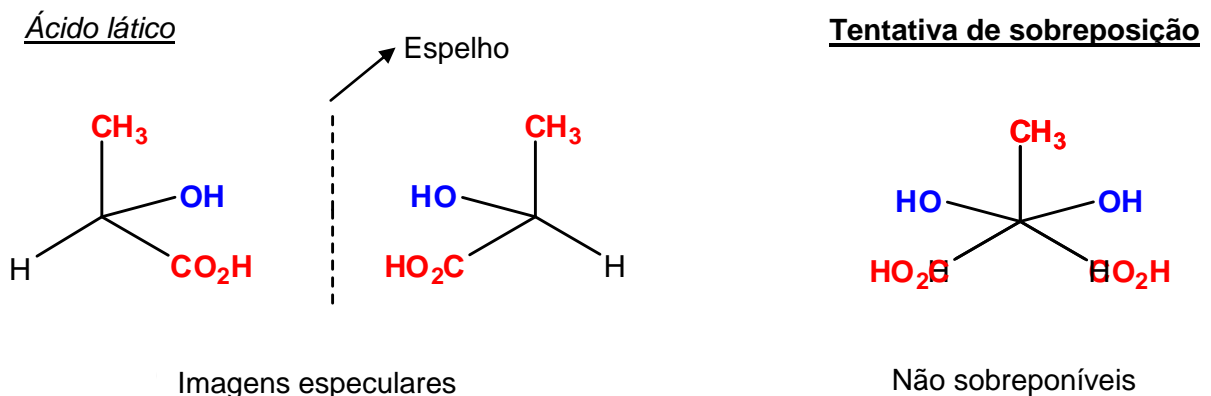
## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	v
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. CONCLUSÕES .....	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

## 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).

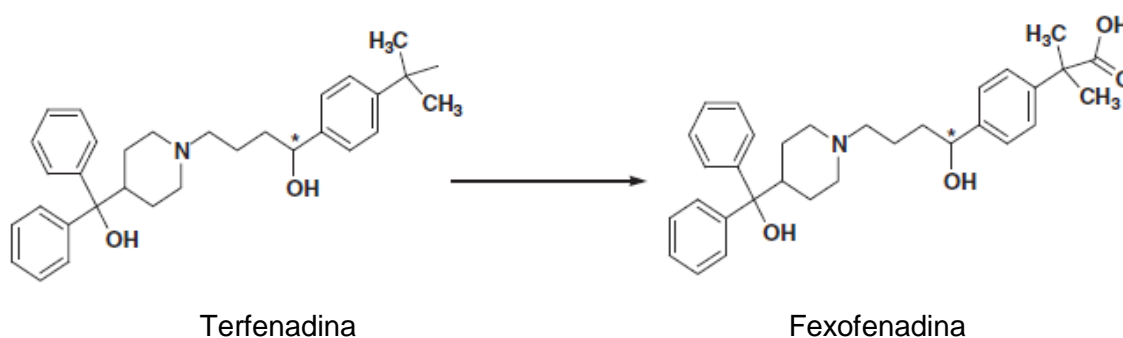
Frente a esses aspectos, algumas mudanças ocorreram na legislação referente ao desenvolvimento de fármacos, sendo que órgãos regulamentadores internacionais, como o FDA (“*Food and Drug Administration*”), tornaram as legislações mais rigorosas tanto no desenvolvimento de fármacos quirais, como no seu 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

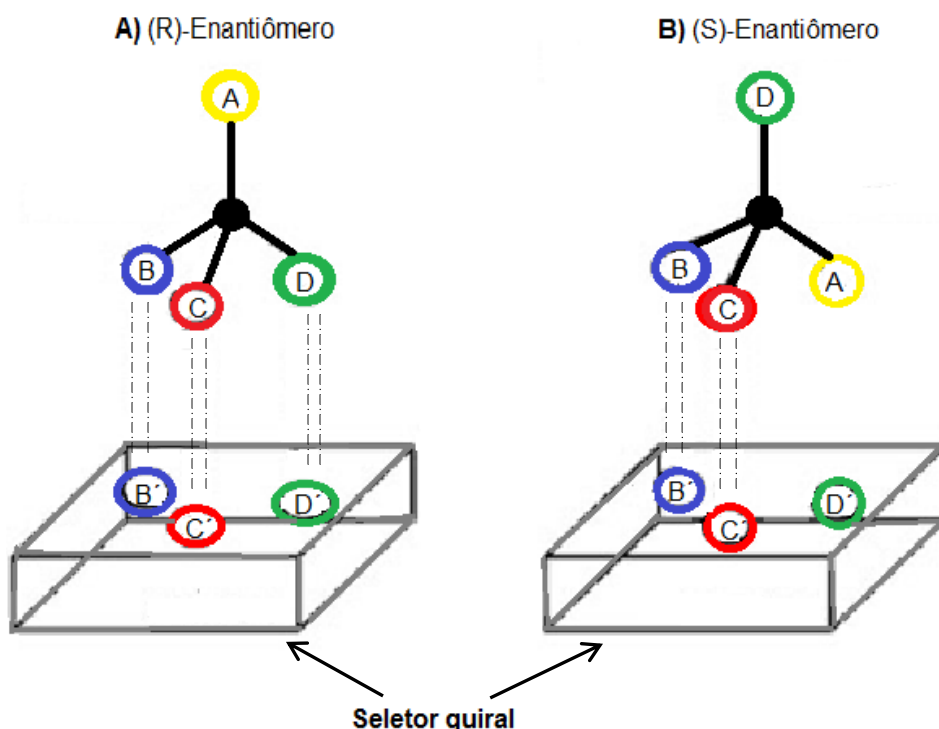
A separação enantiomérica por CLAE vem sendo muito utilizada devido à robustez, facilidade operacional e versatilidade desta técnica. Estas separações podem ser feitas a partir de métodos diretos ou indiretos de análise. Apesar do seu atual desuso, o método indireto consiste no emprego de reagentes de 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 seletores 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 seletores 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.

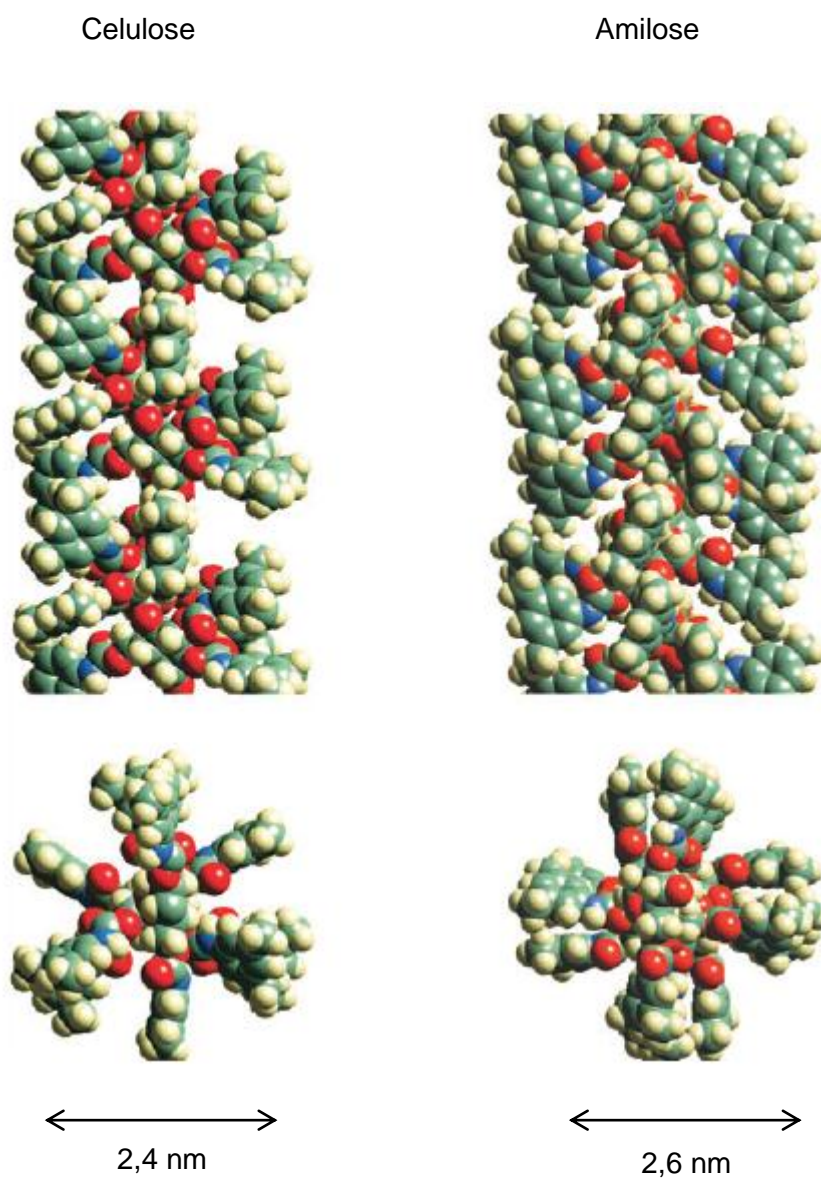
#### 1.3.1.1. Fases estacionárias derivadas de polissacarídeos

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
Chirobiotic T	Teicoplanina	100 Å	5 µm
Chirobiotic T2	Teicoplanina	200 Å	5 µm
Chirobiotic TAG	Teicoplanina aglicona	100 Å	5 µm
Chirobiotic V	Vancomicina	100 Å	5 µm
Chirobiotic V2	Vancomicina	200 Å	5 µm
Chirobiotic R	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**

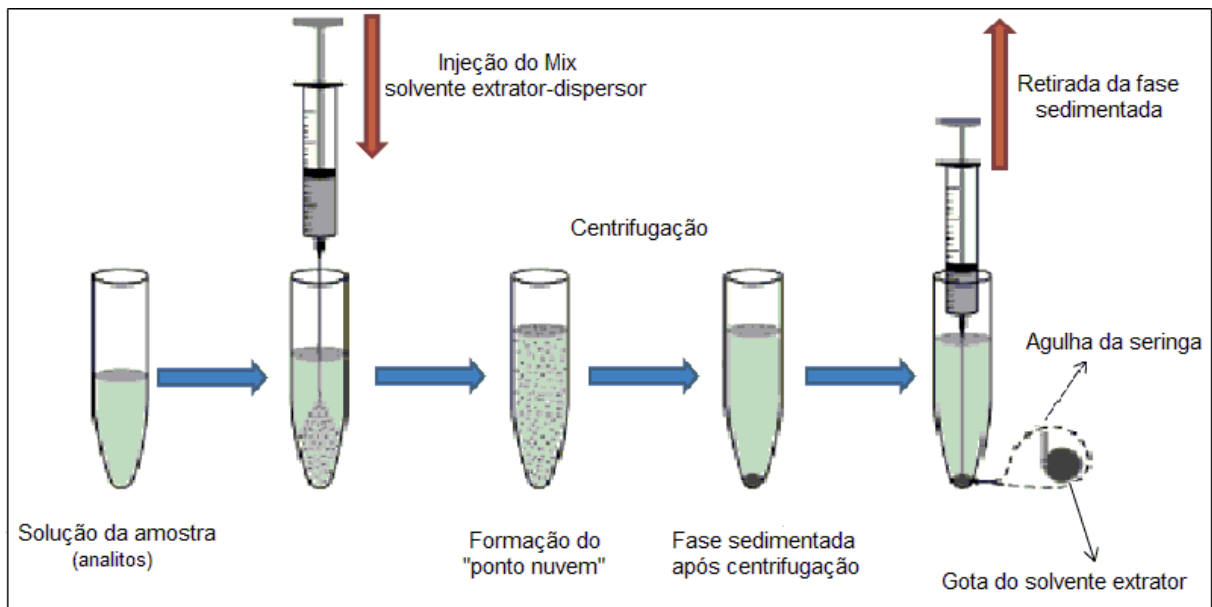
A DLLME é uma técnica rápida, barata, simples, com um alto fator de enriquecimento, baixo consumo de amostra e, que tem se tornado um método de preparo de amostra muito popular e muito atraente do ponto de vista ambiental (REZAEI et al., 2006; EBRAHIMZADEH et al., 2009; OJEDA e ROJAS, 2009; ZANG et al.,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

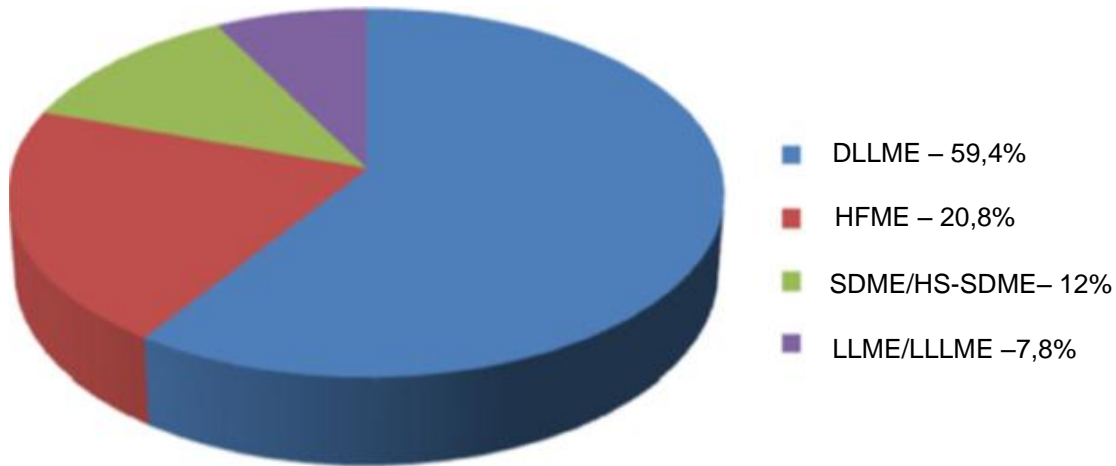
Vale destacar que a turbulência (ponto nuvem), produzida pela injeção rápida da mistura de solventes na fase aquosa contendo o analito, permite a formação de pequenas gotículas (aumento considerável da área de superfície), que rapidamente atingem o estado de equilíbrio e conferem a esta técnica a sua 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

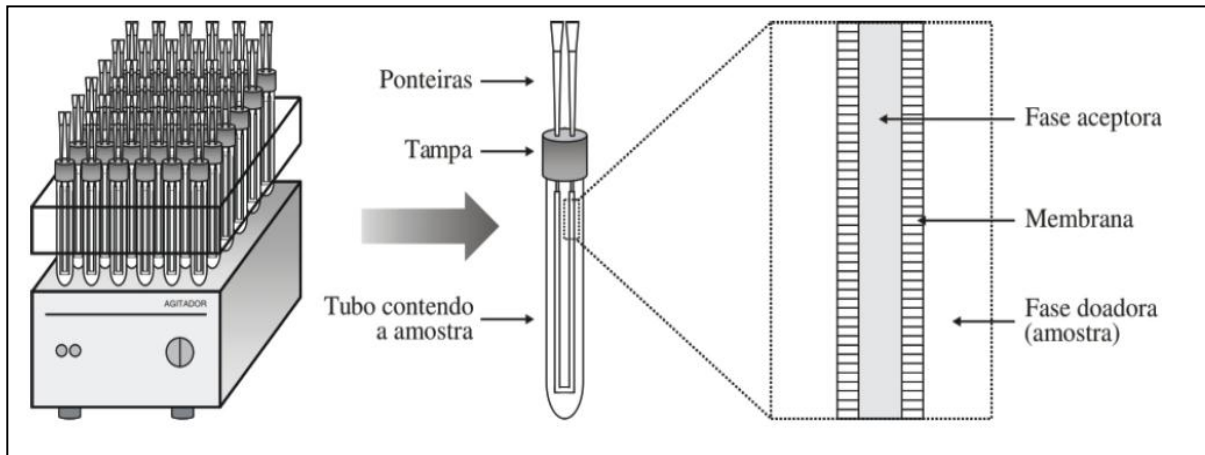
Introduzida em 1999 por Pedersen-Bjegaard e Rasmussen, a HF-LPME (ou microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas) pode ser considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes, unindo conceitos de extração com membranas e a extração líquido-líquido (PEDERSEN-BJEGAARD 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 aceptora é coletada e então analisada (DE OLIVEIRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009).



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

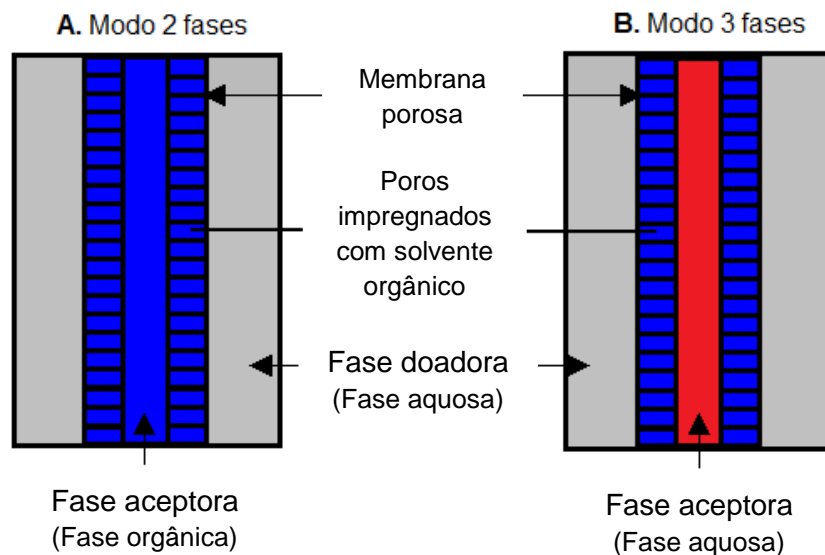
Dentre as vantagens desta técnica, destacam-se: i) baixo custo por unidade de extração, ii) baixo consumo de solvente orgânico, iii) compatibilidade com uma grande variedade de amostras biológicas, iv) fornece recuperações de média a elevada, v) alto enriquecimento dos analitos e vi) simplicidade. Devido 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 aceptora (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 aceptora) 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).

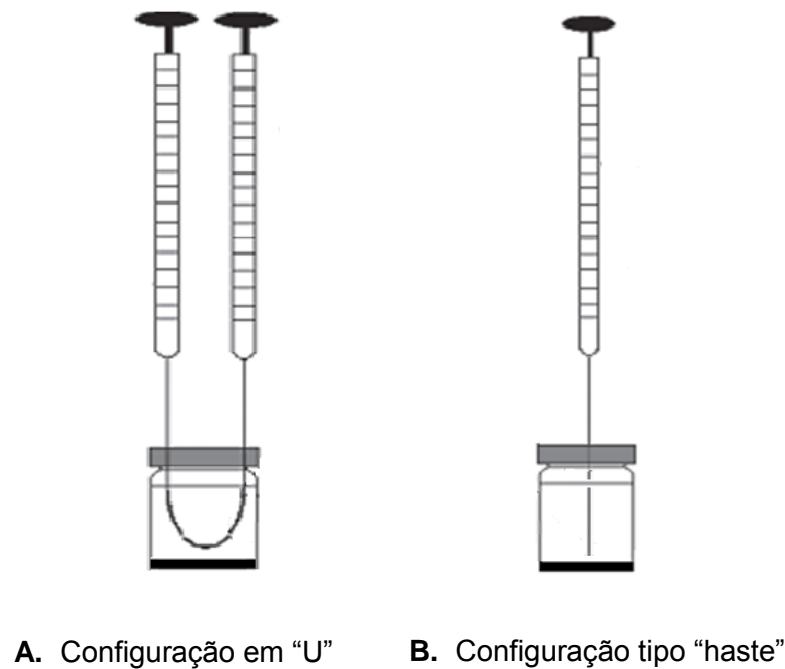
Para ambos os modos, o pH da fase doadora deve ser ajustado, de forma a manter o analito na sua forma não ionizada enquanto estiver na fase doadora (para permitir a extração) (PSILLAKIS e KALOGERAKIS, 2003; BARTH, 2012).

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).



**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. 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.

### 3. 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, John Wiley & Sons, Inc., cap. 5, p.184-210, 2000.

TACHIBANA, K.; OHNISHI, 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 high-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.