UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus
metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com
fungos**

Thiago Barth

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Thiago Barth

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Coorientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-graduação em 27/03/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Barth

Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli
Bonato

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatórias

**Dedico este trabalho a minha esposa Vanessa e aos meus pais
Renato e Maria.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, pelos momentos difíceis que ensinam e os alegres que revigoram.

À minha amiga e esposa Vanessa pelo carinho e vida compartilhada, não parece, mas passaram-se 11 anos. Agradeço também, pelo desprendimento e coragem ao aceitar minha proposta, abandonando trabalho e a segurança e convívio da família, em busca deste sonho.

Aos meus pais Renato e Maria Dolores pela vida, carinho, incentivo e esforço para me proporcionar a melhor educação possível.

Aos meus sogros Maria Corina e Aristides por haverem gerado minha companheira e pelo incentivo e apoio incondicionais.

Agradeço especialmente a Profa. Pierina, pelo privilégio em ser seu orientado, pelos ensinamentos e convívio com uma das pessoas mais justas e competentes que tive o prazer de conhecer. Desejo muita saúde, paz e alegria para ti e tua família. Muito obrigado!

À Profa. Mônica Tallarico Pupo pela co-orientação e indispensável contribuição ao desenvolvimento deste projeto.

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.

Aos colegas pós-graduandos do CROEC, Anderson, Fernando, Igor, Keyller, Leandro, Milena, Patrícia, Rodrigo pelos bons momentos, ajuda e pela troca de experiências e conhecimento.

Aos colegas funcionários do CROEC, Luciana, Roberto e Valquíria pela amizade e suporte para a execução deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Química de micro-organismos da FCFRP pelo auxílio e ensinamentos durante os experimentos de biotransformação, em especial a Cláudia, Denise, Fernanda, Marília, Raphael e Warley.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física e Química.

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

Ao Prof. Isidro González Collado pela oportunidade de realização e supervisão durante o estágio de Doutorado Sanduíche.

Ao professor, Luiz Fernando Lopes Guimarães pela amizade e ensinamentos.

Aos Profs. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira Cristiane Masetto de Gaitani pela amizade, ensinamentos e disponibilização de seus laboratórios.

Aos Profs. Drs. Antonio José Macías Sanchez, Josefina Aleu Casatejada, Rosa Durán Patrón e Rosário Hernández Galán pelas orientações nos experimentos de microbiologia.

Aos colegas do laboratório de Química Orgânica da Universidad de Cádiz, Ana Ligia, Antonio, Beatriz, Cristina, Eugenia, Javier Moraga, Javier Barúa, José, José Manuel, Maria Jesús, Marraiana, Michelli, Raphael.

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 Doutorado sanduíche.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

BARTH, T. **Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos.** 2012. 242f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O uso de fungos na biotransformação estereosseletiva de fármacos pode constituir-se em uma excelente alternativa à síntese assimétrica para obtenção de metabólitos, bem como aos estudos de biotransformação *in vivo* e *in vitro* convencionais. Neste trabalho foram empregados fungos isolados de órgãos internos de plantas, classificados como endofíticos, fungos fitopatógenos, bem como, fungos adquiridos de coleções de micro-organismos. Esses fungos foram empregados no estudo da biotransformação estereosseletiva dos fármacos midodrina, bufuralol e donepezila. Estes fármacos foram selecionados por produzirem metabólitos ativos nos processos de biotransformação em humanos. Para o monitoramento da formação dos metabólitos dos fármacos foi necessário desenvolver e validar métodos analíticos com características adequadas para essa aplicação. Para determinação enantiosseletiva da midodrina e seu metabólito empregou-se a eletroforese capilar, enquanto que para a determinação aquiral empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência. Para avaliar a biotransformação estereosseletiva do bufuralol e donepezila foram desenvolvidos métodos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência. Os dados referentes ao estudo de cada fármaco são apresentados em quatro capítulos. O primeiro capítulo apresenta os resultados obtidos no desenvolvimento de um método empregando a eletroforese capilar para a determinação enantiosseletiva de midodrina e seu metabólito desglímidodrina (DMAE) em meio de cultura Czapek. As análises foram realizadas em capilar de sílica de 50 μm de diâmetro interno e com comprimento efetivo de 40 cm, utilizando 30 mmol L^{-1} de trimetil- β -ciclodextrina dissolvida em solução de acetato de sódio 70 mmol L^{-1} , pH 5, como tampão de análise. A técnica de preparação das amostras empregada foi a extração líquido-líquido. O método foi validado, mostrando linearidade na faixa de concentração de 100 – 12000 ng mL^{-1} , com coeficientes de correlação linear ≥ 0.9975 . Os resultados de precisão e exatidão foram inferiores a 15% e a robustez do método foi avaliada através de um planejamento fatorial fracionário. O método foi aplicado em um estudo de biotransformação usando fungos endofíticos. Foram avaliados oito fungos com destaque para o fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) que biotransformou 21,3% da (+)-midodrina em (+)-DMAE e 2,4% da (-)-midodrina em (-)-DMAE, em 72 h de biotransformação, apresentando um excesso enantiomérico de 79,7%. O segundo capítulo apresenta os resultados obtidos no desenvolvimento de um método cromatográfico para a determinação de midodrina e DMAE em meio de cultura Czapek-Dox. As análises foram realizadas no modo reverso de eluição empregando uma coluna Lichrospher 100 RP 18 e fase móvel composta por acetonitrila:ácido fórmico 40 mmol L^{-1} (60:40, v/v), vazão de 1,4 mL min^{-1} e detecção em 290 nm. O preparo de amostras empregado foi a extração líquido-líquido, usando acetato de etila como solvente extrator. O método foi validado na faixa de concentração de 0,4 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficientes de correlação linear superiores

a 0,9997. Este método foi aplicado em um estudo de biotransformação da midodrina empregando o fungo endofítico *Papulaspora immersa* e duas linhagens do fitopatógeno *Botrytis cinerea* (UCA 992 e 2100). Entre os fungos estudados, o *Botrytis cinerea* 2100, em condição de agitação, apresentou o maior percentual de biotransformação da midodrina em DMAE (42,2% em 48 h). Além disso, nos cromatogramas referentes a biotransformação em condição estática, pelos fungos *Papulaspora immersa* e *Botrytis cinerea* 2100, foi observada a presença de picos adicionais não observados nos controles realizados. Estes fungos foram submetidos à biotransformação em escala ampliada, em condição estática, a partir das quais foram isolados DMAE de ambos os fungos e um derivado desaminado da midodrina (*Botrytis cinerea* 2100). No terceiro capítulo são apresentados os resultados obtidos com o desenvolvimento de um método para a determinação estereosseletiva do bufuralol e seus metabólitos 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol em meio Czapek, usando a coluna Chiralcel OD-H no modo normal de eluição. As demais condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel constituída por hexano:isopropanol:metanol (97,5:2,0:0,5; v/v/v) acrescidos de 0,5% de dietilamina, vazão 1,5 mL min⁻¹ e detecção no UV em 248 e 273 nm. A microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca em três fases foi usada como procedimento de preparação das amostras. As condições empregadas na extração foram: fase doadora em pH 13 ajustado com NaOH 2 mol L⁻¹, *n*-octanol como solvente orgânico, fase aceptora constituída por ácido acético 0,2 mol L⁻¹, tempo de extração de 30 min e velocidade de agitação de 1750 rpm. Os valores de recuperação do método ficaram na faixa de 50 – 69%. O método foi aplicado em um estudo piloto de biotransformação com cinco espécies de fungos endofíticos. Nenhum dos fungos estudados biotransformou o bufuralol em 1'-oxobufuralol e/ou 1'-hidroxibufuralol e, devido a isso, o método desenvolvido não foi validado. O quarto capítulo mostra os resultados obtidos com o desenvolvimento de um método empregando a cromatografia líquida de alta eficiência na determinação enantiosseletiva da donepezila, 5-*O*-desmetil donepezila e 6-*O*-desmetil donepezila em meio de cultura Czapek. As análises foram realizadas na coluna Chiralpak AD-H no modo normal de eluição. As demais condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel constituída por hexano:etanol:metanol (75:20:5, v/v/v) acrescido de 0,3% de trietilamina, vazão 1,5 mL min⁻¹ e detecção no UV em 270 nm. A técnica de preparação das amostras foi a extração líquido-líquido e o solvente extrator foi o acetato de etila. O método descrito foi validado, mostrando linearidade na faixa de concentração de 100 – 10000 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da donepezila ($r \geq 0,9985$) e 100 – 5000 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da 5-*O*-desmetil donepezila e 6-*O*-desmetil donepezila ($r \geq 0,9951$). Os valores de recuperação foram superiores a 90% para todos os analitos. O método foi aplicado em um estudo de biotransformação usando fungos. Foram avaliados cinco fungos endofíticos e os fungos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e *Beauveria bassiana* ATCC 7159. Os fungos endofíticos não desmetilaram a donepezila nas condições estudadas, entretanto, esta reação foi catalisada pelo fungo *B. bassiana* que biotransformou predominantemente 8,3% da donepezila em (-)-(R)-5-*O*-desmetil donepezila (ee, 60,6%), enquanto que o fungo *C. elegans* apresentou biotransformação enantiosseletiva da donepezila em (-)-(R)-6-*O*-desmetil donepezila (ee, 100%) com um rendimento de 15,1%. Os dados aqui apresentados demonstram que biotransformações com fungos são uma importante alternativa para mimetizar a biotransformação em mamíferos e para a obtenção de metabólitos de fármacos, especialmente na forma de enantiômeros puros.

Palavras-chave: Análise estereosseletiva, Biotransformação, Bufuralol, Donepezila, Fungos, Midodrina

ABSTRACT

BARTH, T. **Stereoselective analysis of bufuralol, donepezil, midodrine and its metabolites and applications in biotransformations studies with fungi.** 2012. 242f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Drug biotransformations using fungi are considered an alternative approach to the asymmetric synthesis and conventional *in vivo* and *in vitro* metabolism studies. In this work, endophytic fungi isolated from health internal plant organs, phytopathogenic fungi and fungi purchased from ATCC were used to study the stereoselective biotransformation of midodrine, bufuralol and donepezil drugs. These drugs were selected because the biotransformation process in humans results in active metabolites. To evaluate the metabolite formation during the biotransformation study, suitable analytical methods were required. The midodrine biotransformation was evaluated under chiral and achiral conditions. For the enantioselective determination of midodrine, a capillary electrophoresis method was used, whereas the achiral determination of this drug and its metabolite was carried out by liquid chromatography. The determination of the other drugs was performed by chiral liquid chromatography. The results of each studied drug are presented in four chapters. In the first chapter, a capillary electrophoresis method was described for the stereoselective determination of midodrine and desglymidodrine (DMAE) in Czapek culture medium to be applied to a stereoselective biotransformation study employing endophytic fungi. The electrophoretic analyses were performed using an uncoated fused-silica capillary and 70 mmol L⁻¹ sodium acetate buffer solution (pH 5.0) containing 30 mmol L⁻¹ heptakis (2, 3, 6-tri-O-methyl)- β -CD as running electrolyte. The applied voltage and temperature used were 15 kV and 15°C, respectively. The UV detector was set at 200 nm. The sample preparation was carried out by liquid–liquid extraction using ethyl acetate as extractor solvent. The method was linear over the concentration range of 100 – 12000 ng mL⁻¹ for each enantiomer of midodrine and DMAE ($r \geq 0.9975$). Within-day and between-day precision and accuracy evaluated by RSDs and relative errors, respectively, were lower than 15% for all analytes. The method proved to be robust by a fractional factorial design evaluation. The validated method was used to assess the midodrine biotransformation to DMAE by eight endophytic fungi. The fungus *Papulaspora immersa* (SS13) showed the best biotransformation results. It biotransformed 21.3% of (+)-midodrine to (+)-DMAE and 2.4% of (–)-midodrine to (–)-DMAE, after 72 hours. The observed enantiomeric excess was 79.7%. The second chapter describes the optimization and validation of a method for the determination of midodrine and DMAE in Czapek-Dox culture medium. The analyses were carried out under reverse elution mode using a Lichrospher 100 RP 18 column and acetonitrile: formic acid solution 40 mmol L⁻¹ (60:40, v/v), as mobile phase, at a flow rate of 1.4 mL min⁻¹ and UV detection at 290 nm. The sample preparation was carried out by liquid–liquid extraction using ethyl acetate as extractor solvent. The method was linear over the concentration range of 0.4 – 40 μ g mL⁻¹ for each analyte ($r \geq 0.9997$). This method was applied to evaluate the biotransformation of midodrine by the endophyte *Papulaspora immersa* and two *Botrytis cinerea* strains (UCA 992 and 2100). Among the studied fungi, *Botrytis*

cinerea 2100, at shaken condition, showed the higher percentual of DMAE formation (42.2%, at 48 hours). Moreover, the chromatograms obtained for the biotransformation under static condition, showed additional peaks not detected at performed controls, for both *Papulaspora immersa* and *Botrytis cinerea* 2100. Further biotransformation experiments were carried out at large scale on static condition. In addition to DMAE, a deaminated midodrine derivative was isolated from *Botrytis cinerea* 2100. In the third chapter, a three-phase hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) method was used for the sample preparation of bufuralol and its metabolites 1'-oxobufuralol and 1'-hydroxybufuralol in Czapek culture medium. The analysis was carried out by chiral liquid chromatography using a Chiralcel OD-H column with hexane:isopropanol:methanol (97.5:2.0:0.5, v/v/v) plus 0.5% diethylamine as the mobile phase, and UV detection at 248 and 273 nm. The HF-LPME optimized conditions involved the use of n-octanol as the organic solvent, 0.2 mol L⁻¹ acetic acid as the acceptor phase, donor phase pH adjusted to 13, sample agitation at 1750 rpm and extraction for 30 min. By using this extraction procedure, the recovery rates were in the range of 50–69%. The method was used to assess the biotransformation of bufuralol using five endophytic fungi strains. None of the studied fungi biotransformed bufuralol to 1'-oxobufuralol and / or 1'-hydroxybufuralol and because of this, the method developed was not validated. In the fourth chapter a chiral liquid chromatography method was described for the stereoselective determination of donepezil, 5-*O*-desmethyl donepezil, and 6-*O*-desmethyl donepezil in Czapek culture medium to be applied to a stereoselective biotransformation study employing fungi. The analysis was carried out using a Chiralpak AD-H column with hexane:ethanol:methanol (75:20:5, v/v/v) plus 0.3% triethylamine as the mobile phase at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹ and UV detection at 270 nm. The sample preparation was carried out by liquid–liquid extraction using ethyl acetate as extractor solvent. The method was linear over the concentration range of 100 – 10000 ng mL⁻¹ for each enantiomer of donepezil ($r \geq 0.9985$) and of 100 – 5000 ng mL⁻¹ for each enantiomer of 5-*O*-desmethyl donepezil and 6-*O*-desmethyl donepezil ($r \geq 0.9951$). Within-day and between-day precision and accuracy evaluated by RSDs and relative errors, respectively, were lower than 15% for all analytes. The recoveries were higher than 90% for all analytes. The validated method was used to assess the donepezil biotransformation by five endophytes and by *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 fungi. The endophytic fungi do not demethylate donepezil at the studied conditions. On the other hand, *Beauveria bassiana* ATCC 7159 biotransformed 8.3% of donepezil to (–)-(R)-5-*O*-desmethyl donepezil (ee, 60.6%), while *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B biotransformed 15.1% of donepezil to (–)-(R)-6-*O*-desmethyl donepezil (ee, 100%). The data presented here show that the biotransformations with fungi are an important alternative to mimetize biotransformations in mammals and to obtain drug metabolites, especially as pure enantiomers.

Keywords: Biotransformation, Bufuralol, Donepezil, Fungi, Midodrine, Stereoselective analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura I-1. Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de eletroforese capilar.....	08
Figura I-2. Esquema mostrando o fluxo eletrosmótico (Adaptado de KITAGISHI, 1996).....	09
Figura I-3. Perfil de fluxo eletrosmótico (A) e hidrodinâmico (fluxo laminar) (B) (Adaptado de WEINBERGER, 2000).....	10
Figura I-4. Estruturas da α -CD, β -CD e γ -CD.....	12
Figura I-5 – Estruturas moleculares de bufuralol (a1), donepezila (b1) e midodrina (c1) e de seus principais e respectivos metabólitos: 1'-hidroxibufuralol (a2) e 1'-oxobufuralol (a3); 6-O-desmetil donepezila (b2) e 5-O-desmetil donepezila (b3) e desglímidodrina (c2). *Centros quirais.....	21
Figura C1-1 – Estruturas moleculares da midodrina e desglímidodrina. *Centros quirais.....	33
Figura C1-2. Fotografias dos fungos endofíticos estudados em meio de crescimento BDA.....	52
Figura C1-3. Cromatogramas representativos da melhor separação dos enantiômeros da midodrina (1 e 2) e DMAE (3 e 4) empregando as colunas Chiralcel OD-H(A), Chiralpak AD-RH (B e C), Chiralpak AS (D), Chirobiotic V (E) e Chirobiotic T (F).....	57
Figura C1-4. Eletroferogramas mostrando a separação de midodrina e DMAE empregando ciclodextrinas neutras. Condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L ⁻¹ , pH 5, tensão de 20 kV, concentração do derivado de CD de 30 mmol L ⁻¹ e temperatura de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito na amostra analisada foi 20 µg mL ⁻¹ . (1) (-)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (-)-midodrina, (4) (+)-midodrina.....	59
Figura C1-5. Influência da temperatura de análise na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L ⁻¹ , pH 5, tensão de 20 kV, TM- β -CD na concentração de 30 mmol L ⁻¹ . A concentração de cada enantiômero da midodrina e DMAE na amostra analisada foi 20 µg mL ⁻¹ . Desglímidodrina (DE), midodrina (MI). A resolução foi calculada com auxílio	

do *software* 3D-CE ChemStation® versão B.04.01. A equação empregada pelo *software* foi: $R_s = 1,18(t_{R2} - t_{R1}) / w_{H2} + w_{H1}$, onde t_{R2} é o tempo do pico de maior migração e t_{R1} do pico com menor tempo de migração. w_{H2} e w_{H1} são as respectivas larguras dos picos medidas a meia altura..... 61

Figura C1-6. Influência da concentração de TM- β -CD (mmol L⁻¹) na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5, tensão de 20 kV, temperatura de análise de 15 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito na amostra analisada foi 20 μ g mL⁻¹. Desglimidodrina (DE), midodrina (MI). A resolução foi calculada conforme descrito na **Figura C1.5**..... 62

Figura C1-7. Influência da concentração do eletrólito (mmol L⁻¹) na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio pH 5, tensão de 20 kV, TM- β -CD na concentração de 30 mmol L⁻¹, temperatura de análise de 15 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito na amostra analisada foi 20 μ g mL⁻¹. Desglimidodrina (DE), midodrina (MI). A resolução foi calculada conforme descrito na **Figura C1.5**..... 63

Figura C1-8. Influência do pH do eletrólito na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, tensão de 20 kV, TM- β -CD na concentração de 30 mmol L⁻¹, temperatura de análise de 15 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito na amostra analisada foi 20 μ g mL⁻¹. Desglimidodrina (DE), midodrina (MI). A resolução foi calculada conforme descrito na **Figura C1.5**..... 64

Figura C1-9. Influência da tensão aplicada (kV) na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5, TM- β -CD na concentração de 30 mmol L⁻¹, temperatura de análise de 15 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito na amostra analisada foi 20 μ g mL⁻¹. Desglimidodrina (DE), midodrina (MI). A resolução foi calculada conforme descrito na **Figura C1.5**..... 65

Figura C1-10. Eletroferograma representativo da análise de midodrina e DMAE empregando o método otimizado. As concentrações dos analitos foram as seguintes: 500 ng mL⁻¹ de imipramina (padrão interno) e 4000 ng mL⁻¹ de cada um dos enantiômeros da midodrina e DMAE. As condições eletroforéticas otimizadas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais

(40 cm efetivos x 50 μm d.i.), injeção da amostra em campo amplificado (FASI), tampão acetato 70 mmol L^{-1} (pH 5) contendo 30 mmol L^{-1} de TM- β -CD, tensão de + 15 kV, detecção UV em 200 nm, temperatura de análise de 15 °C. (1) (–)-desglímidodrina, (2) (+)-desglímidodrina, (3) (–)-midodrina, (4) (+)-midodrina e (5) imipramina (P.I.)..... 68

Figura C1-11. (A) Eletroferograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek fortificado com DMF e extraído pelo procedimento de extração líquido-líquido. (B) Eletroferograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek fortificado com 500 ng mL^{-1} de imipramina (P.I.) e 4000 ng mL^{-1} de cada enantiômero da midodrina e DMAE dissolvidos em DMF. As condições eletroforéticas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 μm d.i.); Injeção da amostra em campo amplificado (FASI); Eletrólito constituído por tampão acetato 70 mmol L^{-1} (pH 5) contendo 30 mmol L^{-1} de TM- β -CD; Tensão de + 15 kV; Detecção UV em 200 nm; Temperatura de análise de 15 °C. (1) (–)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (–)-midodrina, (4) (+)-midodrina e (5) imipramina (P.I.)..... 74

Figura C1-12. Eletroferogramas representativos das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos endofíticos *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Phomopsis* sp. (TD2), *Nigrospora sphaerica* (SS67), *Papulaspora immersa* (SS13), *Penicillium crustosum* (VR4), *Pestalotiopsis foedans* (VR8), *Chaetomiun globosum* (VR10) e *Phoma* sp. (ET). As condições eletroforéticas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 μm d.i.); Injeção da amostra em campo amplificado (FASI); Eletrólito constituído por tampão acetato 70 mmol L^{-1} (pH 5) contendo 30 mmol L^{-1} de TM- β -CD; Tensão de + 15 kV; Detecção UV em 200 nm; Temperatura de análise de 15 °C..... 75

Figura C1-13. Gráfico de pareto representando os efeitos dos fatores e da interação entre os fatores para as respostas (A) tempo de migração do pico 4, (B) resolução 1, (C) resolução 2, (D) resolução 3. Resolução 1 entre os picos 1 e 2, resolução 2 entre os picos 2 e 3 e resolução 3 entre os picos 3 e 4. Os picos 1, 2, 3, 4 referem-se a (–)-DMAE, (+)-DMAE, (–)-midodrina e (+)-midodrina, respectivamente e são apresentados na figura C1-11B..... 78

Figura C1-14. Eletroferogramas representativos das amostras de midodrina

incubadas com os fungos endofíticos VR4, VR10, VR8 e ET após 72 h de incubação. As condições eletroforéticas validadas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 µm d.i.); Injeção da amostra em campo amplificado (FASI); Eletrólito constituído por tampão acetato 70 mmol L⁻¹ (pH 5) contendo 30 mmol L⁻¹ de TM-β-CD; Tensão de + 15 kV; Detecção UV em 200 nm; Temperatura de análise de 15 °C. (1) (-)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (-)-midodrina, (4) (+)-midodrina, e (5) imipramina (P.I.). *Penicillium crustosum* (VR4), *Pestalotiopsis foedans* (VR8), *Chaetomium globosum* (VR10) e *Phoma* sp. (ET)..... 80

Figura C1-15. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da desglímidodrina pelo fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12)..... 81

Figura C1-16. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da desglímidodrina pelo fungo *Phomopsis* sp. (TD2)..... 82

Figura C1-17. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da desglímidodrina pelo fungo *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67)..... 83

Figura C1-18. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da desglímidodrina pelo fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13)..... 83

Figura C1-19. Eletroferogramas representativos das amostras de midodrina incubadas com os fungos endofíticos SS13, TD2, SS67 e VR12 após 72 h de incubação. As condições eletroforéticas validadas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 µm d.i.); Injeção da amostra em campo amplificado (FASI); Eletrólito constituído por tampão acetato 70 mmol L⁻¹ (pH 5) contendo 30 mmol L⁻¹ de TM-β-CD; Tensão de + 15 kV; Detecção UV em 200 nm; Temperatura de análise de 15 °C. (1) (-)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (-)-midodrina, (4) (+)-midodrina, e (5) imipramina (P.I.). *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Phomopsis* sp. (TD2), *Nigrospora sphaerica* (SS67), *Papulaspora immersa* (SS13)..... 85

Figura C2-1. Estruturas moleculares da midodrina (A) e DMAE (B) e sua possível rota de biotransformação em humanos (Adaptado de AKIMOTO et al., 2004)..... 95

Figura C2-2. Fotografias dos fungos estudados em meio de cultivo BDA (SS13) e Ágar-malte (*B. cinerea* UCA 992 e 2100)..... 103

Figura C2-3. (A) Cromatograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek-Dox extraído pelo procedimento de extração líquido-líquido. **(B)** Cromatograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek-Dox fortificado com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de midodrina e DMAE e submetido ao procedimento de extração. As condições cromatográficas foram: Coluna Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por acetonitrila / ácido fórmico 40 mmol L^{-1} (60:40, v/v), vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de 25 μL , detecção por absorção no UV em 290 nm, análise a temperatura ambiente. (1) midodrina, (2) DMAE..... 114

Figura C2-4. Cromatogramas representativos das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubadas com os fungos *Botrytis cinerea* (2100) (**A**-Agitação) e (**B**-estático), *Papulaspora immersa* (SS13) (**C**-Agitação) e (**D**-estático), *Botrytis cinerea* (UCA 992) (**E**-Agitação) e (**F**-estático). As condições cromatográficas foram: Coluna Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por acetonitrila / ácido fórmico 40 mmol L^{-1} (60:40, v/v), vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de 25 μL , detecção UV em 290 nm e análise a temperatura ambiente..... 115

Figura C2-5. Gráfico da cinética de formação de DMAE e decaimento da midodrina pelo fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) em condição estática e em agitação. As barras expressam a estimativa do desvio padrão das replicatas ($n=2$)..... 117

Figura C2-6. (A) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubada com o fungo *Papulaspora immersa* (SS13) em condição estática. **(B)** Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubada com o fungo *Papulaspora immersa* (SS13) e midodrina após 120 h de biotransformação em condição estática. As condições cromatográficas foram: Coluna Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por acetonitrila / ácido fórmico 40 mmol L^{-1} (60:40, v/v), vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de 25 μL , detecção UV em 290 nm e análise a temperatura ambiente. (1) midodrina, (2) DMAE e (3) composto desconhecido..... 118

Figura C2-7. Gráfico da cinética de formação de DMAE e decaimento da midodrina pelo fungo *Botrytis cinerea* (UCA 992) em condição estática e de

- agitação. As barras expressam a estimativa do desvio padrão das replicatas ($n=2$)..... 119
- Figura C2-8.** Gráfico da cinética de formação de DMAE e decaimento da midodrina pelo fungo *Botrytis cinerea* (UCA 2100) em condição estática e de agitação. As barras expressam o desvio padrão das replicatas ($n=2$)..... 120
- Figura C2-9. (A)** Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubada com o fungo *Botrytis cinerea* (2100) em condição estática. **(B)** Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubada com o fungo *Botrytis cinerea* (2100) e midodrina após 48 h de biotransformação em condição estática. As condições cromatográficas foram: Coluna Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel constituída por acetonitrila / ácido fórmico 40 mmol L⁻¹ (60:40, v/v), vazão de 1,4 mL min⁻¹, volume de injeção de 25 μ L, detecção UV em 290 nm e análise a temperatura ambiente. **(1)** midodrina, **(2)** DMAE, **(3, 4 e 5)** compostos desconhecidos..... 121
- Figura C2-10.** Cromatograma obtido durante a purificação das frações F5 + F6. As condições cromatográficas foram: Coluna semipreparativa Lichrospher 10 RP-18 (10 μ m) 250 x 10 mm; Fase móvel constituída por água / metanol (70:30, v/v + 0,06% de ácido fórmico); Vazão de 2,5 mL min⁻¹; Volume de injeção de 100 μ L; Detecção no ultravioleta (290 nm); Temperatura de análise: ambiente. **(1)** composto isolado..... 123
- Figura C3-1** – Estruturas moleculares do bufuralol **(a)**, 1'-hidroxibufuralol **(b)** e 1'-oxobufuralol **(c)**. *Centros quirais..... 132
- Figura C3-2.** Fotografia da unidade extratora empregada nas extrações por HF-LPME, desenvolvida por Magalhães e Bonato (2008). Na imagem podem-se observar as partes que compõem a unidade extratora: membrana cilíndrica oca, ponteiras para eletroforese em gel e tampa de frasco de injeção, "vial"..... 139
- Figura C3-3.** Melhor separação dos estereoisômeros do bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol na coluna Chirobiotic V. Picos **1** e **2**: enantiômeros do bufuralol; picos **3** e **4**: 1'-hidroxibufuralol; picos **5** e **6**: enantiômeros do 1'-oxobufuralol. Fase móvel constituída por metanol: trietilamina: ácido acético (100: 0,1: 0,1, v/v/v), vazão de 0,5 mL min⁻¹ e

detecção em 240 nm..... 142

Figura C3-4. Melhor separação dos estereoisômeros do bufuralol e seus metabólitos na coluna Chiralcel OD-H. As condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel composta por hexano:isopropanol:metanol (97,5:2,0:0,5; v/v/v) + 0,5% de DEA, vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção em 240 nm. (1) (*R*)-bufuralol, (2) (*S*)-bufuralol, (3) (*R*)-1'-oxobufuralol, (4) (*S*)-1'-oxobufuralol, (5) (*R,R*) 1'-hidroxibufuralol, (6) (*S,R*) 1'-hidroxibufuralol, (7) (*R,S*) 1'-hidroxibufuralol e (8) (*S,S*) 1'-hidroxibufuralol..... 143

Figura C3-5. Seleção do solvente orgânico. Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 1750 rpm, HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como fase aceptora, tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10 como fase doadora. Concentração de cada estereoisômero: $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata..... 147

Figura C3-6. Seleção da fase aceptora. Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 1750 rpm, n-octanol como solvente orgânico, tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10 como fase doadora. Concentração de cada estereoisômero $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata..... 148

Figura C3-7. Seleção da concentração do ácido acético (fase aceptora). Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 1750 rpm, n-octanol como solvente orgânico, tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10 como fase doadora. Concentração de cada estereoisômero $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata..... 149

Figura C3-8. Seleção do pH da fase doadora. Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 1750 rpm, n-octanol como solvente orgânico, ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como fase aceptora; fase doadora em pH 10 (tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 12 (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e pH 13 (250 μL de NaOH 2 mol L^{-1}). Concentração de cada estereoisômero $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata..... 150

Figura C3-9. Seleção da velocidade de agitação. Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, n-octanol como solvente orgânico, ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como fase aceptora, fase doadora em pH 13 (250 μL de NaOH 2 mol L^{-1}). Concentração de cada estereoisômero $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As

análises foram realizadas em triplicata.....	151
Figura C3-10. Seleção do tempo de extração. Condições de extração: velocidade de agitação de 1750 rpm, n-octanol como solvente orgânico, ácido acético 0,2 mol L ⁻¹ como fase aceptora, fase doadora em pH 13 (250 µL de NaOH 2 mol L ⁻¹). Concentração de cada estereoisômero 1 µg mL ⁻¹ . As análises foram realizadas em triplicata.....	152
Figura C3-11. (A) Cromatogramas representativos das amostras incubadas com os fungos endofíticos ET, SS13, SS67, VR4 e VR12 e bufuralol após 72 h de incubação. (B) Cromatogramas representativos das amostras de meio de cultura Czapek incubada com os fungos endofíticos ET, SS13, SS67, VR4 e VR12 após 72 h de incubação. As condições cromatográficas foram: coluna Chiralcel OD-H, fase móvel constituída por hexano:isopropanol:metanol (97,5:2,0:0,5; v/v/v) + 0,5% de dietilamina, vazão de 1,5 mL min ⁻¹ , detecção em 248 e 273 nm. (1) <i>R</i> -Bufuralol e (2) <i>S</i> -Bufuralol.....	154
Figura C4-1 – Estruturas moleculares da DPZ (a), 6- <i>O</i> -desmetil-donepezila (6-ODD) (b) e 5- <i>O</i> -desmetil-donepezila (5-ODD) (c). *Centros quirais.....	161
Figura C4-2. Fotografias dos fungos <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 10028B e <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 em meio de crescimento BDA.....	171
Figura C4-3. Melhor separação dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD na coluna Chiralcel OD-H. Picos 1 e 2: enantiômeros da 5-ODD; picos 3 e 4: enantiômeros da DPZ; picos 5 e 6: enantiômeros da 6-ODD. Fase móvel constituída por hexano:isopropanol:metanol:TEA:TFA (70:20:10:0,05:0,05; v/v/v/v/v), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e detecção em 270 nm.....	175
Figura C4-4. Melhor separação dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos na coluna Chiralpak AD. As condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel composta por hexano:etanol:metanol:TEA (60:30:10:0,025; v/v/v/v), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e detecção em 270 nm. Picos 1 e 4: enantiômeros da DPZ; Picos 2 e 5 enantiômeros da 5-ODD e picos 3 e 6: enantiômeros da 6-ODD.....	176
Figura C4-5. Melhor separação dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos na coluna Chiralpak AD-H. As condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel composta por hexano:etanol:metanol (75:20:5 v/v/v + 0,3% de	

TEA), vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. (1) (+)-(S)-DPZ, (2) (+)-(S)-5-ODD, (3) (+)-(S)-6-ODD, (4) (-)-(R)-DPZ, (5) (-)-(R)-5-ODD, (6) (-)-(R)-6-ODD..... 177

Figura C4-6. Espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros da DPZ (A), 5-ODD (B) e 6-ODD (C)..... 180

Figura C4-7. (A) Cromatograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek fortificado com 3000 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da DPZ e 1500 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da 5-ODD e 6-ODD dissolvidos em água estéril. (B) Cromatograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek branco extraído pelo procedimento de extração líquido-líquido. (C) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B (D) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna Chiralpak AD-H, fase móvel composta por hexano : etanol : metanol (75:20:5 v/v/v) + 0,3% de trietilamina, vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. (1) (+)-(S)-DPZ, (2) (+)-(S)-5-ODD, (3) (+)-(S)-6-ODD, (4) (-)-(R)-DPZ, (5) (-)-(R)-5-ODD e (6) (-)-(R)-6-ODD..... 187

Figura C4-8. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da 5-ODD e decaimento da DPZ pelo fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159. As barras expressam o desvio padrão das replicatas (n=2)..... 191

Figura C4-9. (A) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e DPZ após 96 h de biotransformação. (B) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna Chiralpak AD-H, fase móvel composta por hexano:etanol:metanol (75:20:5 v/v/v) + 0,3 % de trietilamina, vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. (1) (+)-(S)-DPZ, (2) (+)-(S)-5-ODD, (3) pico desconhecido, (4) (+)-(S)-6-ODD, (5)-(-)-(R)-DPZ, (6) (-)-(R)-5-ODD, (7) (-)-(R)-6-ODD..... 192

Figura C4-10. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da 6-ODD e decaimento da DPZ pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B. As

barras expressam o desvio padrão das replicatas ($n=2$)..... 193

Figura C4-11. (A) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e DPZ após 96 h de biotransformação. **(B)** Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna Chiralpak AD-H, fase móvel composta por hexano:etanol:metanol (75:20:5 v/v/v) + 0,3% de trietilamina, vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. **(1)** (+)-(*S*)-DPZ, **(2)** pico desconhecido, **(3)** (-)-(*R*)-DPZ, **(4)** pico desconhecido, **(5)** (-)-(*R*)-6-ODD..... 194

LISTA DE TABELAS

Tabela I-1. Exemplos do emprego de fungos endofíticos em biotransformações estereosseletivas.....	06
Tabela I-2. Algumas CSPs derivadas de polissacarídeos usadas em HPLC quiral.....	16
Tabela C1-1. Variáveis selecionadas como fatores e valores selecionados como níveis para avaliação da robustez do método.....	49
Tabela C1-2. Composição do meio BDA.....	50
Tabela C1-3. Composição do meio pré-fermentativo malte.....	50
Tabela C1-4. Composição do meio fermentativo Czapek (ALVIANO et al., 1992).....	50
Tabela C1-5. Fungos endofíticos selecionados para o estudo de biotransformação da midodrina.....	51
Tabela C1-6. Melhor condição cromatográfica obtida para as colunas avaliadas durante a otimização da separação quiral.....	56
Tabela C1-7. Condições eletroforéticas otimizadas.....	68
Tabela C1-8. Parâmetros de desempenho do método por CE nas condições otimizadas.....	69
Tabela C1-9. Condições otimizadas para o procedimento de preparação das amostras.....	70
Tabela C1-10. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros da midodrina.....	71
Tabela C1-11. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros da DMAE.....	71
Tabela C1-12. Linearidade do método para determinação enantiosseletiva de midodrina e DMAE.....	72
Tabela C1-13. Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva de midodrina e DMAE.....	72
Tabela C1-14. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da midodrina em meio Czapek.....	73
Tabela C1-15. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros	

da DMAE em meio Czapek.....	73
Tabela C1-16. Estabilidade dos enantiômeros da midodrina nos ciclos de congelamento/descongelamento e bancada por 12 h em meio de cultura Czapek.....	76
Tabela C1-17. Estabilidade do enantiômeros da DMAE nos ciclos de congelamento/descongelamento e bancada por 12 h em meio de cultura Czapek.....	77
Tabela C1-18. Estabilidade dos enantiômeros da midodrina nas condições de biotransformação.....	77
Tabela C1-19. Quantidade máxima de DMAE formada (expressa em % de fármaco adicionado).....	84
Tabela C2-1. Concentrações dos controles empregados na validação do método.....	100
Tabela C2-2. Composição do meio ágar malte.....	102
Tabela C2-3. Composição do meio fermentativo Czapek-Dox.....	103
Tabela C2-4. Condições cromatográficas otimizadas.....	110
Tabela C2-5. Condições otimizadas para o procedimento de preparação das amostras.....	111
Tabela C2-6. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise da midodrina e DMAE em meio de cultura Czapek-Dox.....	112
Tabela C2-7. Linearidade do método para determinação de midodrina e DMAE..	112
Tabela C2-8. Limites de quantificação do método para determinação de midodrina e DMAE.....	113
Tabela C2-9. Precisão e exatidão do método para análise da midodrina e DMAE em meio de cultura Czapek-Dox.....	113
Tabela C2-10. Estabilidade nos ciclos de congelamento/ descongelamento, bancada por 12 horas e autoinjeter por 12 horas.....	116
Tabela C2-11. Estabilidade da midodrina nas condições de biotransformação....	116
Tabela C2-12. Quantidade máxima de DMAE formada (expressa em % de fármaco adicionada).....	122
Tabela C2-13. Dados do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C (100 MHz) do composto 1 (δ , CD_3OD).....	124
Tabela C3-1. Fungos endofíticos selecionados para o estudo da	

biotransformação do bufuralol.....	140
Tabela C3-2. Parâmetros de desempenho do método cromatográfico nas condições otimizadas.....	144
Tabela C3-3. Condições otimizadas para o procedimento de preparação das amostras por HF-LPME.....	152
Tabela C4-1. Concentrações dos controles empregados na validação do método.....	169
Tabela C4-2. Fungos selecionados para o estudo de biotransformação da DPZ..	171
Tabela C4-3. Condições cromatográficas otimizadas.....	178
Tabela C4-4. Parâmetros de desempenho do método cromatográfico nas condições otimizadas.....	178
Tabela C4-5. Influência do pH na recuperação e racemização dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos.....	182
Tabela C4-6. Condições otimizadas para o procedimento de preparação das amostras.....	182
Tabela C4-7. Avaliação da racemização durante o processo de biotransformação.....	183
Tabela C4-8. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD.....	184
Tabela C4-9. Linearidade do método para determinação enantiosseletiva da DPZ, 5-ODD e 6-ODD.....	185
Tabela C4-10. Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva de DPZ e seus metabólitos.....	185
Tabela C4-11. Precisão e exatidão intradia do método para análise dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em meio Czapek.....	186
Tabela C4-12. Precisão e exatidão interdias do método para análise dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em meio Czapek.....	188
Tabela C4-13. Estabilidade nos ciclos de congelamento e descongelamento da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em meio de cultura Czapek.....	189
Tabela C4-14. Estabilidade de bancada por 12 h da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em meio de cultura Czapek.....	189
Tabela C4-15. Quantidade máxima de (+)-(S)-5-ODD, (-)-(R)-5-ODD, (+)-(S)-ODD e (-)-(R)-6-ODD formada (expressa em % de DPZ adicionada).....	195

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata dextrose agar
BGE	Eletrólito
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD	Ciclodextrina
CE	Eletroforese capilar
CSP	Fase estacionária quiral
CV%	Coeficiente de variação percentual
DEA	Dietilamina
d.i.	Diâmetro interno
DMAE	Desglimidodrina
DM- β -CD	Heptakis (2,6-di- <i>O</i> -metil)- β -CD
DMF	Dimetilformamida
DPZ	Donepezila
E%	Erro relativo
EOF	Fluxo eletrosmótico
FASI	Injeção em campo amplificado
HF-LPME	Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca
HP- β -CD	2-Hidroxipropil- β -CD
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPA	Isopropanol
IR	Espectroscopia no infravermelho
LLE	Extração líquido-líquido
LQ	Limite de quantificação
MS	Espectrometria de massas
p.a.	Pró-análise
P.I.	Padrão interno

q.s.p.	Quantidade suficiente para
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rs	Resolução
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
TM- β -CD	Heptakis (2,3,6-tri- <i>O</i> -metil)- β -CD
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
5-ODD	5- <i>O</i> -desmetil donepezila
6-ODD	6- <i>O</i> -desmetil donepezila

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIX
SUMÁRIO.....	XXI
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. UTILIZAÇÃO DE FUNGOS EM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	2
1.2. Utilização de fungos endofíticos em processos de biotransformação.....	5
2. TÉCNICAS DE ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA.....	6
2.1. CE.....	7
2.1.1. Mobilidade eletroforética do analito (μ_{ef}).....	8
2.1.2. Fluxo Eletrosmótico da solução (μ_{eo}).....	9
2.1.3. Análise enantiosseletiva por CE.....	10
2.1.3.1. Seletores quirais.....	11
2.1.4. Vantagens e desvantagens dos métodos eletroforéticos.....	13
2.2. HPLC.....	14
2.2.1. Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos.....	15
2.2.2. Fases estacionárias quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos.....	16
2.2.3. Vantagens e desvantagens dos métodos cromatográficos.....	17
3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	17
3.1. Extração líquido-líquido.....	18
3.2. Microextração em fase líquida com membranas ocas.....	19
4. FÁRMACOS SELECIONADOS PARA O ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
OBJETIVOS GERAIS.....	30
CAPÍTULO 1: DETERMINAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DA MIDODRINA E DMAE POR CE EM MEIO DE CULTURA: APLICAÇÃO EM ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO EMPREGANDO FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	32
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	33

2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. Separação dos enantiômeros da midodrina e DMAE empregando fases estacionárias quirais.....	36
3.1.1. Materiais.....	36
3.1.1.1. Reagentes e solventes.....	36
3.1.1.2. Soluções-padrão	36
3.1.1.3. Colunas com fases estacionárias quirais	37
3.1.1.4. Equipamentos	38
3.1.1.4.1. Espectrofotômetro	38
3.1.1.4.2. Sistema Cromatográfico	38
3.1.1.4.3. Equipamentos empregados no preparo das amostras e fases móveis	38
3.1.2. Métodos.....	38
3.1.2.1. Avaliação de colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais	38
3.2. Análise enantiosseletiva da midodrina e DMAE empregando eletroforese capilar	40
3.2.1. Materiais.....	40
3.2.1.1. Reagentes e solventes	40
3.2.1.2. Soluções – padrão.....	40
3.2.1.3. Capilar	41
3.2.1.4. Equipamentos	41
3.2.1.4.1. Sistema eletroforético.....	41
3.2.1.4.2. Equipamentos empregados no preparo da solução tampão e amostras.....	41
3.2.1.5. Seletores quirais.....	42
3.2.1.6. Meio de cultura fermentativo Czapek	42
3.2.2. Métodos.....	42
3.2.2.1. Condicionamento do capilar	42
3.2.2.2. Avaliação dos seletores quirais empregados em CE	43
3.2.2.3. Procedimento de preparo da solução tampão	43
3.2.2.4. Otimização do procedimento de preparo da amostra.....	43
3.3. Validação do método por eletroforese capilar para a determinação enantiosseletiva de midodrina e seu principal metabólito em meio de cultura	44
3.3.1. Soluções-padrão usadas na validação do método eletroforético	44
3.3.2. Método de extração otimizado	44
3.3.3. Parâmetros avaliados na validação do método.....	45
3.3.3.1. Recuperação	45
3.3.3.2. Linearidade.....	45
3.3.3.3. Limite de quantificação (LQ).....	46
3.3.3.4. Precisão e Exatidão.....	46
3.3.3.5. Seletividade.....	46
3.3.3.6. Estabilidade.....	46
3.3.3.6.1. Ciclos de congelamento e descongelamento	46
3.3.3.6.2. Bancada por 12 horas	47
3.3.3.6.3. Condições de biotransformação	47
3.3.3.6.4. Estabilidade das soluções-padrão.....	48
3.3.3.7. Robustez	48
3.4. Procedimento de biotransformação da midodrina empregando fungos endofíticos	49
3.4.1. Materiais.....	49

3.4.1.1. Reagentes	49
3.4.1.2. Equipamentos	49
3.4.1.3. Meios de cultura	50
3.4.2. Métodos.....	51
3.4.2.1. Isolamento e identificação dos fungos endofíticos	51
3.4.2.2. Manutenção dos fungos endofíticos.....	53
3.4.2.3. Procedimento de biotransformação.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Separação dos enantiômeros da midodrina e DMAE empregando fases estacionárias quirais.....	55
4.1.1. Determinação dos comprimentos de onda (λ) de máxima absorção no ultravioleta	55
4.1.2. Otimização da separação quiral cromatográfica	55
4.2. Análise enantiosseletiva da midodrina e DMAE empregando CE	58
4.2.1. Otimização da separação eletroforética enantiosseletiva.....	58
4.2.1.1. Escolha da ciclodextrina.....	58
4.2.1.2. Influência da temperatura do capilar	60
4.2.1.3. Influência da concentração de ciclodextrina.....	61
4.2.1.4. Influência da composição do tampão de análise.....	62
4.2.1.5. Efeito da tensão aplicada	64
4.2.2. Otimização da detectabilidade do método.....	65
4.2.3. Seleção do padrão interno	67
4.2.4. Condições eletroforéticas otimizadas.....	67
4.2.5. Otimização dos parâmetros da extração líquido-líquido.....	69
4.3. Validação do método por CE para a determinação enantiosseletiva de midodrina e DMAE.....	70
4.3.1. Recuperação	70
4.3.2. Linearidade.....	71
4.3.3. Limite de quantificação.....	72
4.3.4. Precisão e Exatidão	72
4.3.5. Seletividade.....	74
4.3.6. Estabilidade.....	76
4.3.7. Robustez	77
4.4. Biotransformação da midodrina empregando fungos endofíticos.....	79
4.4.1. Fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> (VR12).....	80
4.4.2. <i>Phomopsis</i> sp. (TD2).....	81
4.4.3. <i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E. W. Mason (SS67)	82
4.4.4. <i>Papulaspora immersa</i> Hotson (SS13).....	83
5. COMENTÁRIOS FINAIS.....	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DA MIDODRINA E DMAE POR HPLC EM MEIO DE CULTURA: ESTUDO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA MIDODRINA PELO FUNGO FITOPATÓGENO <i>BOTRYTIS CINEREA</i> E ENDOFÍTICO <i>PAPULASPORA IMMERSA</i>	93
1. REVISÃO DA LITERATURA	94

1.1. Fungo endofítico <i>Papulaspora immersa</i> H. H. Hotson	94
1.2. Fungo fitopatígeno <i>Botrytis cinerea</i>	94
1.3. Midodrina.....	95
2. OBJETIVOS.....	97
3. MATERIAIS E MÉTODOS	98
3.1. Separação da midodrina e DMAE por HPLC	98
3.1.1. Materiais.....	98
3.1.1.1. Reagentes e solventes	98
3.1.1.2. Soluções-padrão	98
3.1.1.3. Sistema Cromatográfico	99
3.1.2. Métodos.....	99
3.1.2.1. Avaliação da coluna cromatográfica.....	99
3.2. Validação do método por cromatografia líquida para determinação de midodrina e DMAE em meio de cultura.....	99
3.2.1. Parâmetros avaliados na validação do método.....	99
3.2.1.1. Seletividade.....	100
3.2.1.2. Estabilidade.....	100
3.2.1.2.1. Condições de biotransformação.....	100
3.2.1.2.2. Autoinjeter por 12 h	101
3.3. Procedimento de biotransformação da midodrina.....	101
3.3.1. Materiais.....	101
3.3.1.1. Reagentes.....	102
3.3.1.2. Meios de cultura	102
3.3.1.3. Fungos empregados no estudo de biotransformação	103
3.3.2. Métodos.....	104
3.3.2.1. Procedimento de biotransformação para avaliação da cinética de biotransformação.....	104
3.3.2.1.1. Fungo endofítico <i>Papulaspora immersa</i> Hotson.....	104
3.3.2.1.1.1. Biotransformação em agitação.....	104
3.3.2.1.1.2. Biotransformação em condição estática.....	104
3.3.2.1.2. Fungos fitopatógenos <i>Botrytis cinerea</i> linhagens UCA 992 e 2100.....	105
3.3.2.1.2.1 Biotransformação em agitação.....	105
3.3.2.1.2.2. Biotransformação em condição estática.....	105
3.3.2.2. Procedimento de biotransformação em escala ampliada em condição estática.....	106
3.3.2.2.1. Fungo endofítico <i>Papulaspora immersa</i> Hotson.....	106
3.3.2.2.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato obtido após 5 dias de biotransformação.....	106
3.3.2.2.1.2 Fracionamento cromatográfico do extrato obtido após 10 dias de biotransformação.....	107
3.3.2.2.2. Procedimento de biotransformação para o fungo <i>Botrytis cinerea</i> 2100	107
3.3.2.2.2.1. Fracionamento cromatográfico do extrato	108
3.3.2.3. Isolamento dos produtos de biotransformação.....	108
3.3.2.4. Caracterização estrutural dos produtos de biotransformação	108
3.3.2.4.1. Atividade óptica ($[\alpha]_D$)	108
3.3.2.4.2. Espectroscopia no infravermelho (IR)	109
3.3.2.4.3. Espectrometria de massas (MS)	109
3.3.2.4.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	109

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
4.1. Separação da midodrina e DMAE	110
4.1.1. Otimização da separação cromatográfica	110
4.1.2. Otimização dos parâmetros da extração líquido-líquido	110
4.2. Validação do método por cromatografia líquida para a determinação de midodrina e DMAE	111
4.2.1. Recuperação	111
4.2.2. Linearidade	112
4.2.3. Limite de quantificação	112
4.2.4. Precisão e Exatidão	113
4.2.5. Seletividade	113
4.2.6. Estabilidade	115
4.3. Biotransformação da midodrina	116
4.3.1. <i>Papulaspora immersa</i> Hotson (SS13)	117
4.3.2. <i>Botrytis cinerea</i> linhagem UCA 992	118
4.3.3. <i>Botrytis cinerea</i> linhagem 2100	119
4.4. Biotransformação da midodrina em escala ampliada	122
4.4.1. Biotransformação com <i>Papulaspora immersa</i> Hotson durante 5 dias	122
4.4.2. Biotransformação com <i>Papulaspora immersa</i> Hotson durante 10 dias	122
4.4.3. Biotransformação com <i>Botrytis cinerea</i> 2100	123
5. COMENTÁRIOS FINAIS	125
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO ESTEREOSSELETIVA DO BUFURALOL, 1'-OXOBUFURALOL E 1'-HIDROXIBUFURALOL EM MEIO DE CULTURA POR HPLC: APLICAÇÃO EM ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO EMPREGANDO FUNGOS ENDOFÍTICOS	130
1. REVISÃO DA LITERATURA	131
2. OBJETIVOS	134
3. MATERIAIS E MÉTODOS	135
3.1. Separação dos estereoisômeros do bufuralol e de seus principais metabólitos empregando fases estacionárias quirais	135
3.1.1. Materiais	135
3.1.1.1. Reagentes e solventes	135
3.1.1.2. Soluções-padrão	135
3.1.1.3. Colunas com fases estacionárias quirais	135
3.1.1.4. Equipamentos	136
3.1.1.4.1. Espectrofotômetro	136
3.1.1.4.2. Sistema Cromatográfico	136
3.1.2. Métodos	136
3.1.2.1. Avaliação de colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais	136
3.2. Otimização do procedimento de microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME)	137
3.2.1. Materiais	137

3.2.1.1. Reagentes e solventes	137
3.2.1.2. Equipamentos	138
3.2.1.3. Soluções-padrão	138
3.2.2. Métodos.....	138
3.2.2.1. Procedimento de extração por HF-LPME	138
3.3. Procedimento de biotransformação do bufuralol empregando fungos endofíticos	140
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
4.1. Separação dos estereoisômeros do bufuralol e de seus principais metabólitos empregando fases estacionárias quirais	141
4.1.1. Determinação dos comprimentos de onda (λ) de máxima absorção no ultravioleta	141
4.1.2. Otimização da separação quiral cromatográfica	141
4.1.2.1. Coluna Chirobiotic V	142
4.1.2.2. Coluna Chiralcel OD-H	142
4.2. Otimização da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas	145
4.2.1. Membrana cilíndrica oca	145
4.2.2. Seleção do solvente	146
4.2.3. Seleção da fase aceptora	147
4.2.4. Seleção da concentração do ácido acético	148
4.2.5. Seleção do pH da fase doadora	149
4.2.6. Seleção da velocidade de agitação	150
4.2.7. Seleção do tempo de extração	151
4.2.8. Parâmetros da HF-LPME otimizados	152
4.3. Biotransformação do bufuralol empregando fungos endofíticos.....	153
5. COMENTÁRIOS FINAIS	155
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
CAPÍTULO 4: DETERMINAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DA DONEPEZILA, 5-O-DESMETIL DONEPEZILA E 6-O-DESMETIL DONEPEZILA POR HPLC EM MEIO DE CULTURA: APLICAÇÃO EM ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO EMPREGANDO FUNGOS	159
1. REVISÃO DA LITERATURA	160
2. OBJETIVOS.....	163
3. MATERIAIS E MÉTODOS	164
3.1. Separação dos enantiômeros da DPZ, 6-ODD e 5-ODD empregando fases estacionárias quirais.....	164
3.1.1. Materiais.....	164
3.1.1.1. Reagentes e solventes	164
3.1.1.2. Soluções-padrão	164
3.1.1.3. Colunas com fases estacionárias quirais	165
3.1.1.4. Equipamentos	165

3.1.1.4.1. Espectrofotômetro	165
3.1.1.4.2. Sistema Cromatográfico	165
3.1.2. Métodos.....	166
3.1.2.1. Avaliação das colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais...	166
3.2. Otimização do procedimento de preparo das amostras	166
3.3. Avaliação da racemização dos enantiômeros da DPZ, 6-ODD e 5-ODD nas condições analíticas e de cultivo	167
3.4. Validação do método cromatográfico para a determinação enantiosseletiva de DPZ, 6-ODD e 5-ODD em meio de cultura.....	168
3.4.1. Soluções-padrão usadas na validação do método	168
3.4.2. Método de extração otimizado	168
3.4.3. Parâmetros avaliados na validação do método.....	169
3.4.3.1. Seletividade	170
3.4.3.2. Estabilidade	170
3.4.3.2.1. Condições de biotransformação	170
3.5. Procedimento de biotransformação da donepezila empregando fungos.....	170
3.5.1. Fungos empregados no estudo de biotransformação da DPZ	170
3.5.1.1. Manutenção dos fungos <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 10028B e <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	171
3.5.2. Procedimento de biotransformação.....	172
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	173
4.1. Separação dos enantiômeros da DPZ, 5-DPZ e 6-DPZ empregando fases estacionárias quirais.....	173
4.1.1. Determinação dos comprimentos de onda (λ) de máxima absorção no ultravioleta	173
4.1.2. Otimização da separação quiral cromatográfica	173
4.1.2.1. Coluna Chiralcel OD-H	173
4.1.2.2. Coluna Chiralpak AD	175
4.1.2.3. Coluna Chiralpak AD-H	176
4.1.3. Condições cromatográficas otimizadas	178
4.2. Otimização dos parâmetros da extração líquido-líquido.....	180
4.3. Avaliação da racemização dos enantiômeros da DPZ, 6-ODD e 5-ODD nas condições analíticas e de cultivo	183
4.4. Validação do método por cromatografia líquida para a determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD	183
4.5. Biotransformação da DPZ empregando fungos	190
4.5.1. Fungo <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	190
4.5.2. <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 10028B	192
5. COMENTÁRIOS FINAIS.....	196
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	198
CONCLUSÕES GERAIS	206

INTRODUÇÃO GERAL

1. UTILIZAÇÃO DE FUNGOS EM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Micro-organismos podem ser utilizados na produção de produtos químicos e farmacêuticos, bem como na degradação de agentes poluentes e recuperação de ambientes quimicamente contaminados (DEMAIN, 1999). O uso de micro-organismos pode simplificar ou, em algumas situações, possibilitar a produção de fármacos e substâncias químicas complexas. A utilização de micro-organismos em processos de biotransformação também pode gerar metabólitos de fármacos já existentes e novas substâncias em escala industrial, constituindo-se em uma alternativa para o lançamento de novos fármacos pela indústria farmacêutica. Além disso, o uso de micro-organismos pode adicionar enantiosseletividade ao processo, eliminando a necessidade de complicadas técnicas de síntese, separação e purificação (POLLARD; WOODLEY, 2006).

Um dos primeiros empregos de biotransformação visando à obtenção de novos compostos foi relatado em 1858 por Pasteur, que utilizou o fungo *Penicillium glaucum* na obtenção de L-tartarato de amônia a partir de DL-tartarato de amônia. No entanto, somente no século 20 os estudos de biotransformação empregando micro-organismos receberam maior atenção, a partir da obtenção da hidroxilação de esteroides bioativos ou produtos intermediários para a síntese de corticosteroides (PUPO et al., 2008). A α -hidroxilação de progesterona usando *Rhizopus arrhizus* foi descrita em 1952 (PETERSON et al., 1952). Essa reação foi muito importante economicamente para a síntese de hormônios adrenocorticais (corticosterona, cortisona e hidro cortisona) e também possibilitou a preparação de derivados bioativos (prednisona, prednisolona e triancinolona) (VÉZINA, 1987). Mais recentemente, Yoshida et al. (2001) empregaram o fungo *Cunninghamella echinulata* MK 40 na biotransformação de 2-[4-(3-metoxipropoxi)-3-metilpiridina-2-yl] metiltiobenzimidazole (PTBI), precursor do fármaco rabeprazol, como alternativa a síntese clássica. Empregando essa reação de biotransformação, os autores obtiveram S-rabeprazol com 99% de pureza enantiomérica.

Apesar do sucesso, o uso de micro-organismos pela indústria para a obtenção de compostos de interesse é ainda modesto, considerando a grande disponibilidade de micro-organismos e a ampla diversidade de reações que podem ser realizadas por eles (BORGES et al., 2008).

Alguns micro-organismos podem transformar fármacos em outros compostos de maneira similar ao que ocorre nos mamíferos. Assim, a utilização de sistemas microbiológicos como modelos para mimetizar e prever a biotransformação de fármacos em humanos e animais tem recebido especial atenção. Muitas reações metabólicas de fase I em mamíferos (fase oxidativa) e reações metabólicas de fase II (fase de conjugação), dentre as quais se destacam a hidroxilação, O e N de-alquilação, desidrogenação e conjugação com sulfato e ácido glicurônico, também acontecem em modelos com micro-organismos (SUN et al., 2004). Esses modelos apresentam vantagens em relação aos estudos com animais e humanos, devido à redução do uso de animais, facilidade de manipulação, alto rendimento e diversidade na produção de metabólitos, baixo custo de produção e a possibilidade de fornecer enantiosseletividade às reações. Em alguns casos, modelos com micro-organismos podem suprir quantidade suficiente de metabólitos para completa elucidação estrutural e para a execução de estudos farmacológicos e toxicológicos, especialmente aqueles que não são facilmente obtidos por síntese química. O uso de micro-organismos pode também auxiliar na previsão das reações metabólicas mais favoráveis em mamíferos (AZERAD, 1999; MOODY et al., 2002; SUN et al., 2004; ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

Fungos são particularmente interessantes para serem empregados em processos de biotransformação. Parshikov et al. (1999), utilizaram os fungos *Aspergillus niger*, *Cunninghamella verticillata* e *Penicillium simplicissimum* na biotransformação de *N*-acetilfenotiazina e observaram a transformação do fármaco em cinco metabólitos. A biotransformação de fenotiazina por *Cunninghamella elegans* gerou quatro metabólitos sendo três idênticos aos formados em mamíferos, sustentando a aplicabilidade de modelos microbiológicos empregando fungos em estudos de biotransformação de fármacos (SUTHERLAND et al., 2001). Por sua vez, Zhong et al. (2003), estudaram a biotransformação de naproxeno usando os fungos *Cunninghamella blakesleana*, *Cunninghamella echinulata* e *Cunninghamella elegans* e observaram a transformação de naproxeno em dois metabólitos: desmetilnaproxeno e desmetilnaproxeno-6-*O*-sulfato, da mesma forma como acontece na biotransformação em mamíferos. A transformação de verapamil foi realizada empregando o fungo *Cunninghamella blakesleana*, que biotransformou esse fármaco em 23 metabólitos, mostrando a aplicabilidade desse modelo na

geração de metabólitos de fase I (SUN et al., 2004). A biotransformação de metoprolol foi avaliada empregando-se cinco espécies do fungo filamentoso *Cunninghamella*. No processo, o metoprolol foi transformado em sete metabólitos pelo fungo *Cunninghamella blakesleana*, cinco dos quais também formados em mamíferos, além de dois novos metabólitos (MA et al., 2007).

Fungos também estão sendo usados no estudo de biotransformação estereosseletiva de alguns fármacos quirais. Freitag et al. (1997), avaliaram a biotransformação de mexiletina racêmica pelo fungo *Cunninghamella echinulata* e verificaram a formação de dois metabólitos: p-hidroximexiletina e hidroximetilmexiletina. Observaram também que mudanças no meio de cultura alteravam enantiosseletivamente a biotransformação do fármaco em seus metabólitos. A biotransformação de doxepina, comercializada como mistura racêmica, pelo fungo *Cunninghamella elegans* gerou, após 96 horas de incubação, 16 metabólitos, nove dos quais nunca haviam sido descritos e não são obtidos pela biotransformação em mamíferos (MOODY; FREEMANN; CERNIGLIA, 1999). A biotransformação enantiosseletiva de mirtazapina foi avaliada em culturas do fungo *Cunninghamella elegans*. Após 168 horas de incubação, verificou-se que 91% do fármaco havia sido biotransformado em sete metabólitos. Observou-se ainda que a fração não biotransformada do fármaco estava enriquecida com o enantiômero (-)-(R). Além disso, quando cada enantiômero foi submetido à incubação isoladamente, o enantiômero (+)-(S) transformou-se nos sete metabólitos formados a partir da mistura racêmica, enquanto que o enantiômero (-)-(R) transformou-se em apenas quatro dos sete metabólitos (MOODY et al., 2002). Recentemente, o emprego de fungos do gênero *Cunninghamella* para mimetizar a biotransformação de fármacos em mamíferos foi revisado (ASHA; VIDYAVATHI, 2009), indicando que este modelo microbiológico representa importante alternativa para a obtenção de metabólitos, já que esses fungos mostraram capacidade de biotransformar a maioria dos fármacos estudados de forma análoga ao que ocorre em mamíferos. A utilização de fungos como catalisadores de reações estereosseletivas também foi revisada. Dentre essas reações receberam destaque a hidroxilação, sulfoxidação, epoxidação, entre outras, reforçando a importância destes micro-organismos na obtenção de compostos enantiomericamente puros (BORGES et al., 2009a).

1.2. Utilização de fungos endofíticos em processos de biotransformação

Dentre os fungos que podem ser utilizados em estudos de biotransformação destacam-se os fungos endofíticos. Literalmente, a palavra endofítico (do grego, *endon*, interior; *phyton*, planta), ou seja, do interior da planta, designa aqueles fungos que podem ser encontrados em um momento particular, associados aos tecidos da planta hospedeira aparentemente saudável. Assim, a maioria dos micologistas utiliza o termo endofítico para classificar aqueles fungos que colonizam plantas sem causar sintomas visíveis de enfermidade em um momento específico (SCHULZ; BOYLE, 2005). Além disso, o termo endofítico, tem sido utilizado como sinônimo de mutualismo, pois os fungos endofíticos fornecem substâncias que estimulam o crescimento da planta, sua reprodução e resistência frente a bactérias, fungos, vírus e insetos e recebem como contrapartida, proteção e nutrientes da planta (LU et al., 2000; SAIKKONEN et al., 2004). Os fungos endofíticos podem ser encontrados em todos os órgãos da planta, colonizando tanto o interior das células como o espaço intercelular. Como resultado desta interação ecológica (mutualismo), alguns fungos endofíticos podem tornar-se fontes alternativas de novas substâncias potencialmente importantes para a agricultura e indústria farmacêutica. Exemplo disso é o fármaco anticancerígeno, taxol, produzido por alguns fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Taxus brevifolia*, reconhecida pela produção deste fármaco (LU et al., 2000). Além disso, micro-organismos endofíticos são relativamente pouco estudados e constituem-se em uma fonte potencial para a descoberta de novos produtos naturais, bem como modelo para o estudo de biotransformação de fármacos. Produtos naturais isolados de micro-organismos endofíticos vêm apresentando diversas atividades, entre elas: antibiótica, antiviral, anticâncer, antioxidante, inseticida, antidiabética e imunossupressora (STROBEL; DAISY, 2003; GUIMARÃES et al., 2008). Borges et al. (2009b) destacam, em recente revisão, a importância dos fungos endofíticos como fonte de novos produtos naturais bioativos, como produtores de enzimas e sua utilização em processos de biotransformação.

Até a presente data, os fungos endofíticos, foram pouco utilizados em estudos de biotransformação estereosseletiva de fármacos. Alguns exemplos de seu uso são apresentados na **Tabela I-1**.

Tabela I-1. Exemplos do emprego de fungos endofíticos em biotransformações estereosseletivas.

Fármaco	Fungo	Planta	Metabólito ^a	Referência
Tioridazina	<i>Phomopsis sp.</i>	<i>Tithonia diversifolia</i>	(<i>R,R</i>)-tioridazina-2-sulfóxido	BORGES et al., 2007
	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Viguiera arenaria</i>	(<i>R</i>)-(SE) + (<i>S</i>)-(FE)-tioridazina-5-sulfóxido	
	<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(<i>S,R</i>)-tioridazina-2-sulfóxido	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(<i>R,S</i>)-tioridazina-2-sulfóxido	
Propranolol	<i>Phomopsis sp.</i>	<i>Tithonia diversifolia</i>	(-)-(S)-4-hidroxi-propranolol	BORGES; PUPO; BONATO, 2009
	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Viguiera arenaria</i>	(-)-(S)-4-hidroxi-propranolol	
	<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(-)-(S)-4-hidroxi-propranolol	
	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(-)-(S)-4-hidroxi-propranolol	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(-)-(S)-4-hidroxi-propranolol	
Ibuprofeno	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(+)-(S)-2-hidroxi-ibuprofeno	BORGES et al., 2011
	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	(+)-(S)-2-hidroxi-ibuprofeno	
Albendazol	<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(-)-albendazol sulfóxido	CARRÃO et al., 2011
Albendazol	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	(+)-albendazol sulfóxido	HILÁRIO et al., 2012
	<i>Pestalotiopsis foedans</i>	<i>Viguiera robusta</i>	(+)-albendazol sulfóxido	
	<i>Papulaspora immersa</i>	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	(+)-albendazol sulfóxido	

^aProduto de biotransformação majoritário.

2. TÉCNICAS DE ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA

Para monitorar a biotransformação estereosseletiva dos fármacos selecionados em seus metabólitos ativos é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos precisos e exatos para a determinação de seus enantiômeros em matrizes biológicas (meios de cultura). Diversas técnicas enantiosseletivas podem ser empregadas na determinação de fármacos e seus metabólitos entre elas a cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*, GC) e

eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE) (BONATO, 2003; CAMPO; BERNARDES; CARVALHO; 2009).

Dentre as técnicas listadas, HPLC e CE são as mais importantes para a análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas (BONATO; JABOR; GAITANI; 2005) e foram selecionadas para este estudo. Na sequência são apresentadas características, seletores quirais, vantagens e desvantagens destas técnicas.

2.1. CE

CE pode ser descrita como uma técnica de alta eficiência para a separação de espécies carregadas, que acontece em capilares com diâmetro interno que varia de 25 – 100 μm , preenchidos por uma solução de eletrólitos. Os principais componentes de um sistema usado em CE são: fonte de alta tensão, capilar que passa através do sistema de detecção conectado ao sistema de aquisição de dados e sistema de introdução da amostra. A **Figura I-1** apresenta um desenho esquemático de um sistema de CE. Para realizar as análises, o capilar é primeiramente preenchido com uma solução tampão, também chamada de eletrólito (*Background Electrolyte*, BGE). Na sequência, a amostra é introduzida na extremidade do capilar oposta ao detector. Então, as duas extremidades do capilar são introduzidas em diferentes reservatórios contendo eletrodo e eletrólito. Um dos eletrodos é conectado a um cabo que conduz a tensão aplicada, enquanto que o outro é conectado a um cabo terra.

Devido à aplicação da tensão através do capilar, os íons migram ao longo deste em direção ao eletrodo apropriado e passam pelo detector. A migração e a separação das espécies carregadas devem-se a dois mecanismos: mobilidade eletroforética do analito (μ_{ef}) e fluxo eletrosmótico da solução (μ_{eo}) (ALTRIA, 1996).

Figura I-1. Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de eletroforese capilar.

2.1.1. Mobilidade eletroforética do analito (μ_{ef})

A mobilidade eletroforética é o movimento de espécies carregadas (íons) influenciado por um campo elétrico. Os cátions são atraídos pelo cátodo (eletrodo negativo) e os ânions pelo ânodo (eletrodo positivo). A mobilidade de cada íon depende da sua relação carga/massa, ou seja, do seu tamanho e número de cargas. Assim, um íon pequeno se moverá mais rapidamente do que um íon maior com o mesmo número de cargas. A equação abaixo relaciona a relação carga/massa com a mobilidade eletroforética (μ_{ef}) do analito:

$$\mu_{ef} = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right)$$

onde q é o número de cargas, η é a viscosidade do meio e r é o raio do íon.

A velocidade eletroforética de cada íon é dada pela equação:

$$V_{ef} = \mu_{ef} E$$

onde V_{ef} é a velocidade eletroforética do íon, e E é a tensão aplicada ($V.cm^{-1}$). Portanto, quanto maior a tensão aplicada, maior será a velocidade de migração do íon no interior do capilar (ALTRIA, 1996).

2.1.2. Fluxo Eletrosmótico da solução (μ_{eo})

O outro mecanismo responsável pela migração dos analitos é o fluxo eletrosmótico. Capilares de sílica fundida usados em CE apresentam grupos silanóis ($Si-OH$) em sua parede interna. Em pHs aproximadamente superiores a 5, os grupamentos silanóis ácidos da parede interna do capilar de sílica encontram-se com carga negativa ($Si-O^-$); uma camada de cátions provenientes da solução de eletrólitos neutraliza parcialmente a carga negativa da sílica. A carga negativa restante é neutralizada pelo excesso de cátions solvatados presentes em uma região localizada na solução próxima à parede. Quando uma tensão é aplicada, os cátions desta camada são atraídos para o cátodo e os ânions para o ânodo, porém o excesso de cátions transfere o movimento resultante na direção do cátodo. Esse movimento cria um fluxo uniforme da solução inteira na direção do cátodo, chamado de fluxo eletrosmótico (*Electroosmotic Flow*, EOF) (**Figura I-2**).

Figura I-2. Esquema mostrando o fluxo eletrosmótico (Adaptado de KITAGISHI, 1996).

O EOF impulsiona tanto espécies carregadas (íons) como espécies neutras. Uma vantagem apresentada pelo EOF em CE é o formato plano de seu fluxo que

resulta em eficiências na separação de analitos superiores ao fluxo hidrodinâmico com formato parabólico observado em HPLC (KITAGISHI, 1996) (**Figura I-3**).

Figura I-3. Perfil de fluxo eletrosmótico (A) e hidrodinâmico (fluxo laminar) (B) (Adaptado de WEINBERGER, 2000).

A mobilidade eletrosmótica é dada pela equação abaixo e está associada com a viscosidade do meio (η) e o potencial zeta (ζ), que é relacionado com a carga da superfície interna do capilar.

$$\mu_{eo} = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right)$$

A velocidade eletrosmótica (V_{eo}) é diretamente proporcional à mobilidade eletrosmótica da solução (μ_{eo}). A equação a seguir apresenta a relação entre a velocidade eletrosmótica e a tensão aplicada:

$$V_{eo} = \mu_{eof} E$$

Em pH baixo, o movimento eletrosmótico da solução diminui devido à diminuição da ionização dos grupamentos silanóis na parede do capilar; e em pHs extremamente ácidos esse movimento pode ser nulo e assim a migração dos analitos se dará apenas devido à migração eletroforética do analito (ALTRIA, 1996).

2.1.3. Análise enantiosseletiva por CE

A separação de enantiômeros por CE é realizada, na maioria das vezes, pela adição de seletos quirais na solução de eletrólitos, resultando na formação de diastereoisômeros transitórios. A diferença de estabilidade dos complexos formados

entre os enantiômeros e o seletor quiral ocasiona diferentes mobilidades tempo-dependentes e proporciona a separação. Quando o seletor quiral adicionado a solução de eletrólito for neutro, a separação acontece no modo denominado eletroforese capilar em solução livre (*Free Solution Capillary Electrophoresis*, FSCE) ou simplesmente eletroforese capilar (DA SILVA et al., 2007; RIEKKOLA; JÖNSSON; SMITH, 2004; TERABE; OTSUKA; NISHI, 1994). Esse modo é conveniente para a separação de solutos que apresentam carga no pH da solução tampão em que a análise está sendo realizada. Solutos neutros, mas também os que se encontram carregados no pH da solução tampão empregada para a análise, podem ser resolvidos pelo uso de seletos quirais carregados ou seletos não carregados, desde que se tenha no meio um tensoativo não quiral (modo Cromatografia Eletrocinética, *Electrokinetic Chromatography*, EKC). Esse modo de separação também acontece quando se emprega tensoativos quirais (TERABE; OTSUKA; NISHI, 1994).

2.1.3.1. Seletos quirais

Diversos seletos quirais vêm sendo utilizados em CE, entre os quais, ciclodextrinas (CDs), polissacarídeos lineares, proteínas, antibióticos macrocíclicos, éteres de coroa e tensoativos quirais (RIZZI, 2001; VAN EECKHAUT; MICHOTTE, 2006; GÜBITZ; SCHMID, 2008). Para ser efetivo, um seletor quiral deve apresentar algumas características: (a) deve formar complexos diastereoisoméricos transitórios com diferentes estabilidades com cada enantiômero; (b) deve ser solúvel e quimicamente estável no eletrólito; (c) não deve interferir com a detecção e (d) deve exibir rápida cinética de complexação (BLANCO; VALVERDE, 2003). Apesar de estarem disponíveis diversos seletos quirais, as CDs e seus derivados são os mais usados seguidos pelos antibióticos macrocíclicos, proteínas e polissacarídeos lineares (ALI; KUMERER; ABOUL-ENEIN, 2006; JUVANCZ et al., 2008).

CD são oligossacarídeos cíclicos preparados através da degradação enzimática do amido. Elas apresentam a forma de um cone truncado com uma cavidade hidrofóbica e extremidades hidrofílicas devido à presença de grupos hidroxilas (posições 2, 3 e 6 da glicopirranose) (FANALI, 2000). As CDs nativas mais usadas são α -CD, β -CD e γ -CD, consistindo de seis, sete e oito unidades de

glicopiranoose, respectivamente. **A Figura I-4** apresenta as estruturas químicas da α -CD, β -CD e γ -CD.

O mecanismo de reconhecimento quiral mais aceito para a resolução enantiomérica com CDs envolve a inclusão do analito quiral em sua cavidade (formando um complexo de inclusão) e o estabelecimento de interações secundárias com os grupos hidroxilas (ou grupos introduzidos por derivação). Estas interações diferem entre os enantiômeros e são responsáveis pela sua separação (BLANCO; VALVERDE, 2003).

Figura I-4. Estruturas da α -CD, β -CD e γ -CD.

As propriedades físicas das CDs nativas são completamente diferentes: largura da cavidade, solubilidade e massa molecular. Entretanto, possuem a mesma profundidade. Mesmo apresentando baixa solubilidade em água, a β -CD apresenta cavidade apropriada para o reconhecimento quiral de uma grande quantidade de compostos químicos de interesse farmacêutico. Dessa forma, a maioria dos derivados de CDs, comercialmente disponíveis e desenvolvidos para melhorar a seletividade da separação enantiomérica e a solubilidade, são de β -CD (FANALI, 2000). Atualmente, uma ampla variedade de derivados de CDs é usada na análise quiral por CE. Estes derivados podem ser classificados em: neutros [heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -CD (DM- β -CD), heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -CD (TM- β -CD) e hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD)]; negativamente carregados [carboximetil- β -CD (CM- β -

CD), β -CD-sulfatada (S- β -CD) e sulfobutiléter- β -CD (SBE- β -CD)]; positivamente carregados [2-hidroxipropil-3-trimetil amônio- β -CD (QA- β -CD)] e anfóteros [2-cloreto de hidroxipropil-trimetil amônio- β -CD] (GÜBITZ; SCHMID, 2000; BLANCO; VALVERDE, 2003; VAN EECKHAUT; MICHOTTE, 2006).

2.1.4. Vantagens e desvantagens dos métodos eletroforéticos

A CE é uma técnica analítica com numerosas vantagens, incluindo elevado poder de separação, uso praticamente nulo de solventes orgânicos, necessidade de pequena quantidade de amostra e curto tempo de análise (ISSAQ, 2002). O uso da CE em separações quirais de fármacos e metabólitos em amostras biológicas ainda é uma prática pouco difundida, apesar da elevada eficiência nas separações permitir uma resolução ao nível de linha de base dos enantiômeros e do fármaco de interesse, mesmo com um baixíssimo grau de enantiosseletividade. Essa elevada eficiência também é importante para prevenir a interferência dos componentes da matriz, metabólitos e outros fármacos coadministrados, contribuindo para a seletividade do método. CE quiral é uma técnica preferencial para análise de fármacos polares e/ou básicos e seus metabólitos, principalmente metabólitos de fase II, que não são facilmente analisados por técnicas cromatográficas convencionais (BONATO, 2003).

As maiores desvantagens da CE são o limite de detecção relativamente alto, como consequência do limitado volume de amostra analisado e do reduzido caminho óptico para a detecção (quando empregada detecção por absorção no UV) e menor precisão da injeção quando comparada aos métodos cromatográficos (VAN EECKHAUT; MICHOTTE, 2006; GÜBITZ; SCHMID, 2008). Para minimizar essas limitações instrumentais, várias medidas podem ser adotadas como: uso de sistemas de detecção mais sensíveis (detectores eletroquímicos, por fluorescência induzida a laser e espectrômetro de massas) (HEMPEL, 2000; BONATO, 2003), procedimentos de preparação das amostras que concentram o analito (extração líquido-líquido, extração em fase sólida) (SENTELLAS; PUIGNOU; GALCERAN, 2002; BONATO, 2003) e procedimentos específicos que permitam injetar um maior volume de amostra sem que haja alargamento das bandas, com consequente perda de eficiência.

Dentre os procedimentos que permitem a injeção de um maior volume de amostra, o mais simples é chamado de empilhamento (*stacking*) dos analitos, caracterizado pela dissolução da amostra em uma solução tampão, em geral mais diluída que aquela usada na análise (BONATO, 2003; URBÁNEK; KŘIVÁNKOVÁ; BOČEK, 2003; BONATO; JABOR; DE GAITANI, 2005). Outro procedimento que permite concentrar a amostra chama-se injeção da amostra em campo amplificado (*Field-Amplified Sample Injection*, FASI). Este procedimento consiste na injeção de uma pequena zona de baixa condutividade (geralmente água) hidrodinamicamente para posterior injeção eletrocinética da amostra diluída em uma solução com menor condutividade que o eletrólito de análise (GRARD; MORIN; RIBET, 2002; URBÁNEK; KŘIVÁNKOVÁ; BOČEK, 2003).

2.2. HPLC

HPLC apresenta ampla versatilidade na determinação de fármacos e metabólitos, tendo como vantagem em relação à GC, a possibilidade de separação de compostos não-voláteis. Os métodos de separação quiral por HPLC podem ser classificados em diretos ou indiretos. Nos métodos diretos, emprega-se uma fase estacionária quiral ou uma fase móvel quiral. Nesse caso, ocorre a formação de diastereoisômeros temporários na fase estacionária ou móvel. Nos métodos indiretos, empregam-se fases estacionárias não-quirais e a resolução ocorre pela formação de diastereoisômeros através de reação com um reagente quiral e enantiomericamente puro (HAGINAKA, 2002; MISLANOVÁ; HUTTA, 2003; OLIVEIRA; SANTANA; BONATO, 2005).

Grande parte das resoluções quirais por HPLC fazem uso da metodologia direta através do emprego de fases estacionária quirais (*Chiral Stationary Phases*, CSP). Nas últimas duas décadas, o número de CSP disponíveis comercialmente aumentou consideravelmente, permitindo a análise da maioria dos racematos existentes. Diferentes tipos de seletores quirais têm sido utilizados na preparação de CSP, dentre eles: polissacarídeos e derivados, CDs e derivados, proteínas, antibióticos macrocíclicos e outros. Os seletores quirais são derivados e incorporados ou imobilizados na superfície de um suporte (geralmente sílica gel), atuando como discriminadores quirais *in situ* durante o processo. Para tanto, deverá

apresentar afinidade seletiva para um dos enantiômeros em particular (HAGINAKA, 2002).

2.2.1. Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos

As CSPs baseadas em derivados de polissacarídeos tornaram-se o tipo de fase estacionária mais usada em cromatografia líquida quiral (WARD, 2006) (**Tabela I-2**). Embora os polissacarídeos naturalmente encontrados realizarem reconhecimento quiral, derivatizações destes polímeros têm aumentado sua estabilidade mecânica e sua habilidade no reconhecimento quiral (YASHIMA, 2001). Estas fases são geralmente preparadas pelo revestimento de um suporte de sílica com o derivado do polissacarídeo (OKAMOTO; YASHIMA, 1998). Fases estacionárias obtidas pela ligação química dos derivados de polissacarídeos em sílica também são disponíveis comercialmente (IKAI et al., 2006). Os polissacarídeos mais empregados como CSPs são as formas poliméricas da amilose e celulose.

Geralmente, essas colunas são muito versáteis e, dependendo do material usado, podem ser utilizadas nos modos de eluição normal, reverso e polar orgânico. No modo normal são usadas misturas de um solvente apolar (hexano, por exemplo) e um solvente polar (etanol, por exemplo), o qual regula o tempo de retenção dos analitos, bem como o reconhecimento quiral (KUNATH; THEIL; JÄHNISCH, 1996). Além disso, aditivos orgânicos podem ser adicionados à fase móvel para melhorar o formato do pico pelo bloqueio dos grupos silanóis residuais (por exemplo, dietilamina para fármacos básicos e ácido trifluoracético para fármacos ácidos). Para fármacos que apresentam problemas de solubilidade usando o modo normal, pode ser aplicado o modo reverso de eluição. Nesse modo de eluição, a separação de analitos neutros é realizada pelo uso de uma fase móvel constituída por misturas de um solvente orgânico e água. Por outro lado, moléculas ionizáveis podem requerer ajustes de pH (por exemplo, meio ácido para fármacos ácidos) ou a adição de reagentes para possibilitar a formação de par iônico (por exemplo, ânion perclorato para fármacos básicos) (TACHIBANA; OHNISHI, 2001).

Tabela I-2. Algumas CSPs derivadas de polissacarídeos usadas em HPLC quiral.

Nome comercial	Seletor quiral	Tamanho de partícula (µm)
Chiralpak AD Chiralpak AD-R	Amilose tris (3,5-dimetilfenil) carbamato	10
Chiralpak AD-H Chiralpak AD-RH	Amilose tris (3,5-dimetilfenil) carbamato	5
Chiralpak AS Chiralpak AS-H Chiralpak AS-RH	Amilose tris [(S)-α-metilbenzilcarbamato]	10 5
Chiralcel OD Chiralcel OD-R	Celulose tris (3,5-dimetilfenil) carbamato	10
Chiralcel OD-H Chiralcel OD-RH	Celulose tris (3,5-dimetilfenil) carbamato	5
Chiralcel OJ Chiralcel OJ-H Chiralcel OJ-RH	Celulose tris (4-metilbenzoato)	10 5

H: tamanho de partícula de 5 µm; R: modo de eluição por fase reversa.

Alternativa à análise de fármacos pouco solúveis no modo normal de eluição é o emprego do modo polar orgânico, o qual implica no uso de solventes polares (por exemplo, metanol, acetonitrila, etc.) ou suas misturas como fase móvel. Esse modo tem ganhado especial atenção devido a uma série de vantagens: solubilização de muitos fármacos, compatibilidade com a detecção por espectrometria de massas e viabilidade de emprego em escala preparativa (IKAI et al., 2006).

2.2.2. Fases estacionárias quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos

A introdução de CSPs baseadas em antibióticos macrocíclicos permitiu a resolução dos enantiômeros de muitos fármacos que não eram separados com outros tipos de CSPs (WARD; FARRIS, 2001). Isso é devido ao grande número de interações que ocorrem neste tipo de CSP, incluindo: complexação, inclusão, ligações iônicas, entre outras (GÜBITZ; SCHMID, 2006). Diversos antibióticos têm

sido usados como seletores quirais e os de maior sucesso são: vancomicina, teicoplanina e ristocetina A. Colunas preparadas com essas fases podem ser usadas em todos os modos de eluição (normal, reverso e polar orgânico), intercambiavelmente sem perda de seu desempenho. Entretanto, maiores eficiências são geralmente observadas quando o modo polar orgânico é empregado, com ou sem a adição de aditivos orgânicos (por exemplo, dietilamina, ácido acético ou sua mistura). Neste modo, uma razão apropriada entre a quantidade de aditivos ácidos e básicos deve ser encontrada para assim se obter tempos de retenção satisfatórios e a resolução de fármacos ionizáveis (ABOUL-ENEIN; ALI, 2000). Em fase reversa, a faixa de pH entre 4 e 7 (faixa que mantém estável a coluna) deve ser avaliada a fim de se obter boas separações (ARMSTRONG et al., 1994). As colunas baseadas em antibióticos macrocíclicos são comercialmente conhecidas por Chirobiotic V e Chirobiotic V2 (vancomicina), Chirobiotic T e Chirobiotic T2 (teicoplanina), Chirobiotic R (ristocetina) e Chirobiotic TAG (teicoplanina aglicona) (SIGMA-ALDRICH, 2010).

2.2.3. Vantagens e desvantagens dos métodos cromatográficos

As análises quirais usando HPLC com CSPs apresentam diversas vantagens: (a) as separações ocorrem em baixas temperaturas e a ocorrência de racemização devido a essa situação é insignificante; (b) possibilidade de se obter os enantiômeros isoladamente em escala preparativa, sem a necessidade de tratamentos adicionais; (c) elevada robustez; (d) comercialização de diversas CSPs. Por outro lado, as principais desvantagens são: (a) alto custo das colunas quirais quando comparadas com colunas convencionais; (b) grande quantidade de solventes consumidos principalmente nos modos normal e polar orgânico de eluição (DE SANTANA et al., 2009).

3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A análise de fármacos em amostras biológicas (urina, plasma, soro, sangue total, homogenatos de tecidos ou saliva), matrizes extremamente complexas e que contém proteínas e sais em altas concentrações, geralmente requer procedimentos

de pré-tratamento da amostra antes da etapa analítica (ERNY; CIFUENTES, 2006; DE OLIVEIRA et al., 2008). Quando a concentração dos analitos presentes na amostra biológica é suficientemente alta ela pode ser analisada diretamente por CE. Entretanto, a análise de fármacos em matrizes com alta concentração iônica empregando essa técnica, pode resultar no alargamento de picos. Além disso, as proteínas presentes na amostra podem adsorver nas paredes internas do capilar ocasionando perda de reprodutibilidade e até mesmo o entupimento do capilar. Por sua vez, nas análises cromatográficas, as proteínas presentes na matriz podem adsorver nas colunas cromatográficas (BONATO, 2003; ERNY; CIFUENTES, 2006). Outra função da etapa de preparação da amostra é possibilitar a concentração dos analitos para que se obtenham os limites de detecção adequados para a aplicação pretendida. Devido a esses problemas, a análise de amostras biológicas requer um pré-tratamento, ou seja, um procedimento de extração do analito. As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem, entre outras coisas, a concentração dos analitos de interesse e uma separação livre de interferentes (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A técnica mais comumente utilizada para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos é a extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; BONATO, 2003; ERNY; CIFUENTES, 2006; DE OLIVEIRA et al., 2008). Porém as tendências atuais apontam no sentido da utilização de menores quantidades de amostras; obtenção de maior seletividade e especificidade na extração; desenvolvimento de métodos menos agressivos ao meio-ambiente, com menor desperdício e, o uso de quantidades mínimas de solvente orgânico. Dentro deste contexto, técnicas de microextração que utilizam quantidades mínimas de solvente orgânico vêm sendo desenvolvidas. Dentre estas técnicas destaca-se a microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas (*Hollow Fiber Liquid-phase Microextraction* – HF-LPME) (DE OLIVEIRA et al., 2008).

3.1. Extração líquido-líquido

Na LLE, o fenômeno de partição dos componentes da amostra entre a fase aquosa e orgânica rege o processo de separação. A eficiência da extração depende

da afinidade do soluto pelo solvente de extração e da razão das fases. Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição (K_D) entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH (para prevenir a ionização de ácidos ou bases), pela formação de pares iônicos com solutos ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros (diminuição da solubilidade dos compostos orgânicos na fase aquosa). Apesar da simplicidade e uso de solventes disponíveis comercialmente, LLE apresenta certas desvantagens, como alto consumo de solventes orgânicos, formação de emulsões, necessidade da etapa de separação de fases e dificuldade de automação (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

3.2. Microextração em fase líquida com membranas ocas

Pedersen-Bjegaard e Rasmussen (1999) idealizaram uma nova metodologia de extração combinando os conceitos de extrações com membranas. Na HF-LPME, considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes, uma membrana capilar, porosa e hidrofóbica (geralmente polipropileno) é impregnada com solvente orgânico, enquanto que o lúmen da membrana é preenchido com uma fase aceptora (microextrato). Essa técnica requer um baixíssimo consumo de solventes orgânicos e o baixo custo de cada unidade de extração (membrana capilar) possibilita o uso único de cada membrana, evitando-se problemas de *carryover* (PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSSEN, 1999; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

A HF-LPME pode ser executada em dois modos de extração: duas ou três fases, de acordo com as características do analito. No modo de duas fases, o analito é extraído a partir de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico, imiscível em água, imobilizado nos poros da membrana, para a fase aceptora (mesmo solvente) localizada no lúmen da membrana. Para obtenção de sucesso nesse modo de extração os analitos devem apresentar média ou elevada hidrofobicidade, podendo apresentar tanto caráter ácido, básico ou neutro. No modo de três fases, o analito é também extraído a partir de uma solução aquosa (fase doadora) através do solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana (fase orgânica) para uma solução aquosa (fase aceptora) presente no lúmen da

membrana. O pH da fase doadora e aceptora são ajustados de tal forma a manter o analito não ionizado e ionizado, respectivamente. Dessa forma, esse modo de extração é útil para analitos com caráter ácido ou básico. Neste caso, a fase orgânica funciona como uma barreira entre a fase aceptora e doadora (ambas aquosas), prevenindo sua mistura. Diferentes parâmetros devem ser estudados durante o desenvolvimento do método por HF-LPME, tais como: ajuste do pH e força iônica da amostra, membrana de extração, volume de amostra (solução doadora), tipo de solvente orgânico, tempo de extração, solução aceptora e agitação do sistema (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

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

4. FÁRMACOS SELECIONADOS PARA O ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM FUNGOS ENDOFÍTICOS.

Os fármacos bufuralol (**Figura I-5 a1**), donepezila (**Figura I-5 b1**) e midodrina (**Figura I-5 c1**) juntamente com seus principais e respectivos metabólitos: 1'-hidroxibufuralol (**Figura I-5 a2**), 1'-oxobufuralol (**Figura I-5 a3**); 6-*O*-desmetil donepezila (**Figura I-5 b2**) e 5-*O*-desmetil donepezila (**Figura I-5 b3**) e desglímidodrina (**Figura I-5 c2**), foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho por apresentarem biotransformação estereosseletiva e metabólitos ativos provenientes do processo de biotransformação em mamíferos.

Os fármacos estudados serão apresentados na forma de capítulos. Cada capítulo consta de revisão da literatura sobre o fármaco, objetivos específicos, materiais e métodos, resultados e discussão e comentários finais.

Figura I-5 – Estruturas moleculares de bufuralol (**a1**), donepezila (**b1**) e midodrina (**c1**) e de seus principais e respectivos metabólitos: 1'-hidroxibufuralol (**a2**) e 1'-oxobufuralol (**a3**); 6-O-desmetil donepezila (**b2**) e 5-O-desmetil donepezila (**b3**) e desglímidodrina (**c2**). *Centros quirais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Macrocyclic antibiotics as effective chiral selectors for enantiomeric resolution by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 52, p. 679-691, 2000.

ALI, I.; KUMERER, K.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 63, n. 7-8, p. 295-307, 2006.

ALTRIA, K.D. Fundamentals of capillary electrophoresis theory. In: _____. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa: Humana Press Inc., 1996. Cap. 1, p. 3-13.

ARMSTRONG, D.W.; TANG, Y.; CHEN, S.; ZHOU, Y.; BAGWILL, C.; CHEN, J. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, 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.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Advances in Biotechnology Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 63, p. 169-218, 1999.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, p. 428-439, 2003.

BONATO, P.S. Recent advances in the determination of enantiomeric drugs and their metabolites in biological fluids by capillary electrophoresis-mediated microanalysis. **Electrophoresis**, Malden, v. 24, p. 4078-4094, 2003.

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. 24, n. 1, p. 68-76, 2005.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 77, p. 669-674, 2007.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 46, n. 5, p. 945-952, 2008.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; DURÁN-PATRÓN, R.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S.; COLLADO, I.G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 385-397, 2009a.

BORGES, K.B.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Enantioselective analysis of propranolol and 4-hydroxypropranolol by CE with application to biotransformation studies employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, Malden, v. 30, p. 3910-3917, 2009.

BORGES, K.B.; OLIVEIRA, A.R.M.; BARTH, T.; JABOR, V.A.P.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. LC-MS-MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 399, p. 915-925, 2011.

BORGES, W.S.; BORGES, K.B.; BONATO, P.S.; SAID, S.; PUPO, M.T. Endophytic fungi: Natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, Amsterdam, v. 13, p. 1137-1163, 2009b.

CAMPO, V.L.; BERNARDES, L.S.C.; CARVALHO, I. Stereoselectivity in Drug Metabolism: Molecular Mechanisms and Analytical Methods. **Current Drug Metabolism**, Sharjah, v. 10, p. 188-205, 2009.

CARRÃO, D.B.; BORGES, K.B.; BARTH, T.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S.; 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.

DA SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 740-744, 2007.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 52, p. 455-463, 1999.

DE OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; DE SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 627-644, 2008.

DE SANTANA, F.J.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; DA FONSECA, P.; BARTH, T.; DE OLIVEIRA, A.R.M. Analytical tools for the enantioselective analysis of drugs and metabolites. In: LOPES, N. P.; GUARATINI, T. **Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences**. Kerala: Transworld Research Network, 2009. Capítulo 2, p. 19-49.

ERNY, G.L.; CIFUENTES, A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 40, p. 509-515, 2006.

FANALI, S. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 875, n. 1-2, p. 89-122, 2000.

FREITAG, D.G.; FOSTER, R.T.; COUTTS, R.T.; PICKARD, M.A.; PASUTTO, F.M. Stereoselective metabolism of rac-mexiletine by the fungus *Cunninghamella echinulata* yields the major human metabolites hydroxymethylmexiletine and p-hydroxymexiletine. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 25, n. 6, p. 685-692, 1997.

GRARD, S.; MORIN, P.; RIBET, J.P. Application of capillary electrophoresis with field-amplified sample injection for the detection of new adrenoreceptor antagonist enantiomers in plasma in the low ng/mL concentration range. **Electrophoresis**, Malden, v. 23, p. 2399-2407, 2002.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M.G. Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Malden, v. 21, p. 4112-4135, 2000.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M.G. Chiral separation principles in chromatographic and electromigration techniques. **Molecular Biotechnology**, New York, v. 32, n. 2, p. 159-179, 2006.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M.G. Chiral separation by capillary electromigration techniques **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1204, n. 2, p. 140-156, 2008.

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.Y.; RIBEIRO, P.H.; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 52, n.1, p. 134-144, 2008.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 357-372, 2002.

HEMPEL, G. Strategies to improve the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of drugs in biological fluids. **Electrophoresis**, Malden, v. 21, p. 691-698, 2000.

HILÁRIO, V.C.; CARRÃO, D.B.; BARTH, T.; BORGES, K.B.; FURTADO, N.A.J.C.; PUPO, M.T.; 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 polysaccharide-based chiral stationary phases for HPLC. **Polymer Journal**, Tokyo, v. 38, n. 2, p. 91-108, 2006.

ISSAQ, H.J. Thirty-five years of capillary electrophoresis: advances and perspectives. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, London, v. 25, p. 1153-1170, 2002.

JÖNSSON, J.Å.; MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, p. 205-225, 2000.

JUVANCZ, Z.; KENDROVICS, R.B.; IVÁNYI, R.; SZENTE, L. The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis, **Electrophoresis**, Malden, v. 29, n. 8, p. 1701-1712, 2008.

KITAGISHI, K. Introduction. In: SHINTANI, H.; POLONSKÝ, J. (Ed.). **Handbook of capillary electrophoresis applications**. London: Blackie Academic and Professional, 1996. cap. 1, p. 1-14.

KUNATH, A.; THEIL, F.; JÄHNISCH, K. Influence of the kind of the alcoholic modifier on chiral separation on a Chiralpak AD column. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 728, n. 1-2, p. 249-257, 1996.

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

MA, B.; HUANG, H.H.; CHEN, X.Y.; SUN, Y.M.; LIN, L.H.; ZHONG, D.F. Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleana*. **Acta Pharmacologica Sinica**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1067-1074, 2007.

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.

MOODY, J.D.; FREEMAN, J.P.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 27, n. 10, p. 1157-1164, 1999.

MOODY, J.D.; FREEMAN, J.P.; FU, P.P.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 30, n. 11, p. 1274-1279, 2002.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharides derivatives for chromatographic separation of enantiomers. **Angewandte Chemie International ed. In English**, Hoboken, v. 37, p. 1020-1043, 1998.

OLIVEIRA, A.R.M.; SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Stereoselective determination of the major ibuprofen metabolites in human urine by off-line coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, p. 25-34, 2005.

PARSHIKOV, I.A.; FREEMAN, J.P.; WILLIAMS, A.J.; MOODY, J.D.; SUTHERLAND, J.B. Biotransformation of *N*-acetylphenothiazine by fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 52, p. 553-557, 1999.

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.

PETERSON, D.H.; MURRAY, H.C.; EPPSTEIN, S.H.; REINEKE, L.M.; WEINTRAUB, A.; MEISTER, P.D.; LEIGH, H.M. Microbial transformation of steroids. I. Introduction of oxygen at Carbon-11 of progesterone. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 74, n. 23, p. 5933-5936, 1952.

POLLARD, D.J.; WOODLEY, J.M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends in Biotechnology**, London, v. 25, n. 2, p. 66-73, 2006.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, n. 10, p. 565-574, 2003.

PUPO, M.T.; BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; BONATO, P.S. Fungal biotransformations: a powerful tool in drug metabolism studies. In: SAIKIA, R.; BEZBARUAH, R. L.; BORA, T. C. **Microbial Biotechnology**. New Delhi: New India Publishing Agency (NIPA), 2008. Capítulo 3, p. 47-65.

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.

RIEKKOLA, M.-L.; JÖNSSON, J.Å.; SMITH, R. M. Terminology for analytical capillary electromigration techniques. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 443-451, 2004.

RIZZI, A. Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Malden, v. 22, p. 3079-3106, 2001.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Oxford, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SENTELLAS, S.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M.T. Capillary electrophoresis with on-line enrichment for the analysis of biological samples. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 25, p. 975-987, 2002.

SIGMA-ALDRICH. **Astec chirobiotic**: Macrocyclic Glycopeptide-Based Chiral HPLC Phases. Saint Louis, MO, EUA, 2010. 12p.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUN, L.; HUANG, H.H.; LIU, L.; ZHONG, D.F. Transformation of Verapamil by *Cunninghamella blakesleana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2722-2727, 2004.

SUTHERLAND, J.B.; FREEMAN, J.P.; HEINZE, T.M.; MOODY, J.D.; PARSHIKOV, I.A.; WILLIAMS, A.J.; ZHANG, D. Oxidation of phenothiazine and phenoxazine by *Cunninghamella elegans*. **Xenobiotica**, Abingdon, v. 31, n. 11, p. 799-809, 2001.

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.

TERABE, S.; OTSUKA, K.; NISHI, H. Separation of enantiomers by capillary electrokinetic techniques. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 666, p. 295-319, 1994.

URBÁNEK, M.; KŘIVÁNKOVÁ, L.; BOČEK, P. Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures. **Electrophoresis**, Malden, v. 24, p. 466-485, 2003.

VAN EECKHAUT, A.; MICHOTE, Y. Chiral separations by capillary electrophoresis: recent developments and applications. **Electrophoresis**, Malden, v. 27, p. 2880-2895, 2006.

VÉZINA, C. Biotransformation. In: Bu'lock, J.; Kristiansen, B. **Basic Biotechnology**. San Diego: Academic Press, p. 463-482, 1987.

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, n. 12, p. 3947-3956, 2006

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis: Basic concepts. In: _____. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2000. Capítulo 2, 25-72.

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

YOSHIDA, T.; KITO, M.; TSUJII, M.; NAGASAWA, T. Microbial synthesis of a proton pump inhibitor by enantioselective oxidation of a sulfide into its corresponding sulfoxide by *Cunninghamella echinulata* MK 40. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 15, p. 1217-1222, 2001.

ZHONG, D.F.; SUN, L.; LIU, L.; HUANG, H.H. Microbial transformation of naproxen by *Chunninghamella* species. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 24, n. 5, p. 442-447, 2003.

OBJETIVOS GERAIS

A biotransformação de fármacos empregando fungos pode ser uma importante fonte de metabólitos conhecidos e desconhecidos que podem então ser empregados em estudos para estabelecer as suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Esse tipo de estudo pode também gerar informações adicionais sobre a capacidade do sistema enzimático desses micro-organismos em mimetizar as enzimas responsáveis pela biotransformação de fármacos em humanos. Para monitorar a formação dos metabólitos nos processos de biotransformação, é necessário desenvolver e validar métodos analíticos com características adequadas para essa aplicação. Sendo assim, este trabalho tem a finalidade de desenvolver novas metodologias analíticas e estudar a biotransformação estereosseletiva dos fármacos bufuralol, donepezila e midodrina empregando fungos, visando estabelecer quais metabólitos são formados, se o processo é estereosseletivo e se as condições empregadas são viáveis para a obtenção desses metabólitos em larga escala. Para alcançar estes objetivos foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- a) Desenvolvimento e validação de métodos empregando CE e HPLC, bem como técnicas convencionais (LLE) e modernas (HF-LPME) de preparação de amostras para a análise estereosseletiva de bufuralol e de seus metabólitos 1'-hidroxibufuralol e 1'-oxobufuralol; donepezila e seus metabólitos 5-O-desmetil donepezila e 6-O-desmetil donepezila; midodrina e seu metabólito desglímidodrina em meio de cultura;
 - b) Aplicação dos métodos validados nos estudos de biotransformação estereosseletiva dos fármacos selecionados empregando fungos;
 - c) Avaliação da cinética de biotransformação estereosseletiva empregando fungos.
-

**CAPÍTULO 1: DETERMINAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DA
MIDODRINA E DMAE POR CE EM MEIO DE CULTURA:
APLICAÇÃO EM ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO
EMPREGANDO FUNGOS ENDOFÍTICOS**

1. REVISÃO DA LITERATURA

A midodrina, “acetamida, 2 - amino - *N* - [2 - (2,5 – dimetoxifenil)-2-hidroxi-etil]-” (SCIFINDER WEB), é um pró-fármaco, comercializado como mistura racêmica. No organismo ela é biotransformada à desglímidodrina (DMAE), um agonista ativo dos receptores α_1 adrenérgicos (**Figura C1-1**). A desglímidodrina estimula os receptores α_1 produzindo aumento do tônus vascular e elevação da pressão sanguínea, sendo utilizada terapeuticamente no tratamento de pacientes com insuficiência autônoma e hipotensão postural (OLDENBURG et al., 2002; WESTFALL; WESTFALL, 2006). A midodrina apresenta um carbono quiral na posição C-2 ligado a um grupo hidroxila.

A DMAE, seu metabólito ativo, origina-se a partir de uma hidrólise enzimática do grupamento amida resultando na perda de uma molécula de glicina; no entanto, a DMAE mantém o carbono quiral na posição C-2 (QUAGLIA et al., 2004). Essa reação ocorre principalmente no fígado, mas também na circulação sistêmica por ação de uma peptidase desconhecida (RAUTIO et al., 2008). A DMAE, por sua vez, é biotransformada a 5'-*O*-desmetil desglímidodrina por ação principal da isoenzima CYP2D6 e em menor extensão pela CYP1A2 do citocromo P450 (AKIMOTO et al., 2004). A midodrina apresenta atividade α_1 -agonista inferior a DMAE e a avaliação da pressão arterial em ratos indicou que sua atividade biológica e de seu metabólito deve-se somente ao enantiômero (-) e que o enantiômero (+) é inativo (QUAGLIA et al., 2004).

Figura C1-1 – Estruturas moleculares da midodrina e desglímidodrina. *Centros quirais.

Quaglia et al. (1998) desenvolveram um método enantiosseletivo para a determinação simultânea de (-)- e (+)-midodrina e (-)- e (+)-DMAE por HPLC e detecção por absorção no ultravioleta. A coluna utilizada na resolução dos enantiômeros foi a Chiral AGP. Posteriormente, Quaglia et al. (2004) utilizaram três

diferentes fases estacionárias quirais para realizar a separação dos enantiômeros de midodrina e DMAE em escala semipreparativa, possibilitando investigar a atividade biológica dos enantiômeros isoladamente. Para a resolução dos enantiômeros da midodrina foi utilizada a coluna Chiralcel OD-H, enquanto que a separação dos enantiômeros da DMAE foi feita empregando a coluna Chiralcel OD-R. A coluna Chiral AGP foi usada na separação da mistura de midodrina e DMAE.

Os métodos acima descritos não possibilitam a determinação enantiosseletiva da midodrina e DMAE em matrizes biológicas. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos pode permitir que estudos adicionais de disposição cinética, biotransformação, possam ser conduzidos. Além disso, nenhum estudo referente ao emprego de micro-organismos para a biotransformação desse fármaco foi relatado na literatura.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta etapa foi desenvolver métodos para estudar a biotransformação enantiosseletiva da midodrina empregando fungos endofíticos. Para alcançar este objetivo foram executadas as seguintes etapas:

- a) Desenvolvimento e validação de método enantiosseletivo para a análise simultânea da midodrina e DMAE em meio de cultura;
 - b) Aplicação do método validado nos estudos de biotransformação enantiosseletiva da midodrina por fungos endofíticos;
 - c) Avaliação da cinética de biotransformação enantiosseletiva da midodrina por fungos endofíticos;
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Separação dos enantiômeros da midodrina e DMAE empregando fases estacionárias quirais

3.1.1. Materiais

3.1.1.1. Reagentes e solventes

Os solventes orgânicos usados no preparo das fases móveis durante a avaliação das colunas quirais foram grau cromatográfico. Metanol e isopropanol (IPA) foram obtidos da Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA), o etanol foi obtido da Tedia (Fairfield, OH, EUA) e a acetonitrila (ACN) foi obtida da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

Os aditivos orgânicos (grau p.a.), dietilamina (DEA) e ácido acético glacial, foram obtidos da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), enquanto que a trietilamina (TEA) e o ácido trifluoracético (TFA) foram obtidos da Acros Organics (Fair Lawn, NJ, EUA).

Os reagentes (grau p.a.) empregados no preparo das fases móveis utilizadas no modo fase reversa foram: acetato de amônio, ácido bórico, fosfato de potássio monobásico e perclorato de sódio monoidratado adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha), tetraborato de sódio decaidratado obtido da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e fosfato de potássio dibásico anidro obtido da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil).

3.1.1.2. Soluções-padrão

A *rac*-midodrina e seu metabólito racêmico, DMAE, usados no preparo das soluções-padrão foram obtidos da Toronto Research Chemical Inc. (North York, Canadá). As soluções-padrão utilizadas na avaliação das colunas quirais foram preparadas em metanol, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de uma solução estoque preparada também em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} . As soluções foram armazenadas a temperatura de -20°C e protegidas da ação da luz.

3.1.1.3. Colunas com fases estacionárias quirais

Foram avaliadas colunas quirais com fases estacionárias baseadas em derivados de polissacarídeos (amilose e celulose), bem como colunas com fases estacionárias baseadas em antibióticos macrocíclicos (vancomicina e teicoplanina). As colunas foram avaliadas em diferentes condições cromatográficas, tanto no modo de eluição polar orgânico como em fase reversa, objetivando buscar uma condição capaz de separar os enantiômeros da midodrina e DMAE. Desse modo, as seguintes colunas quirais foram avaliadas:

Colunas baseadas em derivados de polissacarídeos:

- ✓ Coluna Chiralpak AD-RH (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- ✓ Coluna Chiralcel OD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- ✓ Coluna Chiralcel OJ-R (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída de um derivado de celulose tris (4-metilbenzoato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.
- ✓ Coluna Chiralpak AS (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída de um derivado de amilose tris [(S)-1-fenilcarbamato] recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

Colunas baseadas em antibióticos macrocíclicos:

- ✓ Coluna Chirobiotic V (150 x 4,6 mm, Advanced Separation Technologies (ASTEC), Whippany, NJ, EUA), constituída do antibiótico macrocíclico vancomicina ligado a partículas de sílica de 5 µm.
 - ✓ Coluna Chirobiotic T (150 x 4,6 mm, Advanced Separation Technologies (ASTEC), Whippany, NJ, EUA), constituída do antibiótico macrocíclico teicoplanina ligado a partículas de sílica de 5 µm.
-

3.1.1.4. Equipamentos

3.1.1.4.1. Espectrofotômetro

Os espectros de absorção na região do ultravioleta das soluções de midodrina e DMAE, preparadas em metanol na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram obtidos usando um espectrofotômetro UV-visível da marca NIR Hitachi, modelo U-3501 (Tokyo, Japão), utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

3.1.1.4.2. Sistema Cromatográfico

Foi empregado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-10AS, um injetor Rheodyne (Cotati, CA, EUA) modelo 7125 com amostrador de $20 \mu\text{L}$, um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A, uma controladora modelo SCL-10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japão) e um sistema de aquisição de dados com software LCsolution® versão 1.22 SP1.

3.1.1.4.3. Equipamentos empregados no preparo das amostras e fases móveis

Os sais usados no preparo das soluções tampão foram pesados em balança analítica Ohaus, modelo adventurer (Pine Brook, NJ, EUA). O peagâmetro utilizado nas aferições de pH das soluções aquosas foi da marca Thermo, Orion 420 A+ (Waltham, MA, EUA). Para degaseificação das fases móveis aquosas foi empregado um aparelho de ultrassom da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, SP, Brasil), juntamente com um sistema de vácuo. Foi utilizado também um agitador Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil) na homogeneização das amostras. Um sistema de purificação de água, Milli-Q plus Millipore/Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções e fases móveis aquosas.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Avaliação de colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais

A resolução dos enantiômeros da midodrina e seu metabólito DMAE foi avaliada à temperatura ambiente. Alíquotas de 25 μL das soluções-padrão de *rac*-midodrina e *rac*-DMAE, na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram evaporadas até completa secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 100 μL de fase móvel, dos quais, 20 μL foram cromatografados.

As colunas baseadas em derivados de polissacarídeos Chiralpak AD-RH, Chiralcel OJ-R, Chiralpak AS foram empregadas no modo polar orgânico, utilizando fases móveis variadas constituídas de metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila, de maneira isolada ou suas misturas, respeitando as limitações de cada coluna determinadas pelos seus fabricantes. A adição de bases orgânicas (dietilamina, trietilamina) também foi realizada visando reduzir a interação dos analitos básicos com os grupos silanóis residuais da sílica usada como suporte para o seletor quiral.

As colunas Chiralpak AD-RH e Chiralcel OD-H foram empregadas no modo fase reversa. Nesta situação foram usadas fases móveis aquosas adicionadas de solventes orgânicos. As fases móveis empregadas com a coluna Chiralpak AD-RH foram preparadas com soluções tampão borato de sódio 20 mmol L^{-1} (pH 9) e fosfato de potássio 20 mmol L^{-1} (pH 8). Nos testes com a coluna Chiralcel OD-H foram empregadas soluções aquosas de perclorato de sódio (NaClO_4). Nesta condição, avaliou-se o efeito do pH, concentração das soluções aquosas, além do tipo e proporção do solvente orgânico (metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila) adicionado. Antes da utilização, as fases foram filtradas em membrana Millipore de 0,45 μm e degaseificadas durante 15 minutos.

As colunas Chirobiotic V e Chirobiotic T foram empregadas no modo polar orgânico utilizando fases móveis variadas constituídas de metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila, de maneira isolada ou suas misturas. A adição de aditivos orgânicos (trietilamina e ácido acético) foi também avaliada de maneira isolada, ou suas misturas em diferentes proporções. Além disso, a coluna Chirobiotic T também foi empregada no modo fase reversa, com fases móveis aquosas tamponadas de acetato de amônio e acetato de trietilamina 20 mmol L^{-1} e adicionadas de solventes orgânicos. Nesta condição, avaliou-se o efeito do pH (faixa de 4 a 7), concentração das soluções aquosas tamponadas, além do tipo e proporção do solvente orgânico (metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila) adicionado.

O parâmetro empregado para avaliação da separação foi a resolução (R_s), calculada segundo a equação (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997):

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

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

A vazão empregada foi ajustada conforme a viscosidade da fase móvel, a fim de se evitar que a pressão gerada ultrapassasse os limites permitidos para cada coluna e, ao mesmo tempo, que a análise se tornasse muito longa.

3.2. Análise enantiosseletiva da midodrina e DMAE empregando eletroforese capilar

3.2.1. Materiais

3.2.1.1. Reagentes e solventes

O sal acetato de sódio foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha), o hidróxido de sódio foi obtido da Spectrum (New Brunswick, NJ, EUA) e o ácido acético glacial foi obtido da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), todos grau p.a. Estes reagentes foram usados no preparo do eletrólito.

O clorofórmio adquirido da empresa Omnisolv (Gibbstown, NJ, EUA), diclorometano e acetato de etila obtidos da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA), todos grau cromatográfico, e o hidróxido de amônio grau p.a. obtido da Qhemis (São Paulo, SP, Brasil), completam a lista de solventes e reagentes usados na etapa de otimização do procedimento de preparação das amostras por LLE.

3.2.1.2. Soluções – padrão

As soluções-padrão de midodrina e DMAE foram preparadas e armazenadas conforme item 3.1.1.2. deste capítulo.

3.2.1.3. Capilar

O capilar de sílica fundida revestido externamente por uma camada de poliimida foi adquirido em rolos de 25 m da empresa Microsolv (Eatontown, NJ, EUA). O capilar empregado no desenvolvimento e otimização do método eletroforético possuía 50 µm de diâmetro interno e foi preparado no laboratório com aproximadamente 48,5 cm totais e 40 cm efetivos. O capilar foi cortado com o auxílio de uma caneta de ponta diamantada obtida da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). A janela óptica de detecção ($\approx 0,5$ cm de comprimento) foi construída pela remoção do revestimento de poliimida a 8 cm de uma das extremidades do capilar, através da aplicação de calor. A poliimida queimada foi removida com o auxílio de um algodão embebido em acetona adquirida da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA).

3.2.1.4. Equipamentos

3.2.1.4.1. Sistema eletroforético

As análises eletroforéticas foram realizadas em um sistema de CE da marca Agilent Technologies (Waldbroon, Alemanha), composto por um analisador modelo G1600A e um detector por absorção no UV-VIS com arranjo de diodos. As injeções foram realizadas por um amostrador automático. O equipamento foi controlado pelo *software* Chemstation® 3D-CE, versão B.04.01, que também foi usado na aquisição e tratamento dos dados.

3.2.1.4.2. Equipamentos empregados no preparo da solução tampão e amostras

Os constituintes das soluções tampão foram pesados em balança analítica Ohaus, modelo Adventurer (Pine Brook, NJ, EUA). O peagâmetro utilizado nas aferições de pH das soluções tampão foi da marca Thermo, Orion 420 A+ (Waltham, MA, EUA). Para degaseificação e dissolução dos solutos das soluções empregadas na análise eletroforética foi empregado um aparelho de ultrassom da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, SP, Brasil). Foi utilizado também um agitador Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil) na extração e homogeneização das amostras. Um sistema de purificação de água, Milli-Q plus da

Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções aquosas. A centrífuga utilizada na remoção de partículas suspensas após a extração foi da marca FANEM, modelo 206 (São Paulo, Brasil).

3.2.1.5. Seletores quirais

Três seletores quirais, derivados neutros de CD, foram avaliados no modo de polaridade normal, objetivando selecionar o seletor quiral mais apropriado para a separação enantiosseletiva da midodrina e seu metabólito DMAE, visando obter resolução adequada no menor tempo de análise possível. As três CDs neutras usadas foram:

- ✓ 2-Hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD), obtida da Aldrich (Saint Louis, MO, EUA);
- ✓ Heptakis (2,6-di-*O*-metil)- β -CD (DM- β -CD), obtida da Aldrich (Saint Louis, MO, EUA);
- ✓ Heptakis (2,3,6-tri-*O*-metil)- β -CD (TM- β -CD), obtida da Fluka (Buch, Suíça).

3.2.1.6. Meio de cultura fermentativo Czapek

Foi preparado meio de cultura fermentativo Czapek para ser utilizado no desenvolvimento e otimização do método eletroforético e do procedimento de preparação das amostras. Este meio foi escolhido por ser o que será empregado no estudo de biotransformação da midodrina empregando fungos endofíticos. A composição do meio Czapek está apresentada na **Tabela C1-4**, item 3.4.1.3. desse capítulo.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Condicionamento do capilar

Antes do primeiro uso, os capilares novos foram condicionados por lavagem com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 30 min e água ultrapura durante 30 min.

No início do dia, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 10 min, seguido de uma etapa de lavagem com água ultrapura por 10 min e uma terceira etapa com o eletrólito de análise durante os mesmos 10 min.

Entre cada análise o capilar era condicionado por 2 min com NaOH 0,1 mol L⁻¹, 2 min com água ultrapura e 3 min com o eletrólito de análise.

Ao final das análises, o capilar era lavado com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 min, seguido por uma etapa de lavagem com água ultrapura durante os mesmos 15 min. Durante o armazenamento, as extremidades do capilar permaneceram imersas em água ultrapura.

3.2.2.2. Avaliação dos seletores quirais empregados em CE

O desenvolvimento e otimização do método eletroforético foram conduzidos empregando alíquotas de 25 µL das soluções-padrão de midodrina e DMAE na concentração de 80 µg mL⁻¹. Após evaporação do solvente sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos, nessa etapa, em 50 µL de solução tampão de injeção, constituída pelo tampão de análise diluído dez vezes em água ultrapura. As amostras eram injetadas no modo hidrodinâmico por 25 s a 50 mBar. A concentração na solução analisada de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito era 20 µg mL⁻¹.

Nesta etapa foram otimizadas várias condições e parâmetros do método: seletor quiral, composição, concentração e pH do tampão, pré-condicionamento do capilar, temperatura de análise, modo de injeção e tensão aplicada.

3.2.2.3. Procedimento de preparo da solução tampão

Foi preparada uma solução estoque de acetato de sódio 1 mol L⁻¹. Diariamente a solução estoque era diluída à concentração requerida e o pH era ajustado para 5 com solução de ácido acético 1 mol L⁻¹.

3.2.2.4. Otimização do procedimento de preparo da amostra

Para otimização deste procedimento, as análises foram realizadas fortificando-se 1 mL de meio de cultura Czapek branco com 25 µL das soluções-

padrão de midodrina e DMAE na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em paralelo, 1 mL de meio de cultura branco também era processado sob as mesmas condições de análise, para verificar a presença de interferentes da matriz.

Em todos os experimentos executados no desenvolvimento e otimização do procedimento de extração, o meio aquoso foi alcalinizado, para manter o fármaco de caráter básico na sua forma não dissociada, viabilizando a extração pelo solvente orgânico. A solução alcalina usada nos experimentos foi 100 μL de hidróxido de amônio p.a. Na avaliação do solvente orgânico extrator, foram empregados volumes de 3 mL de diclorometano, clorofórmio e acetato de etila e misturas de acetato de etila com etanol, metanol, isopropanol e acetonitrila, sendo recuperados 2 mL após o término da extração. Além disso, foi também avaliada a influência do tempo de extração.

3.3. Validação do método por eletroforese capilar para a determinação enantiosseletiva de midodrina e seu principal metabólito em meio de cultura

3.3.1. Soluções-padrão usadas na validação do método eletroforético

As soluções-padrão de *rac*-midodrina e *rac*-DMAE utilizadas na validação do método eletroforético foram preparadas em metanol, na concentração de 8, 24, 40, 160, 320, 400, 640, 800 e $960 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de uma solução estoque preparada também em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} . A solução do padrão interno (imipramina, obtida da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA)) foi preparada em metanol na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20°C e protegidas da ação da luz.

3.3.2. Método de extração otimizado

Os enantiômeros da midodrina e DMAE foram extraídos do meio de cultura Czapek por LLE. Alíquotas de 1 mL do meio de cultura Czapek fortificadas com 25 μL das soluções-padrão de midodrina e DMAE ou amostras obtidas no procedimento de biotransformação foram transferidas para tubos de extração de vidro de 10 mL e alcalinizadas com 100 μL de hidróxido de amônio P.A. As amostras foram

homogeneizadas em vortex durante 20 s. Posteriormente, 3 mL do solvente extrator, acetato de etila, foram adicionados. As amostras foram agitadas em vortex durante 2 min e então centrifugadas a 1800g por 10 min. As fases orgânicas (2 mL) foram transferidas para tubos cônicos de vidro de 10 mL e fortificadas com 25 µL da solução do P.I. (imipramina 20 µg mL⁻¹). O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de uma mistura metanol: água (90:10, v/v) + H₃PO₄ 80 µmol L⁻¹, agitados em vortex durante 20 s e analisados pelo sistema de CE.

3.3.3. Parâmetros avaliados na validação do método

O método foi validado conforme recomendações de guias oficiais (FDA, 2001; ANVISA 2003) pela avaliação dos seguintes parâmetros: recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, seletividade, robustez e estabilidade.

3.3.3.1. Recuperação

Na determinação da recuperação do procedimento de extração, alíquotas de 1 mL de meio de cultura Czapek foram fortificadas com midodrina e DMAE nas concentrações de 300, 5000 e 10000 ng mL⁻¹ de cada enantiômero e submetidas ao procedimento de extração. Outro grupo de amostras foi preparado extraíndo-se alíquotas de 1 mL de meio de cultura Czapek e o extrato resultante foi fortificado com as mesmas concentrações dos enantiômeros da midodrina e DMAE, acima descritas. Em virtude da utilização de padrão interno (P.I.), que não foi submetido a extração em nenhum dos dois grupos, a recuperação do método foi determinada pela comparação da razão da área dos picos (analito/P.I.) das soluções submetidas e não submetidas ao procedimento de extração e seu resultado foi expresso em percentagem de extração do analito. O P.I. não foi submetido ao procedimento de extração, pois os resultados de precisão da análise dessas amostras foi melhor que de amostras nas quais o P.I. foi extraído. Portanto, o P.I. foi empregado apenas para corrigir eventuais erros do procedimento de injeção.

3.3.3.2. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de três curvas analíticas obtidas pela fortificação do meio de cultura Czapek com soluções-padrão de *rac*-midodrina e *rac*-DMAE na faixa de concentração de 8 – 960 $\mu\text{g mL}^{-1}$, resultando em concentrações de 100 – 12000 ng mL^{-1} de cada enantiômero.

3.3.3.3. Limite de quantificação (LQ)

A detectabilidade do método foi avaliada pela determinação do limite de quantificação (LQ), definido como a menor concentração de enantiômeros que pode ser determinada com exatidão e precisão inferiores a 20% (FDA, 2001; ANVISA, 2003). Para esta determinação, 5 alíquotas de 1 mL de meio de cultura Czapek foram fortificadas com 100 ng mL^{-1} de cada enantiômero e analisadas com base em uma curva analítica preparada simultaneamente.

3.3.3.4. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas através da avaliação da precisão e exatidão intradia ($n=5$) e interdias ($n=3$). Para isso foram empregadas amostras de meio de cultura Czapek fortificadas com os enantiômeros da midodrina e DMAE nas concentrações de 300, 5000 e 10000 ng mL^{-1} . 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.

3.3.3.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise de meio de cultura Czapek estéril adicionado de *N,N*-dimetilformamida (DMF) e meio de cultura Czapek estéril incubado com os fungos endofíticos e também fortificado com DMF.

3.3.3.6. Estabilidade

3.3.3.6.1. Ciclos de congelamento e descongelamento

Para determinar a estabilidade das amostras sob ciclos de congelamento/descongelamento, três alíquotas ($n=3$) de amostras preparadas em meio de cultura Czapek nas concentrações baixa (300 ng mL^{-1}) e alta (10000 ng mL^{-1}) de cada enantiômero da midodrina e DMAE foram armazenadas a temperatura de -20°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°C por 12 h. Este ciclo de congelamento/descongelamento foi repetido por mais duas vezes e ao final do terceiro ciclo as amostras foram analisadas. Os resultados obtidos no estudo de estabilidade foram comparados com aqueles obtidos pela análise de amostras frescas, recentemente preparadas. As amostras foram consideradas estáveis quando o desvio (expresso como E%) em relação às amostras frescas foi inferior a 15%.

3.3.3.6.2. Bancada por 12 horas

Na determinação da estabilidade a temperatura ambiente por período de 12 h, três alíquotas ($n=3$) de amostras preparadas em meio de cultura Czapek nas concentrações baixa (300 ng mL^{-1}) e alta (10000 ng mL^{-1}) de cada enantiômero da midodrina e DMAE foram mantidas a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) por 12 h. Após este período, as amostras foram analisadas e comparadas a amostras frescas, recentemente preparadas. As amostras foram consideradas estáveis quando o desvio (expresso como E%) em relação às amostras frescas foi inferior a 15%.

3.3.3.6.3. Condições de biotransformação

Na determinação da estabilidade nas condições de biotransformação, uma alíquota de 1 mg de *rac*-midodrina foi dissolvida em 100 μL de DMF e adicionada a Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura Czapek, resultando na concentração de 10000 ng mL^{-1} de cada enantiômero. Estas amostras foram submetidas ao procedimento de biotransformação (item 3.4.2.3, deste capítulo). Diariamente, durante o período de biotransformação (5 dias), alíquotas de 1 mL ($n=3$) foram analisadas e comparadas a amostras recentemente preparadas na concentração de

10000 ng mL⁻¹. As amostras foram consideradas estáveis se o desvio (expresso como E%) em relação às amostras frescas fosse inferior a 15%.

3.3.3.6.4. Estabilidade das soluções-padrão

A estabilidade das soluções-padrão de *rac*-midodrina, *rac*-DMAE e padrão interno, armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz, foi avaliada durante o período de execução da validação e aplicação do método. Para sua determinação alíquotas da solução padrão de *rac*-midodrina e *rac*-DMAE correspondentes a concentração de 5000 ng mL⁻¹, concentração média (CM), de cada um de seus enantiômeros e uma solução na concentração de 20 µg mL⁻¹ do padrão interno (imipramina) foram analisadas em triplicata a cada experimento realizado. As áreas obtidas nas análises foram comparadas com as áreas obtidas na análise realizada após o preparo das soluções (solução recém-preparada). As amostras foram consideradas estáveis se o desvio (expresso como E%) em relação às soluções recém-preparadas fosse inferior a 15%.

3.3.3.7. Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio do emprego de um planejamento experimental. O planejamento selecionado foi um fatorial fracionário de dois níveis 2⁴⁻¹ (8 experimentos) e foi realizado pela seleção de 4 fatores: pH do tampão acetato de sódio, concentração do tampão acetato de sódio, concentração de TM-β-CD e temperatura do capilar e pelo estudo de dois níveis: alto e baixo. Os fatores e níveis avaliados são mostrados na **Tabela C1-1**. As respostas avaliadas foram o tempo de migração e resolução. As respostas obtidas foram processadas pelo programa estatístico Minitab Release versão 14.1 (State College, PA, EUA) para avaliação da significância dos efeitos.

Tabela C1-1. Variáveis selecionadas como fatores e valores selecionados como níveis para avaliação da robustez do método.

Fatores	Valor otimizado	Nível (-)	Nível (+)
pH do tampão acetato de sódio	5,0	4,8	5,2
Concentração do tampão acetato de sódio (mmol L ⁻¹)	70	66	74
Concentração de TM-β-CD (mmol L ⁻¹)	30	28	32
Temperatura do capilar (°C)	15	14	16

3.4. Procedimento de biotransformação da midodrina empregando fungos endofíticos

3.4.1. Materiais

3.4.1.1. Reagentes

O meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), assim como os componentes do meio malte (extrato de malte e triptona de soja) foram adquiridos da Acumedia (Lansing, MI, EUA); a dextrose foi obtida da Dinamica (Diadema, SP, Brasil) e o extrato de levedura da Fluka (Buch, Suíça).

Os reagentes (grau p.a.) utilizados no preparo do meio fermentativo Czapek foram sacarose e nitrato de sódio obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), fosfato de potássio dibásico obtido da Henrifarma (São Paulo, SP, Brasil), sulfato de magnésio heptaidratado, cloreto de potássio e sulfato de ferro (II) heptaidratado obtidos da Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.4.1.2. Equipamentos

A esterilização dos materiais e meios de cultura foi realizada em autoclave vertical Phoenix modelo AV 75 (Araraquara, SP, Brasil). A manipulação dos fungos foi conduzida em cabine de fluxo laminar vertical Pachane (Piracicaba, SP, Brasil) modelo 310. O cultivo dos fungos foi realizado em estufa bacteriológica Odontobrás

(Ribeirão Preto, SP, Brasil) modelo ECB 1.3 digital. O procedimento de pré-cultivo e biotransformação foi realizado em incubadora com agitação orbital, tipo “shaker”, da New Brunswick Scientific Co., Inc., (Edison, NJ, USA) modelo INNOVA™ 4300.

3.4.1.3. Meios de cultura

As composições dos meios de cultura de crescimento, pré-fermentativo e fermentativo são apresentadas nas **Tabelas C1-2, C1-3 e C1-4**, respectivamente.

Tabela C1-2. Composição do meio BDA.

Componente	g/L
BDA	39
Água destilada	qsp

Tabela C1-3. Composição do meio pré-fermentativo malte.

Componente	g/L
Extrato de malte	10,0
Dextrose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Triptona de soja	5,0
Água destilada	qsp

O pH foi ajustado para 6,2 com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹.

Tabela C1-4. Composição do meio fermentativo Czapek (ALVIANO et al., 1992).

Componente	%
Sacarose	3,000
NaNO ₃	0,200
K ₂ HPO ₄	0,100
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,050
KCl	0,050
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,001
Água destilada	qsp

O pH foi ajustado para 5,0 com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹.

3.4.2. Métodos

3.4.2.1. Isolamento e identificação dos fungos endofíticos

Os fungos utilizados nos experimentos de biotransformação foram previamente isolados como endofíticos das plantas *Tithonia diversifolia*, *Viguiera robusta*, *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) e *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae) (**Tabela C1-5**) e identificados através de técnicas de biologia molecular (Guimarães et al., 2008; Gallo et al., 2009). As fotografias dos fungos estudados estão apresentadas na **Figura C1-2**.

Tabela C1-5. Fungos endofíticos selecionados para o estudo de biotransformação da midodrina.

Espécie de fungo	Espécie vegetal	Código do fungo
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Tithonia diversifolia</i>	TD2
<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	VR4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Viguiera robusta</i>	VR12
<i>Pestalotiopsis foedans</i>	<i>Viguiera robusta</i>	VR8
<i>Chaetomiun globosun</i>	<i>Viguiera robusta</i>	VR10
<i>Papulaspora immersa</i> Hotson	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	SS13
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E. W.	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	SS67
<i>Phoma</i> sp.	<i>Tinospora cordifolia</i>	ET

Figura C1-2. Fotografias dos fungos endofíticos estudados em meio de crescimento BDA.

3.4.2.2. Manutenção dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são mantidos em discos de meio BDA, com 0,5 cm de diâmetro, imersos em solução estéril de glicerol 80% e armazenados a temperatura de -20 °C. Estas culturas estão estocadas no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob supervisão da Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo.

3.4.2.3. Procedimento de biotransformação

Primeiramente foi realizada a transferência de três discos de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA contendo o micélio do fungo, com auxílio de alça de platina, para placas de Petri com 9,0 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio BDA (**Tabela C1-2**). As placas inoculadas foram mantidas em estufa bacteriológica por período de 14 dias, a temperatura de 30 °C, possibilitando o crescimento dos micro-organismos.

O procedimento de biotransformação foi realizado em duas etapas (BORGES et al., 2007; BORGES et al., 2008; BORGES; PUPO; BONATO, 2009). No primeiro estágio, chamado de pré-cultivo, três discos de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA contendo o micélio do fungo foram removidos das placas de Petri com auxílio de um *Transfer tube* e assepticamente inoculados em tubos Falcon® de 50 mL contendo 10 mL de meio pré-fermentativo malte (**Tabela C1-3**). Os tubos Falcon® foram incubados por quatro dias (96 h) a temperatura de 30 °C em incubadora com agitação orbital, tipo “shaker” a 120 rpm. No segundo estágio, biotransformação, a massa micelial resultante e 1 mg de midodrina (dissolvida em 100 µL de DMF) foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio Czapek modificado (**Tabela C1-4**). A mistura foi incubada por cinco dias a 30 °C, com agitação de 120 rpm. Alíquotas de 3 mL foram assepticamente coletadas, a cada dia, e 1 mL foi submetido ao procedimento de extração e analisadas por CE.

Em paralelo foram realizados controles com meio de cultura Czapek estéril com DMF e meio de cultura Czapek estéril incubado com os fungos endofíticos e também fortificado com DMF.

Os resultados de formação dos enantiômeros dos metabólitos quando observada enantiosseletividade foram expressos como excesso enantiomérico (*ee*), determinado através do uso da seguinte equação (ALTRIA, 1996a):

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

Onde A é a concentração do enantiômero majoritário e B é a concentração do enantiômero minoritário.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Separação dos enantiômeros da midodrina e DMAE empregando fases estacionárias quirais

4.1.1. Determinação dos comprimentos de onda (λ) de máxima absorção no ultravioleta

Os espectros de absorção da midodrina e DMAE, em metanol, apresentam três principais bandas de absorção: 200; 225 e 290 nm (dados não apresentados). O comprimento de onda empregado na detecção durante a etapa de avaliação das colunas cromatográficas quirais foi 290 nm. Apesar de ser a banda de menor intensidade, foi adequada para a detecção dos analitos nesta etapa e minimizou a influência da absorção de fundo dos solventes e aditivos orgânicos presentes nas fases móveis avaliadas.

4.1.2. Otimização da separação quiral cromatográfica

A midodrina e DMAE são substâncias polares; seus logs de P são respectivamente, - 0,664 e 0,342 (valores obtidos do programa de computador *Scifinder scholar* da ACD/Labs, Toronto, ON, Canadá, versão 2007). Ciente dessa informação avaliou-se a solubilidade dos analitos em hexano, os quais mostraram-se insolúveis neste solvente. Essa característica dos analitos direcionou os estudos para a avaliação de colunas que permitissem a eluição no modo polar orgânico e fase reversa. As colunas, disponíveis no laboratório que podem ser empregadas nesses modos de eluição são: Chiralcel OD-H, Chiralpak AD-RH, Coluna Chiralcel OJ-R, Chiralpak AS, Chirobiotic V e Chirobiotic T. A midodrina (pKa 7,75) e seu metabólito DMAE (pKa 8,25) são substâncias de caráter básico (valores obtidos do programa de computador *Scifinder scholar* da ACD/Labs, Toronto, ON, Canadá, versão 2007), dessa forma, os experimentos conduzidos no modo polar orgânico foram realizados na presença de aditivos orgânicos e no modo reverso, com controle de pH ou adição de reagente para formação de pares iônicos.

A resolução dos enantiômeros da midodrina foi descrita na coluna Chiralcel OD-H e a separação da DMAE foi obtida com a coluna Chiralcel OD-R (QUAGLIA et al., 1998; QUAGLIA et al., 2004). A coluna Chiralcel OD-H foi avaliada com fases móveis diferentes que aquelas propostas pelos autores, obtendo-se resolução parcial dos enantiômeros do fármaco e metabólito. Adicionalmente, outra coluna quiral com fase estacionária baseada em derivado de celulose, Chiralcel OJ-R também foi avaliada. Foram também avaliadas colunas com fases estacionárias baseadas em derivados de amilose (Chiralpak AD-RH e Chiralpak AS) e colunas baseadas em antibióticos macrocíclicos (Chirobiotic V e Chirobiotic T). Todas as colunas foram avaliadas nos modos de eluição fase reversa e polar orgânico, devido a polaridade dos analitos. Nenhuma das colunas avaliadas apresentou, nas condições empregadas, resolução suficiente para a determinação enantiosseletiva simultânea dos analitos. As condições cromatográficas que forneceram os melhores resultados de resolução para cada coluna estão apresentadas na **Tabela C1-6**.

Tabela C1-6. Melhor condição cromatográfica obtida para as colunas avaliadas durante a otimização da separação quiral.

Coluna	Fase móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Figura
Chiralcel OD-H	NaClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ : ACN : metanol (85:10:5, v/v/v)	0,4	C1-3A
Chiralpak AD-RH	Tampão borato 20 mmol L ⁻¹ , pH 9: ACN (80:20, v/v)	0,3	C1-3B
	Metanol: IPA (95:5, v/v) + DEA 0,025 %	0,5	C1-3C
Chiralcel OJ-R	Não foi observada enantiosseletividade	-----	-----
Chiralpak AS	Etanol: IPA (50:50, v/v) + DEA 0,1 %	0,4	C1-3D
Chirobiotic V	Metanol 100% + TEA 0,1% e ácido acético 0,1%	0,5	C1-3E
Chirobiotic T	Metanol: ACN (75:25, v/v), + TEA 0,1 % e ácido acético	0,5	C1-3F

Os cromatogramas relativos à melhor condição cromatográfica (**Tabela C1-6**) são apresentados na **Figura C1-3**. A resolução simultânea dos enantiômeros da midodrina e DMAE foi descrita em coluna Chiral AGP (QUAGLIA et al., 1998; QUAGLIA et al., 2004). Por experiência do laboratório e dados da literatura, optou-se em não testar a coluna Chiral AGP devido a sua falta de reprodutibilidade e estabilidade limitada (DE GAITANI; MARTINEZ; BONATO, 2004; ZHANG et al., 2005).

Figura C1-3. Cromatogramas representativos da melhor separação dos enantiômeros da midodrina (1 e 2) e DMAE (3 e 4) empregando as

colunas Chiralcel OD-H (**A**), Chiralpak AD-RH (**B** e **C**), Chiralpak AS (**D**), Chirobiotic V (**E**) e Chirobiotic T (**F**).

4.2. Análise enantiosseletiva da midodrina e DMAE empregando CE

4.2.1. Otimização da separação eletroforética enantiosseletiva

As condições cromatográficas avaliadas não forneceram condição adequada à análise da midodrina e DMAE, alternativamente partiu-se para o desenvolvimento e otimização da separação através de CE. A CE é considerada a técnica preferencial para análise de fármacos polares e/ou básicos e seus metabólitos (BONATO, 2003).

As separações enantioméricas da midodrina e seu metabólito foram otimizadas através da avaliação de vários parâmetros, incluindo o seletor quiral (tipo e concentração), eletrólito de análise (concentração e pH), temperatura do capilar e tensão aplicada. Nesses experimentos iniciais, as soluções-padrão de midodrina e DMAE foram preparadas em uma solução tampão acetato de sódio 5 mmol L⁻¹, pH 5,0. Este tampão era 10 vezes mais diluído que o tampão de análise para produzir o efeito *stacking* (empilhamento) e melhorar a eficiência dos picos (ALTRIA, 1996b).

4.2.1.1. Escolha da ciclodextrina

Como sugerido na literatura, uma das estratégias para a determinação de compostos quirais fracamente básicos, como a midodrina (pKa 7,75) e DMAE (pKa 8,25), é conduzir a análise em pH 5, usando tampão acetato de sódio e CD ou seus derivados neutros como seletor quiral (JIMIDAR et al., 2004). Os derivados neutros de CDs testados foram: HP-β-CD, DM-β-CD e TM-β-CD.

Em pH 5, analitos básicos encontram-se protonados e a superfície do capilar de sílica está parcialmente ionizada, apresentando desse modo, EOF (ALTRIA, 1996b). As CDs neutras não apresentam carga em nenhum valor de pH (BLANCO; VALVERDE, 2003) e, nessas condições, migram apenas devido ao EOF. Por outro lado, os analitos protonados nesse pH migram em direção ao cátodo devido a sua carga e também ao EOF. O enantiômero que formar o complexo de inclusão mais

estável com a CD migrará mais lentamente que o outro enantiômero, resultando na separação.

Todos os derivados de CDs foram avaliados na concentração de 30 mmol L⁻¹. As demais condições eletroforéticas empregadas, que foram mantidas constantes na avaliação das três CDs neutras, foram: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5, tensão de 20 kV, temperatura do capilar de 25 °C (JIMIDAR et al. 2004).

Nas condições avaliadas, a DM-β-CD não apresentou enantiosseletividade; por sua vez, a HP-β-CD resolveu somente os enantiômeros do metabólito. No entanto, a TM-β-CD apresentou resolução adequada tanto para a midodrina quanto para seu metabólito DMAE, como pode ser observado na **Figura C1-4**. A TM-β-CD já havia sido empregada por Quaglia et al. (2004) na separação enantiosseletiva da midodrina e DMAE para o monitoramento da hidrólise da midodrina em DMAE. Entretanto, este método não foi validado e não apresentava detectabilidade adequada para seu emprego na determinação dos analitos em meio de cultura.

Figura C1-4. Eletroferogramas mostrando a separação da midodrina e DMAE empregando ciclodextrinas neutras. Condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5, tensão de 20 kV, concentração do derivado de CD de 30 mmol L⁻¹ e temperatura de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e DMAE na amostra analisada foi 20 µg mL⁻¹. (1) (-)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (-)-midodrina, (4) (+)-midodrina.

A ordem de migração foi estabelecida pela análise dos enantiômeros puros da midodrina e DMAE obtidos através da análise semipreparativa de seus racematos na coluna Chiral AGP (15 x 4,6 mm, 5 μm de diâmetro de partícula) usando tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH 6, como fase móvel, de acordo com procedimento proposto por Quaglia et al. (2004). Posteriormente, foram obtidos espectros de dicroísmo circular na faixa de 190 a 350 nm dos enantiômeros isolados usando um espectropolarímetro modelo J-810, equipado com aparelho de controle interno de temperatura modelo PTC-423S, ambos da marca Jasco (Easton, PA, EUA), usando uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e temperatura de 25°C. O espectro de dicroísmo circular dos enantiômeros da midodrina apresentou banda intensa de sinal oposto na faixa de 220 – 240 nm enquanto que os enantiômeros da DMAE apresentaram banda intensa de sinal oposto na faixa de 220 – 230 nm. Os enantiômeros que apresentaram efeito “cotton” positivo nestes comprimentos de onda foram considerados (+) enquanto que os enantiômeros com efeito “cotton” negativo foram considerados (–).

As análises demonstraram que o primeiro pico analisado corresponde ao enantiômero (–) e o segundo pico corresponde ao enantiômero (+) tanto para a midodrina como para a DMAE.

4.2.1.2. Influência da temperatura do capilar

Após a escolha do seletor quiral (TM- β -CD), a influência da temperatura do capilar foi avaliada em quatro diferentes níveis: 10, 15, 20 e 25 °C. As demais condições eletroforéticas empregadas foram: tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5, tensão de 20 kV, TM- β -CD na concentração de 30 mmol L^{-1} .

Segundo Servais, Crommen e Fillet (2010), em baixas temperaturas, a cinética de transferência de massa entre o complexo analito/CD é afetada, geralmente melhorando a resolução. Entretanto, um aumento do tempo de migração também é observado.

A temperatura de análise que apresentou os melhores e mais adequados valores de resolução foi de 15 °C (conforme mostra a **Figura C1-5**), sendo a selecionada para os testes posteriores. Nessa temperatura, o tempo de migração do último analito a migrar, (+)-midodrina, foi reduzido em 1,92 min (25 %) quando comparado a análise executada a 10 °C, que apresentou maiores tempos de

migração. Quando a análise foi feita em 25 °C observou-se os menores tempos de análise, mas elevada redução na resolução, abaixo de valores aceitáveis.

Figura C1-5. Influência da temperatura de análise na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5, tensão de 20 kV, TM-β-CD na concentração de 30 mmol L⁻¹. A concentração de cada enantiômero da midodrina e DMAE na amostra analisada foi 20 µg mL⁻¹. A resolução foi calculada com auxílio do *software* 3D-CE ChemStation® versão B.04.01. A equação empregada pelo *software* foi: $R_s = 1,18(t_{R2} - t_{R1}) / w_{H2} + w_{H1}$, onde t_{R2} é o tempo do pico de maior migração e t_{R1} do pico com menor tempo de migração. w_{H2} e w_{H1} são as respectivas larguras dos picos medidas a meia altura.

4.2.1.3. Influência da concentração de ciclodextrina

A influência da concentração da TM-β-CD foi avaliada em quatro diferentes níveis: 20, 30, 40 e 50 mmol L⁻¹. As demais condições eletroforéticas empregadas foram: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5, tensão de 20 kV e temperatura do capilar de 15 °C.

O mecanismo de reconhecimento quiral das CDs está baseado no fenômeno de complexação ou inclusão. Assim, o aumento da concentração de CD no eletrólito aumenta a probabilidade de interações. Entretanto, uma condição de equilíbrio existe para cada separação quiral, e concentrações acima desta condição podem reduzir a resolução (RIZZI, 2001).

Conforme mostra a **Figura C1-6**, a resolução entre os enantiômeros do metabólito DMAE atinge seu máximo na concentração de 40 mmol L⁻¹. Por sua vez,

o aumento da concentração de TM- β -CD diminui a resolução entre a (+)-DMAE e a (-)-midodrina. Por fim, a resolução entre os enantiômeros da midodrina aumenta com o aumento da concentração de TM- β -CD e foi máxima na concentração avaliada de 50 mmol L⁻¹. A concentração de TM- β -CD que possibilitou resolução adequada entre todos os analitos em uma mesma corrida analítica foi 30 mmol L⁻¹.

Figura C1-6. Influência da concentração de TM- β -CD (mmol L⁻¹) na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5, tensão de 20 kV, temperatura de análise de 15 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e DMAE na amostra analisada foi 20 μ g mL⁻¹. A resolução foi calculada conforme descrito na **Figura C1-5**.

4.2.1.4. Influência da composição do tampão de análise

A influência da concentração do eletrólito de análise (acetato de sódio) foi avaliada em quatro diferentes níveis: 40, 50, 60 e 70 mmol L⁻¹. As demais condições eletroforéticas empregadas foram: tampão acetato de sódio pH 5, tensão de 20 kV, temperatura do capilar de 15 °C e TM- β -CD na concentração de 30 mmol L⁻¹.

O aumento da concentração do tampão de análise influencia o EOF, tempo de migração dos analitos e resolução. Porém a concentração deve ser aumentada com cautela, pois isso leva a um aumento da corrente gerada (WEINBERGER, 2000a). Observando a **Figura C1-7**, constata-se que o aumento da concentração do eletrólito de análise aumentou a resolução entre os analitos (a resolução entre os enantiômeros da midodrina variou entre 1,94 e 2,54, para as concentrações de eletrólito 40 mmol L⁻¹ e 70 mmol L⁻¹, respectivamente). A elevação da concentração do eletrólito aumentou também a corrente gerada que variou de 23 μ A (tampão 40

mmol L^{-1}) a $41 \mu\text{A}$ (tampão 70 mmol L^{-1}), porém, dentro de valores aceitáveis. Por sua vez, o tempo de análise total apresentou aumento de aproximadamente 1 min, na condição a 70 mmol L^{-1} quando comparada a concentração de 40 mmol L^{-1} .

A concentração selecionada de acetato de sódio que possibilitou a melhor resolução entre os analitos em uma mesma corrida analítica, ainda com correntes elétricas e tempos de migração adequados foi 70 mmol L^{-1} .

Figura C1-7. Influência da concentração do eletrólito (mmol L^{-1}) na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio pH 5, tensão de 20 kV, TM- β -CD na concentração de 30 mmol L^{-1} , temperatura de análise de 15°C . A concentração de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito DMAE na amostra analisada foi $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. A resolução foi calculada conforme descrito na **Figura C1-5**.

A influência do pH do eletrólito de análise (acetato de sódio) foi avaliada em três diferentes valores (pH): 4; 5 e 5,5. As demais condições eletroforéticas empregadas foram mantidas constantes: tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , tensão de 20 kV, temperatura do capilar de 15°C e TM- β -CD na concentração de 30 mmol L^{-1} .

O pH do tampão de análise (eletrólito) influencia tanto no mecanismo de reconhecimento quiral quanto na mobilidade induzida pelo EOF e pela ionização dos analitos (SERVAIS; CROMMEN; FILLET, 2010).

O emprego 0,5 unidades de pH abaixo e acima do pH 5, reduziram, em ambos os casos, a resolução, provavelmente por ter influenciado no mecanismo de reconhecimento quiral (**Figura C1-8**). Além disso, os tempos de migração quando

empregado pH 5,5 foram inferiores aos demais, muito provavelmente pelo aumento do EOF. O valor de pH otimizado que possibilitou melhores resoluções foi 5.

Figura C1-8. Influência do pH do eletrólito na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, tensão de 20 kV, TM-β-CD na concentração de 30 mmol L⁻¹, temperatura de análise de 15 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito DMAE na amostra analisada foi 20 µg mL⁻¹. A resolução foi calculada conforme descrito na **Figura C1-5**.

A natureza do eletrólito não foi avaliada, visto que o sal acetato de sódio (pKa 4,75), dentre os sais comumente empregados em CE, é o que apresenta efeito tamponante na região do pH empregado (pH 5) (ALTRIA, 1996b).

4.2.1.5. Efeito da tensão aplicada

A influência da tensão aplicada foi avaliada em três diferentes níveis: 15, 20 e 25 kV. A velocidade eletroforética está relacionada com a mobilidade dos íons na solução e com a tensão aplicada (ALTRIA, 1996b). Desse modo, um aumento da tensão aplicada no capilar leva a uma redução nos tempos de migração e na resolução dos compostos.

Observando a **Figura C1-9**, constata-se que o aumento da tensão aplicada resultou na redução da resolução. Os tempos de migração totais também foram reduzidos, variando de 7 min a 4 min, quando aplicadas voltagens de 15 e 25 kV, respectivamente. Porém com elevada perda de detectabilidade avaliada através da relação sinal/ruído, pois quando se aumenta a tensão aplicada observa-se elevação

nas velocidades eletrosmótica e eletroforética. Como consequência, os analitos passam mais rapidamente pelo detector (*on-column*) e resultam em menores respostas (área) (WEINBERGER, 2000b). Por outro lado, o aumento da tensão aplicada provocou aumento da corrente gerada, variando de 22 μA a 38 μA , quando aplicadas tensões de 15 e 25 kV, respectivamente.

A tensão selecionada foi de 15 kV, que permitiu melhores valores de resolução e maior detectabilidade, apesar do aumento no tempo de análise.

Figura C1-9. Influência da tensão aplicada (kV) na resolução. Demais condições de análise: tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5, TM- β -CD na concentração de 30 mmol L⁻¹, temperatura de análise de 15 °C. A concentração de cada enantiômero da midodrina e seu metabólito DMAE na amostra analisada foi 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A resolução foi calculada conforme descrito na **Figura C1-5**.

4.2.2. Otimização da detectabilidade do método

Os volumes injetados em CE são muito pequenos (1-10 nL). Além disso, o caminho óptico de detecção varia de 50 a 200 μm , dependendo do diâmetro interno do capilar empregado. Esses fatores combinados contribuem para a menor detectabilidade dos métodos eletroforéticos com detecção por absorção no ultravioleta quando comparados aos métodos cromatográficos empregando o mesmo detector (ALTRIA, 1996b).

Algumas estratégias empregadas para melhorar a detectabilidade são: detecção em comprimento de onda baixo (190 – 220 nm), aumento do diâmetro do

capilar, aumento do tempo de injeção, alteração do modo de injeção, emprego de detectores mais sensíveis (MS-MS, LIF), aumento da concentração do tampão, diminuição da temperatura e tensão (ALTRIA, 1996b; GRARD; MORIN; RIBET, 2002; URBÁNEK; KŘIVÁNKOVÁ; BOČEK, 2003).

A maioria dos fármacos apresenta alta absorção de radiação ultravioleta na região do espectro de 190-220 nm. Em análises cromatográficas, devido ao emprego de solventes orgânicos que absorvem radiação UV nesses comprimentos de onda, o uso da detecção nessa região do espectro UV deve ser evitado (WEINBERGER, 2000b). Como não foram empregados solventes orgânicos no preparo do eletrólito, a detecção em 200 nm, aumentou consideravelmente a detectabilidade do método.

O método otimizado, conforme item 4.2.4. deste capítulo foi utilizado na quantificação de midodrina e DMAE em amostras fortificadas em meio de cultura Czapek. Porém, até este momento, a injeção das amostras era realizada no modo hidrodinâmico por 25 s a 50 mBar. Com esse modo de injeção foi possível quantificar com precisão e exatidão adequadas ($CV\% < 20$) (FDA, 2001), 500 ng mL^{-1} de cada enantiômero, inadequado para as necessidades da aplicação do método.

Outra estratégia adotada para melhorar a detectabilidade do método foi a injeção no modo FASI. O procedimento consiste da injeção hidrodinâmica de uma pequena zona de baixa condutividade (geralmente água), para posterior injeção eletrocinética da amostra diluída em uma solução com menor condutividade que o eletrólito de análise (GRARD; MORIN; RIBET, 2002; URBÁNEK; KŘIVÁNKOVÁ; BOČEK, 2003).

O procedimento de injeção adotado consistiu da injeção hidrodinâmica de água ultrapura durante 5 s a 35 mBar seguida pela injeção eletrocinética da amostra dissolvida em metanol:água (90:10, v/v) + H_3PO_4 $80 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, durante 5 s a 10 KV, segundo procedimento recomendado por Grard, Morin e Ribet (2002). Este procedimento de injeção permitiu quantificar com precisão e exatidão adequadas ($CV\% < 20$) (FDA, 2001) 100 ng mL^{-1} de cada enantiômero, limite de quantificação considerado adequado para as necessidades da aplicação do método.

De acordo com a literatura (GRARD; MORIN; RIBET, 2002; URBÁNEK; KŘIVÁNKOVÁ; BOČEK, 2003), o método FASI de injeção permite ampliar a detecção em centenas de vezes. As condições empregadas nesse estudo

permitiram ampliar em aproximadamente 80 vezes a detectabilidade do método (sinal/ruído), quando o tempo de injeção da amostra do método FASI (5 s, eletrocineticamente) foi comparado a 5 s de injeção hidrodinâmica a 50 mBar.

4.2.3. Seleção do padrão interno

Em CE, a calibração é realizada da mesma maneira que em HPLC, através do uso de padrão externo ou interno (PI). O uso de padrão interno é altamente recomendável quando possível e a seleção adequada de um PI favorece a correção de erros devido a variações no volume de injeção, auxiliando na obtenção de maior repetibilidade nas injeções (BONATO; JABOR; OLIVEIRA, 2010). Com esse intuito, 16 fármacos candidatos a padrão interno foram avaliados. Entre estes, somente os fármacos cloroquina, hidroxicloroquina, mefloquina e imipramina não comigraram, apresentaram-se suficientemente resolvidos dos picos dos enantiômeros da midodrina e DMAE e apresentaram picos com perfil adequado (simétricos).

Os quatro fármacos foram submetidos a um teste de repetibilidade ($n=10$), onde soluções dos enantiômeros da midodrina e seu metabólito, na concentração de $20 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, foram fortificadas com $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de *rac*-cloroquina, *rac*-hidroxicloroquina, *rac*-mefloquina e imipramina, isoladamente. Foram avaliados os coeficientes de variação percentual (CV%) da razão área do padrão/ área do PI. O fármaco (PI) que propiciou os menores valores de CV% foi a imipramina.

4.2.4. Condições eletroforéticas otimizadas

A condição eletroforética que permitiu melhor resolução com tempo adequado de análise e suficiente detectabilidade é mostrada na **Tabela C1-7**:

Sob essas condições, foi obtida adequada resolução com tempo de análise de 14 min e com nível aceitável de corrente elétrica ($\approx 30 \mu\text{A}$) (**Figura C1-10**).

Tabela C1-7. Condições eletroforéticas otimizadas.

Parâmetro	Condição otimizada
Tampão	Acetato de sódio 70 mmol L ⁻¹ , pH 5
Seletor quiral	TM- β -CD 30 mmol L ⁻¹
Modo	Normal
Injeção	FASI: (1) 5 s a 35 mBar de água ultrapura (2) 5 s a 10 kV de amostra
Temperatura do capilar	15 °C
Tensão	15 kV
Deteção	UV: 200 nm

Figura C1-10. Eletoferograma representativo da análise de midodrina e DMAE empregando o método otimizado. As concentrações dos analitos foram as seguintes: 500 ng mL⁻¹ de imipramina (padrão interno) e 4000 ng mL⁻¹ de cada um dos enantiômeros da midodrina e DMAE. As condições eletroforéticas otimizadas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 μ m d.i.), injeção da amostra em campo amplificado (FASI), tampão acetato de sódio 70 mmol L⁻¹ (pH 5) contendo 30 mmol L⁻¹ de TM- β -CD, tensão de + 15 kV, detecção UV em 200 nm, temperatura de análise de 15 °C. (1) (-)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (-)-midodrina, (4) (+)-midodrina e (5) imipramina (P.I.).

Para garantir a repetibilidade dos tempos de migração, bem como para evitar a eletrólise do tampão de análise, o reservatório do tampão de análise foi substituído após sete análises consecutivas. A **Tabela C1-8** apresenta algumas características de desempenho do método eletroforético otimizado.

Tabela C1-8. Parâmetros de desempenho do método por CE nas condições otimizadas

Analitos	(-)-DMAE	(+)-DMAE	(-)-midodrina	(+)-midodrina	PI
Migração (min)	9,20	9,92	10,39	10,75	13,00
Resolução	-----	6,1	4,37	3,7	20,4
(N) ^a	124438	111386	191970	178100	200060

^aNúmero de pratos. A resolução e o número de pratos foram calculados com auxílio do *software* 3D-CE ChemStation[®] versão B.04.01. Para o cálculo da Rs o *software* emprega a seguinte equação: $Rs = 1,18(t_{R2} - t_{R1}) / w_{H2} + w_{H1}$ onde t_{R2} é o tempo do pico de maior migração e t_{R1} do pico com menor tempo migração. w_{H2} e w_{H1} são as respectivas larguras dos picos medidas a meia altura. Para o cálculo do N o *software* emprega a seguinte equação: $N = 5,54(t_R / w_H)^2$, onde t_R é o tempo de migração do pico e w_H sua largura a meia altura (SNYDER; KIRKLAND, GLAJCH, 1997).

4.2.5. Otimização dos parâmetros da extração líquido-líquido

Na LLE, o fenômeno de partição da amostra entre a fase aquosa e orgânica rege o processo de separação. A eficiência da extração depende principalmente da afinidade do soluto pelo solvente de extração. Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição, K_D , entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH, para prevenir a ionização de ácidos ou bases (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A midodrina e seu metabólito DMAE são substâncias polares, sendo que seus logs de P são respectivamente, - 0,664 e 0,342 (valores obtidos do programa de computador *Scifinder scholar* da ACD/Labs, Toronto, ON, Canadá, versão 2007). Dessa forma, buscou-se avaliar solventes de maior polaridade no desenvolvimento do método por LLE.

Entre os solventes orgânicos avaliados, o acetato de etila foi o que apresentou os melhores valores de recuperação do fármaco e metabólito do meio de cultura, resultando em eletroferogramas livres de interferentes na região de migração dos analitos e PI. As misturas de acetato de etila com solventes mais polares como metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila, resultaram em recuperações um pouco superiores, porém o emprego de solventes mais polares

influenciava negativamente a repetibilidade do método e os eletroferogramas obtidos apresentavam interferentes na região de migração dos analitos e PI. Por sua vez, os solventes clorados como clorofórmio e diclorometano também foram avaliados. Suas recuperações foram semelhantes as do acetato de etila, o que não justifica seu emprego devido a sua elevada toxicidade.

O ajuste do pH da amostra é necessário para assegurar uma boa recuperação dos analitos. A extração de substâncias básicas é, normalmente, realizada em pH maiores que 7 e a extração de substâncias ácidas é realizada em pHs abaixo de 5 (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Visto que a midodrina (pKa 7,75) e seu metabólito DMAE (pKa 8,25) são substâncias de caráter básico, todos os testes de recuperação foram feitos com a adição de 100 µL de NH₄OH p.a., como agente alcalinizante. As condições otimizadas de preparação das amostras podem ser encontradas na **Tabela C1-9**.

Tabela C1-9. Condições otimizadas para o procedimento de preparação das amostras.

Parâmetro	Condição otimizada
Solvente (volume)	Acetato de etila (3 mL)
Solução alcalina (volume)	Hidróxido de amônio (100 µL)
Tempo de agitação	2 min
FCR ^a , tempo e temperatura de centrifugação	1800 g/10 min a 25 °C
Procedimento de evaporação	Fluxo de ar comprimido
Volume recuperado	2 mL
Dissolução dos resíduos	50 µL metanol: água (90:10, v/v) + H ₃ PO ₄ 80 µmol L ⁻¹

^aForça centrífuga relativa.

4.3. Validação do método por CE para a determinação enantiosseletiva de midodrina e DMAE

4.3.1. Recuperação

A **Tabela C1-10** e **C1-11** apresentam os resultados da recuperação da midodrina (aproximadamente 40%) e DMAE (aproximadamente 85%), respectivamente, com CV% inferiores a 13,8 %, considerados adequados (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

Tabela C1-10. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros da midodrina.

Concentração (ng mL ⁻¹ , <i>n</i> = 3) ^a	(-)-Midodrina		(+) -Midodrina	
	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b
300	49,1	1,2	47,9	8,5
5000	38,6	4,3	38,8	4,1
10000	39,3	3,5	39,4	3,4
Média	42,3	13,8	42,1	12,2

^a Número de determinações; ^b CV (%), coeficiente de variação percentual.

Tabela C1-11. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros da DMAE.

Concentração	(-)-DMAE		(+) -DMAE	
	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b
300	84,5	7,6	83,3	7,8
5000	90,9	0,3	90,9	0,4
10000	83,3	2,2	82,9	2,3
Média	86,2	4,7	85,7	5,3

^a Número de determinações; ^b CV (%), coeficiente de variação percentual.

4.3.2. Linearidade

A **Tabela C1-12** apresenta as equações lineares e respectivos coeficientes de correlação linear (*r*) das curvas analíticas para os enantiômeros da midodrina e DMAE. Os valores dos coeficientes de correlação foram superiores a 0,99. A validade estatística dos valores experimentais obtidos para as curvas analíticas foi avaliada pela análise de variância (ANOVA *Lack of fit*), cujo resultado é mostrado na **Tabela C1-12**. Os resultados da ANOVA *Lack of fit* indicam que não houve desvio

de linearidade, pois os valores de p foram maiores que 0,05. A análise de variância foi realizada pelo programa estatístico MINITAB Release versão 14.1 (State College, PA, EUA).

Tabela C1-12. Linearidade do método para determinação enantiosseletiva de midodrina e DMAE.

Analitos	Intervalo (ng mL ⁻¹)	Equação linear	Coeficiente de correlação (r)	ANOVA <i>Lack of fit</i>	
				Valor de (F)	Valor de (p)
(-)-Midodrina	100 – 12000	$y = 0,0006x + 0,0641$	0,9984	0,99	0,448
(+)-Midodrina	100 – 12000	$y = 0,0006x + 0,0669$	0,9975	1,76	0,201
(-)-DMAE	100 – 12000	$y = 0,0011x + 0,0098$	0,9994	0,71	0,598
(+)-DMAE	100 – 12000	$y = 0,0011x + 0,015$	0,9995	0,72	0,592

4.3.3. Limite de quantificação

Os limites de quantificação do método eletroforético foram de 100 ng mL⁻¹ tanto para os enantiômeros da midodrina como da DMAE. Os valores de precisão (CV,%) e exatidão (E,%) dos limites de quantificação foram inferiores a 20% (FDA, 2001; ANVISA, 2003) e são apresentados na **Tabela C1-13**.

Tabela C1-13. Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva de midodrina e DMAE.

Analitos	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração analisada (ng mL ⁻¹) ^a	E (%) ^b	CV (%) ^c
(-)-Midodrina	100	107	7,0	9,7
(+)-Midodrina	100	113	13,0	11,2
(-)-DMAE	100	100	0,0	10,4
(+)-DMAE	100	96	- 4,0	4,8

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

4.3.4. Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão intra e interdias foram utilizadas alíquotas de meio de cultura Czapek fortificadas com 300, 5000 e 10000 ng mL⁻¹ de cada um dos enantiômeros.

Tabela C1-14. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da midodrina em meio Czapek.

Concentração nominal	(-)-Midodrina			(+) -Midodrina		
	300	5000	10000	300	5000	10000
Intradia (n = 5)						
Concentração (ng mL⁻¹)	341,9	5101,1	11166,7	328,8	5012,5	11072,7
Precisão (CV, %)^a	8,7	8,4	3,0	12,1	8,9	2,8
Exatidão (E, %)^b	13,9	2,0	11,6	9,6	0,2	10,7
Interdias (n = 3)						
Concentração (ng mL⁻¹)	293,9	4665,1	9825,9	282,8	4668,0	9791,9
Precisão (CV, %)^a	13,8	10,1	11,0	14,5	9,2	10,5
Exatidão (E, %)^b	- 2,0	- 6,7	- 1,7	- 5,7	- 6,6	- 2,1

n = número de determinações: cinco (intradia) e três (interdias); ^aExpresso como coeficiente de variação percentual, CV (%); ^bExpresso como erro relativo, E%.

Tabela C1-15. Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da DMAE em meio Czapek.

Concentração nominal	(-)-DMAE			(+) -DMAE		
	300	5000	10000	300	5000	10000
Intradia (n = 5)						
Concentração (ng mL⁻¹)	321,7	4950,8	10316,7	318,4	4896,8	10268,5
Precisão (CV, %)^a	7,2	6,0	3,8	7,2	6,3	3,8
Exatidão (E, %)^b	7,2	- 1,0	3,1	6,1	- 2,1	2,7
Interdias (n = 3)						
Concentração (ng mL⁻¹)	311,5	4803,4	9800,1	294,7	4772,2	9754,2
Precisão (CV, %)^a	7,2	5,7	6,2	9,3	5,7	6,1
Exatidão (E, %)^b	3,8	- 3,9	- 2,0	- 1,8	- 4,5	- 2,5

n = número de determinações: cinco (intradia) e três (interdias); ^aExpresso como coeficiente de variação percentual, CV (%); ^bExpresso como erro relativo, E%.

A **Tabela C1-14** apresenta os valores de precisão (CV,%) e exatidão (E,%) intra e interdias dos enantiômeros da midodrina e a **Tabela C1-15** apresenta os

valores de precisão (CV,%) e exatidão (E,%) intra e interdias dos enantiômeros da DMAE. Os resultados de precisão e exatidão para os enantiômeros da midodrina foram inferiores a 14,5% e 13,3%, respectivamente. Por sua vez, os resultados de precisão e exatidão para os enantiômeros da DMAE variaram de 3,8 a 9,3% e - 4,5 a 7,2, respectivamente.

4.3.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da análise eletroforética de amostras extraídas de meio de cultura Czapek fortificado com DMF, amostras de meio de cultura Czapek fortificado com os enantiômeros da midodrina e DMAE dissolvidas em DMF e amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos empregados nos estudos de biotransformação.

Os eletroferogramas referentes à análise do meio de cultura fortificado com DMF e com os enantiômeros da midodrina e DMAE dissolvidos em DMF são apresentados na **Figuras C1-11(A) e C1-11(B)**, respectivamente.

Figura C1-11. (A) Eletroferograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek fortificado com DMF e extraído pelo procedimento de extração líquido-líquido. (B) Eletroferograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek fortificado com 500 ng mL⁻¹ de imipramina (P.I.) e 4000 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da midodrina e DMAE dissolvidos em DMF. As condições

eletroforéticas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 μm d.i.), injeção da amostra em campo amplificado (FASI), eletrólito constituído por tampão acetato de sódio 70 mmol L^{-1} (pH 5) contendo 30 mmol L^{-1} de TM- β -CD, tensão de + 15 kV, detecção UV em 200 nm, temperatura de análise de 15°C. (1) (-)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (-)-midodrina, (4) (+)-midodrina e (5) imipramina (P.I.).

A **Figura C1-12** apresenta os eletroferogramas das amostras de meio de cultura Czapek acrescidas do micélio dos fungos *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Phomopsis* sp. (TD2), *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67), *Papulaspora immersa* Hotson (SS13), *Penicillium crustosum* (VR4), *Pestalotiopsis foedans* (VR8), *Chaetomiun globosun* (VR10) e *Phoma* sp. (ET) onde nenhum pico interferente foi observado com tempos de migração próximos ao dos analitos e padrão interno.

Figura C1-12. Eletroferogramas representativos das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos endofíticos *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Phomopsis* sp. (TD2), *Nigrospora sphaerica* (SS67), *Papulaspora immersa* (SS13), *Penicillium crustosum* (VR4), *Pestalotiopsis foedans* (VR8), *Chaetomiun globosun* (VR10) e *Phoma* sp. (ET). As condições eletroforéticas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 μm d.i.), injeção da amostra em campo amplificado (FASI), eletrólito constituído por tampão acetato de sódio 70 mmol L^{-1} (pH 5) contendo 30 mmol L^{-1} de TM- β -CD, tensão de + 15 kV, detecção UV em 200 nm, temperatura de análise de 15°C.

4.3.6. Estabilidade

A estabilidade dos enantiômeros da midodrina e DMAE foi avaliada nos ciclos de congelamento/ descongelamento, bancada por 12 h, nas condições de biotransformação e nas condições de armazenamento das soluções-padrão. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas, pois não foi observado desvio superior a 15%, avaliado através do E%, em relação às amostras frescas, recentemente preparadas e processadas. Estes resultados podem ser observados nas **Tabelas C1-16, C1-17 e C1-18**.

Tabela C1-16. Estabilidade dos enantiômeros da midodrina nos ciclos de congelamento/descongelamento e bancada por 12 h em meio de cultura Czapek.

Analito	(-)-Midodrina		(+) -Midodrina	
Concentração amostra recém-preparada (ng mL ⁻¹)	333,8	10006,1	325,0	10031,6
Estabilidade				
Congelamento e descongelamento (n = 3)				
Concentração (ng mL ⁻¹)	326,9	10376,8	307,2	10399,9
Precisão (CV, %) ^a	5,3	13,5	3,3	13,3
Exatidão (E, %) ^b	-2,1	3,7	-5,5	3,7
Bancada por 12 h (n = 3)				
Concentração (ng mL ⁻¹)	313,1	11386,8	304,2	11444,7
Precisão (CV, %) ^a	2,1	3,8	7,1	4,1
Exatidão (E, %) ^b	- 6,2	13,8	- 6,4	14,1

n = número de determinações; ^a Expresso como coeficiente de variação percentual, CV; ^b Expresso como erro relativo, E. Calculado frente à concentração da amostra recém-preparada.

Tabela C1-17. Estabilidade dos enantiômeros da DMAE nos ciclos de congelamento/descongelamento e bancada por 12 h em meio de cultura Czapek.

Analito	(-)-DMAE		(+) -DMAE	
Concentração amostra recém-preparada (ng mL ⁻¹)	338,1	10199,5	338,9	10203,8
Estabilidade				
Congelamento e descongelamento (n = 3)				
Concentração (ng mL ⁻¹)	332,0	9276,2	331,6	9265,9
Precisão (CV, %) ^a	8,4	7,7	7,3	7,6
Exatidão (E, %) ^b	- 1,8	- 9,0	- 2,2	- 9,2
Bancada por 12 h (n = 3)				
Concentração (ng mL ⁻¹)	338,9	9814,1	340,1	9767,0
Precisão (CV, %) ^a	3,6	4,0	4,9	3,3
Exatidão (E, %) ^b	0,2	- 3,8	0,4	- 4,3

n = número de determinações; ^a Expresso como coeficiente de variação percentual, CV; ^b Expresso como erro relativo, E. Calculado frente à concentração da amostra recém-preparada

Tabela C1-18. Estabilidade dos enantiômeros da midodrina nas condições de biotransformação.

Tempo de incubação (horas)	0	24	48	72	96	120
(-)-Midodrina (n = 3)						
Concentração (ng mL ⁻¹)	9635	9669	9501	9699	9982	10004
Precisão (CV, %) ^a	3,2	6,1	5,5	2,9	9,1	8,2
Exatidão (E, %) ^b		0,3	-1,4	0,7	3,6	3,8
(+)-Midodrina (n = 3)						
Concentração (ng mL ⁻¹)	9635	9717	9879	10018	10107	10121
Precisão (CV, %) ^a	4,8	6,5	6,6	2,5	12,1	8,5
Exatidão (E, %) ^b		0,8	2,5	4,0	4,9	5,0

n = número de determinações; ^a Expresso como coeficiente de variação percentual, CV; ^b Expresso como erro relativo, E. Tempo 0, refere-se a amostras recém-preparadas.

4.3.7. Robustez

Na determinação da robustez do método, avaliada através de um planejamento experimental, a significância dos efeitos foi representada por um gráfico de pareto que consiste de barras com tamanho proporcional ao valor absoluto do efeito estimado, dividido pelo valor do pseudo-erro padrão definido por Lenth (1989) (lenth's PSE). Os códigos A, B, C e D correspondem aos fatores pH da

solução tampão, concentração de TM- β -CD, temperatura de análise e concentração da solução tampão acetato, respectivamente. A combinação de dois códigos indica a interação entre o efeito de dois fatores. As barras são dispostas em ordem de significância dos efeitos, com o efeito mais importante no alto. O gráfico também inclui uma linha vertical com o valor crítico de t para o α selecionado, no caso 0,05. Os efeitos em que as barras não ultrapassam a linha do valor crítico de t não são considerados significativos e não afetam as respostas avaliadas. A **Figura C1-13** apresenta um gráfico de pareto demonstrando que o efeito dos fatores, nas faixas estudadas, não foram estatisticamente significativos ($\alpha = 0,05$), para as respostas consideradas (tempo de migração e resolução). Dessa maneira, o método pode ser considerado robusto nas condições avaliadas.

Figura C1-13. Gráfico de pareto representando os efeitos dos fatores e da interação entre os fatores para as respostas (A) tempo de migração do pico 4, (B) resolução 1, (C) resolução 2, (D) resolução 3. Resolução 1 entre os picos 1 e 2, resolução 2 entre os picos 2 e 3 e resolução 3 entre os picos 3 e 4. Os picos 1, 2, 3, 4 referem-se a (-)-DMAE, (+)-DMAE, (-)-midodrina e (+)-midodrina, respectivamente e são apresentados na **figura C1-11B**.

4.4. Biotransformação da midodrina empregando fungos endofíticos

Foi realizada uma triagem empregando oito diferentes espécies de fungos endofíticos: *Phomopsis* sp. (TD2), *Penicillium crustosum* (VR4), *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Pestalotiopsis foedans* (VR8), *Chaetomiun globosun* (VR10), *Papulaspora immersa* Hotson (SS13), *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67) e *Phoma* sp. (ET).

As reações de biotransformação dos 8 fungos estudados foram acompanhadas durante 5 dias (120 h). Diariamente, alíquotas foram coletadas, extraídas e analisadas por CE. As concentrações dos analitos foram determinadas com base em curvas analíticas construídas diariamente. Após definidas as concentrações dos analitos, foram construídos gráficos com as curvas cinéticas de biotransformação dos fungos estudados (concentração x tempo de incubação).

Entre os oito fungos endofíticos estudados, quatro deles (VR4, VR8, VR10 e ET), ou não apresentaram ou apresentaram formação de DMAE inferior a 2% (dados de cinética de biotransformação não apresentados). Como pode ser observado no eletroferograma referente a análise de amostras biotransformadas pelo fungo ET (**Figura C1-14**) o pico referente ao enantiômero (+) da midodrina não foi observado, o que pode indicar a biotransformação enantiosseletiva da (+)-midodrina em outro(s) composto(s) que não foram detectados por este método. Além disso, no eletroferograma da biotransformação pelo fungo VR10, os analitos foram detectados, porém com concentrações abaixo do LQ indicando, também, que a midodrina pode estar sendo biotransformada em compostos não detectados pelo método eletroforético.

Por outro lado, os demais quatro fungos (VR12, TD2, SS67 e SS13) biotransformaram a midodrina a DMAE através da hidrólise do grupo amida. Na sequência são apresentados os gráficos referentes às cinéticas de biotransformação.

Figura C1-14. Eletroferogramas representativos das amostras de midodrina incubadas com os fungos endofíticos VR4, VR10, VR8 e ET após 72 h de incubação. As condições eletroforéticas validadas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 μm d.i.), injeção da amostra em campo amplificado (FASI), eletrólito constituído por tampão acetato de sódio 70 mmol L^{-1} (pH 5) contendo 30 mmol L^{-1} de TM- β -CD, tensão de + 15 kV, detecção UV em 200 nm, temperatura de análise de 15°C. (1) (-)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (-)-midodrina, (4) (+)-midodrina, e (5) imipramina (P.I.). *Penicillium crustosum* (VR4), *Pestalotiopsis foedans* (VR8), *Chaetomium globosum* (VR10) e *Phoma* sp. (ET).

4.4.1. Fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12)

O fungo *Aspergillus fumigatus* já foi empregado em algumas biotransformações de fármacos. A progesterona foi metabolizada a 7 β -hidroxi-progesterona através de uma reação de hidroxilação (SMITH et al., 1994). Na biotransformação da tioridazina foi observada uma reação de sulfoxidação que resultou predominantemente na formação do metabólito tioridazina-2-sulfóxido (BORGES et al., 2007). A reação de sulfoxidação também foi observada na biotransformação do alendazol a alendazol sulfóxido pelo *A. fumigatus* isolado de solo (PRASAD; GIRISHAM; REDDY, 2009a). Por outro lado, a reação observada na biotransformação do meloxicam (PRASAD; GIRISHAM; REDDY, 2009b) e do

propranolol (BORGES; PUPO; BONATO, 2009) foi a hidroxilação, resultando nos metabólitos 5-hidroximetil meloxicam e 4-hidroxipropranolol, respectivamente.

Na **Figura C1-15** são apresentados os resultados da biotransformação da midodrina em DMAE pelo fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12).

Figura C1-15. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da desglímidodrina pelo fungo *Aspergillus fumigatus* (VR12).

O fungo *Aspergillus fumigatus* foi empregado com sucesso na biotransformação enantiosseletiva de propranolol e formou predominantemente o enantiômero (–)-(S) do metabólito 4-hidroxipropranolol (BORGES; PUPO; BONATO, 2009). Em outra oportunidade a tioridazina foi biotransformada estereosseletivamente no metabólito (R,S)-tioridazina-2-sulfóxido por este fungo (BORGES et al., 2007). Entretanto, na biotransformação da midodrina por esse fungo, o processo não foi estereosseletivo. A maior quantidade formada dos enantiômeros da DMAE foi observada no quinto dia de biotransformação (≈5%).

4.4.2. *Phomopsis* sp. (TD2)

Na **Figura C1-16** podem ser observados os resultados da biotransformação da midodrina em DMAE pelo fungo *Phomopsis* sp. (TD2). O fungo *Phomopsis* sp. (TD2) apresentou biotransformação estereosseletiva. A maior formação de metabólitos foi observada no quinto dia de biotransformação: 150 ng mL⁻¹ da (–)-DMAE e 930 ng mL⁻¹ da (+)-DMAE, ou seja, um excesso enantiomérico de 72,2%. O

fungo *Phomopsis* sp. também biotransformou estereosseletivamente a tioridazina predominantemente a (*S,R*)-tioridazina-2-sulfóxido (BORGES et al., 2007).

Figura C1-16. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da desglímidodrina pelo fungo *Phomopsis* sp. (TD2).

4.4.3. *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67)

A **Figura C1-17** apresenta os resultados de biotransformação da midodrina pelo fungo *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67). Este fungo apresentou biotransformação estereosseletiva. A diferença máxima na proporção de formação entre a (-)-DMAE e (+)-DMAE foi observada no quinto dia de biotransformação quando foi determinada a concentração de 170 ng mL⁻¹ para a (-)-DMAE e 1280 ng mL⁻¹ para a (+)-DMAE, correspondendo a um excesso enantiomérico de 76,5%. BORGES et al., (2011) empregaram o fungo *Nigrospora sphaerica* na biotransformação de anti-inflamatório ibuprofeno e observaram principalmente a formação de (+)-(*S*)-2-hidroxi ibuprofeno com um excesso enantiomérico de 63,29%.

Figura C1-17. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da desglímidodrina pelo fungo *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67).

4.4.4. *Papulaspora immersa* Hotson (SS13)

Na **Figura C1-18** observam-se os resultados da biotransformação da midodrina pelo fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13).

Figura C1-18. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da DMAE pelo fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13).

O fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) apresentou biotransformação estereosseletiva. Além disso, foi o fungo que apresentou melhor habilidade na

biotransformação da midodrina em DMAE. O tempo de máxima formação do metabólito DMAE foi observado no terceiro dia de biotransformação, 240 ng mL⁻¹ para a (-)-DMAE e 2130 ng mL⁻¹ para (+)-DMAE, o que equivale a um excesso enantiomérico de 79,7%. Após este período houve redução na concentração de ambos enantiômeros, porém com maior destaque para o (+)-enantiômero. Isso pode indicar que os metabólitos possam estar sendo biotransformados novamente. Hilário et al., (2012), empregaram o fungo *Papulaspora immersa* (SS13) na biotransformação enantiosseletiva do fármaco anti-helmíntico albendazol em seu metabólito (+)-albendazol sulfóxido.

A **Tabela C1-19** apresenta o tempo de máxima formação dos enantiômeros do metabólito DMAE. O percentual de DMAE formado foi calculado considerando a adição de 1 mg de *rac*-midodrina a 50 mL de meio de cultura Czapek (20000 ng mL⁻¹), resultando na concentração de 10000 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da midodrina. Essa concentração foi considerada como sendo 100% de biotransformação da midodrina em seu metabólito DMAE.

Tabela C1-19. Quantidade máxima de DMAE formada (expressa em % de fármaco adicionado).

Fungo	Tempo (horas)	% de DMAE formada	
		(-)-DMAE	(+)-DMAE
SS13	72	2,4	21,3
SS 67	120	1,7	12,8
TD2	120	1,5	9,3
VR12	120	5,4	5,1

Portanto, três dos oito fungos endofíticos estudados apresentaram biotransformação estereosseletiva com predomínio para a formação da (+)-DMAE. O fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) formou a maior quantidade do metabólito DMAE. Em 72 h de incubação (**Figura C1-19**) foi observada a biotransformação de 21,3% da (+)-midodrina em (+)-DMAE e 2,4% de (-)-midodrina em (-)-DMAE.

Figura C1-19. Eletroferogramas representativos das amostras de midodrina incubadas com os fungos endofíticos SS13, TD2, SS67 e VR12 após 72 h de incubação. As condições eletroforéticas validadas foram: capilar de sílica fundida com 48,5 cm totais (40 cm efetivos x 50 μm d.i.), injeção da amostra em campo amplificado (FASI), eletrólito constituído por tampão acetato de sódio 70 mmol L^{-1} (pH 5) contendo 30 mmol L^{-1} de TM- β -CD, tensão de + 15 kV, detecção UV em 200 nm, temperatura de análise de 15°C. (1) (–)-DMAE, (2) (+)-DMAE, (3) (–)-midodrina, (4) (+)-midodrina, e (5) imipramina (P.I.). *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Phomopsis* sp. (TD2), *Nigrospora sphaerica* (SS67), *Papulaspora immersa* (SS13).

5. COMENTÁRIOS FINAIS

Nesse capítulo foram mostrados os resultados obtidos com o desenvolvimento e validação de um método eletroforético que apresentou resolução suficiente em tempo relativamente curto de análise (14 min) para a determinação enantiosseletiva da midodrina e DMAE. A otimização da concentração do tampão de análise (70 mmol L⁻¹), tensão (15 kV), concentração de TM-β-CD (30 mmol L⁻¹) e da temperatura de análise (15 °C) levou a resolução mínima de aproximadamente 2,8. A TM-β-CD já havia sido empregada por Quaglia et al. (2004) na separação enantiosseletiva da midodrina e DMAE para o monitoramento da hidrólise da midodrina em DMAE. Entretanto, este método descrito na literatura não foi validado e não apresentava detectabilidade adequada para seu emprego na determinação dos analitos em meio de cultura. Portanto, o método descrito aqui é a primeira contribuição de um método totalmente validado empregando a técnica CE para análise desse fármaco e metabólito.

Após sua validação, o método foi aplicado em um estudo de biotransformação usando fungos endofíticos. Foram avaliadas 8 cepas, das quais 3 apresentaram biotransformação estereosseletiva com destaque para o fungo *Papulaspora immersa* Hotson SS13 que biotransformou 21,3% da (+)-midodrina em (+)-DMAE e 2,4% da (-)-midodrina em (-)-DMAE, ou seja com um excesso enantiomérico de 79,7%. Segundo Quaglia et al. (2004), a atividade agonista sobre os receptores α₁ adrenérgicos que resulta em elevação da pressão arterial deve-se a (-)-DMAE. Portanto, o fungo *Papulaspora immersa* Hotson SS13 não foi apropriado para a produção do metabólito ativo. O metabolismo estereosseletivo da midodrina em mamíferos também não está descrito na literatura, portanto, não é possível determinar se as enzimas presentes nesse e nos outros fungos estudados mimetizam o sistema enzimático em mamíferos. Contudo, as informações apresentadas neste capítulo representam o primeiro relato de uma biotransformação estereosseletiva da midodrina em DMAE. Além disso, o estudo apresentado aqui contribui para ampliar o conhecimento do sistema enzimático destes micro-organismos, descrevendo de maneira inédita, a habilidade que eles apresentaram em realizar reações de hidrólise da função amida de maneira estereosseletiva. Para finalizar, apesar da biotransformação com os fungos endofíticos SS13, SS67 e TD2

não haver gerado o enantiômero ativo da DMAE, ela pode ser usada, na obtenção da (+)-DMAE para uso em estudos toxicológicos e/ou estudos farmacológicos na busca de novas atividades.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMOTO, M.; IIDA, I.; ITOGA, H.; MIYATA, A.; KAWAHARA, S.; KOHNO, Y. The in vitro metabolism of desglymidodrine, an active metabolite of prodrug midodrine by human liver microsomes. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Geneva, v. 29 n. 3, p. 179-186, 2004.

ALTRIA, K.D. Quantitative applications of the resolution of enantiomers by capillary electrophoresis. In: SHINTANI, H.; POLONSKÝ, J. (Ed.). **Handbook of capillary electrophoresis applications**. London: Blackie Academic and Professional, 1996a. cap. 24, p. 334-344.

ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa: Humana Press Inc., 1996b. 349 p.

ALVIANO, C.S.; FARBIARZ, S.R. TRAVASSOS, L.R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environment factors on *Fonsecae pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, New York, v. 119, p. 17-23, 1992.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&mode=PRINT_VERSION. Acesso em 1 de novembro de 2011.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, p. 428-439, 2003.

BONATO, P.S. Recent advances in the determination of enantiomeric drugs and their metabolites in biological fluids by capillary electrophoresis-mediated microanalysis. **Electrophoresis**, Malden, v. 24, p. 4078-4094, 2003.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; OLIVEIRA, A. R. M. Analysis of chiral drugs in body fluids. In: VAN EECKHAUT, A.; MICHOTTE, Y. (Ed.). **Chiral separations by capillary electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. Cap. 12, p. 341-361.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 77, p. 669-674, 2007.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 46, n. 5, p. 945-952, 2008.

BORGES, K.B.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Enantioselective analysis of propranolol and 4-hydroxypropranolol by CE with application to biotransformation studies employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 30, p. 3910-3917, 2009.

BORGES, K.B.; OLIVEIRA, A.R.M.; BARTH, T.; JABOR, V.A.P.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. LC–MS–MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 399, p. 915–925, 2011.

DE GAITANI, C.M.; MARTINEZ, A.S.; BONATO, P.S. Degradation and configurational changes of thioridazine 2-sulfoxide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 36, p. 601-607, 2004.

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

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 *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 49, p. 142-151, 2009.

GRARD, S.; MORIN, P.; RIBET, J.P. Application of capillary electrophoresis with field-amplified sample injection for the detection of new adrenoreceptor antagonist enantiomers in plasma in the low ng/mL concentration range. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 23, p. 2399-2407, 2002.

GUIMARÃES, D.O., BORGES, W.S., KAWANO, C.Y., RIBEIRO, P.H., GOLDMAN, G.H., NOMIZO, A., THIEMANN, O.H., OLIVA, G., LOPES, N.P., PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 52, n.1, p. 134-144, 2008.

HILÁRIO, V.C.; CARRÃO, D.B.; BARTH, T.; BORGES, K.B.; FURTADO, N.A.J.C.; PUPO, M.T.; 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.

JIMIDAR, M.I.; VAN AEL, W.; VAN NYEN, P.; PEETERS, M.; REDLICH, D.; DE SMET, M. A screening strategy for the development of enantiomeric separation methods in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, p. 2772-2785, 2004.

JÖNSSON, J.Å.; MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, p. 205-225, 2000.

LENTH, R.V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. **Technometrics**, Alexandria, v. 31, p. 469-473, 1989.

OLDENBURG, O.; KRIBBEN, A.; BAUMGART, D.; PHILIPP, T.; ERBEL, R.; COHEN, M.V. Treatment of orthostatic hypotension. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 2, p. 740-747, 2002.

PRASAD, G.S.; GIRISHAM, S.; REDDY, S.M. Studies on microbial transformation of albendazole by soil fungi, **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 8, p. 425-429, 2009a.

PRASAD, G.S.; GIRISHAM, S.; REDDY, S.M. Biotransformation of meloxicam by *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium moniliforme* isolated from soil. **National Academy Science Letters**, Allahabad, v. 32, n. 5-6, p. 157-161, 2009b.

QUAGLIA, M.G.; FARINA, A.; BOSSÙ, E.; COTICHINI, V. Human α 1-glycoprotein acid as chiral selector in the enantioseparation of midodrine and deglymidodrine racemates by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 18, p. 171-177, 1998.

QUAGLIA, M.G.; FARINA, A.; PALMERY, M.; DESIDERI, N.; DONATI, E.; BOSSÙ, E.; STRANO, S. Chiral investigation of midodrine, a long-acting α -adrenergic stimulating agent. **Chirality**, Hoboken, v. 16, p. 356-362, 2004.

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.

RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; OH, D.; JÄRVINEN, T.; SAVOLAINEN, J. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 7, n. 3, p. 255-270, 2008.

RIZZI, A. Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Malden, v. 22, p. 3079-3106, 2001.

SCIFINDER WEB. Disponível em: <http://scifinder.cas.org>. Acesso em: 24 out. 2011.

SERVAIS, A.C.; CROMMEN, J.; FILLET, M. Factors influencing cyclodextrin-mediated chiral separations. In: VAN EECKHAUT, A.; MICHOTTE, Y. (Ed.). **Chiral separations by capillary electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. Cap. 4, p. 87-107.

SMITH, K.E.; AHMED, F.; WILLIAMS, R. A.D.; KELLY, S.L. Microbial Transformations of Steroids VIII. Transformation of Progesterone by Whole Cells and Microsomes of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 93-100, 1994.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2 ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997. 765 p.

URBÁNEK, M.; KŘIVÁNKOVÁ, L.; BOČEK, P. Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 24, p. 466-485, 2003.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis: Basic concepts. In: _____. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2000a. Capítulo 2, 25-71.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis: Basic concepts. In: _____. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2000b. Capítulo 9, 365-421.

WESTFALL, T.C.; WESTFALL, D.P. Agonistas e antagonistas adrenérgicos. In: _____. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. cap. 10, p. 215-264.

ZHANG, Y.; WU, D.R.; IVERSON, D.B.; TYMIAK, A.A. Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 10, p. 571-577, 2005

**CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DA MIDODRINA E DMAE POR
HPLC EM MEIO DE CULTURA: ESTUDO DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DA MIDODRINA PELO FUNGO
FITOPATÓGENO *BOTRYTIS CINEREA* E ENDOFÍTICO
*PAPULASPORA IMMERSA***

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Fungo endofítico *Papulaspora immersa* H. H. Hotson

Papulaspora immersa H. H. Hotson é um fungo pertencente à ordem dos Sordariales e à família Chaetomiaceae, frequentemente encontrado em solo como competidor em culturas de cogumelos (FUDO et al., 1997). Este fungo foi recentemente isolado como endofítico em algumas espécies vegetais: *Vitex negundo* (RAVIRAJA; MARIA; SRIDHAR, 2006), *Solanum tuberosum* (O'CALLAGHAN et al., 2005), e *Smallanthus sonchifolius* (GALLO et al., 2010). O fungo *Papulaspora immersa* foi usado na biotransformação da midodrina em DMAE, conforme dados apresentados, no capítulo 1, desta tese, e do anti-helmíntico albendazol em seu metabólito ativo, albendazol sulfóxido (HILÁRIO et al., 2012).

1.2. Fungo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

Micro-organismos do gênero *Botrytis* pertencem à ordem dos Moniliales da família Moniliaceae. São amplamente distribuídos geograficamente sendo encontrados desde regiões frias, como Alasca e Canadá, a regiões subtropicais, como o Egito. São parasitas polípagos que causam sérias perdas econômicas a cultivos comerciais. *B. cinerea* tem sido identificado como um patógeno que ataca mais de 235 espécies de plantas incluindo uvas, alface, tomates, tabaco e morangos, produzindo no cultivo infectado a doença conhecida por podridão cinzenta. Outros fungos do mesmo gênero como *B. allii*, *B. byssoides* e *B. squamosa* são patógenos em cebolas, sendo que o último causa a quebra do pedúnculo. *B. fabae* é patógeno em feijão causando lesões nas folhas. *B. gladioli* é um patógeno de lírios enquanto *B. tulipae* afeta tulipas e açafrão (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007). O uso de espécies de *Botrytis* em biotransformações foi revisado em 2001 destacando-se seu emprego em biotransformações de esteroides, sesquiterpenos, monoterpenos, flavonas e fitoalexinas (ALLEU; COLLADO, 2001a).

1.3. Midodrina

Como já discutido no Capítulo 1, a midodrina é um pró-fármaco, sendo biotransformada à DMAE, um agonista ativo dos receptores α_1 adrenérgicos. A DMAE é posteriormente biotransformada a vários outros metabólitos (**Figura C2-1**).

Figura C2-1. Estruturas moleculares da midodrina (A) e DMAE (B) e sua possível rota de biotransformação em humanos (Adaptado de AKIMOTO et al., 2004).

A 5'-O-desmetilação é a principal rota de biotransformação da DMAE em humanos, a qual é catalisada principalmente pela isoforma do citocromo P450, CYP2D6 e em menor extensão pelo CYP1A2 (AKIMOTO et al., 2004).

O objetivo desta etapa do projeto foi estudar a biotransformação da midodrina empregando fungos endofítico e fitopatógeno, visando a detecção e caracterização de outros metabólitos além da DMAE. Portanto, foi necessário desenvolver um método que pudesse ser usado em escala semipreparativa.

Com a finalidade de determinar simultaneamente a midodrina e DMAE em matrizes biológicas, alguns métodos foram desenvolvidos baseados em técnicas de radioisótopos marcados (KOLOSSA et al., 1979), cromatografia líquida com detecção por fluorescência (POSCH; LINDNER, 1989) e detecção por absorção no UV (QUAGLIA et al., 1998). O método por cromatografia líquida e detecção por fluorescência é bastante complicado, pois necessita de uma técnica de *column-switching*. Por outro lado, o método publicado por Quaglia et al. (1998) é

enantiosseletivo não aplicável a finalidade pretendida. Além disso, o método descrito no Capítulo 1 também não se aplica a essa finalidade, pois a CE é uma técnica essencialmente analítica impossibilitando a obtenção das quantidades requeridas dos metabólitos formados para posterior caracterização.

Esta etapa do projeto foi desenvolvida durante estágio de doutorado sanduíche no Departamento de Química Orgânica, da Faculdade de Ciências, da Universidade de Cádiz, Puerto Real (Cádiz), Espanha, sob a supervisão do Prof. Dr. Isidro González Collado.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta etapa foi estudar a biotransformação da midodrina empregando fungos endofítico e fitopatógeno, visando a detecção e caracterização de outros metabólitos além da DMAE. Para alcançar este objetivo foram executadas as seguintes etapas:

- a) Desenvolvimento e validação de método para análise simultânea da midodrina e DMAE em meio de cultura por HPLC;
 - b) Aplicação do método validado nos estudos de biotransformação da midodrina por fungos endofítico e fitopatógeno;
 - c) Avaliação da cinética de biotransformação da midodrina por fungos endofítico e fitopatógenos;
 - d) Biotransformação da midodrina, em escala ampliada, pelo fungo endofítico *Papulaspora immersa* em condição estática;
 - e) Biotransformação da midodrina, em escala ampliada, pelo fungo fitopatógeno *Botrytis cinerea* linhagem 2100 em condição estática.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Separação da midodrina e DMAE por HPLC

3.1.1. Materiais

3.1.1.1. Reagentes e solventes

Os solventes orgânicos usados no preparo das fases móveis durante a otimização da separação cromatográfica foram grau cromatográfico. Metanol foi obtido da Carlo Erba (Val de Reuil, França) e a acetonitrila da Merck (Darmstadt, Alemanha). O acetato de etila empregado nas extrações foi adquirido da Carlo Erba (Val de Reuil, França).

Os aditivos orgânicos (grau p.a.), ácido fórmico e ácido acético, foram obtidos da Panreac (Barcelona, Espanha). Água ultrapura foi produzida por um sistema MilliQ-plus system da Millipore (Bedford, MA, EUA). Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

3.1.1.2. Soluções-padrão

A midodrina usada na preparação das soluções-padrão foi obtida da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), enquanto que a DMAE foi obtida através da hidrólise da midodrina de acordo com procedimento descrito por Quaglia et al. (2004). Neste procedimento, uma solução de cloridrato de midodrina (0,001 mol) em HCl 2 mol L⁻¹ (10 mL) foi submetida a refluxo durante 3 horas. Após este período, a mistura foi resfriada, alcalinizada com NaOH 60% e extraída com acetato de etila. A fração orgânica resultante foi evaporada sob pressão reduzida. O extrato resultante foi purificado em cartucho Sep-Pak[®] C₁₈ de 10 g e eluição com fase móvel composta por metanol: água (80: 20) + 0,5% de TEA. As frações geradas foram comparadas reunidas e submetidas à análise por RMN de ¹H. O espectro obtido foi comparado ao espectro da DMAE encontrado na literatura (SCIFINDER WEB).

As soluções-padrão da midodrina e DMAE utilizadas na otimização da separação cromatográfica foram preparadas em metanol, na concentração de 100

$\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções empregadas na validação do método foram preparadas nas concentrações de 4, 12, 40, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas estas soluções de trabalho foram preparadas a partir de uma solução estoque preparada também em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} . As soluções foram armazenadas a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e protegidas da ação da luz.

3.1.1.3. Sistema Cromatográfico

Foi empregado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca VWR-HITACHI (Tóquio, Japão), composto de uma bomba com gradiente quaternário, modelo L2130, um injetor automático, modelo L2200, um detector por absorção no UV, modelo L2400 e um sistema de aquisição de dados com software EZChrom Elite Client/Server versão 3.1.6.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Avaliação da coluna cromatográfica

A resolução da midodrina e DMAE foi avaliada à temperatura ambiente. A coluna Lichrospher 100 RP18 (partículas de 5 μm , 250 x 4,6 mm) foi empregada no modo fase reversa. O parâmetro empregado para avaliação da separação foi a resolução (R_s) (item 3.1.2.1., capítulo 1)

3.2. Validação do método por cromatografia líquida para determinação de midodrina e DMAE em meio de cultura

3.2.1. Parâmetros avaliados na validação do método

O método foi validado conforme recomendações de guias oficiais (FDA, 2001; ANVISA 2003) pela avaliação dos seguintes parâmetros: recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, seletividade e estabilidade (soluções-padrão, congelamento/ descongelamento, bancada por 12 horas, condições de biotransformação e autoinjeter por 12 horas).

O procedimento empregado na avaliação dos parâmetros de validação é apresentado no item 3.3.3. do capítulo 1. As concentrações dos controles usados na validação do método para determinação da midodrina e DMAE são apresentadas na **Tabela C2-1**. Os parâmetros seletividade, estabilidade nas condições de biotransformação e estabilidade em autoinjeter por 12 horas, por apresentarem diferenças quanto ao exposto no item 3.3.3. do capítulo 1, estão descritos na sequência deste item.

Tabela C2-1. Concentrações dos controles empregados na validação do método.

Parâmetro	Concentração dos controles ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Midodrina			DMAE		
	CB	CM	CA	CB	CM	CA
Recuperação	1,2	20,0	30,0	1,2	20,0	30,0
Precisão e exatidão	1,2	20,0	30,0	1,2	20,0	30,0
Estabilidade						
Ciclos Congelamento/ descongelação	1,2	-----	30,0	1,2	-----	30,0
Bancada por 12 horas	1,2	-----	30,0	1,2	-----	30,0
Soluções-padrão	-----	20,0	-----	-----	20,0	-----
Linearidade^a		0,4 – 40,0			0,4 – 40,0	
LQ		0,4			0,4	

^aIntervalo de concentrações; CB, concentração baixa; CM, concentração média; CA, concentração alta.

3.2.1.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise de meio de cultura Czapek-Dox estéril e meio de cultura Czapek-Dox estéril incubado com os fungos estudados.

3.2.1.2. Estabilidade

3.2.1.2.1. Condições de biotransformação

A biotransformação da midodrina foi avaliada em condição estática e sob agitação. Na determinação da estabilidade na condição estática de biotransformação, uma alíquota de 6 mg de midodrina foi dissolvida em 750 μL de água estéril e adicionada a frascos *Roux* contendo 150 mL de meio de cultura Czapek-Dox, resultando na concentração de $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas amostras foram submetidas ao procedimento de biotransformação (item 3.3.2.1.1.2. Biotransformação em condição estática, deste capítulo). Por sua vez, na determinação da estabilidade na condição de biotransformação sob agitação, uma alíquota de 8 mg de midodrina foi dissolvida em 1000 μL de água estéril e adicionada a Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura Czapek-Dox ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$). Estas amostras foram submetidas ao procedimento de biotransformação, descrito no item 3.3.2.1.1.1. Biotransformação em agitação, deste capítulo. Diariamente, durante o período de biotransformação (7 dias), alíquotas de 0,5 mL ($n=3$) foram analisadas e comparadas a amostras recentemente preparadas na concentração de $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram consideradas estáveis se o desvio (expresso como E%) em relação às amostras frescas fosse inferior a 15%.

3.2.1.2.2. Autoinjeter por 12 h

Para avaliar a estabilidade das amostras processadas e mantidas por 12 horas no autoinjeter, três alíquotas ($n = 3$) foram preparadas em meio de cultura Czapek-Dox nas concentrações de 1,2 e $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um dos analitos. Estas amostras foram extraídas e acondicionadas nos recipientes do autoinjeter (*vials*) a temperatura ambiente. As amostras foram analisadas após 12 horas. As amostras submetidas a este procedimento foram comparadas a amostras frescas recentemente preparadas nas mesmas concentrações e foram consideradas estáveis se o desvio (expresso como, E%) frente às amostras frescas situou-se em $\pm 15\%$.

3.3. Procedimento de biotransformação da midodrina

3.3.1. Materiais

3.3.1.1. Reagentes

Os reagentes (grau p.a.) utilizados no preparo do meio fermentativo Czapek-Dox foram dextrose, nitrato de sódio, fosfato de potássio dibásico, sulfato de magnésio heptaidratado, sulfato de ferro (II) heptaidratado e extrato de levedura, obtidos da Panreac (Barcelona, Espanha).

O meio de cultura BDA foi obtido da DIFCO (Drogheda, Irlanda). Os componentes do meio de crescimento ágar malte ainda não listados como o extrato de malte e ágar foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) enquanto que a peptona de caseína foi comprada da FLUKA (Buch, Suíça).

Na etapa de fracionamento dos metabólitos foi empregada resina de dextrana da marca Sephadex[®] LH20 da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), cromatofolhas RP-18 F_{254S} da Merck (Darmstadt, Alemanha) e cartuchos de SPE Sep-Pak[®] C₁₈ de 10 g da Waters (Milford, MA, EUA). Os solventes orgânicos, grau cromatográfico, usados no preparo das fases móveis foram metanol e acetato de etila obtidos da Carlo Erba (Val de Reuil, França). Os ácidos fórmico, acético e sulfúrico foram obtidos da Panreac (Barcelona, Espanha).

Os reagentes empregados na etapa de caracterização dos metabólitos foram metanol e acetato de etila, grau cromatográfico, da Carlo Erba (Val de Reuil, França) e metanol deuterado da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.3.1.2. Meios de cultura

A composição dos meios de cultura de crescimento (ágar malte) e fermentativo (Czapek-Dox) são apresentadas nas **Tabelas C2-2 e C2-3**, respectivamente.

Tabela C2-2. Composição do meio ágar malte.

Componente	g/L
Extrato de malte	20,0
Dextrose	20,0
Ágar	20,0
Peptona de caseína	1,0
Água destilada	qsp

Tabela C2-3. Composição do meio fermentativo Czapek-Dox.

Componente	g/L
Dextrose	50,0
Extrato de levedura	1,0
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Água destilada	qsp

O pH foi ajustado na faixa de 6,5 – 7,0 com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹.

3.3.1.3. Fungos empregados no estudo de biotransformação

Nos experimentos de biotransformação foram empregados fungos endofítico e fitopatógenos. O fungo endofítico utilizado, *Papulaspora immersa* Hotson (SS13), foi previamente isolado como endofítico da planta *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) (GALLO et al., 2009). Por sua vez, os fungos fitopatógenos empregados foram duas linhagens de *Botrytis cinerea*. A primeira, *B. cinerea* (UCA 992), foi isolada do fruto de *Vitis vinifera* nos vinhedos Domecq, Jerez de La Frontera, Cádiz, Espanha. Esta linhagem está depositada na Micoteca e Herbarium da Faculdade de Ciências da Universidade de Cádiz (UCA). A outra linhagem empregada foi a *B. cinerea* 2100 obtida do “Centro Español de Cultivos Tipos” (CECT), da Faculdade de Biologia, Universidade de Valencia, Espanha.

As fotografias dos fungos estudados estão apresentadas na **Figura C2-2**.

Figura C2-2. Fotografias dos fungos estudados em meio de cultivo BDA (SS13) e Ágar-malte (*B. cinerea* UCA 992 e 2100).

3.3.2. Métodos

3.3.2.1. Procedimento de biotransformação para avaliação da cinética de biotransformação

3.3.2.1.1. Fungo endofítico *Papulaspora immersa* Hotson

Primeiramente foi realizada a transferência de três discos de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA contendo o micélio do fungo, com auxílio de alça de platina, para placas de Petri com 9,0 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio BDA (**Tabela C1-2**, capítulo 1). As placas inoculadas foram mantidas em sala climatizada por período de 7 dias, a temperatura de 25°C, possibilitando o crescimento dos micro-organismos.

O procedimento de biotransformação foi realizado em duas etapas (BORGES et al., 2007; BORGES et al., 2008; BORGES et al., 2009b). No primeiro estágio, chamado de pré-cultivo, três discos de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA (**Tabela C1-2**, capítulo 1) contendo o micélio do fungo foram removidos das placas de Petri com auxílio de um *Transfer tube* e assepticamente inoculados em tubos Falcon® de 50 mL contendo 10 mL de meio pré-fermentativo malte (**Tabela C1-3**, capítulo 1). Os tubos Falcon® foram incubados por 4 dias (96 h) a temperatura de 25°C em incubadora com agitação orbital, tipo “shaker” modelo CH 4127 da Adolph Kühner (Birsfelden, Suíça) a 120 rpm.

3.3.2.1.1.1. Biotransformação em agitação

No segundo estágio, biotransformação, a massa micelial resultante do pré-cultivo e 8 mg de midodrina (dissolvidos em 1,0 mL de água estéril) foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL (duplicata) de meio Czapek-Dox (**Tabela C2-3**). A mistura foi incubada por 5 dias a 25°C, com agitação de 120 rpm. Alíquotas de 3 mL foram assepticamente coletadas, a cada dia, e 0,5 mL foi submetido ao procedimento de extração e análise por cromatografia líquida.

3.3.2.1.1.2. Biotransformação em condição estática

No segundo estágio, biotransformação, a massa micelial resultante e 6 mg de midodrina (dissolvidos em 0,75 mL de água estéril) foram transferidos para frascos Roux contendo 150 mL (duplicata) de meio Czapek-Dox. A mistura foi incubada por 5 dias a 25°C. Alíquotas de 3 mL foram assepticamente coletadas, a cada dia, e 0,5 mL foi submetido ao procedimento de extração e análise por cromatografia líquida.

3.3.2.1.2. Fungos fitopatógenos *Botrytis cinerea* linhagens UCA 992 e 2100

Primeiramente foi realizada a inoculação de 100 µL de uma suspensão contendo 10^7 esporos de cada uma das linhagens de *Botrytis cinerea* selecionadas, para placas de Petri com 9,0 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio ágar-malte (**Tabela C2-2**). As placas inoculadas foram mantidas em sala climatizada por período de 14 dias, a temperatura de 25°C, visando à obtenção de esporos para o procedimento de biotransformação propriamente dito.

3.3.2.1.2.1 Biotransformação em agitação

No procedimento de biotransformação, 10^7 esporos foram adicionados a Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL (duplicata) de meio Czapek-Dox e submetidos à incubação por 48 h a 25 °C, com agitação de 120 rpm. Após este período, 8 mg de midodrina (dissolvidos em 1,0 mL de água estéril) foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL (duplicata) de meio Czapek-Dox (**Tabela C2-3**). A mistura foi incubada por 7 dias a 25°C, com agitação de 120 rpm. Alíquotas de 3 mL foram assepticamente coletadas, a cada dia, e 0,5 mL foi submetido ao procedimento de extração e análise por cromatografia líquida.

3.3.2.1.2.2. Biotransformação em condição estática

No procedimento de biotransformação, 10^7 esporos foram adicionados a frascos Roux contendo 150 mL (duplicata) de meio Czapek-Dox e submetidos a incubação por 48 h a 25 °C. Após este período, 6 mg de midodrina (dissolvidos em 0,75 mL de água estéril) foram transferidos para frascos Roux contendo 150 mL (duplicata) de meio Czapek-Dox. A mistura foi incubada por 7 dias a 25°C. Alíquotas

de 3 mL foram assepticamente coletadas, a cada dia, e 0,5 mL foi submetido ao procedimento de extração e análise por cromatografia líquida.

3.3.2.2. Procedimento de biotransformação em escala ampliada em condição estática

3.3.2.2.1. Fungo endofítico *Papulaspora immersa* Hotson

O procedimento de biotransformação foi conduzido conforme item 3.3.2.1.1.2. deste capítulo. Porém, neste experimento, foram empregados 16 frascos *Roux*, dos quais oito foram extraídos ao final de 5 dias e os demais ao final de 10 dias. O filtrado do meio de cultivo foi alcalinizado com hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹ e extraído com acetato de etila.

3.3.2.2.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato obtido após 5 dias de biotransformação

O extrato resultante (280 mg) foi submetido a fracionamento em coluna de vidro de 80 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro. A coluna de vidro foi empacotada com Sephadex[®] LH20 até a altura de 56 cm e a eluição foi feita a pressão atmosférica usando metanol como fase móvel. Foram geradas 67 frações de 10 mL as quais foram submetidas à análise comparativa por cromatografia em camada delgada (CCD) em fase reversa (Cromatofolhas RP-18 F_{254S}), usando como fase móvel a mistura de metanol: água (1:1) + ácido fórmico 0,1%. Após eluição, as cromatoplasmas foram observadas sob radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e, posteriormente, reveladas com “oleum” (ácido acético/água/ácido sulfúrico 80:16:4) seguido por aquecimento a 100 °C durante alguns minutos. De acordo com os perfis cromatográficos obtidos, foram reunidas 4 frações: F1(1-21) 11,6 mg, F2(22-45) 130 mg, F3(46-52) 33,4 mg e F4(53-67) 8 mg. As frações geradas foram comparadas por CCD frente a soluções-padrão de midodrina e DMAE, bem como submetidas à análise por RMN de ¹H em busca de sinais semelhantes aqueles fornecidos pelo precursor (midodrina). Com base nos dados acima partiu-se para o fracionamento de F2 (130 mg).

A fração F2 (130 mg) foi submetida a fracionamento em cartucho Sep-Pak[®] C₁₈ de 10 g e eluição por gradiente linear (20 mL de cada proporção) com fase móvel

inicial composta por água:metanol (90:10) + ácido fórmico 0,1% e incrementos de 10% de metanol até atingir a composição de 100% de metanol. Foram geradas 29 frações de aproximadamente 15 mL. Estas frações foram comparadas por CCD em fase reversa conforme procedimento acima descrito. De acordo com seu perfil cromatográfico foram reunidas 9 frações F2.1(1-2) 75 mg, F2.2(3-5) 19,1 mg, F2.3(6-9) 2,0 mg, F2.4(10-14) 0,83mg, F2.5(15-18) 4,2 mg, F2.6(19-22) 9,9 mg, F2.7(23-24) 1,43 mg, F2.8(25-27) 2,36 mg e F2.9(28-29) 2,56 mg.

Estas frações foram analisadas por CCD frente a soluções-padrão de midodrina e DMAE, bem como submetidas a análise por RMN de ¹H em busca de sinais semelhantes aqueles fornecidos pelo precursor (midodrina).

3.3.2.2.1.2 Fracionamento cromatográfico do extrato obtido após 10 dias de biotransformação

O extrato resultante (305 mg) foi submetido a fracionamento em coluna empacotada com Sephadex LH-20, conforme descrito no item 3.3.2.2.1.1., deste capítulo. De acordo com os perfis cromatográficos obtidos foram reunidas 4 frações: F1(1-8) 1,97 mg, F2(9-16) 146 mg, F3(17-20) 48,8 mg e F4(21-35) 1 mg.

A fração F2 (146 mg) foi submetida a fracionamento em cartucho Sep-Pak[®] C₁₈ de 10 g (procedimento descrito no item 3.3.2.2.1.1., deste capítulo). Foram geradas 33 frações de aproximadamente 15 mL. Estas frações foram comparadas por CCD em fase reversa. De acordo com seu perfil cromatográfico foram reunidas 5 frações F2.1(1-2) 0,7 mg, F2.2(3-5) 81,95 mg, F2.3(6-14) 5,69 mg, F2.4(15-24) 4,86mg e F2.5(25-33) 32,52 mg.

As frações geradas foram comparadas por CCD frente a soluções-padrão de midodrina e DMAE, bem como submetidas a análise por RMN de ¹H em busca de sinais semelhantes àqueles fornecidos pelo precursor (midodrina).

3.3.2.2.2. Procedimento de biotransformação para o fungo *Botrytis cinerea* 2100

O procedimento de biotransformação foi conduzido conforme item 3.3.2.1.2.2., deste capítulo. Porém, neste experimento, foram empregados 18 frascos Roux, os quais foram extraídos ao final de 48 h de biotransformação. O

filtrado, do meio de cultivo, foi alcalinizado com hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹ e extraído com acetato de etila.

3.3.2.2.2.1. Fracionamento cromatográfico do extrato

O extrato resultante (891 mg) foi submetido a fracionamento em cartucho Sep-Pak[®] C₁₈ de 10 g. Foi empregado um gradiente linear (40 mL de cada proporção) com fase móvel inicial composta por água:metanol (90:10) + ácido fórmico 0,1% e incrementos de 10% de metanol até atingir a proporção de 100% deste solvente. Foram geradas 44 frações de aproximadamente 10 mL. Estas foram comparadas por CCD em fase reversa conforme procedimento acima descrito. De acordo com seu perfil cromatográfico foram reunidas 13 frações F1(1-2) 335,8 mg, F2(3-4) 291,1 mg, F3(5-11) 15,32 mg, F4(12-13) 3,58 mg, F5(14-17) 18,9 mg, F6(18-19) 6,92 mg, F7(20-24) 27,55 mg, F8(25-27) 15,3 mg, F9(28-30) 62,1 mg, F10(31-32) 11,68 mg, F11(33-34) 14,6 mg, F12(35-39) 45 mg e F13(40-44) 9,58 mg.

As frações geradas foram comparadas por CCD frente a soluções-padrão de midodrina e DMAE, bem como submetidas a análise por RMN de ¹H em busca de sinais semelhantes àqueles fornecidos pelo precursor (midodrina).

3.3.2.3. Isolamento dos produtos de biotransformação

As frações geradas foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna semipreparativa Lichrospher 10 RP-18 (partículas de 10 µm, 250 x 10 mm) da Merck (Darmstadt, Alemanha) e misturas de água e metanol em diferentes proporções adicionadas de ácido fórmico, como fase móvel, na vazão de 2,5 mL min⁻¹. A detecção foi feita em 290 nm e o volume injetado foi de 100 µL.

3.3.2.4. Caracterização estrutural dos produtos de biotransformação

3.3.2.4.1. Atividade óptica ([α]_D)

As atividades ópticas de cada produto isolado foram determinadas em um polarímetro modelo 241 da Perkin-Elmer (Brunn am Gebirge, Áustria), empregando

uma lâmpada de sódio ($\lambda=589$ nm), com cela de 1 decímetro de comprimento e volume de 1 mL. O solvente utilizado foi metanol.

3.3.2.4.2. Espectroscopia no infravermelho (IR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro com transformada de Fourier, Genesis Series FTIR da Mattson (Middleton, WI, EUA). As amostras foram dissolvidas em acetato de etila: metanol (3:1) e preparadas em película sobre célula de NaCl.

3.3.2.4.3. Espectrometria de massas (MS)

Os espectros de massas, de baixa resolução, foram gerados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas VG Autospec-Q da Finnigan (Waltham, MA, EUA), através da injeção direta das amostras dissolvidas em metanol. A ionização empregada foi por impacto eletrônico, com energia de 70 eV.

3.3.2.4.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros foram adquiridos nos espectrômetros Varian Inova-400 ou Varian Inova-600 MHz (Santa Clara, CA, EUA) a temperatura ambiente (25 °C), empregando metanol deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos foram expressos na escala de δ em ppm e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). Os valores de δ foram referenciados com base no pico residual do metanol deuterado para o hidrogênio a 3,30 ppm e para o carbono a 49 ppm. A multiplicidade dos sinais está indicada pelas seguintes abreviaturas: *s* (singleto), *d* (dubleto), *t* (tripleto), *m* (multiplete), *dd* (duplo dubleto), *dt* (dubleto de tripleto), *ddd* (duplo duplo dubleto) e etc.

Os experimentos realizados foram os seguintes: RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT (*Delay Enhancement by Polarization Transfer*), COSY (correlação homonuclear ^1H - ^1H), HSQC (*Heteronuclear single quantum coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Separação da midodrina e DMAE

4.1.1. Otimização da separação cromatográfica

A coluna disponível no laboratório que pode ser empregada na análise da midodrina e DMAE foi a Lichrospher 100 RP18, utilizando fases móveis variadas constituídas de metanol, acetonitrila e água. A adição de ácidos orgânicos (fórmico e acético) foi realizada visando suprimir a ionização dos grupos silanóis da coluna e sua interação com os analitos, atenuando a cauda nos picos dos compostos básicos (MCCALLEY, 2010).

A condição cromatográfica que permitiu melhor resolução com tempo adequado de análise está apresentada na **Tabela C2-4**:

Tabela C2-4. Condições cromatográficas otimizadas.

Parâmetro	Condição otimizada
Coluna	Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila / Ácido fórmico 40 mmol L ⁻¹ (60:40, v/v)
Vazão	1,4 mL min ⁻¹
Volume de Injeção	25 µL
Temperatura de análise	Ambiente
Deteção	UV: 290 nm

Sob essas condições, foi obtida suficiente resolução (1,52) com tempo de análise de 10 min (**Figura C2-3B**). A separação de outros possíveis metabólitos não foi avaliada nessa etapa, pois não foi possível obter os padrões analíticos necessários.

4.1.2. Otimização dos parâmetros da extração líquido-líquido

O procedimento de extração descrito no Capítulo 1 (item 4.2.5) foi adaptado, aumentando o volume de solvente orgânico empregado nas extrações (3 para 4 mL), reduzindo o volume da matriz (1,0 para 0,5 mL) e substituindo o hidróxido de

amônio por solução de hidróxido de sódio para alcalinizar a amostra, visando aumentar a recuperação da midodrina que era de 42%. Esta alteração possibilitou obter recuperações semelhantes para os dois analitos, midodrina (82%) e DMAE (84%). As condições da extração líquido-líquido otimizadas podem ser encontradas na **Tabela C2-5**.

Tabela C2-5. Condições otimizadas para o procedimento de preparação das amostras.

Parâmetro	Condição otimizada
Solvente (volume)	Acetato de etila (4 mL)
Solução alcalina (volume)	Hidróxido de sódio 10 mol L ⁻¹ (50 µL)
Tempo de agitação	2 min
FCR ^a e tempo de centrifugação	1800 g/10 min
Procedimento de evaporação	Fluxo de ar comprimido
Volume recuperado	3 mL
Dissolução dos resíduos	Acetonitrila / Ácido fórmico 40 mmol L ⁻¹ (60:40, v/v)

^aForça centrífuga relativa.

4.2. Validação do método por cromatografia líquida para a determinação de midodrina e DMAE

4.2.1. Recuperação

A **Tabela C2-6** apresenta os resultados obtidos na avaliação da recuperação da midodrina (aproximadamente 82%) e DMAE (aproximadamente 84%), com CV% inferiores a 8,6%, considerados adequados (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

Tabela C2-6. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise da midodrina e DMAE em meio de cultura Czapek-Dox.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$, $n = 3$) ^a	Midodrina		DMAE	
	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b
1,2	75,3	10,4	75,6	9,3
20,0	86,5	4,8	88,4	3,6
30,0	84,4	3,9	87,8	4,0
Média	82,0	7,2	83,9	8,6

^a Número de determinações; ^b CV (%), coeficiente de variação percentual.

4.2.2. Linearidade

A **Tabela C2-7** apresenta as equações lineares, os coeficientes de correlação linear (r) e a análise de variância. Os valores dos coeficientes de correlação foram superiores a 0,9997 e os resultados da ANOVA *Lack of fit* indicam que não houve desvio de linearidade, pois os valores de p foram maiores que 0,05. A análise estatística foi realizada pelo programa estatístico MINITAB Release versão 14.1 (State College, PA, EUA).

Tabela C2-7. Linearidade do método para determinação de midodrina e DMAE.

Analitos	Intervalo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação linear	Coeficiente de correlação	ANOVA	
				Valor de (F)	Valor de (p)
Midodrina	0,4 – 40,0	$y = 126688x - 17947$	0,9997	2,86	0,055
DMAE	0,4 – 40,0	$y = 139789x - 16114$	0,9998	0,25	0,934

4.2.3. Limite de quantificação

Os limites de quantificação do método foram de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ tanto para midodrina como para DMAE. Os valores de precisão (CV,%) e exatidão (E,%) na concentração correspondente ao limite de quantificação foram inferiores a 20% (FDA, 2001; ANVISA, 2003) e são apresentados na **Tabela C2-8**.

Tabela C2-8. Limites de quantificação do método para determinação de midodrina e DMAE.

Analitos	Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	E (%) ^b	CV (%) ^c
Midodrina	0,4	0,439	9,7	5,9
DMAE	0,4	0,443	10,7	5,3

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

4.2.4. Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão intra e interdias foram utilizadas alíquotas de meio de cultura Czapek-Dox fortificadas com 1,2; 20,0 e 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um dos analitos. A **Tabela C2-9** apresenta os valores de precisão (CV,%) e exatidão (E,%) intra e interdias para a análise da midodrina e DMAE, mostrando que o método atende as recomendações de guias oficiais de validação.

Tabela C2-9. Precisão e exatidão do método para análise da midodrina e DMAE em meio de cultura Czapek-Dox.

Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Midodrina			DMAE		
	1,2	20,0	30,0	1,2	20,0	30,0
Intradia ($n = 5$)						
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,12	20,40	30,98	1,14	19,74	30,05
Precisão (CV, %) ^a	2,4	3,8	3,1	3,6	4,1	2,5
Exatidão (E, %) ^b	- 6,6	2,0	3,2	- 5,0	- 1,3	0,2
Interdias ($n = 3$)						
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,12	20,33	31,26	1,12	20,14	29,99
Precisão (CV, %) ^a	4,7	6,7	7,6	3,7	6,9	8,2
Exatidão (E, %) ^b	- 6,6	1,6	4,2	- 6,6	0,7	0,0

n = número de determinações: cinco (intradia) e três (interdias); ^aExpresso como coeficiente de variação percentual, CV (%); ^bExpresso como erro relativo, E%.

4.2.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da análise cromatográfica de amostras de meio de cultura Czapek-Dox (**Figura C2-3 (A)**) e amostras de meio de cultura Czapek-Dox fortificadas com midodrina e DMAE (**Figura C2-3 (B)**). Nesses

cromatogramas não foram observados picos interferentes eluindo nos mesmos tempos de retenção dos analitos.

Figura C2-3. (A) Cromatograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek-Dox extraído pelo procedimento de extração líquido-líquido. (B) Cromatograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek-Dox fortificado com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de midodrina e DMAE e submetido ao procedimento de extração. As condições cromatográficas foram: Coluna Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel constituída por acetonitrila / ácido fórmico 40 mmol L^{-1} (60:40, v/v), vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de 25 μL , detecção por absorção no UV em 290 nm, análise a temperatura ambiente. (1) midodrina, (2) DMAE.

A **Figura C2-4** apresenta os cromatogramas das amostras de meio de cultura Czapek-Dox acrescidas do micélio dos fungos *Papulaspora immersa* (SS13), *Botrytis cinerea* (UCA 992) e *Botrytis cinerea* (2100) em condições de agitação e estática. Em nenhuma das condições foram observados picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos com área superior a 5% do valor dos analitos (ANVISA, 2003).

Figura C2-4. Cromatogramas representativos das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubadas com os fungos *Botrytis cinerea* (2100) (A-Agitação) e (B-estático), *Papulaspora immersa* (SS13) (C-Agitação) e (D-estático), *Botrytis cinerea* (UCA 992) (E-Agitação) e (F-estático). As condições cromatográficas foram: Coluna Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel constituída por acetonitrila / ácido fórmico 40 mmol L⁻¹ (60:40, v/v), vazão de 1,4 mL min⁻¹, volume de injeção de 25 μ L, detecção UV em 290 nm e análise a temperatura ambiente.

4.2.6. Estabilidade

A estabilidade da midodrina e DMAE foi avaliada nos ciclos de congelamento/descongelamento, bancada por 12 horas, autoinjeter por 12 horas, nas condições de biotransformação e nas condições de armazenamento das soluções-padrão. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas, pois não foi observado desvio superior a 15%, avaliado através do E%, em relação às amostras frescas, recentemente preparadas e processadas, bem como picos de produtos de degradação. Estes resultados podem ser observados nas **Tabelas C2-10 e C2-11**.

A estabilidade das soluções-padrão de midodrina e DMAE em metanol, armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz foi avaliada durante o período da validação e aplicação do método analítico. Os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites especificados. Os desvios observados em relação as áreas obtidas no dia do preparo das soluções-padrão foram de 6,9% e 6,4% para a midodrina e DMAE, respectivamente.

Tabela C2-10. Estabilidade nos ciclos de congelamento/ descongelamento, bancada por 12 horas e autoinjeter por 12 horas.

Analito	Midodrina		DMAE	
Concentração amostra recém-preparada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,26	32,05	1,14	33,22
Estabilidade				
Congelamento e descongelamento ($n = 3$)				
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,34	33,59	1,25	33,70
Precisão (CV, %) ^a	2,6	7,7	6,0	6,1
Exatidão (E, %) ^b	6,3	4,8	9,6	1,4
Bancada por 12 h ($n = 3$)				
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,35	33,58	1,19	33,92
Precisão (CV, %) ^a	1,2	0,6	2,8	2,9
Exatidão (E, %) ^b	7,1	4,8	4,4	2,1
Autoinjeter por 12 h ($n=3$)				
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,31	33,99	1,12	32,24
Precisão (CV, %) ^a	3,9	0,9	5,0	2,5
Exatidão (E, %) ^b	4,0	6,1	- 1,7	-2,9

n = número de determinações; ^aExpresso como coeficiente de variação percentual, CV; ^b Expresso como erro relativo, E.

Tabela C2-11. Estabilidade da midodrina nas condições de biotransformação.

Tempo de incubação (horas)	0	24	48	72	96	120	144	168
Agitação ($n = 3$)								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	35,24	34,45	33,18	34,78	33,50	33,78	33,89	32,99
Precisão (CV, %) ^a	5,2	6,3	1,8	10,4	4,9	8,5	9,3	10,4
Exatidão (E, %) ^b		-2,2	-5,8	-1,3	-4,9	-4,1	-3,8	-6,4
Estático ($n = 3$)								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	37,34	37,90	37,15	36,25	36,40	35,78	35,96	35,73
Precisão (CV, %) ^a	3,4	7,8	9,7	2,4	10,9	4,7	5,9	9,8
Exatidão (E, %) ^b		1,5	-0,5	-2,9	-2,5	-4,2	-3,7	-4,3

n = número de determinações; ^aExpresso como coeficiente de variação percentual, CV; ^b Expresso como erro relativo, E. Tempo 0, refere-se a amostras recém-preparadas.

4.3. Biotransformação da midodrina

A biotransformação da midodrina foi avaliada frente a três fungos em condições de agitação e estática. Estas diferentes condições foram testadas a fim de avaliar a influência da aeração dos cultivos, bem como, da morfologia de crescimento destes fungos. Em condição estática os fungos apresentam, em geral,

um crescimento homogêneo sobre a superfície do cultivo e em agitação observa-se a formação de agregados esféricos, chamados *pellets* (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). As reações de biotransformação dos fungos fitopatógenos estudados foram acompanhadas durante 7 dias (168 h), enquanto que a biotransformação pelo fungo endofítico foi monitorada durante 5 dias (120 h). Diariamente, alíquotas foram coletadas, extraídas e analisadas por cromatografia líquida. As concentrações dos analitos foram determinadas com base em curvas analíticas construídas diariamente. Após definidas as concentrações dos analitos, foram construídos gráficos com as curvas cinéticas de biotransformação dos fungos estudados (concentração x tempo de incubação). Os gráficos referentes à cinética de biotransformação da midodrina pelos três fungos em condição de agitação e estática são apresentados abaixo.

4.3.1. *Papulaspora immersa* Hotson (SS13)

A **Figura C2-5** apresenta os resultados de biotransformação da midodrina em DMAE pelo fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13).

Figura C2-5. Gráfico da cinética de formação de DMAE e decaimento da midodrina pelo fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) em condição estática e em agitação. As barras expressam a estimativa do desvio padrão das replicatas ($n=2$).

O fungo *Papulaspora immersa* (SS13) apresentou maior biotransformação em condição de agitação quando comparado à condição estática. A quantidade máxima determinada em ambas as condições foi verificada em 120 horas de biotransformação (**Figura C2-5**). Em condição estática, a partir do segundo dia de biotransformação, foi observada a presença de um pico adicional (pico 3 da **Figura C2-6B**) nas amostras biotransformadas o qual não foi detectado em nenhum dos controles avaliados (**Figura C2-6A**). Além disso, sua área máxima foi detectada em 120 horas de biotransformação.

Figura C2-6. (A) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubada com o fungo *Papulaspora immersa* (SS13) em condição estática. (B) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubada com o fungo *Papulaspora immersa* (SS13) e midodrina após 120 h de biotransformação em condição estática. As condições cromatográficas foram: Coluna Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel constituída por acetonitrila / ácido fórmico 40 mmol L⁻¹ (60:40, v/v), vazão de 1,4 mL min⁻¹, volume de injeção de 25 μ L, detecção UV em 290 nm e análise a temperatura ambiente. (1) midodrina, (2) DMAE e (3) composto desconhecido.

4.3.2. Botrytis cinerea linhagem UCA 992

Na **Figura C2-7** podem ser observados os resultados da cinética de biotransformação da midodrina pelo fungo *Botrytis cinerea* (UCA 992).

Figura C2-7. Gráfico da cinética de formação de DMAE e decaimento da midodrina pelo fungo *Botrytis cinerea* (UCA 992) em condição estática e de agitação. As barras expressam a estimativa do desvio padrão das replicatas ($n=2$).

O fungo *Botrytis cinerea* (UCA 992), da mesma maneira que o fungo *Papulaspora immersa* (SS13), apresentou maior biotransformação em condição de agitação quando comparado à condição estática. A quantidade máxima determinada em condição estática foi verificada em 168 horas de biotransformação (**Figura C2-7**), apresentando o maior percentual de biotransformação para esta condição entre os três fungos estudados (11,52%). Em condição de agitação o máximo de biotransformação foi verificado já em 96 horas de biotransformação (29,25%). Nas biotransformações conduzidas com este fungo não foi detectada a presença de nenhum pico adicional nas amostras biotransformadas.

4.3.3. *Botrytis cinerea* linhagem 2100

A **Figura C2-8** apresenta os resultados da cinética de biotransformação da midodrina pelo fungo *Botrytis cinerea* (2100). Assim como para os demais fungos estudados, o fungo *Botrytis cinerea* (2100) apresentou as melhores taxas de biotransformação em condição de agitação. A máxima quantidade de DMAE quantificada, no meio de cultivo, em condição de agitação, foi observada após 48

horas de biotransformação e consiste na condição que apresentou o melhor rendimento de DMAE entre as condições avaliadas neste estudo (42,2%). Por outro lado, em condição estática a máxima quantidade biotransformada foi observada em 72 horas de biotransformação (8,92%). Vale ressaltar que após 72 horas de incubação, praticamente toda midodrina havia sido biotransformada. Como a máxima porcentagem de midodrina obtida foi 42,2 %, sugere-se que outros metabólitos não detectados foram formados. Por outro lado, em condição estática foram observados três picos adicionais (picos 3, 4 e 5 **Figura C2-9B**), aos esperados (picos da midodrina e DMAE), em amostras submetidas a biotransformação por 48 horas. Esses picos não foram observados em nenhum dos controles avaliados (**Figura C2-9A**) e, após sua detecção, em 48 h, suas áreas não sofreram alteração durante o período do estudo. Esses picos adicionais formados podem ser considerados possíveis metabólitos da midodrina.

Figura C2-8. Gráfico da cinética de formação de DMAE e decaimento da midodrina pelo fungo *Botrytis cinerea* (2100) em condição estática e de agitação. As barras expressam o desvio padrão das replicatas ($n=2$).

Figura C2-9. (A) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubada com o fungo *Botrytis cinerea* (2100) em condição estática. (B) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek-Dox incubada com o fungo *Botrytis cinerea* (2100) e midodrina após 48 h de biotransformação em condição estática. As condições cromatográficas foram: Coluna Lichrospher 100 RP18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel constituída por acetonitrila / ácido fórmico 40 mmol L⁻¹ (60:40, v/v), vazão de 1,4 mL min⁻¹, volume de injeção de 25 μ L, detecção UV em 290 nm e análise a temperatura ambiente. (1) midodrina, (2) DMAE, (3, 4 e 5) compostos desconhecidos.

A reação observada na biotransformação da midodrina em DMAE consiste em uma hidrólise do grupo funcional amida. Esta reação com *Botrytis cinerea* foi também observada por Tellier et al. (2004).

O fungo *Botrytis cinerea* vem sendo empregado em diversas biotransformações principalmente de produtos sintéticos (BUSTILLO et al., 2003; DAOUBI et al., 2005; DURAN et al., 1999; DURÁN-PATRÓN et al., 2000; PINEDO-RIVILLA et al., 2011) e naturais (ALEU et al., 2001b; NUÑEZ et al., 2006) com potencial atividade fungistática e fungicida.

A **Tabela C2-12** apresenta o tempo de máxima formação da DMAE. O percentual de DMAE formado foi calculado considerando como 100% de biotransformação a concentração de midodrina quantificada no tempo 0 (alíquota coletada logo após a adição do fungo e fármaco ao meio de cultura) de biotransformação.

Tabela C2-12. Quantidade máxima de DMAE formada (expressa em % de fármaco adicionada).

Fungo	Condição	Tempo (horas)	% DMAE formada
Bc 2100	Agitação	48	42,20
Bc UCA 992	Agitação	96	29,25
Bc UCA 992	Estático	168	11,52
Bc 2100	Estático	72	8,92
SS 13	Agitação	120	7,96
SS13	Estático	120	7,36

4.4. Biotransformação da midodrina em escala ampliada

Após avaliação da cinética de biotransformação pelos fungos *Papulaspora immersa* Hotson, *Botrytis cinerea* UCA 992 e 2100 observou-se que para o primeiro e o último, em condição estática, havia a presença de picos adicionais nos cromatogramas. Com esta informação decidiu-se realizar a biotransformação da midodrina em escala ampliada, nessas condições e pelo período de tempo onde foi detectada a área máxima dos picos não identificados. Particularmente, para o fungo *Papulaspora immersa* Hotson, a biotransformação foi feita durante 5 e 10 dias, já que a área do pico não identificado aumentou desde o terceiro dia, quando foi observado pela primeira vez até o quinto e último dia de monitoramento.

4.4.1. Biotransformação com *Papulaspora immersa* Hotson durante 5 dias

Entre as frações avaliadas a F2.5 (4,2 mg) foi a única que apresentou manchas com fator de retardamento (R_F) e sinais de RMN de 1H semelhantes ao precursor (midodrina) e foi submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna semipreparativa. Após purificação da fração F2.5 foi obtida massa muito pequena do produto, o que inviabilizou sua caracterização estrutural.

4.4.2. Biotransformação com *Papulaspora immersa* Hotson durante 10 dias

As frações F3 (48,8 mg) apresentou manchas com R_F e sinais de RMN de 1H semelhantes ao precursor (midodrina). A fração F3 foi submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna semipreparativa, porém a massa isolada dos compostos foi muito pequena, não permitindo sua caracterização estrutural.

4.4.3. Biotransformação com *Botrytis cinerea* 2100

As frações F5 (18,9 mg) e F6 (6,92 mg) apresentaram manchas com fator de retardamento (R_F) e sinais de RMN de 1H semelhantes entre si e ao precursor (midodrina). Dessa maneira foram combinadas e submetidas à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna semipreparativa (**Figura C2-10**).

Figura C2-10. Cromatograma obtido durante a purificação das frações F5 + F6. As condições cromatográficas foram: coluna semipreparativa Lichrospher 10 RP-18 (10 μm) 250 x 10 mm, fase móvel constituída por água / metanol (70:30, v/v + 0,06% de ácido fórmico), vazão de 2,5 mL min⁻¹, volume de injeção de 100 μL , detecção em 290 nm, análise a temperatura ambiente. (1) composto isolado.

A quantidade isolada do composto **1**, foi 2,4 mg o que representa um rendimento de 2,2%. Em busca realizada no Scifinder scholar não foi encontrado descrição na literatura para a estrutura proposta para o composto.

O composto **1** foi obtido como um sólido branco; $[\alpha]_D^{25}$: + 2,0°; IR $V_{\max}$ (filme): 3358, 1637, 1496, 1213, 1044 cm^{-1} ; MS m/z (intensidade relativa): 239 (M^+ , 5), 221 ($M^+ - 18$, 24), 180 (58), 167 (91), 139 (65), 123 (35), 73 (54). Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C estão apresentados na **Tabela C2-13**.

Tabela C2-13. Dados espectroscópicos de RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C (100 MHz) do composto **1** (δ , CD_3OD).

RMN de ^{13}C		RMN de ^1H	
Posição	δ (ppm)	Posição	δ (ppm)
C1	155,2	H ₂	6,77 (<i>dd</i> , J 3,1; 9,0 Hz; 1H)
C2	113,8	H ₃	7,03 (<i>d</i> , J 9,0 Hz; 1H)
C3	112,5	H ₆	6,85 (<i>d</i> , J 3,1 Hz; 1H)
C4	151,8	H ₇	5,06 (<i>q</i> , J 3,8 Hz; 1H)
C5	132,8	H _{8α}	3,31 (<i>dd</i> , J 7,7; 13,58 Hz; 1H)
C6	113,8	H _{8β}	3,41 (<i>dd</i> , J 4,1; 13,58 Hz; 1H)
C7	68,3	H ₁₀	1,91 (<i>s</i> ; 3H)
C8	46,8	H ₁₁	3,77 (<i>s</i> ; 3H)
C9	173,7	H ₁₂	3,74 (<i>s</i> ; 3H)
C10	22,4		
C11	56,0		
C12	56,3		

δ = deslocamento químico; Hz = hertz

5. COMENTÁRIOS FINAIS

Neste capítulo foram mostrados os resultados obtidos com o desenvolvimento e validação de um método para a determinação simultânea de midodrina e DMAE por HPLC e detecção por absorção no ultravioleta empregando modo de eluição em fase reversa. Este método é mais simples que o proposto por Posch e Lindner (1989) que emprega um detector de fluorescência e técnica de preparo de amostra empregando *column-switching*. O método desenvolvido foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, limite de quantificação, seletividade, precisão, exatidão e estabilidade, cumprindo com os requisitos estabelecidos pela legislação.

Após sua validação, o método foi empregado em um estudo de biotransformação com um fungo endofítico *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) e outras duas linhagens do fungo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (UCA 992 e 2100). A biotransformação com os fungos foi conduzida em condições de agitação e estática. Para todos os fungos, a condição de agitação proporcionou maior produção de DMAE com destaque para o fungo *Botrytis cinerea* (2100). Por sua vez, as biotransformações com o fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) e o fungo *Botrytis cinerea* (2100) em condição estática forneceram picos adicionais aos esperados e não encontrados nos controles realizados.

Estas condições foram empregadas para realizar experimentos de biotransformação em escala ampliada visando o isolamento dos compostos. A biotransformação pelo fungo *Papulaspora immersa* não forneceu nenhum produto com massa suficiente para realizar sua caracterização. Por sua vez, o fungo *Botrytis cinerea* biotransformou a midodrina em um derivado desaminado, não descrito na literatura, com um rendimento de 2,2%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMOTO, M.; IIDA, I.; ITOGA, H.; MIYATA, A.; KAWAHARA, S.; KOHNO, Y. The in vitro metabolism of desglymidodrine, an active metabolite of prodrug midodrine by human liver microsomes. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Paris, v. 29 n. 3, p. 179-186, 2004.

ALEU, J.; COLLADO, I.G. Biotransformations by *Botrytis* species. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 13, p. 77-93, 2001a.

ALEU, J.; HANSON, J.R.; GALÁN, R.H.; COLLADO, I.G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol, ginsenosol, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 11, p. 329–334 2001b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&mode=PRINT_VERSION. Acesso em 1 de novembro de 2011.

.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 77, p. 669-674, 2007.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 46, n. 5, p. 945-952, 2008.

BORGES, W.S.; BORGES, K.B.; BONATO, P.S.; SAID, S.; PUPO, M.T. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformations. **Current Organic Chemistry**, Sharjah, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

BUSTILLO, A.J.; ALEU, J.; GALÁN, R.H.; COLLADO, I.G. 2003 Biotransformation of the fungistatic compound (*R*)-(+)-1-(4'-chlorophenyl)propan-1-ol by *Botrytis cinerea*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 21, p. 267–271, 2003.

COLLADO, I.G.; SÁNCHEZ, A.J.M.; HANSON, J.R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Natural Product Reports**, London, v. 24, p. 674-686, 2007.

DAOUBI, M.; DELIGEORGOPOULOU, A.; SÁNCHEZ, A.J.M.; GALÁN, R.H.; HITCHCOCK, P.B.; HANSON, J.R.; COLLADO, I.G. Antifungal Activity and Biotransformation of Diisophorone by *Botrytis cinerea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 6035-6039, 2005.

DURÁN, R.; CORRALES, E.; GALÁN, R.H.; COLLADO, I.G. Biotransformation of Caryophyllene Oxide by *Botrytis cinerea*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, p. 41-44, 1999.

DURÁN-PATRÓN, R.; ALEU, J.; GALÁN, R.H.; COLLADO, I.G. Biotransformation of (4*E*,8*R*)-Caryophyll-4(5)-en-8-ol by *Botrytis cinerea*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, p. 44-47, 2000.

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

FUDO, R.; ANDO, T.; SATO, S.; KAMEYAMA, T.; YAMANAKA, S. Isolation of isoeugenitin as a fruiting body inducer for *Stigmatella aurantiaca* from a soil fungus *Papulaspora* sp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, p. 183-184, 1997.

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 sonchifolia* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, v. 49, p. 142-151, 2009.

GALLO, M.B.C.; CAVALCANTI, B.C.; BARROS, F.W.A.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; BASTOS, J.K.; PUPO, M.T. Chemical constituents of *Papulaspora immersa*, an endophyte from *Smilax sonchifolia* (Asteraceae), and their cytotoxic activity. **Chemistry and Biodiversity**, Malden, v. 7, p. 2941-2950, 2010.

GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions 2000. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 20, p. 17-48, 2000.

HILÁRIO, V.C.; CARRÃO, D.B.; BARTH, T.; BORGES, K.B.; FURTADO, N.A.J.C.; PUPO, M.T.; 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.

KOLOSSA, N.; SCHUTZEMBERG, W.G.; WIENER, H.; KRIVANEK, P. Plasma level of the prodrug midodrine and its active metabolite in comparison with the α -mimetic action in dogs. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, Ghent, v. 238, p. 96-104, 1979.

MCCALLEY, D.V. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 858-880, 2010.

NUÑEZ, Y.O.; SALABARRIA, I.S.; COLLADO, I.G.; GALÁN, R.H. The Antifungal Activity of Widdrol and Its Biotransformation by *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. & Sacc. and *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 7517-7521, 2006.

O'CALLAGHAN, M.; GERARD, E.M.; WAIPARA, N.W.; YOUNG, T.R.; GLARE, T.R.; BARRELL, P.J.; CONNER, A.J. Microbial communities of *Solanum tuberosum* and magainin-producing transgenic lines. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 47-56, 2005.

PINEDO-RIVILLA, C.; BUSTILLO, A.J.; GALÁN, R.H.; ALEU, J.; COLLADO, I.G. Asymmetric preparation of antifungal 1-(4'-chlorophenyl)-1-cyclopropyl methanol and 1-(4'-chlorophenyl)-2-phenylethanol. Study of the detoxification mechanism by *Botrytis cinerea*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 70, p. 61-66, 2011.

POSCH, W.; LINDNER, W. Quantification of midodrine and its active metabolite in plasma using a high performance liquid chromatography column switching technique. **Biomedical Chromatography**, Malden, v. 3, p. 153-156, 1989.

QUAGLIA, M.G.; FARINA, A.; BOSSÙ, E.; COTICHINI, V. Human α 1-glycoprotein acid as chiral selector in the enantioseparation of midodrine and deglymidodrine racemates by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 18, p. 171-177, 1998.

QUAGLIA, M.G.; FARINA, A.; PALMERY, M.; DESIDERI, N.; DONATI, E.; BOSSÙ, E.; STRANO, S. Chiral investigation of midodrine, a long-acting α -adrenergic stimulating agent. **Chirality**, Malden, v. 16, p. 356-362, 2004.

RAVIRAJA, N.S.; MARIA, G.L.; SRIDHAR, K.R. Antimicrobial evaluation of endophytic fungi inhabiting medicinal plants of the western Ghats of India. **Engineering in Life Sciences**, Malden, v. 6, p. 515-520, 2006.

SCIFINDER WEB. Disponível em: <http://scifinder.cas.org>. Acesso em: 24 out. 2011.

TELLIER, F.; CARLIN-SINCLAIR, A.; FRITZ, R.; CHERTON, J.C.; LEROUX, P. Activity and metabolism of cyano-oxime derivatives in various strains of *Botrytis cinerea*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 78, p. 151–160, 2004.

**CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO ESTEREOSSELETIVA DO
BUFURALOL, 1'-OXOBUFURALOL E 1'-HIDROXIBUFURALOL
EM MEIO DE CULTURA POR HPLC: APLICAÇÃO EM ESTUDO
DE BIOTRANSFORMAÇÃO EMPREGANDO FUNGOS
ENDOFÍTICOS**

1. REVISÃO DA LITERATURA

O bufuralol, "2-benzofurano metanol, α -[[[(1, 1-dimetiletil)amino]metil]-7-etil-"(SCIFINDER WEB), é um fármaco pertencente à classe dos antiadrenérgicos; apresenta potente atividade β -bloqueadora, porém não seletiva e apresenta também, propriedade β_2 agonista. O bufuralol apresenta farmacodinâmica estereosseletiva, pois a atividade β -bloqueadora do (*S*)-bufuralol é aproximadamente 100 vezes superior a do enantiômero (*R*) (IKEGAWA et al., 1998; NARIMATSU et al., 2002; HEFNAWY; SULTAN; AL-SHERI, 2007).

O bufuralol apresenta farmacocinética estereosseletiva, transformando-se, nos mamíferos, em diversos metabólitos dentre os quais: (*1R*)-1'-oxobufuralol, (*1S*)-1'-oxobufuralol, (*1R*, 1'*R*)-1'-hidroxibufuralol, (*1R*, 1'*S*)-1'-hidroxibufuralol, (*1S*, 1'*S*)-1'-hidroxibufuralol, (*1S*, 1'*R*)-1'-hidroxibufuralol, (*1R*)-1'-oxobufuralol *O*-carboximetiloxima, (*1S*)-1'-oxobufuralol *O*-carboximetiloxima (**Figura C3-1**). Dentre os metabólitos listados, somente os enantiômeros (*1R*) e (*1S*) -1'-oxobufuralol *O*-carboximetiloxima não são ativos (IKEGAWA et al., 1998). A atividade β -bloqueadora dos metabólitos sintéticos, álcool e cetona-bufuralol, foi avaliada em ratos por Machin, Hurst e Osbond (1985), os quais observaram que, da mesma forma que para o bufuralol, os metabólitos que apresentavam configuração (*S*) eram mais potentes que os de configuração (*R*). Neste sentido, foi observado que os metabólitos 1'-hidroxibufuralol e 1'-oxobufuralol apresentavam atividade β -bloqueadora semelhante ou até mesmo superior ao bufuralol (NARIMATSU et al., 2003). A biotransformação do bufuralol a 1'-hidroxibufuralol é mediada principalmente pelas isoenzimas CYP2D6 e CYP2C19 e em menor extensão pelas isoenzimas CYP1A2 e CYP3A4 do citocromo P450 (NARIMATSU et al., 2002; NARIMATSU et al., 2003).

Francis, East e Larman (1982) avaliaram a farmacocinética e o metabolismo do bufuralol em humanos e observaram que a concentração plasmática do enantiômero (*S*) foi maior, porém o seu tempo de meia-vida foi inferior ao do enantiômero (*R*). Além disso, verificaram que reações de hidroxilação são a rota metabólica principal para o isômero (*S*), enquanto que para o isômero (*R*), a rota principal envolve reações de conjugação.

Figura C3-1 – Estruturas moleculares do bufuralol (a), 1'-hidroxibufuralol (b) e 1'-oxobufuralol (c). *Centros quirais.

A determinação estereosseletiva do bufuralol e/ou seus metabólitos em matrizes biológicas foi descrita em poucos trabalhos. Weerawarna et al. (1991) descreveram a resolução dos estereoisômeros do 1'-hidroxibufuralol através de um método indireto usando (*S*)-(-)-1-feniletil isocianato como agente derivatizante. Ikegawa et al. (1998) desenvolveram um método estereosseletivo para a determinação de bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol em plasma humano empregando procedimento de extração por imunoafinidade, separação em coluna quiral baseada na proteína ovomucóide e detecção por absorção no ultravioleta. Narimatsu et al. (2002) desenvolveram um método por cromatografia líquida empregando coluna quiral baseada no polissacarídeo celulose tris (3,5-dimetilfenil) carbamato e detecção por fluorescência para a determinação estereosseletiva de (*R*) e (*S*) bufuralol e dos quatro diastereoisômeros do 1'-hidroxibufuralol em microsomas hepáticos humanos. Recentemente, Hefnawy, Sultan e Al-Sheri (2007) publicaram um método aplicável à determinação de (*R*) e (*S*)-bufuralol em plasma e produtos farmacêuticos usando coluna contendo o antibiótico macrocíclico vancomicina como seletor quiral e detecção por absorção no ultravioleta.

Os métodos acima descritos são baseados em procedimentos convencionais de preparo de amostras: SPE (WEERAWARNA et al., 1991) e LLE (HEFNAWY; SULTAN; AL-SHERI, 2007; IKEGAWA et al., 1998; NARIMATSU et al., 2002). Por

outro lado a HF-LPME, por ser uma técnica de microextração, apresenta uma série de vantagens com relação às técnicas convencionais de preparo de amostra: simplicidade, baixo custo, excelente “*clean up*” especialmente para o modo de três fases, baixo consumo de solvente orgânico e problemas limitados de “*carryover*” devido ao uso de unidades extratoras descartáveis (CALIXTO; BONATO, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2008; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Além disso, a configuração da unidade extratora desenvolvida por Magalhães e Bonato (2008) permite a extração simultânea de diversas amostras.

De acordo com as informações acima apresentadas decidimos pelo desenvolvimento de um método combinando a HF-LPME e HPLC empregando coluna quiral baseada em derivado de polissacarídeo.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta etapa foi desenvolver método para estudar a biotransformação estereosseletiva do bufuralol empregando fungos endofíticos. Para alcançar este objetivo foram executadas as seguintes etapas:

- a) Avaliação de colunas quirais para análise estereosseletiva de bufuralol, 1'-hidroxibufuralol e 1'-oxobufuralol por HPLC;
 - b) Desenvolvimento do procedimento de extração para a determinação dos estereoisômeros de bufuralol e seus metabólitos em meio de cultura, empregando HF-LPME no preparo das amostras.
 - c) Estudar a biotransformação estereosseletiva do bufuralol empregando fungos endofíticos.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Separação dos estereoisômeros do bufuralol e de seus principais metabólitos empregando fases estacionárias quirais

3.1.1. Materiais

3.1.1.1. Reagentes e solventes

Os solventes orgânicos usados na preparação das fases móveis durante a avaliação das colunas quirais foram grau cromatográfico. Metanol e isopropanol foram obtidos da Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA), o etanol e a acetonitrila foram obtidos da Tedia (Fairfield, OH, EUA) e o hexano (60% de n-hexano) foi adquirido da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, EUA). Os aditivos orgânicos (grau p.a.), dietilamina (DEA) e ácido acético foram obtidos da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

3.1.1.2. Soluções-padrão

O *rac*-bufuralol e seus metabólitos racêmicos, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol, usados na preparação das soluções-padrão, foram obtidos da Toronto Research Chemical Inc. (North York, Canadá). As soluções-padrão utilizadas na avaliação das colunas quirais e otimização da HF-LPME foram preparadas em metanol, na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de uma solução estoque preparada também em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} . As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da luz.

3.1.1.3. Colunas com fases estacionárias quirais

Foram avaliadas duas colunas quirais sendo uma com fase estacionária baseada em derivado de polissacarídeo (celulose) e outra com fase estacionária derivada de antibiótico macrocíclico (vancomicina). As colunas foram avaliadas em diferentes condições cromatográficas, tanto no modo de eluição polar orgânico como em fase normal, objetivando buscar uma condição capaz de separar os estereoisômeros do bufuralol e seus metabólitos.

- ✓ Coluna Chiralcel OD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrando partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- ✓ Coluna Chirobiotic V (150 x 4,6 mm, Advanced Separation Technologies (ASTEC), Whippany, NJ, EUA), constituída do antibiótico macrocíclico vancomicina ligado a partículas de sílica de 5 µm.

3.1.1.4. Equipamentos

3.1.1.4.1. Espectrofotômetro

Os espectros de absorção na região do ultravioleta das soluções de bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol, preparadas em metanol na concentração de 10 µg mL⁻¹, foram obtidos usando um espectrofotômetro UV-visível da marca NIR Hitachi, modelo U-3501 (Tokyo, Japão), utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

3.1.1.4.2. Sistema Cromatográfico

Conforme item 3.1.1.4.2. do capítulo 1.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Avaliação de colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais

A resolução dos estereoisômeros do bufuralol e seus metabólitos 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol foi avaliada à temperatura ambiente. Alíquotas de 25 µL das soluções-padrão de *rac*-bufuralol, *rac*-1'-oxobufuralol e *rac*-1'-hidroxibufuralol, na concentração de 25 µg mL⁻¹, foram evaporadas até completa secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de fase móvel, dos quais, 50 µL foram cromatografados.

A coluna Chiralcel OD-H foi empregada no modo fase normal, utilizando fases móveis constituídas por hexano e álcoois (metanol, etanol, isopropanol). A adição de base (dietilamina) também foi realizada visando reduzir a interação do analito com os grupos silanóis residuais da coluna cromatográfica, atenuando a cauda nos picos dos analitos.

A coluna Chirobiotic V foi empregada no modo polar orgânico utilizando fases móveis variadas constituídas de metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila, de maneira isolada ou suas misturas. A adição de aditivos básicos e ácidos (triethylamina e ácido acético) foi também avaliada de maneira isolada, ou suas misturas em diferentes proporções.

O parâmetro avaliado para a determinação das melhores condições de separação foi a resolução (R_s). A vazão empregada era ajustada conforme a viscosidade da fase móvel, a fim de se evitar que a pressão gerada ultrapassasse os limites das respectivas colunas e, ao mesmo tempo, que a análise se tornasse muito longa.

3.2. Otimização do procedimento de microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME)

3.2.1. Materiais

3.2.1.1. Reagentes e solventes

Na otimização dos parâmetros da HF-LPME foram empregados os seguintes reagentes grau p.a.: tetraborato de sódio e fosfato de sódio tribásico da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), ácido bórico da Merck (Darmstadt, Alemanha), hidróxido de sódio da Spectrum (New Brunswick, NJ, EUA), ácido perclórico da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil), ácido acético glacial da Cinética (Jandira, SP, Brasil), ácido clorídrico e ácido trifluoracético da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA). Os solventes utilizados na extração foram éter hexílico da Alfa AESAR (Ward Hill, MA EUA), n-octanol da Sigma (St. Louis, MO, EUA) e acetato de dodecila da Aldrich (Steinheim, Alemanha).

3.2.1.2. Equipamentos

Na realização dos experimentos de extração foi empregado um agitador Vibrax VXR basic da IKA (Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha). Foi utilizado também um agitador Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil) na homogeneização das amostras. A purificação da água foi obtida pelo uso do sistema de purificação de água Milli-Q plus da Millipore (Bedford, OH, EUA). O peagâmetro usado nas medidas de pH das soluções aquosas foi o Thermo Orion 420 A+ (Waltham, MA, EUA). A pesagem dos reagentes foi realizada em balança Ohaus, modelo adventurer (Pine Brook, NJ, EUA). Membrana capilar de polipropileno Accurel PP Q 3/2 (diâmetro interno de 600 μm , parede com espessura de 200 μm , poros de 0,2 μm , Membrana, Wuppertal, Alemanha) foi utilizada para as microextrações.

3.2.1.3. Soluções-padrão

A preparação das soluções-padrão empregadas na otimização da extração por HF-LPME estão descritas no item 3.1.1.2. deste capítulo.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Procedimento de extração por HF-LPME

Foram pipetados 25 μL das soluções-padrão de bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para tubos de vidro; o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Na sequência, foram adicionados 250 μL de meio de cultura Czapek, seguido de agitação em vórtex por 20 s. Posteriormente, foram adicionados até o volume final de 4 mL, soluções tampão ou solução de hidróxido de sódio e água ultrapura, a fim de se obter o pH desejado. Paralelamente, as membranas de polipropileno (15 cm) foram fixadas nas extremidades de ponteiros plásticos (**Figura C3-2**) e imersas em um solvente orgânico por 10 segundos; o excesso do solvente foi removido mergulhando a membrana em água ultrapura sob agitação em banho ultrassônico pelos mesmos 10 segundos. Em seguida, utilizando uma microseringa, 50 μL da fase aceptora selecionada foram

introduzidos no lúmen da membrana, que foi então imersa na amostra. A extração foi conduzida sob agitação e ao final, o microextrato foi recolhido da membrana com auxílio de uma microseringa e transferido para um tubo cônico de vidro. O extrato foi evaporado sob fluxo de ar comprimido até secar e o resíduo foi dissolvido em 100 μL de fase móvel e 50 μL foram injetados no sistema cromatográfico.

Na otimização da HF-LPME foram avaliados os seguintes parâmetros: tipo de solvente orgânico (n-octanol, éter hexílico e acetato de dodecila), tempo de extração (15, 30, 45 e 60 min), velocidade de agitação (1000, 1500 e 1750 rpm), pH da fase doadora (10, 12 e 13), tipo e concentração da fase aceptora (ácido acético nas concentrações de 0,05 – 0,2 mol L^{-1} , ácido clorídrico, ácido trifluoracético e ácido perclórico na concentração de 0,1 mol L^{-1}). Os experimentos realizados nesta etapa foram feitos em triplicata.

Figura C3-2. Fotografia da unidade extratora empregada nas extrações por HF-LPME, desenvolvida por Magalhães e Bonato (2008). Na imagem podem-se observar as partes que compõem a unidade extratora: membrana cilíndrica oca, ponteiros para eletroforese em gel e tampa de frasco de injeção, “vial”.

3.3. Procedimento de biotransformação do bufuralol empregando fungos endofíticos

Na avaliação da biotransformação do bufuralol foram empregadas cinco espécies de fungos, as quais são apresentadas na tabela **C3-1**.

Tabela C3-1. Fungos endofíticos selecionados para o estudo da biotransformação do bufuralol.

Espécie de fungo	Espécie vegetal	Código do fungo
<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	VR4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Viguiera robusta</i>	VR12
<i>Papulaspora immersa</i> Hotson	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	SS13
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E. W. Mason	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	SS67
<i>Phoma</i> sp.	<i>Tinospora cordifolia</i>	ET

O procedimento de biotransformação do bufuralol foi conduzido conforme descrito no item **3.4 do capítulo 1**, alterando-se de cinco para 7 dias o tempo de incubação da biotransformação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Separação dos estereoisômeros do bufuralol e de seus principais metabólitos empregando fases estacionárias quirais

4.1.1. Determinação dos comprimentos de onda (λ) de máxima absorção no ultravioleta

Os espectros de absorção do bufuralol e 1'-hidroxibufuralol (em metanol) apresentam duas principais bandas de absorção com picos máximos em 205 e 248 nm enquanto o 1'-oxobufuralol (em metanol) apresenta suas bandas de absorção em 230 e 273 nm (dados não apresentados). O comprimento de onda empregado na detecção durante a etapa de avaliação das colunas quirais cromatográficas foi 240 nm. Apesar de não ser a banda de maior intensidade, foi adequado para a detecção de todos os analitos nesta etapa e minimizou a influência da absorção de fundo dos modificadores e aditivos orgânicos presentes nas fases móveis avaliadas. Durante a etapa de avaliação da biotransformação empregou-se os comprimentos de onda de máxima absorção no UV dos analitos, ou seja, 248 nm para o bufuralol e 1'-hidroxibufuralol e 273 nm para o 1'-oxobufuralol.

4.1.2. Otimização da separação quiral cromatográfica

O bufuralol e seus metabólitos 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol são substâncias de polaridade média; seus logs de P são respectivamente, 3,37; 1,83 e 1,55 (valores obtidos do programa de computador *Scifinder scholar* da ACD/Labs, Toronto, ON, Canadá, versão 2007). Essas características permitem o emprego do modo normal e polar orgânico de eluição.

O bufuralol (pKa 8,97), 1'-oxobufuralol (pKa 8,87) e 1'-hidroxibufuralol (8,92) são substâncias de caráter básico (valores obtidos do programa de computador *Scifinder scholar* da ACD/Labs, Toronto, ON, Canadá, versão 2007), dessa forma, os experimentos conduzidos no modo polar orgânico e fase normal foram realizados na presença de aditivos alcalinos.

4.1.2.1. Coluna Chirobiotic V

A coluna Chirobiotic V foi empregada por Hefnawy, Sultan e Al-Sheri (2007) na determinação enantiosseletiva do bufuralol empregando modo de eluição polar orgânico. Ciente dessa informação, a coluna foi avaliada buscando a enantiosseparação simultânea do bufuralol e seus metabólitos 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol.

A coluna Chirobiotic V apresentou enantiosseletividade para o bufuralol e 1'-oxobufuralol. Porém a coluna não foi capaz de separar os quatro estereoisômeros do 1'-hidroxibufuralol e, além disso, este analito coeluiu com os enantiômeros do bufuralol. A melhor separação obtida com essa coluna (**Figura C3-3**) ocorreu nas seguintes condições cromatográficas: Fase móvel: metanol:triethylamina:ácido acético (100: 0,1: 0,1, v/v/v), vazão de 0,5 mL min⁻¹ e detecção em 240 nm.

Figura C3-3. Melhor separação dos estereoisômeros do bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol na coluna Chirobiotic V. Picos **1** e **2**: enantiômeros do bufuralol; picos **3** e **4**: 1'-hidroxibufuralol; picos **5** e **6**: enantiômeros do 1'-oxobufuralol. Fase móvel constituída por metanol: trietilamina: ácido acético (100: 0,1: 0,1, v/v/v), vazão de 0,5 mL min⁻¹ e detecção em 240 nm.

4.1.2.2. Coluna Chiralcel OD-H

Narimatsu et al. (2002) desenvolveram um método estereosseletivo para a determinação simultânea de bufuralol e um de seus metabólitos 1'-hidroxibufuralol empregando a coluna Chiralcel OD (partículas de 10 µm) e fase móvel composta por hexano : etanol : dietilamina (95:5:0,1; v/v/v). Esta condição foi avaliada e não foi observada a separação dos enantiômeros do 1'-oxobufuralol.

Usando este mesmo seletor quiral, porém com tamanho de partículas de 5 µm, e fase móvel constituída por hexano:isopropanol:metanol (97,5:2,0:0,5; v/v/v) acrescidos de 0,5% de dietilamina, vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 240 nm, foi possível obter a separação simultânea desses analitos, inclusive do 1'-oxobufuralol. A condição de separação otimizada dos estereoisômeros do bufuralol e seus metabólitos empregando a coluna Chiralcel OD-H pode ser observada na **Figura C3-4**.

Figura C3-4. Melhor separação dos estereoisômeros do bufuralol e seus metabólitos na coluna Chiralcel OD-H. As condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel composta por hexano:isopropanol:metanol (97,5:2,0:0,5; v/v/v) + 0,5% de DEA, vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 240 nm. (1) (*R*)-bufuralol, (2) (*S*)-bufuralol, (3) (*R*)-1'-oxobufuralol, (4) (*S*)-1'-oxobufuralol, (5) (*R,R*) 1'-hidroxibufuralol, (6) (*S,R*) 1'-hidroxibufuralol, (7) (*R,S*) 1'-hidroxibufuralol e (8) (*S,S*) 1'-hidroxibufuralol.

A **Tabela C3-2** apresenta algumas características de desempenho do método otimizado.

Tabela C3-2. Parâmetros de desempenho do método cromatográfico nas condições otimizadas.

Picos	Tempo de retenção (min)	Resolução	Fator de retenção (k)	Número de pratos (N)
(R)-Bufuralol	2,7	-----	1,30	2381
(S)-Bufuralol	4,0	4,64	2,35	2596
(R)-1'-Oxobufuralol	4,7	1,88	2,91	2267
(S)-1'-Oxobufuralol	5,2	1,10	3,30	2152
(R,R)-1'-Hidroxibufuralol	8,0	4,82	5,66	1917
(S,R)-1'-Hidroxibufuralol	9,3	1,71	6,76	2077
(R,S)-1'-Hidroxibufuralol	11,3	2,25	8,45	2115
(S,S)-1'-Hidroxibufuralol	15,6	3,75	12,04	2297

A resolução, número de pratos e fator de retenção foram calculados com auxílio do *software* Lcsolution® versão 1.22 SP1. Para o cálculo da Rs o *software* emprega a seguinte equação: $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / w_{b2} + w_{b1}$, onde t_{R2} é o tempo de retenção do pico mais retido e t_{R1} do pico menos retido. w_{b2} e w_{b1} são as respectivas larguras das bases dos picos na linha da base, calculadas pelo método da tangente. No cálculo do N o *software* emprega a seguinte equação: $N = 16(t_R / w_b)^2$, onde t_R é o tempo de retenção do pico e w_b é a largura do pico na linha da base. O cálculo do fator de retenção é realizado pelo *software* empregando a seguinte equação: $k = (t_R - t_M) / t_M$, onde t_R é o tempo de retenção do analito e t_M é o tempo necessário para as moléculas da fase móvel percorrerem a coluna ou tempo de “volume morto” (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A ordem de eluição foi estabelecida pela análise dos estereoisômeros puros do bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol obtidos através da análise semipreparativa de seus racematos na coluna Chiralcel OD-H nas condições descritas no item “4.1.2.2. Coluna Chiralcel OD-H” deste capítulo. Posteriormente, os estereoisômeros coletados do bufuralol e 1'-hidroxibufuralol foram analisados isoladamente em uma coluna Chiralcel OD (25 x 4,6 mm, 10 µm) usando hexano:etanol:dietilamina (95:5:0,1; v/v/v) como fase móvel, de acordo com método descrito por Narimatsu et al. (2002). Então, os tempos de retenção dos estereoisômeros do bufuralol e 1'-hidroxibufuralol foram comparados e a ordem de eluição determinada. A ordem de eluição para os enantiômeros do 1'-oxobufuralol foi determinada pela obtenção de espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros puros do bufuralol e 1'-oxobufuralol na faixa de 190 a 400 nm usando um espectropolarímetro modelo J-810, equipado com aparelho de controle interno de temperatura modelo PTC-423S, ambos da marca Jasco (Easton, PA, EUA), usando uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e temperatura de 25°C. Em todas as análises foi realizada a subtração do ruído da linha de base (solvente onde estão diluídos os enantiômeros). As condições de varredura empregadas foram as

seguintes: modo contínuo na taxa de 200 nm min^{-1} , largura da banda espectral de 1 nm e resposta de 0,5 s. O enantiômero do 1'-oxobufuralol que apresentou o mesmo efeito "cotton" do (*R*)-bufuralol foi considerado (*R*) e o que apresentou o mesmo efeito "cotton" do (*S*)-bufuralol foi considerado (*S*).

O uso de diferentes fases móveis com um mesmo seletor quiral derivado de polissacarídeo pode resultar em inversão da ordem de eluição (OKAMOTO, 2002; MA et al., 2009), porém isso não foi observado neste estudo. A ordem de eluição dos enantiômeros do bufuralol e estereoisômeros do 1'-hidroxibufuralol no método apresentado neste capítulo foi a mesma observada no método descrito por Narimatsu et al. (2002). O pico 1 (**Figura C3-4**) corresponde a (*R*)-bufuralol, pico 2 a (*S*)-bufuralol, pico 5 a (*R,R*)-1'-hidroxibufuralol, pico 6 a (*S,R*)-1'-hidroxibufuralol, pico 7 a (*R,S*)-1'-hidroxibufuralol e pico 8 a (*S,S*)-1'-hidroxibufuralol.

A ordem de eluição dos enantiômeros do 1'-oxobufuralol não está descrita na literatura. Devido a isso, a combinação de métodos cromatográficos e dicroísmo circular pode ser usada para a determinação da configuração absoluta de análogos estruturais (LÄMMERHOFER et al., 2010), que é o caso do 1'-oxobufuralol em relação ao bufuralol. Dessa forma, foi realizada a comparação dos espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros do bufuralol e 1'-oxobufuralol e foi observado que o primeiro enantiômero eluído do 1'-oxobufuralol (**Figura C3-4**) apresentou efeito "cotton" semelhante ao (*R*)-bufuralol e foi considerado (*R*)-1'-oxobufuralol (pico 3) e o segundo enantiômero eluído apresentou efeito "cotton" semelhante ao (*S*)-bufuralol e foi considerado (*S*)-1'-oxobufuralol (pico 4).

4.2. Otimização da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas

4.2.1. Membrana cilíndrica oca

As membranas disponíveis em nosso laboratório estão entre as mais empregadas. Suas dimensões são: 600 μm de diâmetro interno, parede com 200 μm de espessura, o que fornece estabilidade mecânica durante a extração e poros com tamanho de 0,2 μm que permitem a microfiltração de macromoléculas (proteínas). Além disso, seu material de constituição, polipropileno, apresenta hidrofobicidade e

compatibilidade com os solventes orgânicos empregados (DE OLIVEIRA et al., 2008). O comprimento da membrana utilizada (15 cm) foi definido devido a sua facilidade de manuseio e adequação ao frasco e configuração da unidade extratora.

4.2.2. Seleção do solvente

Um importante parâmetro a ser avaliado durante o desenvolvimento de um método de extração por HF-LPME, tanto no modo de duas fases como no modo em três fases, é a seleção de um solvente orgânico adequado (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Um solvente orgânico adequado deve ser insolúvel em água, ter elevada afinidade pelo material da membrana e ter seletividade pelos analitos (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

O bufuralol e seus metabólitos 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol são substâncias de caráter básico e apresentam polaridade intermediária, já que seus logP são respectivamente, 3,37, 1,83 e 1,55. Essas características físico-químicas recomendam o uso da HF-LPME no modo de três fases.

Na avaliação do solvente extrator foram selecionados solventes de três funções químicas diferentes: n-octanol, éter hexílico e acetato de dodecila.

Conforme mostra a **Figura C3-5**, os solventes, éter hexílico e acetato de dodecila apresentaram os melhores resultados de recuperação para os enantiômeros do bufuralol. Para os enantiômeros do 1'-oxobufuralol, os resultados de recuperação foram semelhantes, porém uma maior variabilidade foi observada com o solvente acetato de dodecila. Por sua vez, o metabólito 1'-hidroxibufuralol apresentou os melhores resultados de recuperação com o solvente n-octanol. Devido ao n-octanol apresentar os melhores resultados de recuperação para os dois metabólitos foi o solvente selecionado para os estudos posteriores.

Figura C3-5. Seleção do solvente orgânico. Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 1750 rpm, HCl 0,1 mol L⁻¹ como fase aceptora, tampão borato 0,1 mol L⁻¹, pH 10 como fase doadora. Concentração de cada estereoisômero: 1 µg mL⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3. Seleção da fase aceptora

O emprego da HF-LPME em três fases na extração de analitos de caráter básico requer que o pH da fase aceptora esteja na faixa ácida, diferentemente da fase doadora que deve estar na faixa básica. Essa configuração permite a eficaz protonação dos analitos evitando o seu retorno para a fase orgânica, favorecendo a partição na fase aceptora aquosa. Neste modo em três fases, empregado na extração de analitos básicos, diversas soluções ácidas vem sendo usadas como fases aceptoras: ácido clorídrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido trifluoracético (DE OLIVEIRA et al., 2008). Neste trabalho, os ácidos avaliados como soluções aceptoras foram: ácido perclórico, ácido trifluoracético, ácido acético e ácido clorídrico na concentração de 0,1 mol L⁻¹. A **Figura C3-6** mostra que a fase aceptora que apresentou melhor recuperação para todos os analitos foi o ácido acético 0,1 mol L⁻¹ e foi a fase aceptora selecionada para os estudos seguintes. Soluções de ácidos fortes como clorídrico e sulfúrico, por fornecerem pHs mais baixos, em geral, conferem melhores resultados de recuperação, quando comparadas a soluções de ácidos fracos, como fórmico ou

acético (PEDERSEN-BJERGAARD; HO; RASMUSSEN, 2002). Neste trabalho e em outros descritos na literatura (SANTANA; BONATO, 2008; FONSECA; BONATO, 2010) foi observado resultado oposto.

Figura C3-6. Seleção da fase aceptora. Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 1750 rpm, n-octanol como solvente orgânico, tampão borato 0,1 mol L⁻¹, pH 10 como fase doadora. Concentração de cada estereoisômero 1 µg mL⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4. Seleção da concentração do ácido acético

A concentração da fase aceptora (solução de ácido acético) foi avaliada na faixa de 0,05 – 0,2 mol L⁻¹. A concentração de 0,2 mol L⁻¹ forneceu as melhores recuperações dos analitos, conforme pode ser observado na **Figura C3-7** e foi adotada para os próximos experimentos.

Figura C3-7. Seleção da concentração do ácido acético (fase aceptora). Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 1750 rpm, n-octanol como solvente orgânico, tampão borato 0,1 mol L⁻¹, pH 10 como fase doadora. Concentração de cada estereoisômero 1 µg mL⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.5. Seleção do pH da fase doadora

O controle do pH da amostra é fundamental para a eficiente extração tanto de compostos ácidos como básicos (DE OLIVEIRA et al., 2008). O pH da amostra deve ser ajustado a valores onde os analitos estejam não-ionizados, reduzindo sua solubilidade na fase aquosa e melhorando sua solubilidade no solvente orgânico. Assim, estes analitos são extraídos da fase doadora através do solvente orgânico presente nos poros da membrana cilíndrica oca. Na sequência passam ao lúmen da membrana e em seguida para a fase aceptora com pH oposto ao da fase doadora, que ioniza os analitos e não permite seu retorno para o solvente orgânico (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

O bufuralol (pKa 8,97), 1'-oxobufuralol (pKa 8,87) e 1'-hidroxibufuralol (8,92) são compostos de caráter básico, portanto o pH da fase doadora deve estar na faixa alcalina. Com isso, a influência do pH da fase doadora foi avaliada no intervalo de 10 a 13, conforme mostra a **Figura C3-8**.

Figura C3-8. Seleção do pH da fase doadora. Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, velocidade de agitação de 1750 rpm, n-octanol como solvente orgânico, ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como fase aceptora; fase doadora em pH 10 (tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 12 (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e pH 13 (250 μL de NaOH 2 mol L^{-1}). Concentração de cada estereoisômero $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata.

Pode-se observar aumento gradual na extração para os enantiômeros do bufuralol até pH 13, o que é observado em menor proporção para os metabólitos. Esse pH foi selecionado para a fase doadora.

4.2.6. Seleção da velocidade de agitação

A agitação das amostras é normalmente aplicada visando acelerar a cinética da extração. O aumento da velocidade de agitação aumenta a taxa de difusão dos analitos da fase doadora para a fase aceptora através do solvente orgânico, reduzindo-se o tempo para atingir o equilíbrio (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). No experimento realizado (**Figura C3-9**), verifica-se aumento da recuperação dos metabólitos em 1750 rpm e uma pequena redução na recuperação dos enantiômeros do bufuralol e também, na variabilidade da extração, sendo esta a velocidade de agitação fixada para os próximos experimentos.

Figura C3-9. Seleção da velocidade de agitação. Condições de extração: tempo de extração de 30 minutos, n-octanol como solvente orgânico, ácido acético 0,2 mol L⁻¹ como fase aceptora, fase doadora em pH 13 (250 µL de NaOH 2 mol L⁻¹). Concentração de cada estereoisômero 1 µg mL⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.7. Seleção do tempo de extração

A eficiência da extração na HF-LPME depende da transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica e desta para a fase aceptora (para o sistema de três fases). É um processo de equilíbrio e, portanto, a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma situação de platô (DE OLIVEIRA et al., 2008). O tempo de extração foi avaliado no período de 15 a 60 min, no qual o equilíbrio foi alcançado em 30 min sendo o tempo selecionado para os experimentos subsequentes (**Figura C3-10**). A queda na recuperação em tempos superiores pode estar relacionada à perda do solvente orgânico da fibra, quando associam-se altas velocidades de agitação e elevados tempos de extração.

Figura C3-10. Seleção do tempo de extração. Condições de extração: velocidade de agitação de 1750 rpm, n-octanol como solvente orgânico, ácido acético 0,2 mol L⁻¹ como fase aceptora, fase doadora em pH 13 (250 µL de NaOH 2 mol L⁻¹). Concentração de cada estereoisômero 1 µg mL⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.8. Parâmetros da HF-LPME otimizados

Os parâmetros da HF-LPME selecionados forneceram recuperações de aproximadamente 50, 64 e 69% para os estereoisômeros do bufuralol, 1'-hidroxibufuralol e 1'-oxobufuralol, respectivamente. Os parâmetros selecionados que forneceram estes resultados são apresentados na **Tabela C3-3**.

Tabela C3-3. Condições otimizadas para o procedimento de preparação das amostras por HF-LPME.

Parâmetro avaliado	Condição otimizada
Solvente orgânico	n-octanol
Fase doadora	pH 13 (250 µL NaOH 2 mol L ⁻¹)
Fase aceptora	ácido acético 0,2 mol L ⁻¹
Tempo de extração	30 min
Velocidade de agitação	1750 rpm

4.3. Biotransformação do bufuralol empregando fungos endofíticos

Antes da validação do método, foi realizada uma triagem empregando cinco diferentes espécies de fungos endofíticos para verificar se o bufuralol poderia ser biotransformado por fungos: *Penicillium crustosum* (VR4), *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Papulaspora immersa* Hotson (SS13), *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67) e *Phoma* sp. (ET).

As reações de biotransformação dos cinco fungos estudados foram acompanhadas durante sete dias (168 h). Diariamente, alíquotas foram coletadas, extraídas e analisadas pelo método otimizado combinando a HF-LPME e HPLC-UV.

Entre os cinco fungos endofíticos estudados, nenhum deles biotransformou o bufuralol nos metabólitos monitorados, 1'-hidroxibufuralol e 1'-oxobufuralol. Além disso, nenhum pico adicional foi observado durante as análises realizadas. Os cromatogramas referentes ao terceiro dia de biotransformação são apresentados na figura **Figura C3-11**.

Figura C3-11. (A) Cromatogramas representativos das amostras incubadas com os fungos endofíticos ET, SS13, SS67, VR4 e VR12 e bufuralol após 72 h de incubação. (B) Cromatogramas representativos das amostras de meio de cultura Czapek incubada com os fungos endofíticos ET, SS13, SS67, VR4 e VR12 após 72 h de incubação. As condições cromatográficas foram: coluna Chiralcel OD-H, fase móvel constituída por hexano:isopropanol:metanol (97,5:2,0:0,5; v/v/v) + 0,5% de dietilamina, vazão de 1,5 mL min⁻¹, detecção em 248 e 273 nm. (1) *R*-Bufuralol e (2) *S*-Bufuralol.

5. COMENTÁRIOS FINAIS

Neste terceiro capítulo foram apresentados os resultados referentes a avaliação das colunas Chirobiotic V no modo polar orgânico e Chiralcel OD-H no modo fase normal visando obter a separação dos estereoisômeros do bufuralol e seus metabólitos. A coluna Chiralcel OD-H forneceu resolução suficiente para a análise estereosseletiva de bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol empregando como fase móvel a mistura composta por hexano:isopropanol:metanol:dietilamina (97,5:2,0:0,5:0,5; v/v/v/v), em 18 min de análise.

A seletividade da coluna Chiralcel OD para a separação enantiosseletiva do bufuralol e do 1'-hidroxibufuralol foi inicialmente descrita por Narimatsu et al. (2002) no modo de eluição fase normal com tempo total de análise de 30 min. Porém, o método aqui apresentado é capaz de determinar adicionalmente os enantiômeros de outro metabólito o 1'-oxobufuralol e ainda com tempo de análise inferior.

Após a definição das condições empregadas na separação cromatográfica, o procedimento de preparação das amostras empregando HF-LPME em três fases foi otimizado, apresentando recuperações de 50, 64 e 69% para o bufuralol, 1'-hidroxibufuralol e 1'-oxobufuralol, respectivamente. Esses valores são considerados satisfatórios para técnicas miniaturizadas de preparação de amostra.

Os fungos estudados não apresentaram habilidade para biotransformar o bufuralol em seus principais metabólitos, 1'-hidroxibufuralol e 1'-oxobufuralol nas condições de biotransformação empregadas. Dessa forma, o método de preparação de amostra por HF-LPME em combinação com o cromatográfico empregando a coluna Chiralcel OD-H não foi validado para aplicação em estudos de biotransformação com fungos. O método foi otimizado, validado e aplicado em um estudo de biotransformação empregando microssomas hepáticos de ratos (dados não apresentados).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALIXTO, L.A.; BONATO, P.S. Simultaneous determination of rosiglitazone and its metabolites in rat liver microsomal fraction using hollow-fiber liquid-phase microextraction for sample preparation. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 33, p. 2872–2880, 2010.

DE OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; DE SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 627-644, 2008.

FONSECA, P.; BONATO, P.S. Chiral HPLC analysis of venlafaxine metabolites in rat liver microsomal preparations after LPME extraction and application to an in vitro biotransformation study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 396, p. 817-824, 2010.

FRANCIS, R.J.; EAST, P.B.; LARMAN, J. Kinetics and Metabolism of (+)-, (-)- and (±)-bufuralol. **European Journal of Clinical Pharmacology**, New York, v. 23, p. 529-533, 1982.

HEFNAWY, M.M.; SULTAN, M.A.; AL-SHERI, M.M. HPLC separation technique for analysis of bufuralol enantiomers in plasma and pharmaceutical formulations using a vancomycin chiral stationary phase and UV detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 856, p. 328-336, 2007.

IKEGAWA, S.; MATSUURA, K.; SATO, T.; ISRIYANTHI, N.M.R.; NIWA, T.; MIYAIRI, S.; TAKASHINA, H.; KAWASHIMA, Y.; GOTO, J. Enantioselective immunoaffinity extraction for simultaneous determination of optically active bufuralol and its metabolites in human plasma by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 17, p. 1-9, 1998.

LÄMMERHOFER, M.; PELL, R.; MAHUT, M.; RICHTER, M.; SCHIESEL, S.; ZETTL, H.; DITTRICH, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; LINDNER, W. Enantiomer separation and indirect chromatographic absolute configuration prediction of chiral pirinixic acid derivatives: Limitations of polysaccharide-type chiral stationary phases in comparison to chiral anion-exchangers. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 1033-1040, 2010.

MA, S.; SHEN, S.; LEE, H.; ERIKSSON, M.; ZENG, X.; XU, J.; FANDRICK, K.; YEE, N.; SENANAYAKE, C.; GRIMBERG, N. Mechanistic studies on the chiral recognition of polysaccharide-based chiral stationary phases using liquid chromatography and

vibrational circular dichroism. Reversal of elution order of N-substituted alpha-methyl phenylalanine esters. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, p. 3784-3793, 2009.

MACHIN, P.J.; HURST, D.N.; OSBOND, J.M. β -Adrenoceptor activity of the stereoisomers of bufuralol alcohol and ketone metabolites. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 28, p. 1648-1651, 1985.

MAGALHÃES, I.R.S.; BONATO, P.S. Enantioselective determination of chlroquine and its *n*-dealkylated metabolites in plasma using liquid-liquid-phase microextraction and LC-MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 31, p. 3106-3116, 2008.

NARIMATSU, S.; TAKEMI, C.; TSUZUKI, D.; KATAOKA, H.; YAMAMOTO, S.; SHIMADA, N.; SUZUKI, S.; SATOH, T.; MEYER, U.A.; GONZALEZ, F.J. Stereoselective metabolism of bufuralol racemate and enantiomers in human liver microsomes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 303, n. 1, p. 172-178, 2002.

NARIMATSU, S.; TAKEMI, C.; KURAMOTO, S.; TSUZUKI, D.; HICHIYA, H.; TAMAGAKE, K.; YAMAMOTO, S. Stereoselectivity in the oxidation of bufuralol, a chiral substrate, by human cytochrome P450s. **Chirality**, Hoboken, v. 15, p. 333-339, 2003.

OKAMOTO, M. Reversal of elution order during the chiral separation in high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 401-407, 2002.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; HO, T.S.; RASMUSSEN, K.E. Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs. **Journal of Separation Science**, Malden, v. 25, p. 141-146, 2002.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, n. 10, p. 565-574, 2003.

RASMUSSEN, K.E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, p. 1-10, 2004.

SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Enantioselective analysis of mirtazapine and its two major metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass

spectrometry after three-phase liquid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 606, p. 80-91, 2008.

SCIFINDER WEB. Disponível em: <http://scifinder.cas.org>. Acesso em: 24 out. 2011.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2 ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997. 765 p.

WEERAWARNA, S.A.; GEISSHUSLER, S.M.; MURTHY, S.S.; NELSON, W.L. Enantioselective and Diastereoselective Hydroxylation of Bufuralol. Absolute Configuration of the 7-(1-Hydroxyethyl)-2-[1-hydroxy-2-(*tert*-butylamino)ethyl]benzofurans, the benzylic hydroxylation metabolites. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 34, p. 3091–3097, 1991.

**CAPÍTULO 4: DETERMINAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DA
DONEPEZILA, 5-O-DESMETIL DONEPEZILA E 6-O-DESMETIL
DONEPEZILA POR HPLC EM MEIO DE CULTURA: APLICAÇÃO
EM ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO EMPREGANDO
FUNGOS**

1. REVISÃO DA LITERATURA

A doença de Alzheimer é uma doença progressiva e degenerativa do cérebro. É a causa mais comum de demência senil e responde por mais da metade dos casos de demência. Essa doença é caracterizada por déficits cognitivos múltiplos e acompanhada por vários distúrbios psiquiátricos e comportamentais (SHIGETA; HOMMA, 2001). Diversos sistemas de neurotransmissores são afetados pela doença, mas as mudanças mais pronunciadas são observadas no sistema colinérgico (JELIC; DARREH-SHORI, 2010). A degeneração de neurônios colinérgicos no córtex cerebral e outras regiões do cérebro trazem como resultado uma redução da transmissão colinérgica e nos níveis de acetilcolina que são consideradas as causas primárias da redução da cognição. Dessa maneira, estratégias vêm sendo desenvolvidas no sentido de aumentar os níveis de acetilcolina e a transmissão colinérgica (FARLOW, 2001) através do uso de medicamentos.

Um dos fármacos empregados no tratamento da doença de Alzheimer é a donepezila (DPZ), “1H-Inden-1-ona, 2,3-dihidro-5,6-dimetoxi-2-[[1-(fenilmetil)-4-piperidinil] metil]-” (SCIFINDER WEB) (**Figura C4-1a**). A DPZ é um fármaco inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), pertencente ao grupo dos inibidores não covalentes, os quais inibem a enzima reversivelmente (RADWAN et al., 2006; TAYLOR, 2006). A DPZ é um inibidor seletivo da AChE no sistema nervoso central, apresentando poucos efeitos na AChE dos tecidos periféricos (STANDAERT; YOUNG, 2006; WILKINSON, 2007).

A DPZ é comercializada na forma de cloridrato, como mistura racêmica (RADWAN et al., 2006). Matsui et al. (1999a) afirmam que os enantiômeros, (*R*)- e (*S*)-DPZ, apresentam diferentes potências de inibição da AChE *in vivo* e *in vitro*, sem mencionar qual é o mais ativo.

Matsui et al. (1999b) avaliaram a biotransformação de DPZ em ratos após administração oral e observaram que o fármaco foi biotransformado em 14 metabólitos. Além disso, constataram que a biotransformação da DPZ envolve três principais tipos de reação: *O*-desmetilação, *N*-dealquilação do anel piperidínico e a *N*-oxidação deste mesmo anel. Observaram também que parece haver seletividade

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

para a reação de *O*-desmetilação com formação predominante do metabólito 6-*O*-desmetil donepezila (6-ODD) (**Figura C4-1b**).

Um estudo de biotransformação da DPZ em humanos sugere que esse fármaco sofre significativa biotransformação hepática de primeira passagem e é biotransformado pelas isoenzimas CYP 2D6 e CYP 3A4 do citocromo P450. Além disso, foi constatado que os principais metabólitos são resultado de reações de: *O*-desmetilação seguida por glicuronidação, *N*-dealquilação e *N*-oxidação do anel piperidínico (TISEO; PERDOMO; FRIEDHOFF, 1998). O principal metabólito da DPZ em humanos é o 6-ODD, seguido pelos metabólitos donepezila-cis-*N*-óxido, 5-*O*-desmetil donepezila (5-ODD) (**Figura C4-1c**) e a forma conjugada ao ácido glicurônico do metabólito 5-ODD. O 6-ODD é o único metabólito que apresenta atividade farmacológica semelhante à DPZ (DOOLEY; LAMB, 2000).

Figura C4-1 – Estruturas moleculares da donepezila (DPZ) (**a**), 6-*O*-desmetil-donepezila (6-ODD) (**b**) e 5-*O*-desmetil-donepezila (5-ODD) (**c**). *Centros quirais.

A determinação enantiosseletiva da DPZ em matrizes biológicas foi descrita em poucos trabalhos. Haginaka e Seyama (1992) desenvolveram um método cromatográfico enantiosseletivo para a determinação de DPZ em plasma de ratos empregando coluna quiral baseada na proteína ovomucóide e detecção por fluorescência. A técnica de precipitação de proteínas foi usada na preparação das

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

amostras. Matsui et al. (1995) desenvolveram um método cromatográfico empregando coluna quiral baseada na proteína avidina com injeção direta de plasma de cães através da técnica “*column-switching*”. A detecção foi conduzida por espectrometria de massas. Posteriormente, Matsui et al. (1999a) desenvolveram um método enantiosseletivo para a determinação de (*R*)- e (*S*)-DPZ em plasma humano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, utilizando LLE como procedimento de extração e coluna quiral baseada na proteína avidina. Por sua vez, Radwan et al. (2006) desenvolveram um método enantiosseletivo para a determinação de (*R*)- e (*S*)-DPZ em plasma de ratos e produtos farmacêuticos, por cromatografia líquida e detecção por absorção no ultravioleta. A coluna quiral usada foi baseada em um derivado de polissacarídeo (celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)). Lu et al. (2006) desenvolveram um método por eletroforese capilar para a determinação enantiosseletiva de DPZ em plasma de coelhos. As condições eletroforéticas empregadas foram: capilar de sílica fundida e tampão fosfato de trietilamônio (pH 2,5) com β -ciclodextrina sulfatada como seletor quiral. A LLE foi empregada na preparação das amostras.

Por outro lado, a análise enantiosseletiva simultânea da DPZ e de seus metabólitos em matrizes biológicas ainda não foi descrita na literatura. Além disso, as propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e/ou toxicológicas enantiosseletivas da DPZ e principalmente de seus metabólitos foram pouco estudadas. Para realização destes estudos são necessários miligramas dos metabólitos na forma enantiomericamente pura. Uma estratégia para obter metabólitos enantiomericamente puros é o uso de fungos em processos de biotransformação. Estudos de biotransformação com fungos também podem fornecer informações para futuras correlações com estudos de biotransformação enantiosseletivas *in vivo*. Essas considerações justificam o interesse no desenvolvimento de um método enantiosseletivo para a determinação simultânea de DPZ, 6-ODD e 5-ODD em meio de cultura para ser empregado em estudos de biotransformação da DPZ por fungos.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta etapa foi desenvolver métodos de análise para estudar a biotransformação enantiosseletiva da DPZ empregando fungos.

- a) Avaliação de colunas quirais para análise enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC;
 - b) Desenvolvimento do procedimento de extração para a determinação dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos em meio de cultura, empregando LLE no preparo das amostras.
 - c) Estudar a biotransformação estereosseletiva da DPZ empregando fungos.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Separação dos enantiômeros da DPZ, 6-ODD e 5-ODD empregando fases estacionárias quirais

3.1.1. Materiais

3.1.1.1. Reagentes e solventes

Os solventes orgânicos usados na preparação das fases móveis durante a avaliação das colunas quirais foram grau cromatográfico. Metanol e etanol foram obtidos da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), o isopropanol foi obtido da Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA) e o hexano (95% de *n*-hexano) foi adquirido da Tedia (Fairfield, OH, EUA). Os aditivos orgânicos (grau p.a.), dietilamina (DEA) e trietilamina (TEA) foram obtidos da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e o ácido trifluoracético (TFA) foi obtido da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA).

Os solventes empregados na otimização do procedimento de extração líquido-líquido foram grau cromatográfico. O hexano (95% de *n*-hexano), o acetato de etila e o éter metil *terc*-butilico foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA). O isopropanol foi obtido da Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA).

Os reagentes (grau p.a.) empregados no preparo das soluções tampão usadas no ajuste do pH da matriz a ser extraída foram: ácido bórico e fosfato de potássio monobásico adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha), tetraborato de sódio decaidratado obtido da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e fosfato de potássio dibásico anidro obtido da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil).

3.1.1.2. Soluções-padrão

A *rac*-donepezila e seus metabólitos racêmicos, 6-ODD e 5-ODD, usados na preparação das soluções-padrão, foram obtidos da Toronto Research Chemical Inc. (North York, Canadá). As soluções-padrão utilizadas na avaliação das colunas quirais foram preparadas em metanol, na concentração de 10 µg mL⁻¹, a partir de

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

uma solução estoque preparada também em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da luz.

3.1.1.3. Colunas com fases estacionárias quirais

Foram avaliadas três colunas quirais baseadas em derivados de polissacarídeos (celulose e amilose). As colunas foram avaliadas em diferentes condições cromatográficas no modo de eluição normal, na busca de uma condição capaz de separar os enantiômeros da DPZ e seus metabólitos.

- ✓ Coluna Chiralcel OD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- ✓ Coluna Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.
- ✓ Coluna Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

3.1.1.4. Equipamentos

3.1.1.4.1. Espectrofotômetro

Os espectros de absorção na região do ultravioleta das soluções de DPZ, 5-ODD e 6-ODD, preparadas em metanol na concentração de 10 µg mL⁻¹, foram obtidos usando um espectrofotômetro UV-visível da marca NIR Hitachi, modelo U-3501 (Tokyo, Japão), utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

3.1.1.4.2. Sistema Cromatográfico

Conforme item 3.1.1.4.2. do capítulo 1.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Avaliação das colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais

A resolução dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos foi avaliada à temperatura ambiente. Alíquotas de 25 μL das soluções-padrão de *rac*-donepezila, *rac*-6-*O*-desmetil donepezila e *rac*-5-*O*-desmetil donepezila, na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram evaporadas até completa secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 100 μL de fase móvel, dos quais, 50 μL foram cromatografados.

As colunas Chiralcel OD-H, Chiralpak AD e Chiralpak AD-H foram empregadas no modo fase normal, com fases móveis constituídas de hexano e álcoois (metanol, etanol, isopropanol) e adicionadas de uma base orgânica (dietilamina e/ou trietilamina). Os parâmetros avaliados para a determinação das condições de separação foram a resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s).

3.2. Otimização do procedimento de preparo das amostras

Para otimização deste procedimento, as análises foram realizadas fortificando-se 0,5 mL de meio de cultura Czapek branco com 25 μL das soluções-padrão de DPZ e seus metabólitos na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em paralelo, 0,5 mL de meio de cultura branco também foram processados sob as mesmas condições de análise, para verificar a presença de interferentes da matriz. Estes analitos são compostos de caráter básico, dessa maneira, a influência do pH na eficiência de extração foi avaliada na faixa de pH de 7 – 10, a fim de tentar manter os analitos em sua forma não dissociada. Na avaliação do solvente orgânico extrator, foram empregados volumes de 4 mL de hexano, acetato de etila, éter metil *terc*-butílico e misturas de hexano com isopropanol, sendo recuperados 3 mL após o término da extração. Além disso, foi também avaliada a influência do tempo de extração.

3.3. Avaliação da racemização dos enantiômeros da DPZ, 6-ODD e 5-ODD nas condições analíticas e de cultivo

Haginaka e Seyama (1992), Matsui et al. (1999a) e Matsui et al. (1995) afirmam que os enantiômeros da DPZ podem sofrer interconversão, em soluções aquosas e plasma, via um intermediário ceto-enólico. Com base nessas informações, foi avaliada a influência do pH da matriz (meio de cultura Czapek) na racemização dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos. Para avaliar a racemização da DPZ e seus metabólitos, inicialmente, foram obtidos seus enantiômeros isolados através da análise semipreparativa de seus racematos em coluna Chiralpak AD-H nas condições descritas no item 4.1.3. condições cromatográficas otimizadas, deste capítulo. No isolamento dos enantiômeros foram empregadas soluções estoque de *rac*-DPZ e seus metabólitos na concentração de 1 mg mL⁻¹. Essas soluções foram injetadas separadamente dez vezes cada uma. Os enantiômeros foram coletados na saída do detector e, após evaporação da fase móvel sobre fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 5 mL de metanol. Essas soluções foram então analisadas com o intuito de avaliar a pureza dos enantiômeros. A pureza enantiomérica foi avaliada pelo cálculo do excesso enantiomérico (*ee*), determinado através do uso da seguinte equação (ALTRIA, 1996):

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

Onde A é o enantiômero presente em maior concentração na mistura e B é o enantiômero presente em concentração mais baixa.

Os enantiômeros coletados foram empregados na avaliação da influência do pH da matriz durante o preparo de amostras e na avaliação da racemização nas condições de cultivo e análise.

Para avaliar a influência do pH da matriz durante o preparo de amostras, na racemização, alíquotas de 0,5 mL de meio de cultura Czapek branco foram fortificadas, independentemente, com 25 µL das soluções dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos, em triplicata. A racemização dos enantiômeros foi avaliada em

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹); 9,0 (tampão borato de sódio 0,1 mol L⁻¹) e 10,0 (tampão borato de sódio 0,1 mol L⁻¹).

Para a avaliação da racemização nas condições de cultivo, 1 mL das soluções dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos foram transferidos, isoladamente, para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapek e submetidos ao procedimento de biotransformação (item 3.5.2. Procedimento de biotransformação, deste capítulo). Diariamente, durante 7 dias, alíquotas foram coletadas. Ao final do estudo de biotransformação as alíquotas coletadas no sétimo dia foram extraídas e analisadas em triplicata, frente ao método de preparo de amostras e cromatográfico otimizados, e o excesso enantiomérico foi comparado ao valor obtido após a purificação dos enantiômeros.

3.4. Validação do método cromatográfico para a determinação enantiosseletiva de DPZ, 6-ODD e 5-ODD em meio de cultura

3.4.1. Soluções-padrão usadas na validação do método

As soluções-padrão de *rac*-donepezila foram preparadas na concentração de 4,12, 40, 120, 300 e 400 µg mL⁻¹, enquanto que as soluções de 6-ODD e 5-ODD foram preparadas nas concentrações de 4, 12, 30, 60, 150 e 200 µg mL⁻¹. Em ambos os casos as soluções foram preparadas em metanol a partir de soluções estoque preparadas também em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz.

3.4.2. Método de extração otimizado

Os analitos foram extraídos do meio de cultura Czapek por LLE. Alíquotas de 0,5 mL do meio de cultura Czapek fortificadas com 25 µL das soluções-padrão de DPZ, 6-ODD e 5-ODD ou amostras obtidas no procedimento de biotransformação foram transferidas para tubos de extração de vidro de 10 mL e tamponadas com 0,5 mL de tampão borato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 9. As amostras foram homogeneizadas em vortex durante 20 s. Posteriormente, 4 mL do solvente extrator, acetato de etila,

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

foram adicionados. As amostras foram agitadas usando um agitador Vibrax VXR basic da IKA (Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha) durante 15 min e então centrifugadas a 1800g por 5 min a 4 °C. As fases orgânicas (3 mL) foram transferidas para tubos cônicos de vidro de 10 mL. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de fase móvel, agitados em vortex durante 20 s e 50 µL foram analisados pelo sistema cromatográfico.

3.4.3. Parâmetros avaliados na validação do método

O método foi validado conforme recomendações de guias oficiais (FDA, 2001; ANVISA 2003) pela avaliação dos seguintes parâmetros: recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, seletividade e estabilidade.

O procedimento empregado na avaliação dos parâmetros de validação foi apresentado no item 3.3.3. do capítulo 1. As concentrações dos controles usados na validação do método para determinação enantiosseletiva da DPZ, 5-ODD e 6-ODD são mostradas na **Tabela C4-1**. Os parâmetros seletividade e estabilidade nas condições de biotransformação por apresentar diferenças quanto ao exposto no item 3.3.3. do capítulo 1, estão descritos na sequência deste item.

Tabela C4-1. Concentrações dos controles empregados na validação do método.

Parâmetro	Concentração dos enantiômeros ng mL ⁻¹								
	DPZ			5-ODD			6-ODD		
	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CM	CA
Recuperação	300	3000	7500	300	1500	3750	300	1500	3750
Precisão e exatidão	300	3000	7500	300	1500	3750	300	1500	3750
Estabilidade									
Ciclos Congelamento/	300	-----	7500	300	-----	3750	300	-----	3750
Bancada por 12 horas	300	-----	7500	300	-----	3750	300	-----	3750
Soluções-padrão	-----	3000	-----	-----	1500	-----	-----	1500	-----
Linearidade^a	100 – 10000			100 – 5000			100 – 5000		
LQ	100			100			100		

^aIntervalo de concentrações; CB, concentração baixa; CM, concentração média; CA, concentração alta.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

3.4.3.1. Seletividade

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

3.4.3.2. Estabilidade

3.4.3.2.1. Condições de biotransformação

Na determinação da estabilidade nas condições de biotransformação, uma alíquota de 2 mg de *rac*-donepezila foi dissolvida em 1 mL de água estéril e adicionada a Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura Czapek, resultando na concentração de 10000 ng mL⁻¹ de cada enantiômero. Estas amostras foram submetidas ao procedimento de biotransformação (item 3.5.2. Procedimento de biotransformação, deste capítulo). Diariamente, durante o período de biotransformação (7 dias), alíquotas de 3 mL foram coletadas. Ao final da biotransformação alíquotas do sétimo dia de biotransformação foram analisadas e comparadas a amostras recentemente preparadas na concentração de 10000 ng mL⁻¹. As amostras foram consideradas estáveis se o desvio (expresso como E%) em relação às amostras frescas foi inferior a 15%.

3.5. Procedimento de biotransformação da donepezila empregando fungos

Os reagentes, equipamentos, meios de cultura e procedimentos de isolamento e manutenção dos fungos endofíticos foram apresentados no capítulo 1, item 3.4. “Procedimento de biotransformação da midodrina empregando fungos endofíticos”.

3.5.1. Fungos empregados no estudo de biotransformação da DPZ

No estudo de biotransformação da DPZ foram empregados fungos endofíticos previamente isolados das plantas *Viguiera robusta*, *Smallanthus sonchifolius* (*Asteraceae*) e *Tinospora cordifolia* (*Menispermaceae*) (**Tabela C4-2**) e identificados através de técnicas de biologia molecular (GUIMARÃES et al., 2008; GALLO et al.,

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

2009). As fotografias dos fungos endofíticos estudados estão apresentadas na **Figura C1-2**, no capítulo 1. Além dos fungos endofíticos também foram estudados dois fungos adquiridos da ATCC (*American type culture collection*). Suas fotografias são apresentadas na **Figura C4-2**.

Tabela C4-2. Fungos selecionados para o estudo de biotransformação da DPZ.

Espécie de fungo	Espécie vegetal	Código do fungo
<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Viguiera robusta</i>	VR4
<i>Papulaspora immersa</i> Hotson	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	SS13
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E. W. Mason	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	SS67
<i>Phoma</i> sp.	<i>Tinospora cordifolia</i>	ET
<i>Beauveria bassiana</i>	-----	ATCC 7159
<i>Cunninghamella elegans</i>	-----	ATCC 10028B

Figura C4-2. Fotografias dos fungos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 em meio de crescimento BDA.

3.5.1.1. Manutenção dos fungos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e *Beauveria bassiana* ATCC 7159

Os fungos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 são mantidos em discos de meio BDA, com 0,5 cm de diâmetro, imersos em solução estéril de glicerol 80% e armazenados a temperatura de -20 °C. Estas culturas estão estocadas no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de

Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto sob supervisão da Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo.

3.5.2. Procedimento de biotransformação

Primeiramente foi realizada a transferência de três discos de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA contendo o micélio do fungo, com auxílio de alça de platina, para placas de Petri com 9,0 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio BDA (**Tabela C1-2**, capítulo 1). As placas inoculadas foram mantidas em estufa bacteriológica pelo período de 7 dias, a temperatura de 30 °C, possibilitando o crescimento dos micro-organismos.

O procedimento de biotransformação foi realizado em duas etapas (BORGES et al., 2007; BORGES et al., 2008; BORGES; PUPO; BONATO, 2009). No primeiro estágio, chamado de pré-cultivo, três discos de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA contendo o micélio do fungo foram removidos das placas de Petri com auxílio de um *Transfer tube* e assepticamente inoculados em tubos Falcon® de 50 mL contendo 10 mL de meio pré-fermentativo malte (**Tabela C1-3**, capítulo 1). Os tubos Falcon® foram incubados por 96 h a temperatura de 30 °C em incubadora com agitação orbital, tipo “shaker” a 120 rpm. No segundo estágio, biotransformação, a massa micelial resultante e 2 mg de rac-donepezila como base livre (dissolvida em 1 mL de água estéril) foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapek (**Tabela C1-4**, capítulo 1). A mistura foi incubada por 7 dias a 30 °C, com agitação de 120 rpm. Alíquotas de 3 mL foram assepticamente coletadas, a cada dia, incluindo o dia 0 (dia inicial da biotransformação) e 0,5 mL foram submetidos ao procedimento de extração e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Em paralelo foram realizados controles com meio de cultura Czapek estéril incubado com os fungos estudados.

Os resultados de formação dos enantiômeros dos metabólitos quando observada enantiosseletividade foram expressos como excesso enantiomérico (ee), determinado através do uso da equação apresentada no item 3.3. deste capítulo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Separação dos enantiômeros da DPZ, 5-DPZ e 6-DPZ empregando fases estacionárias quirais

4.1.1. Determinação dos comprimentos de onda (λ) de máxima absorção no ultravioleta

Os espectros de absorção da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em metanol apresentam três principais bandas de absorção no UV com picos máximos em 230, 270 e 315 nm (dados não apresentados). A banda de maior intensidade é a de 230 nm, mas optou-se por trabalhar em um comprimento de onda um pouco maior (270 nm) para evitar a interferência da absorção de fundo dos modificadores e aditivos orgânicos presentes nas fases móveis avaliadas.

4.1.2. Otimização da separação quiral cromatográfica

Em função da baixa polaridade da DPZ e seus metabólitos 5-ODD e 6-ODD (log *P* de 3,91, 3,89 e 3,70, respectivamente) e do caráter de base fraca desses compostos (pKa de 8,84, 8,85 e 8,82, respectivamente - valores obtidos em *Scifinder web*), as separações foram feitas no modo normal de eluição, na presença de aditivos básicos para evitar a interação desses compostos com os grupos silanóis residuais da sílica que é usada como suporte do seletor quiral das colunas quirais empregadas.

4.1.2.1. Coluna Chiralcel OD-H

As colunas baseadas em celulose tris-(3,5-dimetilfenil carbamato), amilose tris-(3,5-dimetilfenil carbamato) e celulose tris-(4-metil benzoato) apresentam propriedades enantiosseletivas complementares e numerosas publicações demonstram que são capazes de resolver mais de 80% dos fármacos quirais disponíveis no mercado (LIPKA-BELLOLI et al., 2001; MATTHIJS et al., 2004; RAO; RAJU; NAGARAJU, 2006; PATAJ et al., 2010). Estas fases estacionárias quirais são

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

comercializadas com os seguintes nomes: Chiralcel OD, Chiralpak AD e Chiralcel OJ, respectivamente.

Radwan et al. (2006) empregaram a coluna Chiralcel OD (partículas de 10 µm) e fase móvel composta pela mistura de hexano:isopropanol:TEA (87:12,9:0,1) para a determinação enantiosseletiva da DPZ. Com base nesta informação, uma coluna com fase estacionária baseada no mesmo derivado de celulose, porém incorporado em sílica de menor diâmetro (5 µm) foi avaliada visando a separação quiral simultânea da DPZ e de seus metabólitos. Esta coluna foi inicialmente avaliada na condição descrita acima, na qual foi possível observar apenas a separação dos enantiômeros da DPZ. Na análise dos metabólitos, observou-se reduzida enantiosseletividade acompanhada por picos largos e com cauda. Tang (1996) empregou, pela primeira vez, a mistura de um aditivo ácido (TFA) e um básico (TEA) a fases móveis no modo normal de eluição em colunas baseadas em derivados de celulose para a determinação de compostos com caráter básico. A partir deste primeiro relato, outros pesquisadores empregaram esta estratégia para melhorar a enantiosseletividade e eficiência e também, para a redução da cauda dos picos (SELLERS et al., 2006; YE; STRINGHAM, 2006; CACCAMESE; BIANCA; CARTER, 2007; GUO et al., 2010).

Tang (1996) afirma que a presença de aditivos ácidos na fase móvel pode resultar na formação de pares iônicos com analitos de caráter básico, o que pode levar a um aumento da enantiosseletividade. Descreve também que o mecanismo para isto não está completamente determinado. Provavelmente o par iônico move-se ao longo da coluna como uma única molécula (TFA + analito) e o grupo funcional polar trifluoracetato fornece um sítio extra de interação com a fase estacionária quiral. Além disso, o TFA pode mascarar os grupos silanóis através de ligações de hidrogênio reduzindo as interações não quirais entre a fase estacionária e os enantiômeros do analito.

Com base nestas informações, as fases móveis compostas por hexano e álcoois (isopropanol, etanol e metanol) isolados ou em misturas foram sempre acrescidas por um aditivo ácido (TFA) e um básico (TEA ou DEA). Com a adição simultânea de TFA e TEA a coluna Chiralcel OD-H passou a apresentar enantiosseletividade tanto para a DPZ como para seus metabólitos. Porém a coluna não apresentou seletividade aquiral suficiente que possibilitasse a separação entre

os diferentes analitos. A melhor separação obtida com essa coluna é mostrada na **Figura C4-3**.

Figura C4-3. Melhor separação dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD na coluna Chiralcel OD-H. Picos 1 e 2: enantiômeros da 5-ODD; picos 3 e 4: enantiômeros da DPZ; picos 5 e 6: enantiômeros da 6-ODD. Fase móvel constituída por hexano:isopropanol:metanol:TEA:TFA (70:20:10:0,05:0,05; v/v/v/v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm.

Esta condição, devido à coeluição aquiral dos analitos, não permitiu o emprego da detecção por absorção no ultravioleta. Devido à enantiosseletividade apresentada para este derivado de celulose, os experimentos posteriores foram realizados empregando este mesmo derivado, porém de amilose.

4.1.2.2. Coluna Chiralpak AD

A coluna Chiralpak AD foi avaliada no modo normal de eluição empregando hexano e álcoois (isopropanol, etanol e metanol) isoladamente ou suas misturas sempre acrescidas de um aditivo básico (DEA ou TEA). Esta coluna apresentou enantiosseletividade para a DPZ e seus metabólitos. Porém, entre as condições avaliadas, não foi possível separar o segundo enantiômero da 5-ODD e o primeiro

enantiômero da DPZ. A melhor separação obtida com essa coluna é mostrada na **Figura C4-4**.

Figura C4-4. Melhor separação dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos na coluna Chiralpak AD. As condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel composta por hexano:etanol:metanol:TEA (60:30:10:0,025; v/v/v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. Picos 1 e 4: enantiômeros da DPZ; Picos 2 e 5 enantiômeros da 5-ODD e picos 3 e 6: enantiômeros da 6-ODD.

4.1.2.3. Coluna Chiralpak AD-H

As colunas Chiralpak AD e Chiralpak AD-H apresentam o mesmo seletor quiral, mas incorporado em partículas de 10 µm e 5 µm, respectivamente. Como acima descrito, diversas fases móveis foram avaliadas com a coluna Chiralpak AD, porém com nenhuma delas foi observada eficiência suficiente para a resolução do segundo enantiômero da 5-ODD e o primeiro enantiômero da DPZ. O aumento da eficiência de colunas empacotadas pode ser obtido através do aumento de seu comprimento e/ou redução do tamanho das partículas (GUIOCHON, 2006). Entre as estratégias citadas a opção disponível no laboratório foi o uso de uma coluna com partícula de diâmetro menor (5 µm).

A coluna Chiralpak AD-H foi também empregada no modo normal de eluição, devido à enantiosseletividade observada para este seletor quiral, neste modo. Esta

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

coluna foi inicialmente avaliada usando a fase móvel que forneceu os melhores resultados com a coluna Chiralpak AD, com a qual foi possível observar um princípio de separação do segundo enantiômero da 5-ODD e o primeiro enantiômero da DPZ. Na sequência, foram empregadas fases móveis de menor força cromatográfica, reduzindo-se o percentual de etanol e metanol na fase móvel. A adição de DEA e TEA visando à redução da interação dos grupos silanóis da sílica com os analitos básicos foi também estudada obtendo-se melhores resultados com o uso da TEA. Além disso, a presença combinada de metanol e TEA na fase móvel foram importantes para obter resolução suficiente para esse par crítico de compostos. O percentual de TEA adicionado à fase móvel foi também alterado no intervalo de 0,1 a 0,5% e o percentual selecionado foi 0,3%, por fornecer maiores resoluções e menores fatores de assimetria.

A condição de separação otimizada dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos empregando a coluna Chiralpak AD-H é mostrada na **Figura C4-5**.

Figura C4-5. Melhor separação dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos na coluna Chiralpak AD-H. As condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel composta por hexano:etanol:metanol (75:20:5 v/v/v + 0,3% de TEA), vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. (1) (+)-(S)-DPZ, (2) (+)-(S)-5ODD, (3) (+)-(S)-6-ODD, (4) (-)-(R)-DPZ, (5) (-)-(R)-5-ODD, (6) (-)-(R)-6-ODD.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

4.1.3. Condições cromatográficas otimizadas

A condição cromatográfica que permitiu a melhor resolução com menor tempo de análise é apresentada na **Tabela C4-3**:

Tabela C4-3. Condições cromatográficas otimizadas.

Parâmetro	Condição otimizada
Coluna	Chiralpak AD-H
Fase móvel	hexano:etanol:metanol (75:20:5, v/v/v) + 0,3% de TEA
Vazão	1,5 mL min ⁻¹
Volume de injeção	50 µL
Temperatura de análise	Ambiente
Deteção	UV: 270 nm

Sob essas condições, foi obtida adequada resolução ($R_s > 1,5$) com tempo de análise de 19 min (**Figura C4-5**). A **Tabela C4-4** apresenta algumas características de desempenho do método otimizado.

Tabela C4-4. Parâmetros de desempenho do método cromatográfico nas condições otimizadas.

Analitos	Tempo de retenção (min)	Resolução	Fator de assimetria (As)	Número de pratos (N)
(+)-(S)-DPZ	5,4	-----	1,09	4132
(+)-(S)-5-ODD	6,4	2,21	1,44	1973
(+)-(S)-6-ODD	9,9	5,17	1,19	2439
(-)-(R)-DPZ	11,4	1,85	1,05	3659
(-)-(R)-5-ODD	15,1	3,60	1,11	2151
(-)-(R)-6-ODD	17,1	1,56	1,11	2836

A resolução, número de pratos e fator de assimetria foram calculados com auxílio do *software* LC solution[®] versão 1.22 SP1. Para o cálculo da R_s o *software* emprega a seguinte equação: $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_{b2} + w_{b1})$, onde t_{R2} é o tempo de retenção do pico mais retido e t_{R1} do pico menos retido. w_{b2} e w_{b1} são as respectivas larguras das bases dos picos na linha da base, calculadas pelo método da tangente. No cálculo do N o *software* emprega a seguinte equação: $N = 16(t_R / w_b)^2$, onde t_R é o tempo de retenção do pico e w_b é a largura do pico na linha da base. Para o cálculo do fator de assimetria o *software* emprega a seguinte equação: $As = b / a$, onde a é a largura da metade frontal do pico e b da metade distal do pico medidos a 10% de sua altura (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

A ordem de eluição foi estabelecida pela análise dos enantiômeros puros da DPZ obtidos através da análise semipreparativa do racemato na coluna Chiralcel AD-H nas condições descritas no item “4.1.3. Condições cromatográficas otimizadas” deste capítulo. Posteriormente, os enantiômeros coletados da DPZ foram analisados isoladamente em uma coluna Chiralcel OD (25 x 4,6 mm, 10 µm) usando hexano:isopropanol:triethylamina (87:12,9:0,1; v/v/v) como fase móvel, de acordo com o método descrito por Radwan et al. (2006). Na sequência, os tempos de retenção dos enantiômeros da DPZ foram comparados e a ordem de eluição determinada. A ordem de eluição dos enantiômeros da 5-ODD e 6-ODD foi determinada pela obtenção de espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros puros na faixa de 200 a 400 nm, usando um espectropolarímetro modelo J-810, equipado com aparelho de controle interno de temperatura modelo PTC-423S, ambos da marca Jasco (Easton, EUA), e cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e temperatura de 25°C. Em todas as análises foi realizada a subtração do ruído da linha de base (solvente onde estão diluídos os enantiômeros). As condições de varredura empregadas foram as seguintes: modo contínuo na taxa de 200 nm min⁻¹, largura da banda espectral de 0,1 nm e resposta de 0,5s. O enantiômero da 5-ODD e 6-ODD que apresentou o mesmo efeito “cotton” do (-)-(R)-DPZ foi considerado (-)-(R) e o que apresentou o mesmo efeito “cotton” da (+)-(S)-DPZ foi considerado (+)-(S).

A ordem de eluição dos enantiômeros da DPZ no método apresentado neste capítulo foi contrária a ordem observada no método descrito por Radwan et al. (2006). A inversão na ordem de eluição quando da substituição da coluna Chiralcel OD pela Chiralpak AD, ou vice-versa, já foi descrita em uma série de trabalhos (WANG; CHEN, 1999; WANG; CHEN; VAILAYA, 2000; KAZUSAKI; KAWABATA; MATSUKURA, 2000; GAGGERI et al., 2011). O pico 1 (**Figura C4-5**) corresponde a (+)-(S)-DPZ e o pico 4 a (-)-(R)-DPZ.

A ordem de eluição dos enantiômeros da 5-ODD e 6-ODD não está descrita na literatura. Uma estratégia para a determinação da configuração absoluta de análogos estruturais é a combinação de métodos cromatográficos e dicroísmo circular (LÄMMERHOFER et al., 2010). Dessa forma, foi realizada a comparação dos espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros da DPZ, da 5-ODD e da 6-ODD e foi observado que o primeiro enantiômero eluído da 5-ODD e da 6-ODD

(Figura C4-5) apresentaram efeito “cotton” semelhante a (+)-(*S*)-DPZ e foram considerados (+)-(*S*)-5-ODD (pico 2) e (+)-(*S*)-6-ODD (pico 3) e o segundo enantiômero eluído apresentou efeito “cotton” semelhante ao (-)-(*R*)-DPZ e foram considerados (-)-(*R*)-5-ODD (pico 5) e (-)-(*R*)-6-ODD (pico 6). Os espectros de dicroísmo circular empregados na determinação da ordem de eluição são apresentados na Figura C4-6.

Figura C4-6. Espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros da DPZ (A), 5-ODD (B) e 6-ODD (C).

4.2. Otimização dos parâmetros da extração líquido-líquido

Os métodos de preparação de amostras para a determinação de DPZ em matrizes biológicas complexas são baseados na precipitação de proteínas (HAGINAKA; SEYAMA, 1992; RADWAN et al., 2006), LLE usando hexano (APOSTOLOU et al., 2007), acetato de etila (XIE et al., 2006) ou a mistura hexano: isopropanol (MATSUI et al., 1999; YASUI-FURUOKI et al., 2002; NAKASHIMA et al., 2006; LU et al., 2006; YEH et al., 2008) e SPE (SHAH et al., 2009). Para o preparo de amostras para a determinação simultânea de DPZ e 6-ODD, a literatura relata o

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

emprego da LLE com a mistura hexano: acetato de etila (PILLI et al., 2011) e da SPE (PATEL et al., 2008). Entre os métodos apresentados, os descritos por Haginaka e Seyama (1992), Lu et al. (2006), Matsui et al. (1999) e Radwan et al. (2006) são empregados na determinação enantiosseletiva da DPZ, enquanto que os demais são métodos aquirais.

Entre os solventes e misturas avaliados, o acetato de etila foi o que apresentou os melhores valores de recuperação do fármaco e metabólitos do meio de cultura, e com cromatogramas livres de interferentes nos tempos de retenção dos analitos. O hexano isoladamente e sua mistura com isopropanol forneceram baixos valores de recuperação para os metabólitos e, além disso, a presença de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos. Quando o hexano foi misturado com acetato de etila, a recuperação para todos os analitos foi melhorada, porém manteve-se a presença de picos interferentes. Outro solvente avaliado de maneira isolada foi o éter metil *terc*-butílico que forneceu recuperações semelhantes a do acetato de etila e da mesma maneira com cromatogramas livres de interferentes. Porém optou-se pelo acetato de etila por apresentar custo inferior ao do éter metil *terc*-butílico.

A DPZ (pKa 8,84) e seus metabólitos 5-ODD (pKa 8,85) e 6-ODD (pKa 8,82) são compostos de caráter básico, portanto, a alcalinização da amostra é necessária para assegurar uma boa recuperação dos analitos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Além disso, a DPZ apresenta uma função cetona adjacente ao centro quiral que pode favorecer a racemização via tautomerismo ceto-enólico (HAGINAKA; SEYAMA, 1992; MATSUI et al., 1995; MATSUI et al., 1999a). Desta maneira, visando obter a melhor recuperação na ausência de racemização foi avaliada a recuperação da DPZ e seus metabólitos em pH 7,0; 9,0 e 10,0. Como pode ser observado na **Tabela C4-5**, os melhores resultados de recuperação foram observados em pH 10, porém neste pH, já é observada racemização dos analitos o que inviabiliza seu uso. Por sua vez, em pH 7 e 9 não foi observada racemização, porém os valores de recuperação em pH 9 foram melhores e, conseqüentemente, foi o pH selecionado para a validação do método. As condições da extração líquido-líquido otimizadas podem ser encontradas na **Tabela C4-6**.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

Tabela C4-5. Influência do pH na recuperação e racemização dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos.

Analito	ee inicial ^a	pH 7,0		pH 9,0		pH 10,0	
		ee (%) ^b	Recuperação (%) ^b	ee (%) ^b	Recuperação (%) ^b	ee (%) ^b	Recuperação (%) ^b
(+)-(S)-DPZ	99,3 ± 0,32	99,1 ± 0,46	71,0 ± 4,4	98,8 ± 0,98	95,2 ± 4,4	90,2 ± 1,15	96,5 ± 5,3
(-)-(R)-DPZ	98,7 ± 0,41	98,2 ± 1,1	72,0 ± 4,8	97,8 ± 0,71	95,9 ± 4,3	89,7 ± 1,34	97,1 ± 5,7
(+)-(S)-5-ODD	98,3 ± 0,81	97,9 ± 0,71	65,3 ± 6,8	97,3 ± 0,23	93,1 ± 6,2	88,5 ± 0,97	94,2 ± 6,7
(-)-(R)-5-ODD	99,3 ± 0,72	98,9 ± 0,45	63,3 ± 6,6	98,2 ± 0,53	92,5 ± 6,4	89,3 ± 0,88	93,9 ± 6,8
(+)-(S)-6-ODD	98,7 ± 0,28	98,5 ± 0,63	55,1 ± 8,3	97,9 ± 0,65	89,1 ± 7,8	90,3 ± 1,6	92,1 ± 7,9
(-)-(R)-6-ODD	99,3 ± 0,33	98,7 ± 0,53	56,7 ± 9,9	98,0 ± 0,78	90,2 ± 8,2	91,8 ± 1,5	93,4 ± 8,3

^aDeterminado em triplicata após a purificação dos enantiômeros.

^bDeterminado em triplicata.

Tabela C4-6. Condições otimizadas para o procedimento de preparação das amostras.

Parâmetro	Condição otimizada
Solvente (volume)	Acetato de etila (4 mL)
Solução alcalina (volume)	Tampão borato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH 9,0 (0,5 mL)
Tempo de agitação	15 min
FCR ^a , tempo e temperatura de centrifugação	1800 g/ 5 min a 4 °C
Procedimento de evaporação	Fluxo de ar comprimido
Volume recuperado	3 mL
Dissolução dos resíduos	100 µL de fase móvel

^aForça centrífuga relativa

4.3. Avaliação da racemização dos enantiômeros da DPZ, 6-ODD e 5-ODD nas condições analíticas e de cultivo

A **Tabela C4-7** apresenta os resultados do estudo de racemização dos enantiômeros da DPZ e seus metabólitos nas condições de cultivo, onde pode ser observada uma taxa de interconversão de aproximadamente 2% para todos os analitos, que não impede a realização do estudo de biotransformação.

Tabela C4-7. Avaliação da racemização durante o processo de biotransformação.

Analitos	Excesso enantiomérico (%)	
	Inicial ^a	7 ^o dia de biotransformação ^b
(+)-(S)-DPZ	99,3 ± 0,32	96,5 ± 0,15
(-)-(R)-DPZ	98,7 ± 0,41	97,0 ± 0,22
(+)-(S)-5-ODD	98,3 ± 0,81	95,3 ± 0,25
(-)-(R)-5-ODD	99,3 ± 0,72	95,5 ± 0,67
(+)-(S)-6-ODD	98,7 ± 0,28	97,4 ± 0,54
(-)-(R)-6-ODD	99,3 ± 0,33	97,6 ± 0,70

^aDeterminado em triplicata após a purificação dos enantiômeros.

^bDeterminado em triplicata.

4.4. Validação do método por cromatografia líquida para a determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD

A **Tabela C4-8** apresenta os resultados da recuperação dos enantiômeros da DPZ (aproximadamente 97%), 5-ODD (aproximadamente 95%) e 6-ODD (aproximadamente 92%), com CV% inferiores a 10,1 %, considerados adequados (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

Tabela C4-8. Recuperação do método de extração líquido-líquido para análise dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD.

Analitos	Concentração (ng mL ⁻¹ , <i>n</i> = 3) ^a	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação média (%)	CV (%) ^b
(+)-(S)-DPZ	300	97,6	6,3	97,8	0,2
	3000	98,0	3,0		
	7500	97,7	3,6		
(-)-(R)-DPZ	300	96,0	6,8	96,8	0,7
	3000	97,0	2,7		
	7500	97,4	2,6		
(+)-(S)-5-ODD	300	99,1	9,8	96,6	3,4
	1500	97,9	1,8		
	3750	92,9	4,1		
(-)-(R)-5-ODD	300	93,3	6,0	95,0	3,0
	1500	98,3	4,4		
	3750	93,5	3,4		
(+)-(S)-6-ODD	300	94,3	3,9	91,6	5,6
	1500	94,9	3,7		
	3750	85,7	2,8		
(-)-(R)-6-ODD	300	89,2	5,1	93,8	7,1
	1500	101,5	10,1		
	3750	90,8	4,0		

^a Número de determinações; ^b CV (%), coeficiente de variação percentual.

Os valores de recuperação dos enantiômeros da DPZ foram semelhantes (HAGINAKA; SEYAMA, 1992; MATSUI et al., 1999; YASUI-FURUOKI et al., 2002; NAKASHIMA et al., 2006; RADWAN et al., 2006; YEH et al., 2008; SHAH et al., 2009) ou maiores (XIE et al., 2006; APOSTOLOU et al., 2007; PATEL et al., 2008; PILLI et al., 2011) que os apresentados pelos métodos descritos na literatura. Para o metabólito 6-ODD, os valores de recuperação foram superiores tanto para o método por LLE (PILLI et al., 2011) como para o método por SPE (PATEL et al., 2008). Por sua vez, a extração da 5-ODD de matrizes biológicas ainda não foi descrita na literatura.

As **Tabelas C4-9 a C4-12** apresentam os resultados obtidos avaliação dos parâmetros linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão. Todos os valores obtidos na avaliação desses parâmetros cumpriram as exigências de guias oficiais de validação (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

Tabela C4-9. Linearidade do método para determinação enantiosseletiva da DPZ, 5-ODD e 6-ODD.

Analitos	Intervalo (ng mL ⁻¹)	Equação linear	Coeficiente de correlação	ANOVA <i>Lack of fit</i>	
				Valor de (F)	Valor de (p)
(+)-(S)-DPZ	100 – 10000	y = 165,8x + 1154,5	0,9985	1,77	0,2
(-)-(R)-DPZ	100 – 10000	y = 166,5x + 2545,3	0,9986	1,27	0,33
(+)-(S)-5-ODD	100 – 5000	y = 149,1x – 2769,6	0,9983	0,74	0,58
(-)-(R)-5-ODD	100 – 5000	y = 144,9x – 1013,6	0,9977	0,56	0,69
(+)-(S)-6-ODD	100 – 5000	y = 164,3x + 163,5	0,9970	0,15	0,96
(-)-(R)-6-ODD	100 – 5000	y = 165,8x – 1168,2	0,9951	0,22	0,92

Tabela C4-10. Limites de quantificação do método para determinação enantiosseletiva de DPZ e seus metabólitos.

Analitos	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração analisada (ng mL ⁻¹) ^a	E (%) ^b	CV (%) ^c
(+)-(S)-DPZ	100	102,6	2,6	5,3
(-)-(R)-DPZ	100	96,0	-4,0	8,3
(+)-(S)-5-ODD	100	108,8	8,8	10,7
(-)-(R)-5-ODD	100	98,2	-1,8	4,9
(+)-(S)-6-ODD	100	95,3	-4,7	6,7
(-)-(R)-6-ODD	100	93,0	-7,0	9,1

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

A seletividade do método foi avaliada através da análise cromatográfica de amostras extraídas de meio de cultura Czapek branco (**Figuras C4-7B**), amostras de meio de cultura Czapek fortificadas com os enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD dissolvidos em água estéril (**C4-7A**) e amostras de meio de cultura Czapek incubadas com os fungos empregados nos estudos de biotransformação.

A **Figura C4-7** também apresenta os cromatogramas das amostras de meio de cultura Czapek acrescidas do micélio dos fungos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B (**Figura C4-7C**) e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (**Figura C4-7D**). Em nenhum dos controles avaliados foi observada a presença de picos interferentes com tempos de retenção próximos ao dos analitos, comprovando a seletividade do método proposto.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

Tabela C4-11. Precisão e exatidão intradia do método para análise dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em meio Czapek.

Analito	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Intradias (n = 5) ^a		
		Concentração medida (ng mL ⁻¹)	CV (%) ^b	E (%) ^c
(+)-(S)-DPZ	300	304,0	3,1	1,3
	3000	3028,1	3,2	0,9
	7500	7145,0	1,7	-4,7
(-)-(R)-DPZ	300	308,1	7,6	2,7
	3000	3068,5	3,0	2,3
	7500	7252,9	2,9	-3,3
(+)-(S)-5-ODD	300	306,6	8,6	2,2
	1500	1588,4	2,0	5,9
	3750	3840,2	4,5	2,4
(-)-(R)-5-ODD	300	294,6	8,9	-1,8
	1500	1596,6	4,6	6,4
	3750	3847,1	3,6	2,6
(+)-(S)-6-ODD	300	310,1	3,6	3,4
	1500	1578,7	2,0	5,2
	3750	3465,7	2,9	-7,6
(-)-(R)-6-ODD	300	284,8	4,6	-5,1
	1500	1612,7	2,9	7,5
	3750	3555,3	3,1	-5,2

^an = número de determinações: cinco; ^bExpresso como coeficiente de variação percentual, CV (%);^cExpresso como erro relativo, E%.

Figura C4-7. (A) Cromatograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek fortificado com 3000 ng mL^{-1} de cada enantiômero da DPZ e 1500 ng mL^{-1} de cada enantiômero da 5-ODD e 6-ODD dissolvidos em água estéril. (B) Cromatograma representativo de amostra de meio de cultura Czapek branco extraído pelo procedimento de extração líquido-líquido. (C) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B (D) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna Chiralpak AD-H, fase móvel composta por hexano : etanol : metanol (75:20:5 v/v/v) + 0,3% de trietilamina, vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção em 270 nm . (1) (+)-(S)-DPZ, (2) (+)-(S)-5-ODD, (3) (+)-(S)-6-ODD, (4) (-)-(R)-DPZ, (5) (-)-(R)-5-ODD e (6) (-)-(R)-6-ODD.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

Tabela C4-12. Precisão e exatidão interdias do método para análise dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em meio Czapek.

Analito	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Interdias (n = 3) ^a		
		Concentração medida (ng mL ⁻¹)	CV (%) ^b	E (%) ^c
(+)-(S)-DPZ	300	301,2	2,0	0,4
	3000	3005,2	1,3	0,2
	7500	7055,9	2,1	-5,9
(-)-(R)-DPZ	300	308,8	2,9	2,9
	3000	2992,9	2,3	-0,2
	7500	7032,1	3,1	-6,2
(+)-(S)-5-ODD	300	293,0	4,7	-2,3
	1500	1503,9	6,7	0,3
	3750	3612,3	6,5	-3,7
(-)-(R)-5-ODD	300	293,0	1,9	-2,3
	1500	1509,2	6,6	0,6
	3750	3621,7	6,9	-3,4
(+)-(S)-6-ODD	300	304,1	4,8	1,4
	1500	1510,6	5,4	0,7
	3750	3452,1	2,4	-7,9
(-)-(R)-6-ODD	300	280,9	3,5	-6,3
	1500	1529,8	5,1	2,0
	3750	3514,4	3,9	-6,3

^an = número de determinações: cinco; ^bExpresso como coeficiente de variação percentual, CV (%);^cExpresso como erro relativo, E%.

A estabilidade dos enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD foi avaliada nos ciclos de congelamento/descongelamento, bancada por 12 h, nas condições de biotransformação e nas condições de armazenamento das soluções-padrão. Os resultados da estabilidade nos ciclos de congelamento e descongelamento e bancada por 12 h são apresentados nas **Tabelas C4-13 e C4-14**, respectivamente. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas, pois não foi observado desvio superior a 15%, avaliado através do E%, em relação às amostras frescas, recentemente preparadas e processadas. Nas condições de biotransformação também não foi observado desvio superior a 15% entre amostras recentemente preparadas e aquelas submetidas ao procedimento de biotransformação durante 7 dias. Por sua vez, na avaliação da estabilidade das soluções-padrão foi observado um desvio em relação às amostras frescas inferior a 7,6%, 6,7% e 8,7%, respectivamente para os enantiômeros da DPZ, 5-ODD e 6-ODD.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

Tabela C4-13. Estabilidade nos ciclos de congelamento e descongelamento da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em meio de cultura Czapek.

Analito	Concentração amostra recém-preparada (ng mL ⁻¹)	Estabilidade nos ciclos congelamento e descongelamento (n = 6)		
		Concentração medida (ng mL ⁻¹)	CV (%) ^a	E (%) ^b
(+)-(S)-DPZ	289,0	275,3	2,5	-4,7
	6884,8	6942,1	1,91	0,83
(-)-(R)-DPZ	270,2	259,0	3,0	-4,1
	6781,7	6859,2	2,2	1,1
(+)-(S)-5-ODD	304,6	276,8	3,1	-9,1
	3317,6	3342	1,6	0,7
(-)-(R)-5-ODD	280,4	261,6	9,0	-7,2
	3505,6	3515,7	2,6	0,3
(+)-(S)-6-ODD	303,6	264,9	3,7	-12,7
	3249,0	3283,0	2,7	1,0
(-)-(R)-6-ODD	283,6	265,4	9,5	-6,4
	3272,5	3349,4	2,2	2,3

n = número de determinações; ^a Expresso como coeficiente de variação percentual, CV; ^b Expresso como erro relativo, E%. Calculado frente à concentração da amostra recém-preparada

Tabela C4-14. Estabilidade de bancada por 12 h da DPZ, 5-ODD e 6-ODD em meio de cultura Czapek.

Analito	Concentração amostra recém-preparada (ng mL ⁻¹)	Estabilidade de bancada por 12 horas (n = 6)		
		Concentração medida (ng mL ⁻¹)	CV (%) ^a	E (%) ^b
(+)-(S)-DPZ	289,0	286,7	2,5	-0,8
	6884,8	6743,4	2,5	-2,0
(-)-(R)-DPZ	270,2	269,3	4,0	-0,3
	6781,7	6677,7	2,6	-1,5
(+)-(S)-5-ODD	304,6	294,1	5,6	-3,4
	3317,6	3266,7	1,33	-1,5
(-)-(R)-5-ODD	280,4	280,5	4,9	0,0
	3505,6	3404,8	3,1	-2,9
(+)-(S)-6-ODD	303,6	275,2	7,1	-9,3
	3249,0	3318,5	3,1	2,1
(-)-(R)-6-ODD	283,6	277,0	12,4	-2,3
	3272,5	3333,5	3,4	1,9

n = número de determinações; ^a Expresso como coeficiente de variação percentual, CV; ^b Expresso como erro relativo, E%. Calculado frente à concentração da amostra recém-preparada.

4.5. Biotransformação da DPZ empregando fungos

Foi realizada uma triagem empregando 4 diferentes espécies de fungos endofíticos: *Penicillium crustosum* (VR4), *Papulaspora immersa* Hotson (SS13), *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E. W. Mason (SS67) e *Phoma* sp. (ET) e outras duas espécies de fungos obtidos da ATCC: *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B. Estes fungos endofíticos foram selecionados por haverem apresentado habilidade em biotransformar tioridazina, propranolol, midodrina, ibuprofeno e albendazol em investigações realizadas por nosso grupo de pesquisa (BORGES et al., 2007; BORGES; PUPO; BONATO, 2009; BORGES et al., 2011; CARRÃO et al., 2011), por meio de reações de hidroxilação, sulfoxidação e hidrólise de amida. Porém, reações de *O*-desmetilação não foram observadas quando do uso desses fungos em processo de biotransformação. Por sua vez, a habilidade dos fungos dos gêneros *Beauveria* e *Cunninghamella* em realizar uma série de reações, inclusive *O*-desmetilação foram revisadas (GROGAN; HOLLAND, 2000; ASHA; VIDYAVATHI, 2009), e direcionaram sua seleção para este estudo.

Entre os seis fungos estudados, quatro deles (VR4, SS13, SS67 e ET) não apresentaram formação tanto da 5-ODD como da 6-ODD. Os gráficos referentes à cinética de biotransformação da DPZ pelos demais fungos *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B são apresentados a seguir.

4.5.1. Fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159

Fungos do gênero *Beauveria* vêm sendo frequentemente usados em biotransformações, pois são capazes de catalisar diversas reações, tais como oxidações, reduções e hidrólises (GROGAN; HOLLAND, 2000). Particularmente, reações de *O*-desmetilação com *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram observadas em um derivado β -lactâmico (ARCHELAS, FOUMERON; FURSTOSS, 1988), em metil éter antraciclinas (WU; GARD; ROSAZZA, 1980) e em 7-azanorbornanos *N*-substituídos (OLIVO et al., 2003).

A **Figura C4-8** apresenta os resultados da biotransformação da DPZ pelo fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159.

Figura C4-8. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da 5-ODD e decaimento da DPZ pelo fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159. As barras expressam o desvio padrão das replicatas ($n=2$).

O fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159 apresentou habilidade em desmetilar as funções metoxila da DPZ principalmente na posição 5. A formação do 6-ODD não está apresentada na **Figura C4-8**, pois as quantidades formadas estão abaixo do limite de quantificação do método validado. Esta mesma figura indica que a formação do metabólito 5-ODD inicia-se após 48 horas de incubação. A máxima concentração quantificada deste metabólito foi observada após 168 horas (7 dias) de incubação, com predominância de formação do enantiômero (-)-(*R*). O excesso enantiomérico observado em 168 horas de biotransformação foi de 60,6%.

Na **Figura C4-9** é apresentado um cromatograma de uma amostra após 96 horas de incubação onde observa-se a presença de um pico adicional (pico 3 da **Figura C4-9A**), o qual não foi detectado em nenhum dos controles avaliados. Este pico pode ser considerado um possível metabólito da DPZ não estudado neste trabalho.

Figura C4-9. (A) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e DPZ após 96 h de biotransformação. (B) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna Chiralpak AD-H, fase móvel composta por hexano:etanol:metanol (75:20:5 v/v/v) + 0,3 % de trietilamina, vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. (1) (+)-(S)-DPZ, (2) (+)-(S)-5-ODD, (3) pico desconhecido, (4) (+)-(S)-6-ODD, (5) (-)-(R)-DPZ, (6) (-)-(R)-5-ODD, (7) (-)-(R)-6-ODD.

4.5.2. *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B

Fungos do gênero *Cunninghamella* apresentam habilidade de biotransformar, inclusive estereosseletivamente, uma variedade de xenobióticos de maneira similar ao que ocorre nos sistemas enzimáticos de mamíferos (DAVIS, 1988). Fungos deste gênero são capazes de biotransformar xenobióticos através dos mecanismos de biotransformação de fase I (oxidação) e fase II (conjugação) (ZHANG et al., 1996). A habilidade dos fungos do gênero *Cunninghamella* em biotransformar fármacos através de reações de *O*-desmetilação já foi descrita algumas vezes: Zhang et al. (2006) descreveram a biotransformação do antidiabético, muraglitazar; Zhong et al. (2003) do anti-inflamatório, naproxeno; Xie, Huang, Zhong (2005) do inibidor da bomba de prótons, pantoprazol; Hansen et al. (1987) do anti-histamínico, pirlamina e Sun et al. (2004) do inibidor de canais de cálcio, verapamil.

A **Figura C4-10** apresenta os resultados de biotransformação da DPZ pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B. Entre os dois metabólitos monitorados, a biotransformação com este fungo resultou na formação do (–)-(R)-6-ODD de maneira enantiosseletiva. O 6-ODD é considerado o metabólito ativo da DPZ (DOOLEY; LAMB, 2000) e consiste no principal metabólito observado em ratos (MATSUI et al., 1999b) e em humanos (TISEO; PERDOMO; FRIEDHOFF, 1998).

Como é possível observar na **Figura C4-10**, a formação do 6-ODD inicia-se após 72 horas de incubação. A máxima concentração quantificada deste metabólito foi observada após 168 h de incubação, com predominância de formação do enantiômero (–)-(R). O excesso enantiomérico observado em 168 h de biotransformação foi de 100%. Portanto, esse fungo é um excelente modelo para a produção desse metabólito de forma enantiomericamente pura.

Figura C4-10. Gráfico da cinética de formação dos enantiômeros da 6-ODD e decaimento da DPZ pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B. As barras expressam o desvio padrão das replicatas ($n=2$).

Na **Figura C4-11** é apresentado um cromatograma representativo de uma amostra após 96 horas de incubação onde observa-se a presença de dois picos adicionais (pico 2 e 4 da **Figura C4-11A**). O pico 2 começou a ser observado após 48 h de incubação e o pico 4 após 72 horas; esses picos não haviam sido

observados em nenhum dos controles avaliados e podem ser considerados possíveis metabólitos da DPZ.

A **Tabela C4-15** apresenta o tempo de máxima formação dos enantiômeros dos metabólitos 5-ODD e 6-ODD. O percentual de formação dos metabólitos foi calculado considerando como 100% de biotransformação a concentração de DPZ quantificada no tempo 0 (alíquota coletada logo após a adição do fungo e fármaco ao meio de cultura) de biotransformação.

Figura C4-11. (A) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e DPZ após 96 h de biotransformação. (B) Cromatograma representativo das amostras de meio de cultura Czapek incubadas com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna Chiralpak AD-H, fase móvel composta por hexano:etanol:metanol (75:20:5 v/v/v) + 0,3% de trietilamina, vazão de 1,5 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. (1) (+)-(S)-DPZ, (2) pico desconhecido, (3) (-)-(R)-DPZ, (4) pico desconhecido, (5) (-)-(R)-6-ODD.

Portanto, dois dos seis fungos estudados apresentaram biotransformação enantiosseletiva com predomínio para a formação dos enantiômeros (-)-(R) dos metabólitos. O fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159 formou predominantemente o metabólito (-)-(R)-5-ODD e a máxima quantidade formada foi observada em 168 horas de incubação (**Tabela C4-15**). Por outro lado o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B formou exclusivamente o metabólito (-)-(R)-6-ODD.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

Tabela C4-15. Quantidade máxima de (+)-(S)-5-ODD, (-)-(R)-5-ODD, (+)-(S)-6-ODD e (-)-(R)-6-ODD formada (expressa em % de DPZ adicionada).

Fungo	Tempo (horas)	Metabólitos (% formado)			
		(+)-(S)-5-ODD	(-)-(R)-5-ODD	(+)-(S)-6-ODD	(-)-(R)-6-ODD
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	168	2,3	8,3	< LQ	< LQ
<i>Cunninghamella</i> <i>elegans</i> ATCC 10028B	168	nd	nd	nd	15,1

< LQ, analito detectado abaixo do limite de quantificação; nd, analito não detectado.

5. COMENTÁRIOS FINAIS

A resolução dos enantiômeros da DPZ já foi descrita na literatura, sendo que os autores empregaram, para esse propósito, colunas baseadas em proteínas: Ultron ES-OVM (HAGINAKA; SEYAMA 1992) e Biopack AV-1 (MATSUI et al., 1995; MATSUI et al., 1999a). Estas colunas não foram avaliadas nesse estudo, pois a experiência do grupo e dados da literatura indicam que elas possuem estabilidade limitada (DE GAITANI; MARTINEZ; BONATO, 2004; ZHANG et al., 2005). A coluna Chiralcel OD foi empregada por Radwan et al. (2006) na separação dos enantiômeros da DPZ com tempo de análise de 20 minutos. A coluna Chiralcel OD foi avaliada com fases móveis diferentes daquelas propostas pelos autores, obtendo-se resolução quiral do fármaco e metabólitos, porém não foi observada separação aquiral dos analitos. Também foram avaliadas colunas com fases estacionárias baseadas em derivados de amilose (Chiralpak AD e AD-H), também no modo normal de eluição. Dentre estas, a coluna Chiralpak AD-H apresentou resolução suficiente para a determinação enantiosseletiva simultânea dos analitos.

Desta maneira, foi desenvolvido um método cromatográfico empregando a coluna Chiralpak AD-H e fase móvel composta de hexano:etanol:metanol (75:20:5, v/v/v) acrescida de 0,3% de trietilamina que apresentou resoluções suficientes (> 1,5) em um tempo de análise de 19 min. Sendo assim, este método é o primeiro que permite a determinação enantiosseletiva simultânea da DPZ, 5-ODD e 6-ODD.

Após sua validação, o método foi aplicado em um estudo de biotransformação com fungos. Seis cepas foram avaliadas, das quais duas biotransformaram a DPZ. O fungo *B. bassiana* ATCC 7159 biotransformou a DPZ predominantemente no metabólito (-)-(R)-5-ODD com um excesso enantiomérico de 60,6 % enquanto que o fungo *C. elegans* ATCC 10028B biotransformou 15,1% da (-)-(R)-DPZ em (-)-(R)-6-ODD com um excesso enantiomérico de 100%. Além disso, os resultados de biotransformação do fungo *C. elegans* ATCC 10028B correlacionam com os dados de biotransformação observados em ratos (MATSUI et al., 1999b) e humanos (TISEO; PERDOMO; FRIEDHOFF, 1998), nos quais também foi observada a formação predominante do metabólito 6-ODD. Estes dados reforçam o que foi descrito em uma revisão publicada por Asha e Vidyavathi (2009) que aponta a

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

correlação dos resultados de biotransformação deste gênero de fungos com os resultados de biotransformação observado em mamíferos. Portanto, pode-se sugerir o uso do fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B como uma alternativa para mimetizar a biotransformação da DPZ em mamíferos objetivando a obtenção de metabólitos para estudos toxicológicos e farmacológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTRIA, K.D. Quantitative applications of the resolution of enantiomers by capillary electrophoresis. In: SHINTANI, H.; POLONSKÝ, J. (Ed.). **Handbook of capillary electrophoresis applications**. London: Blackie Academic and Professional. cap. 24, p. 334-344, 1996.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&mode=PRINT_VERSION. Acesso em 1 de novembro de 2011.

APOSTOLOU, C.; DOTSIKAS, Y.; KOUSOULOS, C.; LOUKAS, Y.L. Quantitative determination of donepezil in human plasma by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry employing an automated liquid-liquid extraction based on 96-well format plates. Application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 848, p. 239-244, 2007.

ARCHELAS, A; FOURNERON, J.D.; FURSTOSS, R. Microbial transformations 11. Regioselective hydroxylation of β -lactams by the fungus *Beauveria sulfurescens*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 29, p. 6611-6614, 1988.

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

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 77, p. 669-674, 2007.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 46, n. 5, p. 945-952, 2008.

BORGES, K.B.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Enantioselective analysis of propranolol and 4-hydroxypropranolol by CE with application to biotransformation studies employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, Malden, v. 30, p. 3910-3917, 2009.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

BORGES, K.B.; OLIVEIRA, A.R.M.; BARTH, T.; JABOR, V.A.P.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. LC–MS–MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 399, p. 915–925, 2011.

CACCAMESE, S.; BIANCA, S.; CARTER, G.T. Direct High-Performance Liquid Chromatographic Separation of the Enantiomers of an Aromatic Amine and Four Aminoalcohols Using Polysaccharide Chiral Stationary Phases and Acidic Additive. **Chirality**, Malden, v. 19, p. 647-653, 2007.

CARRÃO, D.B.; BORGES, K.B.; BARTH, T.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S.; 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.

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

DE GAITANI, C.M.; MARTINEZ, A.S.; BONATO, P.S. Degradation and configurational changes of thioridazine 2-sulfoxide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 36, p. 601-607, 2004

DOOLEY, M; LAMB, H.M. Donepezil. A Review of its Use in Alzheimer's Disease. **Drugs and Aging**, Auckland, v. 16, n. 3, p. 199-226, 2000.

FARLOW, M.R. Pharmacokinetic Profiles of Current Therapies for Alzheimer's Disease: Implications for Switching to Galantamine. **Clinical Therapeutics**, Bridgewater, v. 23, p. 13-24, 2001.

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

GAGGERI, R.; ROSSI, D.; COLLINA, S.; MANUCCI, B.; BAIERL, M.; JUZA, M. Quick development of an analytical enantioselective high performance liquid chromatography separation and preparative scale-up for the flavonoid Naringenin. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, p. 5414-5422, 2011.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

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**, Weinheim, v. 49, p. 142-151, 2009.

GROGAN, G.J.; HOLLAND, H.L. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 9, p. 1–32, 2000.

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.Y.; RIBEIRO, P.H.; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 52, n.1, p. 134-144, 2008.

GUIOCHON, G. The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1126, p. 6-49, 2006.

GUO, H.X.; WU, S.; NADEAU, K.; MONIZ, G.A.; CAILLE, S. Effects of solvent on chiral and enantiomeric separation of koga bases using derivatized amylose chiral stationary phase. **Chirality**, Malden, v. 22, p. 50-55, 2010.

HAGINAKA, J.; SEYAMA, C. Determination of enantiomers of 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-indanon)-2-yl]methylpiperidine hydrochloride (E2020), a centrally acting acetylcholine esterase inhibitor, in plasma by liquid chromatography with fluorometric detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 577, p. 95-102, 1992.

HANSEN JR, E.B.; CERNIGLIA, C.E.; KORFMACHER, W.A.; MILLER, D.W.; HEFLICH, R.H. Microbial transformation of the antihistamine pyrrolamine maleate: formation of potential mammalian metabolites. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 15, p. 97-106, 1987.

JELIC, V.; DARREH-SHORI, T. Donepezil: A Review of Pharmacological Characteristics and Role in the Management of Alzheimer Disease. **Clinical Medicine Insights: Therapeutics**, Auckland, v. 2, p. 771–788, 2010.

KAZUSAKI, M.; KAWABATA, H.; MATSUKURA, H. Comparative study of amylose and cellulose derivatized chiral stationary phases in the reversed-phase mode. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, Philadelphia, v. 23, n. 18, p. 2819-2828, 2000.

LÄMMERHOFER, M.; PELL, R.; MAHUT, M.; RICHTER, M.; SCHIESEL, S.; ZETTL, H.; DITTRICH, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; LINDNER, W. Enantiomer separation and indirect chromatographic absolute configuration prediction of chiral pirinixic acid derivatives: Limitations of polysaccharide-type chiral stationary phases in comparison to chiral anion-exchangers. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 1033-1040, 2010.

LIPKA-BELLOLI, E.; LEN, C.; MACKENZIE, G.; RONCO, G.; BONTE, J.P.; VACCHER, C. Diastereomeric resolution of nucleoside analogues, new potential antiviral agents, using high-performance liquid chromatography on polysaccharide-type chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 943, p. 91–100, 2001.

LU, Y.H.; ZHANG, M.; MENG, Q.; ZHANG, Z.X. Separation and determination of donepezil hydrochloride enantiomers in plasma by capillary electrophoresis. **Yaoxue xuebao**, Beijing, v. 41, n. 5, p. 471-475, 2006.

MATSUI, K.; ODA, Y.; OHE, H.; TANAKA, S.; ASAKAWA, N. Direct determination of E2020 enantiomers in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and column-switching techniques. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 694, p. 209-218, 1995.

MATSUI, K.; ODA, Y.; NAKATA, H.; YOSHIMURA, T. Simultaneous determination of donepezil (aricept®) enantiomers in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 729, p. 147-155, 1999a.

MATSUI, K.; MISHIMA, M.; NAGAI, Y.; YUZURIHA, T.; YOSHIMURA, T. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of donepezil (aricept) after a single oral administration to rat. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda v. 27, n. 12, p.1406-1414, 1999b.

MATTHIJS, N.; PERRIN, C.; MAFTOUH, M.; MASSART, D.L.; VANDER HEYDEN, Y. Definition and system implementation of strategies for method development of chiral separations in normal- or reversed-phase liquid chromatography using polysaccharide-based stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1041, p. 119–133, 2004.

NAKASHIMA K.; ITOH, K.; NAKASHIMA, M.N.; WADA, M. Determination of donepezil hydrochloride in human and rat plasma, blood and brain microdialysates

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

by HPLC with a short C30 column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 41, p. 201–206, 2006.

OLIVO, H.F.; PEEPLES, T.L.; RÍOS, M.Y.; VELÁSQUEZ, F.; KIM, J.W.; NARANG, S. Microbial C-hydroxylation and β -4-O-methylglucosidation of methyl-benzamide 7-azanorbornane ethers with *Beauveria bassiana*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 21, p. 97-105, 2003.

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 β -Lactams, **Chirality**, Malden, v. 22, p. 120–128, 2010.

PATEL, B.N.; SHARMA, N.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P.S. Quantitation of donepezil and its active metabolite 6-O-desmethyl donepezil in human plasma by a selective and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometric method, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 629, p. 145-157, 2008.

PILLI, N.R.; INAMADUGU, J.K.; KONDREDDY, N.; KARRA, V.K.; DAMARAMADUGU, R.; RAO, J.V.L.N.S. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of donepezil and its active metabolite, 6-*o*-desmethyl donepezil in human plasma and its pharmacokinetic application, **Biomedical Chromatography**, Malden, v. 25, p. 943-951, 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.

RADWAN, M.A.; ABDINE, H.H.; AL-QUADEB, B.T.; ABOUL-EINEIN, H.Y.; NAKASHIMA, K. Stereoselective HPLC assay of donepezil enantiomers with UV detection and its application to pharmacokinetics in rats. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 830, p. 114-119, 2006.

RAO, R.N.; RAJU, A.N.; NAGARAJU, D. An improved and validated LC method for resolution of bicalutamide enantiomers using amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) as a chiral stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Malden, v. 42, p. 347–353, 2006.

SCIFINDER WEB. Disponível em: <http://scifinder.cas.org>. Acesso em: 24 out. 2011.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

SELLERS, J.A.; OLSEN, B.A.; OWENS, P.K.; GAVIN, P.F. Determination of the enantiomer and positional isomer impurities in atomoxetine hydrochloride with liquid chromatography using polysaccharide chiral stationary phases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 41, p. 1088-1094, 2006.

SHAH, H.J.; KUNDLIK, M.L.; PANDYA, A.; PRAJAPATI, S.; SUBBIAH, G.; PATEL, C.N.; PATEL, D.M.; SUHAGIA, B.N. A rapid and specific approach for direct measurement of donepezil concentration in human plasma by LC-MS/MS employing solid-phase extraction. **Biomedical Chromatography**, Malden, v. 23, p. 141–151, 2009.

SHIGETA, M.; HOMMA, A. Donepezil for Alzheimer's Disease: Pharmacodynamic, Pharmacokinetic, and Clinical Profiles. **CNS Drug Reviews**, Auckland, v. 7, n. 4, p. 353-368, 2001.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2 ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997. 765 p.

STANDAERT, D.G.; YOUNG, A.B. Tratamento dos distúrbios degenerativos do sistema nervoso central. In: _____. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. cap. 20, p.469-486.

SUN, L.; HUANG, H.H.; LIU, L.; ZHONG, D.F. Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 2722–2727, 2004.

TANG, Y. Significance of Mobile Phase Composition in Enantioseparation of Chiral Drugs by HPLC on a Cellulose-Based Chiral Stationary Phase. **Chirality**, Malden, v. 8, p. 136-142, 1996.

TAYLOR, P. Agentes anticolinesterásicos. In: _____. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. cap. 8, p. 183-196.

TISEO, P.J.; PERDOMO, C.A.; FRIEDHOFF, L.T. Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Malden, v. 46, supl. 1, p. 19-24, 1998.

Capítulo 4 – Determinação enantiosseletiva de DPZ, 5-ODD e 6-ODD por HPLC

WANG, T.; CHEN, Y.W. Application and comparison of derivatized cellulose and amylose chiral stationary phases for the separation of enantiomers of pharmaceutical compounds by high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 855, p. 411-421, 1999.

WANG, T.; CHEN, Y.W.; VAILAYA, A. Enantiomeric separation of some pharmaceutical intermediates and reversal of elution orders by high-performance liquid chromatography using cellulose and amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) derivatives as stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, p. 345-355, 2000.

WILKINSON, D. Pharmacotherapy of Alzheimer's disease. **Psychiatry**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 9-14, 2007.

WU, G.; GARD, A.; ROSAZZA, J. Microbial transformations of natural antitumor agents. 13. Conversions of 13-blocked anthracylinones. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 33, p. 705-710, 1980.

XIE, Z.Y.; HUANG, H.H.; ZHONG, D.F. Biotransformation of pantoprazole by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Xenobiotica**, London, v. 35, p. 467-477, 2005.

XIE, Z.; LIAO, Q.; XU, X.; YAO, M.; WAN, J.; LIU, D. Rapid and sensitive determination of donepezil in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Malden, v. 20, p. 3193-3198, 2006.

YASUI-FURUOKI, N.; FURUYA, R.; TAKAHATA, T.; TATEISHI, T. Determination of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection, **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 768, p. 261-265, 2002.

YE, Y.K.; STRINGHAM, R.W. The effect of acidic and basic additives on the enantioseparation of basic drugs using polysaccharide-based chiral stationary phases. **Chirality**, Malden, v. 18, p. 519-530, 2006.

YEH, H.; YANG, Y.; KO, J.; CHEN, S. Sensitive analysis of donepezil in plasma by capillary electrophoresis combining on-column field-amplified sample stacking and its application in Alzheimer's disease. **Electrophoresis**, Malden, v. 29, p. 3649-3657, 2008.

ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J.E.; CERNIGLIA, C.E. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 138, p. 221–226, 1996.

ZHANG, Y.; WU, D.R.; IVERSON, D.B.; TYMIAK, A.A. Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 10, p. 571–577, 2005.

ZHANG, D.; ZHANG, H.; ARANIBAR, N.; HANSON, R.; HUANG, Y.; CHENG, P.T.; WU, S.; BONACORSI, S.; ZHU, M.; SWAMINATHAN, A.; HUMPHREYS, G. Structural elucidation of human oxidative metabolites of muraglitazar: use of microbial bioreactors in the biosynthesis of metabolite standards. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 34, p. 267–280, 2006.

ZHONG, D.F.; SUN, L.; LIU, L.; HUANG, H.H. Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 24, p. 442–447, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho as técnicas HPLC e CE foram empregadas na determinação estereosseletiva dos fármacos midodrina, bufuralol, donepezila, e seus respectivos metabólitos em meio de cultura. Também foi desenvolvido um método aquiral para a determinação da midodrina e seu metabólito. Os métodos desenvolvidos e validados foram empregados para estudar a biotransformação dos referidos fármacos empregando fungos. Estas técnicas analíticas forneceram métodos com suficiente resolução, seletividade, precisão, exatidão e detectabilidade para a determinação dos fármacos e seus metabólitos para a finalidade pretendida. A CE mostrou-se particularmente interessante, devido ao baixo custo do método decorrente, principalmente, da reduzida quantidade de reagentes usados. Esta técnica destaca-se também por sua complementariedade em relação aos métodos cromatográficos estereosseletivos, já que somente a CE quiral possibilitou a determinação simultânea dos enantiômeros da midodrina e DMAE, o que não foi possível obter por HPLC. Por outro lado, a análise estereosseletiva por HPLC, apesar do maior volume de solventes orgânicos empregados, apresentou excelente habilidade no reconhecimento quiral do bufuralol, donepezila e seus metabólitos, com destaque para as colunas baseadas nos derivados tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) dos polissacarídeos celulose e amilose. Essas colunas têm a vantagem adicional de poderem também ser empregadas em análises semipreparativas para isolamento dos metabólitos formados. Uma estratégia para reduzir a quantidade total de solventes orgânicos usados nos métodos foi a combinação da análise quiral cromatográfica com técnicas miniaturizadas de preparo de amostras, como a HF-LPME. A HF-LPME forneceu valores adequados de recuperação com cromatogramas livres de interferentes e emprego reduzido de solventes orgânicos.

A biotransformação estereosseletiva empregando fungos endofíticos foi observada, nas condições estudadas, somente para o fármaco midodrina, que foi convertida no metabólito DMAE através de uma hidrólise do grupo funcional amida. Estudos de biotransformação (aquiral) da midodrina por fungo endofítico e fitopatógeno foram realizados comparativamente em condição estática e de agitação. Na condição de agitação foi observada a formação preferencial e com maior rendimento do metabólito monitorado (DMAE) enquanto que na condição estática foi verificada uma maior diversidade de picos (prováveis produtos de biotransformação), com rendimento inferior ao do metabólito monitorado. A condição

estática de biotransformação com os fungos *Papulaspora immersa* e *Botrytis cinerea* 2100 foi avaliada em escala ampliada. A biotransformação com ambos os fungos produziram DMAE, além de um derivado desaminado inédito da midodrina pelo fungo *Botrytis cinerea* 2100.

Exceto pelo estudo de biotransformação aquiral da midodrina, todos os demais foram feitos empregando uma condição padronizada de biotransformação. Nesta condição não foi observada a biotransformação do bufuralol nos metabólitos 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol pelos fungos endofíticos, indicando a necessidade da busca de condições mais propícias para este tipo de reações.

Na biotransformação da donepezila foram observadas reações de desmetilação em grupo funcional metoxila. O fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159 formou predominantemente o metabólito (-)-(R)-5-ODD enquanto que o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B formou predominantemente o metabólito (-)-(R)-6-ODD, com excesso enantiomérico de 100%. Portanto, esse fungo é particularmente interessante para obtenção desse metabólito na forma enantiomericamente pura.

Para finalizar, este estudo é o primeiro relato da biotransformação dos fármacos midodrina e donepezila empregando fungos. Também, mostra de maneira inédita, a habilidade dos fungos endofíticos em realizar reações de hidrólise estereosseletiva (midodrina) e a produção de um metabólito de forma enantiomericamente pura (donepezila). Portanto, as informações aqui apresentadas podem ser usadas para a obtenção de metabólitos enantiomericamente puros, ou não, para serem empregados em estudos farmacológicos e/ou toxicológicos, bem como para mimetizar reações de biotransformação em mamíferos e para direcionar a seleção de micro-organismos catalisadores das reações observadas.