UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo 9-hidroxirisperidona (paliperidona) e análise por eletroforese capilar

Liana Inara de Jesus

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo 9-hidroxisperidona (paliperidona) e análise por eletroforese capilar

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Liana Inara de Jesus

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicamentos e Cosméticos no dia 10/05/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Jesus, Liana Inara de

Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quirál e ativo 9-hidroxirisperidona (paliperidona) e análise por eletroforese capilar. Ribeirão Preto, 2013.

67 p.; 30cm.

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

Orientador: Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes

1. Eletroforese Capilar 2. HF-LPME 3. Biotransformação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Liana Inara de Jesus

Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo 9-hidroxirisperidona (paliperidona) e análise por eletroforese capilar

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo
Moraes de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho ao meu amado marido Wesley
e aos meus Pais Jose Patricio de Jesus e Isabel Rosa de Jesus
Sem vocês não seria possível realizar o meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela misericórdia e pelas bênçãos recebidas.

Agradeço aos meus pais pelo incondicional amor.

Agradeço ao meu marido Wesley pelo apoio, carinho e incentivo. Por estar sempre ao meu lado e por acreditar na minha capacidade de conquistar meus objetivos. Amo você.

Ao meu orientador Anderson pela valiosa oportunidade de fazer meu mestrado. Sou muito grata pelo conhecimento proporcionado, pela paciência e amizade nos momentos mais difíceis, pelo incentivo, pela disponibilidade em ajudar, e principalmente por acreditar no meu potencial. Você fez parte de um processo que me tornou uma pessoa melhor tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Você é um líder que acredita no que faz e um Professor que inspira... Toda a minha Gratidão.

À Professora Dra. Niede A. J. C. Furtado pela contribuição no projeto ao ceder o fungo *Mucor rouxii* e por gentilmente disponibilizar seu tempo para conversar e trocar ideias sobre os experimentos com os fungos.

À professora Dra. Monica T. Pupo por gentilmente ter cedido os fungos para os estudos de biotransformação e pela contribuição no exame de qualificação.

Às profas. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani e Dra. Maria Eugenia Queiroz Nassur pelas correções e sugestões no exame de qualificação, muito obrigada pelas colaborações.

À professora Dra. Kamilla Swiech Antonietto pela orientação no estágio PAE e pelos conselhos.

Aos colegas de pós graduação pela ajuda nos experimentos e pelos ensinamentos: Leandro Calixto, Rodrigo Almeida e Thiago Barth.

Ao pessoal do laboratório LABMETS: Nayara, Daniel, Viviane, Alana, Simone, Tanize, Mariana, Lídia, Fernanda, Gisele, Marcela, Renan, Lucas Maciel, Bruno e Lucas (Sky).

Ao técnico do LABMETS: Thiago Cavassani pela ajuda e paciência.

Ao pessoal do Departamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo suporte e auxílio no que foi necessário, em especial a Eleni, Rafael e Rosana.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela minha formação no mestrado.

À todos os colegas e professores da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo convívio e aprendizado.

Aos amigos que tornaram a minha vida em Ribeirão Preto mais fácil: Gra, Henry, Ju, Buiú e Gui.

À minha querida amiga Talita por toda a atenção, pelas conversas e conselhos, pela ajuda e por cuidar de mim nos momentos mais difíceis.

A CAPES e FAPESP pelo suporte e auxílio financeiro.

*O coração do homem pode fazer
planos, mas a resposta certa dos lábios vem
do Senhor.
(Provérbios 16:1)*

RESUMO

JESUS, L.I. **Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quirais e ativo 9-hidroxisperidona (paliperidona) e análise por eletroforese capilar.** 2013. 67f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A risperidona (RISP) é um fármaco neuroléptico que após sua administração oral é metabolizado resultando em dois metabólitos quirais, a 7-hidroxisperidona (7-RispOH) e a 9-hidroxisperidona (9-RispOH). A 9-RispOH é o metabólito majoritário da risperidona a qual é comercializada na forma de racemato com o nome de paliperidona. Esse projeto teve como finalidade avaliar a capacidade dos fungos endofíticos *Penicillium crustosum* (VR4), *Chaetomium globosum* (VR10), *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Papulaspora immersa* Hotson (SS13), *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason (SS67) e *Glomerella cingulata* (VA1) e do fungo de solo *Mucor rouxii* em biotransformar a risperidona em seu metabólito ativo 9-RispOH enantiosseletivamente. Foi objeto de estudo também a otimização do processo de biotransformação através do emprego de diferentes meios de cultura (Czapek, Czapek Dox e Koch's K1) para o cultivo dos fungos utilizados no estudo. O método escolhido para a separação da risperidona e seus metabólitos quirais foi a eletroforese capilar (CE). As separações eletroforéticas dos analitos foram realizadas empregando um capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, uma solução tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹ pH 3,0 contendo CD-α-sulfatada 2,0% (p/v) e carboximetil-β-CD 0,5% (p/v) como seletores quirais. Todos os experimentos no CE foram realizados no modo reverso aplicando uma tensão de -10kV. As amostras foram injetadas aplicando uma pressão 0,5 psi por 8 s. O capilar e as amostras permaneceram na temperatura de 20°C. Para a extração dos analitos do meio de cultura foi utilizado a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME). A técnica de preparação de amostra foi realizada no modo de três fases utilizando uma fibra de polipropileno impregnada com n-octanol e preenchida com uma solução de ácido clorídrico 100 mmol L⁻¹ pH 3,0. A fibra foi mergulhada na amostra tamponada com uma solução de fosfato de potássio dibásico 500 mmol L⁻¹ pH 12,0. O método foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para análise de fármacos em material biológico avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade. Todos os parâmetros avaliados ficaram dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA. Entre os fungos avaliados, apenas o *Mucor rouxii* foi capaz de biotransformar a risperidona em seu metabólito ativo e quiral 9-RispOH. Nas condições empregadas a razão enantiomérica foi de 79,6%.

Palavras-chave: Risperidona. Paliperidona. Fungos. Biotransformação. Eletroforese capilar. HF-LPME.

ABSTRACT

JESUS, L.I. **Evaluation of fungi to obtain the chiral and active metabolite 9-hydroxyrisperidone (paliperidone) and analysis by capillary electrophoresis.** 2013. 67f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Risperidone (RISP) is a neuroleptic drug which after oral administration is metabolized into two chiral metabolites, 7-hydroxyrisperidone (7-RispOH) and 9-hydroxyrisperidone (9-RispOH). 9-RispOH is the major metabolite and it is commercialized under the generic name paliperidone. The objective of this project was to evaluate the capability of the endophytic fungi *Penicillium crustosum* (VR4), *Chaetomium globosum* (VR10), *Aspergillus fumigatus* (VR12), *Papulaspora immersa* Hotson (SS13), *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason (SS67) and *Glomerella cingulata* (VA1) and the soil fungus *Mucor rouxii* to biotransform risperidone into its chiral and active metabolite 9-RispOH, enantioselectively. In addition, it was also optimized the biotransformation process through the use of different culture medium (Czapek, Czapek Dox and Koch's K1). The chiral analysis was performed by capillary electrophoresis (CE). The electrophoretic separation of the analytes was accomplished in a silica capillary with 40 cm of length and 75 μm of internal diameter. The background electrolyte was a sodium phosphate 100 mmol L^{-1} pH 3.0 plus 2.0% (w/v) sulfated- α -CD and 0.5% (w/v) carboxymethyl- β -CD. All experiment on CE was performed in reverse mode by applying a voltage of -10 KV. The samples were injected hydrodynamically by applying a pressure of 0.5 psi for 8 s. The temperature of analysis was 20°C. For the extraction of the analytes from the culture medium it was employed the hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME). The extraction conditions were: n-octanol as organic solvent and a hydrochloridric acid solution of 100 mm L^{-1} pH 3.0. The pH of the sample was controlled by the addition of potassium phosphate buffer 500 mmol L^{-1} pH 12.0. The method was validated according to ANVISA guidelines (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) for the analysis of drugs in biological fluids. The following parameters were evaluated: selectivity, linearity, precision, accuracy, limit of quantification and stability. All parameters were in agreement with the established limits by ANVISA. From all the evaluate fungi only *Mucor rouxii* was able to biotransform risperidone into its chiral and active metabolite 9-RispOH. In the conditions used in these project the enantiomeric ratio was 79.6%.

Keywords: Risperidone. Paliperidone. Fungi. Biotransformation. Capillary Electrophoresis. HF-LPME.

1 INTRODUÇÃO

1.1 FÁRMACOS QUIRAIS

Enantiômeros podem ser definidos como um par de espécies moleculares os quais possuem imagens especulares não sobreponíveis, possuindo as mesmas propriedades físico-químicas em ambiente aquiral. Em ambiente quiral, um enantiômero apresenta comportamento químico e farmacológico diferente em relação a outro enantiômero. Organismos vivos são naturalmente quirais, a quiralidade é frequentemente encontrada em enzimas, receptores biológicos e proteínas ligantes. Isso implica que cada enantiômero possui diferentes ações *in vivo*, o que pode acarretar em efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes com impacto na eficácia clínica (McCONATHY; OWENS, 2003; GAL, 2013) como demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema representando as diferentes interações entre enantiômeros de fármacos quirais.

No passado, aspectos estereoespecíficos de fármacos quirais foram ignorados, e a maior razão deste fato foi de ordem econômica, cuja produção de racematos por síntese química em grande escala era mais acessível que a elaboração de produtos enantiomericamente puros (ORLANDO *et al.*, 2007). Uma

conscientização da importância dos fármacos quirais ocorreu a partir da década de 90 em que houve a elaboração de diretrizes por parte das autoridades regulatórias como a FDA (*food and drug administration*) regulamentando a pesquisa e desenvolvimento dessas substâncias. A partir desse momento, a produção de um novo fármaco quiral deve ser acompanhada de um estudo detalhado sobre as implicações da quiralidade molecular sobre os efeitos farmacológicos e toxicológicos no organismo (GAL, 2013). Por outro lado, fármacos já comercializados como racematos estão sendo exaustivamente estudados, no sentido de se avaliar suas propriedades cinéticas e dinâmicas estereosseletivas e verificar se existem vantagens na produção como enantiômero puro. (LIND *et al.*, 2000). O desenvolvimento de fármacos que são originalmente racematos na sua forma enantiomericamente pura é denominado de “*chiral switch*” (NGUYEN *et al.*, 2006).

Para o desenvolvimento e controle de qualidade de um fármaco quiral é necessário avaliar a composição e a pureza dos enantiômeros em produtos sintéticos, formulações farmacêuticas e amostras biológicas. Portanto, métodos analíticos enantiosseletivos para identificação e quantificação de enantiômeros e, adicionalmente, ensaios farmacológicos e toxicológicos devem ser desenvolvidos. Entre os diversos métodos existentes, podemos citar a eletroforese capilar (SCRIBA, 2011; KLERCK *et al.*, 2012).

1.2 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica analítica baseada na separação de analitos que possuem mobilidades diferentes no eletrólito de análise. É efetuada em capilares de diâmetro reduzido (usualmente 25-75 μm de diâmetro interno) preenchidos com a solução eletrolítica e submetidos à alta tensão (geralmente de 5-30 kV) (ESPADA; MOLINA-MARTIN, 2012).

A CE apresenta como vantagens a alta eficiência de separação, baixo consumo de amostras e reagentes e baixo consumo de solventes orgânicos. Além do mais é versátil, simples no uso e possui baixo custo. A composição da solução eletrolítica pode ser ajustada para alcançar os requisitos analíticos necessários para a resolução de compostos em uma mistura complexa, o que demonstra a flexibilidade da técnica (SIMPSON JUNIOR *et al.*, 2008; ESPADA; MOLINA-MARTIN, 2012).

1.2.1 Histórico

A eletroforese é uma técnica de separação que foi descrita primeiramente por Tiselius em 1937, o qual ganhou o prêmio Nobel em 1948 pelo seu trabalho de separação de proteínas plasmáticas. O conceito de separação eletroforética elaborado por Tiselius recebeu pouca atenção até sua descoberta por Hjerten e colaboradores em 1967 que demonstrou pela primeira vez o uso de campos elétricos elevados em eletroforese. A partir disso, CE permaneceu ainda pouco conhecida até Jorgenson e Lukacs na década de 80 aprimorarem a técnica empregando capilares de 75 μm de diâmetro interno. A CE tem chamado a atenção da comunidade científica por ser considerada uma poderosa técnica para a separação e análise de compostos de interesse de diversas áreas como a ambiental, clínica, farmacêutica e industrial (EECKHAUT *et al.*, 2009; TAVARES, 1996).

1.2.2 Instrumentação

A instrumentação da CE é relativamente simples. O equipamento para CE é composto por uma fonte de alta tensão (capaz de gerar uma voltagem de até 30 kV), um capilar (25-100 μm de diâmetro interno), detector e um sistema para aquisição dos dados (O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008). Um equipamento de eletroforese capilar está esquematizado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema de um equipamento de eletroforese capilar

A fonte de alta tensão é aplicada para formar uma corrente elétrica no interior do capilar, sendo ligada a dois eletrodos de platina (ânodo e cátodo) os quais estão mergulhados nos recipientes preenchidos com a solução eletrolítica. A janela de detecção está localizada em uma determinada região do capilar e as informações geradas são processadas por um computador conectado ao sistema. O gráfico resultante da análise é chamado de eletroferograma (BONATO *et al.*, 2005).

1.2.3 Fundamentos Teóricos

Em eletroforese capilar existem dois fatores que são responsáveis pela separação dos analitos no interior do capilar: o fluxo eletroforético e o fluxo eletro-osmótico (EOF). O fluxo eletroforético é a movimento dos íons que ocorre devido à carga e o tamanho do íon sob a influência de um campo elétrico. Dessa forma, considerando dois íons de tamanhos diferentes e mesma carga, o menor se moverá mais rapidamente no interior do capilar (WEINBERGER, 2000), conforme a Equação 1 abaixo:

$$\mu_{ef} = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right) \quad (1)$$

Onde:

- μ_{ef} é a mobilidade eletroforética, q é o número de cargas, η é a viscosidade da solução e r é o raio do íon em solução.

Já o fluxo eletro-osmótico (EOF) funciona como uma “bomba” que arrasta os analitos em direção ao detector (polaridade normal). O fluxo eletro-osmótico inicia-se no ânodo e vai em direção ao cátodo e impulsiona os íons do soluto ao longo do capilar em direção ao detector. O EOF é um movimento da solução que ocorre no interior do capilar devido a ionização dos grupos silanóis residuais presentes na parede do capilar de sílica fundida (WEINBERGER, 2000). Esse grau de ionização depende do pH do meio e do pKa desses grupamentos. A extensão do fluxo está relacionada com a carga no interior do capilar, com a viscosidade e com a constante dielétrica da solução tampão de acordo com a Equação 2 (WHATLEY, 2001):

$$v_{eof} = -(\epsilon\zeta/4\pi\eta)E \quad (2)$$

Sendo que:

- ϵ = Constante dielétrica da solução tampão,
- ζ = potencial zeta da parede do capilar de sílica,
- η = viscosidade da solução tampão e
- E = tensão aplicada.

O EOF é muito dependente do pH do eletrólito de análise pois o potencial zeta é governado pela ionização dos silanóis presentes na parede do capilar, ou seja, é a medida da carga presente na parede do capilar. Abaixo de pH 4 a ionização é pequena e o EOF não é significativo, e em pH acima de 9 os grupos silanóis estão completamente ionizados e o EOF é intenso (ALTRIA, 1996).

A força direcionada do fluxo eletro-osmótico assim como as forças friccionais que surgem da parede do capilar resultam em um fluxo que apresenta um perfil plano, em que a velocidade do fluxo no centro é próxima à velocidade apresentada na parede do capilar (Figura 3B). Não ocorre difusão radial, ao contrário do fluxo gerado por diferença de pressão, como ocorre em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em que a velocidade do fluxo perto da parede da coluna é menor que a velocidade na parte central da coluna (Figura 3A). A difusão radial do analito próximo à parede da coluna e do analito no centro leva à uma menor eficiência na separação. Dessa forma, a CE apresenta uma eficiência de separação melhor que o HPLC (WÄTZIG; GÜNTHER, 2003) como mostra a Figura 3.

A

B

Figura 3 - Perfis do fluxo observados em HPLC (A) e CE (B).

Portanto, o fluxo eletro-osmótico pode possibilitar a separação de cátions e ânions em uma mesma análise, sendo que os cátions migram primeiro por migrarem na mesma direção do fluxo, espécies neutras (que não são separadas) migram junto ao EOF e os ânions mais lentamente devido aos seus movimentos eletroforéticos serem opostos ao EOF como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Esquema de separação dos analitos com diferentes tamanhos e cargas em CE.

1.2.4 Análise Enantiosseletiva por Eletroforese Capilar

Além dos métodos cromatográficos, as técnicas de eletromigração vêm mostrando ser uma poderosa ferramenta para separações quirais e por isso têm

despertado o interesse na indústria e nos centros de pesquisa. Usualmente em eletroforese capilar, a separação dos enantiômeros é realizada pela adição de seletores quirais ao eletrólito de análise. Diversos seletores quirais podem ser empregados, como ciclodextrinas, antibióticos macrocíclicos, proteínas, polissacarídeos e outros. Contudo, as ciclodextrinas se destacam (GÜBITZ; SCHMID, 2008).

1.2.4.1 Ciclodextrinas

Há diversos tipos de seletores quirais, mas a eficiência destes depende de alguns requisitos, tais como: não podem interferir na detecção; devem ser solúveis e estáveis no eletrólito de análise; devem interagir de forma diferente com cada enantiômero, formando diastereoisômeros. Entre todos esses requisitos, as ciclodextrinas cumprem grande parte deles. As ciclodextrinas (CDs), podem ser α -, β - ou γ -CD, formadas por seis, sete e oito unidades de glicopiranoses, respectivamente (SANTANA *et al.*, 2009). A forma das ciclodextrinas é semelhante a um cone truncado, onde existe uma cavidade hidrofóbica e um exterior hidrofílico.

Para a resolução enantiosseletiva com CDs é necessário formar um complexo de inclusão entre o analito e a CD, ou seja, o analito deve entrar na cavidade hidrofóbica da CD, e formar interações secundárias com os grupos hidroxilas existentes na periferia. Isso somente é possível se todo analito, ou ao menos parte deste, conseguir um encaixe nesta cavidade. São estas interações as responsáveis pela diferença posterior entre os enantiômeros no tempo de migração, pois um enantiômero que formar um complexo de inclusão mais estável nesta cavidade hidrofóbica levará um tempo maior para migrar e, portanto a separação entre os enantiômeros torna-se possível (GÜBITZ; SCHMID, 2010).

As CDs podem ser derivatizadas melhorando sua solubilidade e seu poder de separação. Existem ciclodextrinas neutras, e também carregadas positivamente ou negativamente. As CDs neutras apenas podem resolver analitos carregados, e estão entre as mais comuns: heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -CD e heptakis (2,6-di-O-metil)- β -CD. As principais CD aniônicas são a carboximetil- β -CD, CD- β -sulfatada e a sulfobutiléter- β -CD. Uma das principais CD catiônicas é a 2-hidroxipropil-trimetilamônio- β -CD (DE SANTANA *et al.*, 2009; GÜBITZ; SCHMID, 2010). As ciclodextrinas carregadas podem separar analitos neutros ou ionizados.

1.3 ANÁLISE DA RISPERIDONA E SEUS METABÓLITOS QUIRAIS EM MATRIZES BIOLÓGICAS: REVISÃO DA LITERATURA

Metodologias analíticas foram desenvolvidas para a quantificação da risperidona (RISP) e a 9-hidroxirisperidona (9-RISPOH) (YASUI-FURUKORI *et al.*, 2001; DANIEL *et al.*, 2007; LOCATELLI *et al.*, 2009; BOCATO *et al.*, 2012) em matrizes complexas. Esses métodos empregam como instrumentos de análise sistemas cromatográficos (HPLC-UV; HPLC-ECD; LC-MS/MS) e sistemas eletroforéticos (CE). Um estudo comparativo do perfil farmacocinético da RISP e 9-RispOH empregando microssomas hepáticos humanos e amostras de plasma de 18 pacientes que estavam em tratamento com a risperidona foi feito pelo grupo de Yasui-Furukori *et al.* (2001). Nesse estudo foi empregado a extração líquido-líquido para a preparação das amostras e HPLC com uma coluna quiral a base de glicoproteína para análise. Foi constatado que o enantiômero (+)-9-RispOH prevaleceu em relação ao (-)-9-RispOH tanto nas amostras dos microssomas como nas de plasma de pacientes. No trabalho do grupo de DANIEL e colaboradores (2007) foi desenvolvido duas metodologias para a determinação da pureza enantiomérica da 9-RispOH empregando HPLC e eletroforese capilar para a enantiosseparação. Ambas metodologias mostraram ser eficientes para a detecção, quantificação e avaliação do grau de pureza dos enantiômeros da 9-RispOH. Outro estudo realizado com plasma humano para a determinação da RISP e da 9-RispOH empregando HPLC com detector eletroquímico (ECD) foi realizado por Locatelli *et al.* (2009). Nesse estudo os autores utilizaram como técnica de preparação de amostras a extração em fase sólida. Os resultados mostraram maior prevalência do enantiômero (+)-9-RispOH no plasma. Estudos de biotransformação estereosseletiva da RISP empregando fungos e LC-MS/MS foram realizados por Bocato *et al.* (2012). Nesse estudo empregou-se a SPME como técnica de preparação de amostra e a biotransformação foi realizada pelo fungo *Cunninghamella echinulata* apresentando razão enantiomérica de 100% para (+)-9-RispOH.

1.4 BIOTRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR MICRO-ORGANISMOS

A biotransformação pode ser definida como o uso de sistemas biológicos para a produção de compostos químicos ou substratos não naturais (BORGES *et al.*, 2009). A biocatálise se tornou uma ferramenta valiosa para a preparação de compostos quirais, os quais são extremamente necessários em síntese orgânica, assim como nas áreas farmacêutica e agroquímica, devido estes compostos apresentarem grandes diferenças na atividade biológica de seus enantiômeros. Nessas conversões, um composto em particular é modificado através das transformações de seus grupos funcionais, as quais são difíceis ou impossíveis de alcançar através de procedimentos de química convencional. Além do mais, as biotransformações possuem grande potencial pois configura-se como uma metodologia sustentável para a produção química, sendo denominada de química verde (SORTINO; ZACHINNO, 2010). As grandes vantagens do uso da biocatálise nos processos de biotransformação são as condições relativamente brandas dos procedimentos, ambientalmente seguro e, especialmente, por apresentar alta seletividade. Muitas reações metabólicas em mamíferos de fase I como a hidroxilação, O- e N-dealquilação, ocorrem também em modelos microbiológicos. Dessa forma, a utilização de sistemas microbiológicos como modelos biomiméticos para prever o metabolismo de fármacos em humanos e animais têm recebido considerável atenção. Fungos têm sido usados com sucesso na biotransformação de alguns compostos. Além do mais, reações quimio-, regio- e estereosseletivas empregando-se fungos têm sido estudadas (BORGES *et al.*, 2011; HILARIO *et al.*, 2012; CARRÃO *et al.*, 2011; BOCATO *et al.*, 2012). Estes são capazes de gerar quantidades significativas de metabólitos, os quais são iguais aos gerados por humanos e animais, como também a formação de novos metabólitos. O custo e o tempo requeridos para a produção destes compostos é menor quando comparado com o emprego de técnicas que envolvem o uso de animais, culturas de células e sistemas enzimáticos de mamíferos (MOODY *et al.*, 2002).

1.4.1 Biotransformação Estereosseletiva mediada por Fungos

Diversos estudos enantiosseletivos vêm sendo realizados empregando fungos no processo de biotransformação. Salvi e Chattopadhyay (2008)

estabeleceram em seus estudos que o fungo *Rhizopus arrhizus* apresenta grande versatilidade para a redução estereosseletiva de uma ampla variedade de cetonas e ceto-ésteres. Ravia *et al.* (2009) relataram que os fungos *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus terreus*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma koningii* e *Aspergillus niger* promoveram a redução diastereo- e enantiosseletiva da 2-metil-3-oxobutanoato de etila para seus correspondentes (R,S)-3-hidroxi-2-metil-ésteres. Pinedo-rivilla *et al.* (2009) demonstraram o potencial biocatalítico dos fungos filamentosos *B. cinerea*, *T. viride*, *E. lata*, *C. crassipes* e *Xylaria sp.* em obter compostos com alta pureza enantiomérica a partir da biotransformação de cetonas pró-quirais. BARTH e colaboradores (2010) descreveram que o fungo *Phomopsis sp.* isolado da planta *Tithonia diversifolia*, foi capaz de converter estereosseletivamente o fármaco midodrina em desglimidodrina. Carrão *et al.* (2011) desenvolveram um método que envolve o uso da microextração em fase líquida e da eletroforese capilar para a determinação enantiosseletiva do metabólito ativo albendazol sulfóxido, após este ser biotransformado pelo fungo endofítico *Penicillium crustosum*, sendo que o fungo foi capaz de metabolizar o fármaco modelo albendazol em albendazol sulfóxido enantiosseletivamente. Borges *et al.* (2011) investigaram a habilidade do fungo endofítico *Nigrospora sphaerica* e *Chaetomium globosum* em biotransformar o fármaco quiral ibuprofeno nos seus metabólitos, obtendo uma grande formação do metabólito (+)-(S)-2-hidroxiibuprofeno. A Tabela 1 resume alguns estudos enantiosseletivos de biotransformação empregando fungos.

Tabela 1 - Estudos de biotransformação empregando fungos.

Fármaco	Fungo	Metabólito	Referência
Ibuprofeno	<i>Chaetomium globosum</i>	(+)-(S)-2-hidroxi-ibuprofeno	BORGES <i>et al.</i> , 2011
	<i>Nigrospora sphaerica</i>	(+)-(S)-2-hidroxi-ibuprofeno	
Midrodina	<i>Phomopsis sp</i>	Desmidrodina	BARTH <i>et al.</i> , 2011
Albendazol	<i>Penicillium crustosum</i>	(-)-albendazol sulfóxido	CARRÃO <i>et al.</i> , 2011
Risperidona	<i>Cunninghamella echinulata</i>	(+)-9-hidroxisperidona	BOCATO <i>et al.</i> , 2012
	<i>Cunninghamella elegans</i>	(+)/(–)-9-hidroxisperidona	
Albendazol	<i>Nigrospora sphaerica</i>	(+)-albendazol sulfóxido	HILÁRIO <i>et al.</i> , 2012
	<i>Pestalotiopsis foedans</i>	(+)-albendazol sulfóxido	
	<i>Papulaspora immersa</i>	(+)-albendazol sulfóxido	

1.5 FÁRMACO EMPREGADO NO ESTUDO

A risperidona é um agente neuroléptico atípico que antagoniza os receptores dopamina (D_2) e serotonina ($5-HT_{2A}$) seletivamente. Este medicamento foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos para o tratamento da esquizofrenia, desordens bipolares e irritabilidade associada ao autismo em crianças e adolescentes. Este fármaco apresenta poucos efeitos adversos extrapiramidais se comparado com outros antipsicóticos típicos. Após sua administração oral, a risperidona sofre uma extensiva hidroxilação estereosseletiva na posição 9 acarretando a formação da (+/-)-9-hidroxirisperidona, sendo que a (-)-9-hidroxirisperidona é o enantiômero predominante. Entretanto, ocorre também durante a metabolização da risperidona uma hidroxilação, em menor extensão, na posição 7 levando a formação de dois enantiômeros inativos, a (+/-)-7-hidroxirisperidona como demonstrado na Figura 5 (BOOLENG *et al.*, 2010; LOCATELLI *et al.*, 2009). Atualmente, o metabólito ativo, 9-hidroxirisperidona, já é comercializado como medicamento na forma de racemato com o nome genérico de paliperidona.

Figura 5 - Risperidona e seus metabólitos. * Centro quiral

De acordo com os estudos *in vitro* e *in vivo*, o citocromo P450 (CYP) 2D6 é o responsável pelo metabolismo da risperidona para a formação da paliperidona. A paliperidona alcança altas concentrações no plasma e no cérebro sendo um fármaco antipsicótico potente. Ambos os fármacos (risperidona e paliperidona) apresentam propriedades de ligação aos receptores e efeitos clínicos similares (SUZUKI *et al.*,

2012; KOZIELSK *et al.*, 2012). Ainda não há relato na literatura de diferenças na farmacodinâmica nos enantiômeros da paliperidona.

1.6 PREPARO DA AMOSTRA

Técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (CE) são adequadas para a análise de amostras contendo inúmeros componentes. Contudo, a determinação de analitos presentes em matrizes complexas (plasma, soro, urina, tecido, água, solo entre outras) requer processos prévios de preparação das amostras bem elaborados. A preparação de amostras é a obtenção, através de um processo de extração, de uma sub-fração da amostra complexa enriquecida com as substâncias de interesse analítico para que se obtenha uma compatibilidade com o sistema de detecção e uma separação cromatográfica livre de interferentes com detecção adequada e um tempo razoável. Vários motivos justificam este procedimento, destacando-se a necessidade de eliminação prévia de parte dos componentes devido à complexidade das matrizes (interferentes biológicos, ambientais, entre outros), além da necessidade de concentração das substâncias a serem analisadas que estão geralmente presentes em nível de traços (OLIVEIRA *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2001). Diversas técnicas de preparação de amostras podem ser empregadas, tais como a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida e a precipitação proteica. Além disso, técnicas miniaturizadas vêm sendo desenvolvidas, na tentativa de aumentar a seletividade no processo e diminuir o consumo de solventes orgânicos. Entre essas microtécnicas, a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME) vem se destacando.

1.6.1 HF-LPME

A HF-LPME é uma técnica de preparo de amostra baseada em uma membrana capilar porosa e hidrofóbica (fibra oca) que fica conectada a duas microponteiras ou microseringas. Os poros dessa fibra são impregnados com um solvente orgânico adequado para a extração. O excesso de solvente presente na superfície da fibra é posteriormente removido e o seu interior é preenchido com microlitros de uma fase aceptora (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

No processo de extração, os analitos migram através dos poros, passam pelo solvente orgânico e são concentrados na fase aceptora (Figura 6).

Figura 6 - Diagrama de um dispositivo para HF-LPME

Há duas configurações principais em que a HF-LPME é empregada: (i) configuração em “U” na qual é empregado duas microseringas ou microponteiras conectadas a fibra e a (ii) configuração do tipo haste (“rod like”) em que apenas uma microseringa ou microponteira é empregada para suportar a membrana de polipropileno (Figura 7). Atualmente as microseringas vêm sendo completamente substituídas pelo uso de microponteiras. As microseringas são utilizadas apenas para inserir a fase aceptora no lúmen da fibra e retirar o que foi extraído da amostra através da sua inserção na ponteira. É muito importante destacar que esta substituição da microseringa pela ponteira possibilita o aumento substancial do número de extrações (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Figura 7 - Configurações da HF-LPME. (A) Em “U” e (B) Tipo haste.

1.6.1.1 Modos de Extração

A HF-LPME possui dois modos de extração: o modo de duas fases e o modo de três fases.

No sistema de duas fases, o analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora) e coletado pela fase orgânica. A solução aceitadora é constituída pelo mesmo solvente que é impregnado nos poros da parede da fibra. O equilíbrio que existe entre o analitos nas duas fases está representado abaixo:

O modo de duas fases deve ser aplicado para analitos que possuem alta solubilidade em solventes orgânicos apolares.

Alternativamente, a solução aceitadora pode ser aquosa, com pH oposto ao da solução doadora caracterizando assim o sistema de três fases. Nesse modo os analitos são extraídos da amostra aquosa (fase doadora) através da fina camada de solvente orgânico formada nos poros da fibra e posteriormente “concentrada” na solução aquosa presente na aceitadora.

Analito na fase doadora $\rightleftharpoons$ Analito na fase orgânica $\rightleftharpoons$ Analito na fase aceptora

Este modo de extração é limitado a analitos que são ionizáveis. Para a extração de analitos básicos, por exemplo, o pH da amostra deve ser ajustado para uma região alcalina (evitando dessa forma a ionização do analito básico) que promove a extração através da fase orgânica; enquanto que na fase aceptora o pH deve ser ácido (ionização do composto básico) para que o analito fique aprisionado no lúmen da fibra e a extração seja eficiente. Os sistemas de HF-LPME de duas e três fases são baseados na difusão passiva, onde a extração requer coeficientes de partição altos das amostras para a fase aceptora (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

1.6.1.2 Principais parâmetros otimizados na HF-LPME

1.6.1.2.1 Solvente orgânico

Os solventes orgânicos utilizados para impregnar a fibra devem possuir algumas características. Devem ser imiscíveis em água para evitar perda do solvente, além disso, este necessita ser fortemente imobilizado nos poros da fibra oca para prevenir perdas durante a extração. O solvente deve propiciar uma seletividade adequada para o analito de interesse a fim de promover altas recuperações deste (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Os solventes mais utilizados para a extração são o éter diexílico e o n-octanol, outros também utilizados são o tolueno, acetato de hexila, éter dibutílico e butil acetato. Em todos os casos, um solvente de baixa volatilidade é recomendado para evitar perdas durante a extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

1.6.1.2.2 Tempo de agitação

A amostra é submetida a agitação durante um determinado período afim de que ocorra o equilíbrio do analito nas fases e fim da extração. Após atingir o equilíbrio, tempos de extração prolongados não fornecem nenhum ganho adicional na recuperação dos analitos. No entanto, existem trabalhos que demonstram que a

extração pode ser feita em tempos de não equilíbrio, controlando-se precisamente as condições experimentais (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

A agitação facilita a difusão dos analitos através da interface fase doadora / solvente orgânico. Com isso, diminui-se o tempo necessário para atingir o equilíbrio. Pode ser utilizado para a agitação: o agitador do tipo “vibrax” ou a barra magnética, mas esta última possui algumas desvantagens como a contaminação cruzada das amostras, devido a utilização da mesma barra magnética e a formação de bolhas de ar que aceleram o processo de evaporação do solvente (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

1.6.1.2.3 pH

O ajuste de pH tanto da fase doadora como da aceptora é necessário para proporcionar elevados fatores de enriquecimento e de recuperação do analito de interesse, principalmente no modo três fases (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2005).

Para a extração de compostos básicos, o pH na amostra (fase doadora) deve ser ajustado na região alcalina para que o analito permaneça na forma não ionizada, atinja o solvente orgânico e, posteriormente, a fase aceptora. Por outro lado, o pH da fase aceptora deve ser ajustada para a região ácida para que o analito na forma ionizada não volte para o solvente orgânico. Para analitos ácidos o ajuste de pH é feito de forma contrária a descrita. O ajuste de pH também é necessário na HF-LPME de 2 fases, na qual a fase doadora tem que ser ajustada em um pH ideal que mantenha o analito na forma não-ionizada para que ele seja extraído (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2005).

1.6.1.2.4 Aditivos na fase doadora

A adição de sais à matriz leva ao efeito de *salting-out*. Neste processo, as moléculas de água da fase doadora passam a hidratar também os íons adicionados levando a redução de moléculas do analito dissolvido na solução aquosa por mecanismos de competição. Com isso, a eficiência da extração de analitos mais polares pode aumentar, já que assim o analito fica livre para passar para o solvente orgânico (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

REFERENCIAS

AGRAWAL, Y. K.; BHATT, H. G.; RAVAL, H. G. Chirality – a new era of therapeutics. **Mini Reviews Medicinal Chemistry**, Oak Park, v. 7, p. 451-460, 2007.

AL AZZAM, K. M.; MAKAHLEAH, A.; SAAD, B.; MANSOR, S. M. Hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of trace amounts of rosiglitazone (anti-diabetic drug) in biological fluids using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatographic. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 23, p. 3654-3659, 2010.

ALTRIA, K. D. Fundamentals of capillary electrophoresis theory In: _____. **Capillary Electrophoresis Guidebook**: principles, applications and operation. Totowa: Humana Press Inc, 1996. p. 3-13.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. RE N°99, de 29 de maio de 2003. Brasília, 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 10 fev. 2011.

ATLAS, R. M. **Handbook of Microbiological Media**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

BARTH, T.; ALEU, J.; PUPO, M. T.; *et al.* HPLC analysis of midodrine and desglymidodrine in culture medium: evaluation of static and shaken conditions on the biotransformation by fungi. **Journal of Chromatographic Science**, v. 1, n. 163, 2012.

BARTH, T.; PUPO, M. T.; BORGES, K. B.; OKANO, L. T.; BONATO, P. S. Stereoselective determination of midodrine and desglymidodrine in culture medium: application to a biotransformation study employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 31, n.9, p. 1521-1528, 2010.

BENES, M.; ZUSKOVA, I.; SYBODOVA, J.; GAS, B. Determination of stability constants of complexes of neutral analytes with charged cyclodextrins by affinity capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weiheim, v. 33, p. 1032-1039, 2012.

BOCATO, M. Z.; SIMÕES, R. A.; CALIXTO, L. A.; *et al.* Solid phase microextraction and LC-MS/MS for the determination of paliperidone after stereoselective fungal

biotransformation of risperidone. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 742, p. 80-89, 2012.

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

BORGES, K. B.; DÚRAN-PATRÓN, R.; SÁNCHEZ, A. J. M.; *et al.* Fast HPLC analysis of omeprazole, 5-hydroxyomeprazole and omeprazole sulfone in liquid culture medium using monolithic column for application in biotransformation studies with fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 6, p. 1140-1149, 2011.

BORGES, K. B.; OLIVEIRA, A. R. M.; BARTH, T.; *et al.* LC-MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing fungi. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, Heildenberg, v. 399, p. 915-925, 2011.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRÓN, R.; *et al.* Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, Philadelphia, v. 20, p. 385–397, 2009.

BOOLENG, J.; PIPATRATTANASEREE, W.; THANTANA, C.; MAHATTHANATRAKUL, W. Relative bioavailability and pharmacokinetic comparison of two 2-mg risperidone tablet formulations: a single dose, a randomized-sequence, double blind, 2 way crossover study in healthy male volunteers in Thailand. **Clinical Therapeutics**, Philadelphia, v.32 (10), p. 1842 - 1856, 2010.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

CALDWEL, J.; WAINER, I. W. Stereochemistry: definitions and a note on nomenclature. Human Psychopharmacology. **Clinical and Experimental**, Weinheim, v. 16, p. 105-107, 2001.

CALDWEL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drugs metabolism. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.694, p.39-48, 1995.

CAPEL, C. S.; SOUZA, A. C. D.; CARVALHO, T. C.; *et al.* **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heildenberg, v. 38, n. 1, p. 1493-1498, 2011.

CARVALHO, T. C.; POLIZELI, A. M.; TURATTI, I. C. C.; *et al.* Screening of filamentous fungi to identify biocatalysts for lupeol biotransformation. **Molecules**, Basel, v. 15, n.1, p. 6140-6151, 2010.

CARRÃO, D. B.; BORGES, K. B.; BARTH, T.; *et al.* Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 32, n. 19, p. 2746-2756, 2011.

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

CIANCIULLI, C.; WÄTZIG, H. Infrared-based temperature measurements in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 32, p. 1530-1536, 2011.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 8, p. 881-885.

DANEL, C.; AZAROUAL, N.; BRUNEL, A.; *et al.* Configurational stability of 9-hydroxyrisperidone. Kinetics and mechanism of racemization. **Tetrahedron: Asymmetry**, Philidelphia, v. 20, p. 1125-1131, 2009.

DANEL, C.; BARTHÉLÉMY, C.; AZARZAR, D.; *et al.* Analytical and semi-preparative enantioseparation of 9-hydroxyrisperidone, the main metabolite of risperidone, using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Validation and determination of enantiomeric purity. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1163, p. 228-236, 2007.

EECKHAUT, A. V.; MICHOTTE, Y. Pharmacological importance of chiral separations In: _____. **Chiral Separations by Capillary Electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 1-18.

ESPADA, A.; MOLINA-MARTIN, M. Capillary electrophoresis and small molecule drug discovery: a perfect match? **Drug Discovery Today**, Philidelphia, v.7, p. 396-404, 2012.

FDA. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, 2001. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em 10 junho de 2011.

GAL, J. Molecular Chirality: Language, History and Significance. **Topics in Current Chemistry**, Heidelberg, 2013.

GÜBTIZ, G.; M. G. SCHMID. Cyclodextrin mediated chiral separations. In: EECKHAUT, A. V.; MICHOTTE, Y. **Chiral Separations by Capillary Electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 3. p. 47-86.

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

HARRIS, D. C. Métodos cromatográficos e eletroforéticos In: _____. **Análise Química Quantitativa**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. cap. 26, p. 643-648.

HILÁRIO, V. C.; CARRÃO, D. B.; BARTH, K. B.; *et al.* Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 61, p. 100-107, 2012.

HUTT, A.J.; TAN, S.C. Drug chirality and its clinical significance. **Drugs**, Heildenberg, v. 52, p. 1-12, 1996.

KLERCK, K.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y. V. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 69, p. 77-92, 2012.

KOZIELSKA, M.; JOHNSON, M.; REDDY, V. P.; *et al.* Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling of the D₂ and 5-HT_{2A} receptor occupancy of risperidone and paliperidone in rats. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 29, n. 7, p. 1932-1948, 2012.

LIND, T.; RYDBERG, L.; KYLEBACK, A. *et al.* Esomeprazole provides improved acid control vs. omeprazole In patients with symptoms of gastro-oesophageal reflux disease. **Alimentary Pharmacological Therapeutics**, Oxford, v.14, p.861-867, 2000.

LOCATELLI, I.; MRHAR, A.; GRABNAR, I. Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone enantiomers in human blood plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.50, n. 1, p.905-910, 2009.

MAGALHÃES, I.; BONATO, P. S. Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the enantioselective analysis of mefloquine in plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 46, n.5, p. 929-936, 2008.

MAGALHÃES, I. R. S.; JABOR, V. A. P.; FARIA, A. M.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; BONATO, P. S. Determination of b-artemether and its main metabolite dihydroartemisinin in plasma employing liquid-phase microextraction prior to liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis. **Talanta**, Philidelphia, v. 81, p. 941-947, 2010.

MARTINS, M. P. **Biotransformação de epóxidos com fungos de origem marinha e síntese de cloridrinas**. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 2008.

McCONATHY, J.; OWENS, M. J. Stereochemistry in drug action. **Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry**, Bethesda, v. 5, p. 70-73, 2003.

MORAES, M. L. L.; MORAES, S. L.; PEREIRA, E. A.; *et al.* Estratégias de pré-concentração em em eltroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Química Nova**, São Paulo, v.32, p.1041-1046, 2009.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; FU, P. P.; *et al.* Biotransformation of mirtazapine by *cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 30, n.11, p. 1274-1279, 2001.

NÉMETH, K.; TÁRKÁNYI, G.; VARGA, E.; *et al.* Enantiomeric separation of antimalarial drugs by capillary electrophoresis using neutral and negatively charged cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 54, p. 475-481, 2011.

NGUYEN, L. A.; PHAM-HUY, CHUONG. Chiral Drugs: An Overview. **International Journal of Biomedical Science**, Pomona, v.2, p.85-100, 2006.

O'FLAHERTY, B.; NUNNALLY, B. K. Equipment considerations for capillary electrophoresis In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M. I. **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 43-62.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. DOS S.; *et al.* Liquid-phase microextraction (LPME): Fundamentals and applications to the analysis of drugs in biological samples. **Quimica Nova**, São Paulo, v.31, p.637-644, 2008.

ORLANDO, R. M.; FILHO, N. C.; GIL, E. S.; *et al.* Importância farmacêutica de fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. IV, n.1, p. 8-14, 2007.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 817, p. 3-12, 2005.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, Philadelphia, v.165, p. 216-224, 2007.

PINEDO-RIVILLA, C.; CAFÊU, M. C.; CASATEJADA, J. A.; *et al.* Asymmetric microbial reduction of ketones: absolute configuration of trans-4-ethyl-1-(1S-hydroxyethyl)cyclohexanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, Philadelphia, v. 20, p. 2066–2072, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 68-76, 2001.

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

RAVÍA, S. P.; CARRERA, I.; SEOANE, G. A.; *et al.* Novel fungi-catalyzed reduction of α -alkyl- β -keto esters. **Tetrahedron: Asymmetry**, Philadelphia, v. 20, p. 1393–1397, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SALVI, N. A.; CHATTOPADHYAY, S. Asymmetric reduction of halo-substituted arylalkanones with *Rhizopus arrhizus*. **Tetrahedron: Asymmetry**, Philadelphia, v. 19, p. 1992–1997, 2008.

SANTANA, F. J. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; FONSECA, P.; *et al.* 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. p. 19-49.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Philadelphia, v. 29, n.1, p. 1-14, 2010.

SCRIBA, G. K. E. Chiral recognition mechanisms in analytical separation sciences. **Chromatographia**, Heildenberg, v. 75, p. 815-838, 2012.

SCRIBA, G. K. E. Fundamental aspects of chiral electromigration techniques and application in pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 35, p. 688-701, 2011.

SERVAIS, A. C.; FILLET, M. Application of dual cyclodextrin systems in capillary electrophoresis enantioseparations. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 970, n.3, p. 289-295, 2013.

SERVAIS, A-C.; CROMMEN, J.; FILLET, M. Factor influencing cyclodextrins-mediated chiral separations In: EECKHAUT, A.V.; MICHOTTE, Y. **Chiral Separations by Capillary Electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 4, p. 87-104.

SHRIVAS, K.; PATEL, D. K. Liquid-phase microextraction combined with gas chromatography mass spectrometry for rapid determination of nicotine in one-drog of nightshades vegetables and commercial food products. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 122, p. 314-318, 2010.

SIMPSON JUNIOR, S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. **Journal of chromatography A**, Amsterdam, v. 1184, p. 504-541, 2008.

SORTINO, M.; ZACHINNO, S. A. Efficient asymmetric hydrogenation of the C–C double bond of 2-methyl- and 2,3-dimethyl-N-phenylalkylmaleimides by *Aspergillus fumigatus*. **Tetrahedron: Asymmetry**, Philadelphia, v. 21, p. 535–539, 2010.

SUZUKI, Y.; FUKUI, Y.; WATANABE, J.; *et al.* QT prolongation of the antipsychotic risperidone is predominantly related to its 9-hydroxy metabolite paliperidone. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, Weinheim, v. 27, p. 39-42, 2012.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n.2, p. 173-181, 1996.

VAN EECKHAUT, A.; MICHOTTE, Y. Chiral Separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 27, p. 2880-2895, 2006.

WÄTZIG, H. Validation of analytical methods using capillary electrophoresis In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M. I. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis**. San Diego: Academic Press, 2008. cap. 10, p. 225-244.

WÄTZIG, H.; GÜNTER, S. Capillary electrophoresis – a high performance analytical separation technique. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 41, n.6, p. 724-738, 2003.

.

WEINBERGER, R. Capillary zone electrophoresis: basic concepts In: _____. **Practical Capillary Electrophoresis**. San Diego: Academic Press, 2000. cap. 2, p. 25-72.

WHATLEY, H. Basic principles and modes of capillary electrophoresis In: PETERSEN, J. R.; MOHAMMAD, A. A. **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. Totowa: Humana Press Inc, 2001. cap. 2, p. 21-59.

YASUI-FURUKORI, N.; HIDESTRAND, M.; SPINA, E.; *et al.* Different enantioselective 9-hydroxylation of risperidone by the two human CYP2D6 and CYP3A4 enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 29, n.9, p. 1263-1268, 2001.