



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

**Desenvolvimento de métodos cromatográficos e eletroforéticos
enantiosseletivos para análise de fármacos e praguicidas em
estudos de biotransformação e metabolismo in vitro**

Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

Texto sistematizado apresentado à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para o Concurso de Livre Docente junto ao Departamento de Química, na Área de Conhecimento Química Analítica, Especialidade I: Química Analítica Instrumental – Técnicas de Separação, Espectroanalíticas e de Preparação de Amostras (Edital ATAc 006/2020)

Ribeirão Preto

Maio de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

*a minha esposa, Franciane, por estar sempre ao meu
lado e acreditar em mim, mais do que eu mesmo próprio
acredito*

*as minhas filhas Clarinha e Bia por ser a luz que ilumina
minha vida*

*ao meu pai e meu melhor amigo, Nílo, por ser a minha
inspiração de ser humano*

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Aos meus alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado por acreditarem e confiarem a mim parte da sua formação. O trabalho apresentado nesse texto só foi possível graças ao empenho e dedicação deles.

À Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato por todos seus ensinamentos e por ter me apresentado essa área fantástica da ciência.

À minha amiga, Profa. Dra. Marilda da Dolores Assis, pelos ensinamentos, pelo companheirismo e pelas risadas. Trabalhar ao seu lado foi fantástico!!!

À minha amiga, Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, pelas valiosas discussões científicas.

Aos meus amigos (e ex-companheiros de laboratório), Profs. Leandro Calixto, Thiago Barth e Rodrigo Simões, por todo apoio durante o início da minha carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas da Química Analítica, Zéfer, Yassuko, Adalgisa, Márcia, Lúcia, Bruno, Maria Eugênia e Marcelo, pelo acolhimento no momento da minha chegada ao Departamento de Química.

A Mércia por todo apoio que vem dando ao nosso grupo de pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto: Isabel, Lâmia, Josimara, André e Hélio, por todo o apoio.

Às agências de fomento, FAPESP, CNPq e CAPES, pelo essencial apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema da importância do desenvolvimento e validação dos métodos analíticos nos estudos propostos. | 5 |
| Figura 2. Esquema da HF-LPME em duas e três fases. | 18 |
| Figura 3. Estrutura química da risperidona e seus metabólitos. | 34 |
| Figura 4. Eletroferograma da risperidona e seus metabólitos. | 40 |
| Figura 5. Parâmetros avaliados na HF-LPME. | 42 |
| Figura 6. Representação da HF-LPME. | 45 |
| Figura 7. Separação dos analitos na coluna Chiralcel OJ-H e análise por LC-MS/MS. | 47 |
| Figura 8. Fibras avaliadas na extração dos analitos. | 50 |
| Figura 9. Representação da SPME. | 51 |
| Figura 10. Parâmetros avaliados na SPME. | 52 |
| Figura 11. Cromatogramas representativos dos estudos de biotransformação. | 55 |
| Figura 12. Estrutura química do albendazol e de seus metabólitos. | 57 |
| Figura 13. Eletroferogramas representativos da análise dos metabólitos do ABZ. | 60 |
| Figura 14. Avaliação do tipo solvente orgânico utilizado na HF-LPME. | 61 |
| Figura 15. Parâmetros avaliados na HF-LPME para extração dos metabólitos do ABZ do meio de cultura. | 63 |
| Figura 16. Separação do albendazol e seus metabólitos. | 65 |
| Figura 17. Avaliação do modo 2 fases na extração do ABZ e seus metabólitos. | 66 |
| Figura 18. Gráfico da concentração logarítmica <i>versus</i> tempo de incubação referente ao processo de biotransformação da ABZ por fungos. | 69 |
| Figura 19. Cromatograma relativo à biotransformação do ABZ, após 144 h de incubação, pelo fungo <i>Mucor rouxii</i> | 70 |
| Figura 20. Metabolismo da zopiclona. | 71 |
| Figura 21. Estrutura química e valores de pKa e logP. | 74 |
| Figura 22. Influência do valor de pH na separação da ZO, N-Des e N-Ox. | 75 |
| Figura 23. Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva da ZO, N-Des e | |

| | |
|--|-----|
| N-Ox. padrão interno mirtazapina. | 76 |
| Figura 24. Avaliação da combinação de solventes extrator/dispersor na extração da ZO e N-Des em meio de cultura líquido. | 78 |
| Figura 25. Avaliação dos volumes dos solventes extrator e dispersor na extração dos analitos do meio de cultura. | 79 |
| Figura 26. Eletroferograma representativo da biotransformação da ZO pelo fungo <i>Cunninghamella echinulata var. elegans</i> ATCC 8688A após 360 h de incubação. | 81 |
| Figura 27. Estrutura química do fenamifós e seus metabólitos. | 87 |
| Figura 28. Cromatograma referente à análise quiral do fenamifós, fenamifós sulfóxido e fenamifós sulfona empregando a coluna Chiralpak AS-H em fase normal. | 90 |
| Figura 29. Foto do acoplamento <i>in-line</i> das colunas quiral e aquiral para análise do FS e seus metabólitos. | 90 |
| Figura 30. Cromatograma referente à análise quiral do FS, FSO e FSO ₂ empregando as colunas Chiralpak AS-H e Lichrosorb Si60 em fase normal. ... | 91 |
| Figura 31. Contribuição das isoformas do CYP450 no metabolismo do fenamifós. | 99 |
| Figura 32. Reações de degradação e estruturas químicas dos principais metabólitos do fipronil. | 103 |
| Figura 33. Cromatogramas representativos das melhores condições analíticas obtidas para análise dos enantiômeros do fipronil. | 105 |
| Figura 34. Cromatograma representativo da análise enantiosseletiva do fipronil e seus metabólitos. | 107 |
| Figura 35. Determinação das principais isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do <i>rac</i> -fipronil, <i>S</i> -fipronil e <i>R</i> -fipronil. | 111 |
| Figura 36. Estrutura química do miclobutanil. | 115 |
| Figura 37. Cromatograma referente a separação enantiosseletiva do miclobutanil. | 117 |
| Figura 38. Cromatograma referente a análise enantiosseletiva do miclobutanil por LC-MS/MS no modo MRM. | 119 |
| Figura 39. Determinação das isoformas envolvidas no metabolismo do <i>rac</i> -, (+)- e (-)-miclobutanil. | 121 |
| Figura 40. Rota metabólica de ETO em plantas, animais e solo. | 124 |

Figura 41. Resolução cromatográfica quiral do ETO e do ETO-2-OH.125

Figura 42. Efeito da acidez e basicidade da fase móvel na enantiomerização do ETO-2-OH.....126

Figura 43. Efeito da temperatura sobre a enantiomerização de ETO-2-OH...127

Figura 44. Cromatograma representativo para análise do ETO e ETO-2-OH por GC-MS.....128

Figura 45. Fenotipagem do *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO utilizando isoformas recombinantes do CYP450 e inibidores químicos seletivos.133

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Efeito da variação da concentração da CD- α -sulfatada na resolução dos enantiômeros da 9-RispOH. | 38 |
| Tabela 2. Efeito da variação da concentração da carboximetil- β -CD na resolução da 7-RispOH. | 38 |
| Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos com a coluna Chiralcel OJ-H para diferentes fases móveis. | 46 |
| Tabela 4. Estudos de biotransformação empregando fungos do gênero <i>Cunninghamella</i> | 54 |
| Tabela 5. Comparação dos melhores resultados inicialmente obtidos. | 59 |
| Tabela 6. Parâmetros enzimáticos do metabolismo enantiosseletivo do fenamifós empregando microsomas hepático de humanos. | 95 |
| Tabela 7. Parâmetros toxicocinéticos in vivo preditos do metabolismo estereosseletivo do fenamifós. | 96 |
| Tabela 8. Valores de IC ₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) do fenamifós frente a diferentes isoformas do CYP450. | 101 |
| Tabela 9. Constantes de inibição das isoformas CYP1A2, CYP2C19 e CYP3A pelo praguicida fenamifós empregando microsomas hepáticos de humanos e predição in vivo. | 101 |
| Tabela 10. Melhores condições analíticas para separação enantiosseletiva do fipronil. | 104 |
| Tabela 11. <i>System suitability</i> do método analítico desenvolvido (n = 6). | 108 |
| Tabela 12. Parâmetros enzimáticos do metabolismo in vitro enantiosseletivo e predição dos parâmetros toxicocinéticos in vivo do fipronil. | 109 |
| Tabela 13. Parâmetros toxicocinéticos in vivo preditos. | 110 |
| Tabela 14. Valores de IC ₅₀ do <i>rac</i> -fipronil, <i>S</i> -fipronil, <i>R</i> -fipronil para diferentes isoformas do CYP450. | 112 |
| Tabela 15. Mecanismo e constante de inibição enzimática da CYP2D6. | 113 |
| Tabela 16. Condição para análise enantiosseletiva do miclobutanil no modo normal. | 117 |
| Tabela 17. Condições estabelecidas para análise enantiosseletiva do miclobutanil. | 118 |

Tabela 18. Predição dos parâmetros toxicocinéticos in vivo.120

Tabela 19. Valores de IC₅₀ do miclobutanil frente as enzimas do CYP450 de humanos.122

Tabela 20. Parâmetros cinéticos para o metabolismo do etofumesato pelas enzimas CYP450.129

Tabela 21. Resultados da correlação in vitro-in vivo para o *rac*-ETO, (+)-ETO E (-)-ETO.....131

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| Prefácio | 1 |
| Capítulo 1 – Introdução | 3 |
| 1.1. Análise Enantiosseletiva por CLAE..... | 5 |
| 1.2. Análise Enantiosseletiva por Eletroforese Capilar..... | 9 |
| 1.3. Técnicas de Preparo de Amostra..... | 14 |
| 1.3.1. <i>Microextração em Fase Líquida Empregando Membranas Cilíndricas Ocas (HF-LPME)</i> | 15 |
| 1.3.2. <i>Microextração em Fase Sólida (SPME)</i> | 23 |
| 1.3.3. <i>Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)</i> | 27 |
| Capítulo 2 – Estudos de Biotransformação* de Fármacos Quirais Empregando Fungos como Agentes Catalisadores | 31 |
| 2.1. Introdução | 31 |
| 2.2. Objetivos | 32 |
| 2.3. Resultados e Discussão | 33 |
| 2.3.1. <i>Estudos de Biotransformação da Risperidona</i> | 33 |
| 2.3.2. <i>Estudos de Biotransformação do Albendazol</i> | 56 |
| 2.3.3. <i>Estudos de Biotransformação da Zopiclona</i> | 71 |
| 2.3.4. <i>Considerações Críticas Quanto os Estudos de Biotransformação Desenvolvidos por Nosso Grupo de Pesquisa</i> | 82 |
| Capítulo 3 – Estudos de Metabolismo In Vitro, Correlação In Vitro-In Vivo e Predição de Interação Medicamentosa de Praguicidas Quirais | 85 |
| 3.1. Introdução | 85 |
| 3.2. Objetivos | 86 |
| 3.3. Resultados e Discussão | 86 |
| 3.3.1. <i>Estudos In Vitro de Metabolismo e Inibição Enzimática do Fenamifós</i> | 86 |
| 3.3.2. <i>Estudos In Vitro de Metabolismo e Inibição Enzimática do Fipronil</i> | 103 |
| 3.3.3. <i>Estudos In Vitro de Metabolismo e Inibição Enzimática do Miclobutanil</i> | 115 |
| 3.3.4. <i>Estudos In Vitro de Metabolismo do Etofumesato</i> | 123 |

| | |
|---|------------|
| <i>3.3.5. Conclusões e Avaliação Crítica Quanto os Estudos de Metabolismo e Inibição Enzimática In Vitro Envolvendo os Praguicidas Quirais Avaliados.....</i> | <i>135</i> |
| Capítulo 4 – Considerações Finais e Perspectivas Futuras | 139 |
| Referências..... | 144 |

PREFÁCIO

Nosso grupo de pesquisa teve início em 2009 no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto e durante esses 11 anos temos trabalhado no desenvolvimento de métodos cromatográficos e eletroforéticos enantiosseletivos para posteriores estudos de biotransformação (utilizando fungos como agentes catalisadores) e de metabolismo *in vitro* (utilizando microssomas hepático de humanos). Nesse sentido temos utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (CE) como técnicas de análise. Além disso, devido à natureza das matrizes em análise (meio de cultura e microssomas hepático) como técnica de preparo de amostras temos trabalhado com algumas técnicas miniaturizadas de extração, como por exemplo, a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Portanto, nossa linha de pesquisa segue duas frentes, uma relacionada ao desenvolvimento de métodos para serem aplicados nos estudos de biotransformação e outra nos estudos de metabolismo *in vitro*.

O texto apresentado nesse trabalho compila os principais resultados do nosso grupo de pesquisa nessas duas linhas descritas. Os resultados aqui apresentados estão presentes nas teses, dissertações e artigos publicados por nosso grupo ao longo desse período. O objetivo do texto foi relatar, de maneira objetiva e crítica, a evolução científica do nosso grupo.

O Capítulo 1 apresenta uma introdução aos temas essenciais descritos no texto. Assim relata uma breve revisão acerca da separação enantiosseletiva por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Além disso,

discute objetivamente técnicas de preparo de amostras, focando na microextração em fase sólida, microextração em fase líquida e microextração líquido-líquido dispersiva.

No Capítulo 2 é descrito o desenvolvimento dos métodos enantiosseletivos para análise de fármacos após biotransformação por fungos. Além disso, nesse capítulo são discutidas as limitações e vantagens do emprego da eletroforese capilar e das técnicas miniaturizadas de preparo de amostras nesses estudos.

No Capítulo 3 é descrito o desenvolvimento dos métodos enantiosseletivos para análise de praguicidas após metabolismo in vitro por microsomas hepático de humanos. Além disso, nesse capítulo é discutido a determinação dos parâmetros enzimáticos obtidos, assim como a correlação in vitro, a predição de parâmetros toxicocinéticos e a identificação das principais enzimas do citocromo P450 responsáveis pelo metabolismo dos praguicidas estudados. Finalmente, ao final de cada subtópico, o efeito inibitório dos praguicidas quirais sobre as enzimas do citocromo P450 é relatado.

No Capítulo 4 são apresentadas as considerações finais e perspectivas do nosso grupo de pesquisa.

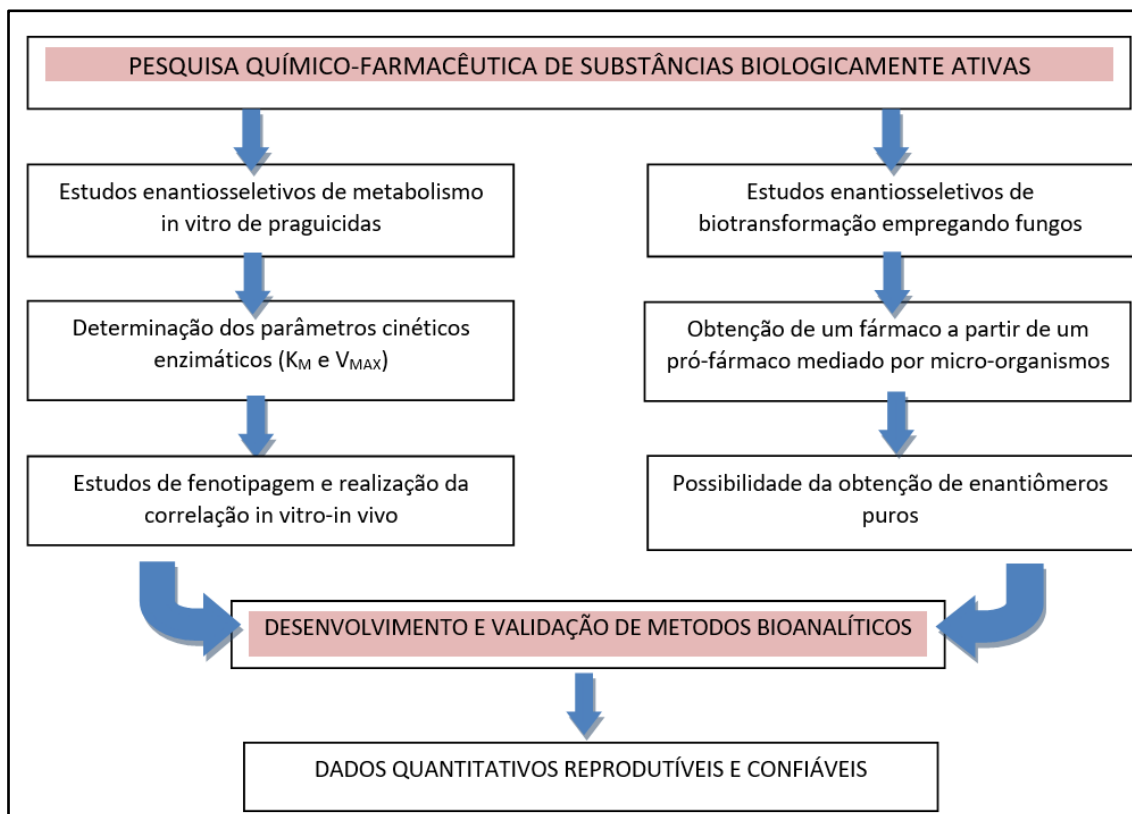
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Alguns métodos de análise como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (CE) são ferramentas que desempenham papéis fundamentais na pesquisa e análise de substâncias biologicamente ativas. Um método analítico é desenvolvido e validado tendo como objetivo central a adequada quantificação de um ou alguns analitos em uma amostra, seja ela um fluido biológico, tecido humano/animal, meio de cultura, material inerte ou em uma forma farmacêutica. Durante o desenvolvimento e, principalmente, na etapa de validação analítica, haverá, realmente, um profundo conhecimento no que tange aquele(s) analito(s) e amostra. Dessa forma, anteriormente a quantificação do analito na matriz em questão, a validação do método é essencial, sendo essa etapa de grande importância em estudos de metabolismo in vitro e biotransformação. A importância reside, principalmente, na confiabilidade da concentração que está sendo determinada e na certeza de que a quantificação está sendo realizada monitorando o analito correto. Além disso, considerando os estudos de metabolismo in vitro e biotransformação, é fundamental o conhecimento acerca da estabilidade dos analitos. Exemplos da importância da validação analítica no desenvolvimento de métodos analíticos são vários. Durante o desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação de um complexo de rutênio foi observado a instabilidade do mesmo em meio biológico. Essa informação foi fundamental na condução dos estudos de metabolismo in vitro desse complexo [1]. Da mesma forma, para fármacos já consolidados, como o ibuprofeno, foi observado que ele não se mantém estável quando em contato com a matriz biológica (urina) durante um determinado

intervalo de tempo, anterior a sua análise [2]. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa observou a instabilidade de alguns substratos, como por exemplo, o fármaco albendazol [3], e os praguicidas fenamifós [4] e etofumesato [5]. Tal conhecimento foi essencial no delineamento dos estudos posteriores e determinação dos parâmetros enzimáticos e/ou avaliação dos resultados de biotransformação. Neste contexto, o adequado desenvolvimento e validação de um método analítico demonstram ser a base para atingir os resultados pretendidos em um estudo quer seja durante a pesquisa por novos fármacos/substâncias, quer seja em estudos farmacocinéticos/toxicocinéticos ou metabolismo in vitro.

Entre os vários seguimentos de pesquisa da área químico-farmacêutica, métodos analíticos validados são importantes em estudos estereosseletivos de biotransformação empregando micro-organismos. A busca por micro-organismos capazes de realizarem reações enzimáticas semelhantes aos mamíferos é importante dada a possibilidade da rota metabólica ser semelhante entre essas espécies. Nesses estudos, a repetibilidade do método, considerando tempos de retenção ou migração dos metabólitos formados assim como a seletividade do método desempenha um papel fundamental na interpretação dos resultados. A Figura 1 apresenta um esquema da contribuição do desenvolvimento analítico nessas áreas de ciência.

Figura 1. Esquema da importância do desenvolvimento e validação dos métodos analíticos nos estudos propostos.



Fonte: autoria própria.

1.1. Análise Enantiosseletiva por CLAE

Historicamente, a CLAE é a técnica analítica mais empregada para a separação de compostos quirais apresentando como vantagens o grande número de equipamentos disponíveis comercialmente, diversidade de colunas quirais e seletores quirais, compatibilidade com vários detectores, disponibilidade de diferentes modos de eluição e a capacidade de analisar compostos com diferentes propriedades físico-químicas [6,7].

A separação enantiosseletiva pode ser realizada utilizando métodos indiretos ou diretos. O método indireto é baseado no emprego de uma reação de derivatização química entre os enantiômeros e um seletor quiral, que forma diastereômeros estáveis antes da separação ser realizada em colunas

cromatográficas convencionais não-quirais. Atualmente, o método indireto está em desuso devido às suas desvantagens em comparação o método direto, como a busca de um seletor quiral adequado, o tempo necessário e a complexidade das reações de derivatização e a necessidade de um reagente quiral de elevada pureza enantiomérica [8]. O método direto é baseado na formação de complexos diastereoméricos transitórios entre os enantiômeros e um seletor quiral em um equilíbrio termodinâmico. Nesse caso, as análises são realizadas adicionando um seletor quiral à fase móvel ou empregando uma fase estacionária quiral [6]. As vantagens do método direto incluem a ampla quantidade de seletores quirais disponíveis, diversas fases estacionárias quirais comercialmente disponíveis, a não necessidade de etapas longas e complexas de derivatização anterior à análise e maior simplicidade [9].

A separação enantiosseletiva por CLAE vem sendo realizada quase que exclusivamente empregando colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais. As principais fases estacionárias quirais empregadas em CLAE são derivados de polissacarídeos [10,11], antibióticos macrocíclicos [12,13], ciclodextrinas [14] e fases estacionárias do tipo Pirkle [15].

As fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos derivados de amilose e celulose são as mais utilizadas devido à ampla diversidade de compostos que são capazes de separar [16]. O poder de resolução enantiosseletivo dos polissacarídeos nativos é bem limitado, no entanto, a sua derivatização aumenta significativamente a capacidade de reconhecimento quiral, dependendo da estrutura do polímero e do tipo de radical derivado [17]. A derivatização com carbamato ou ésteres aromáticos está envolvida no reconhecimento quiral deste tipo de fase estacionária, sendo que o poder de

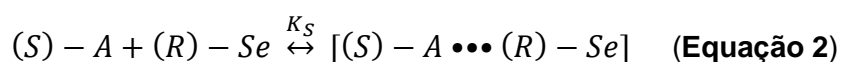
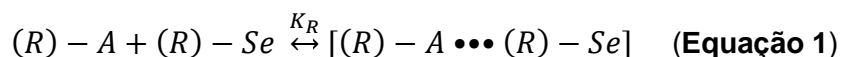
resolução quiral aumenta significativamente quando substituintes doadores ou receptores de elétrons estão na posição correta da porção fenil [17].

As colunas quirais baseadas em derivados de polissacarídeos podem ser revestidas ou imobilizadas em um suporte cromatográfico (geralmente sílica). As fases estacionárias revestidas são produzidas através de processos de adsorção, o que permite maior área superficial e maior eficiência na separação [18]. As fases estacionárias imobilizadas são produzidas através da ligação covalente do seletor quiral ao suporte cromatográfico, o que permite o uso de solventes não convencionais como fase móvel, por exemplo, acetona, clorofórmio, diclorometano e tolueno. No entanto, as fases estacionárias imobilizadas apresentam menor potencial de reconhecimento quiral em comparação às revestidas, devido a modificações na conformação estereoespecífica que podem ocorrer durante o processo de imobilização [18].

As separações por CLAE empregando colunas com fase estacionárias quirais podem ser realizadas empregando os modos fase reversa, normal e polar orgânico [19–21]. Os três modos são complementares e as vantagens de cada um dos mesmos devem ser exploradas [22]. A composição da fase móvel influencia as interações entre os analitos com a fase estacionária e, dessa forma, influencia a resolução cromatográfica [23]. Em fase reversa, a fase móvel é composta por água ou solução tampão e um solvente orgânico (geralmente metanol ou acetonitrila). Na fase normal, a fase móvel é composta por um alcano (como *n*-hexano) e um álcool (geralmente etanol ou isopropanol). O alcano como é um solvente não polar tem menos influência na separação e o álcool pode modificar as cavidades e o volume da fase estacionária quiral, alterando a sua seletividade [24]. No modo polar orgânico, a fase móvel é composta apenas de

solventes polares como metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila. Esse modo é interessante para análises quirais, apresentando como vantagens tempo de análise curto, compatibilidade com diversos detectores e alta solubilidade do analito na fase móvel, o que é excelente para análises em escala preparativa [7].

Como já citado anteriormente, a separação dos enantiômeros ocorre através da formação de complexos diastereoisoméricos transitórios formados pela interação entre os dois enantiômeros do analito (denominados de $(R/S) - A$) e o seletor quiral (denominado de Se). Estes complexos são denominados transitórios porque se trata de formações rápidas e reversíveis. Podemos explicar a formação desses diastereoisômeros através das Equações 1 e 2 abaixo, por exemplo, se o seletor quiral tiver a configuração (R) – (ou seja, ele for o seletor $(R) - Se$):



O seletor quiral com a configuração $(R) - Se$, de acordo com a Equação 1, ao interagir com o analito de configuração $(R) - A$, formará o complexo $((R) - A \cdots (R) - Se)$ com uma determinada constante de associação dada por K_R ; o mesmo se dá com o seletor $(R) - Se$ interagindo com o analito de configuração (S) : $(S) - A$, que irá formar o complexo descrito na Equação 2 com uma determinada constante de associação K_S . O que ocorre são diferenças físico-químicas que acarretam diferenças nas velocidades de formação dos complexos diastereoisoméricos representadas pelas constantes K_R e K_S , que têm como

consequência tempos de retenção diferentes na eluição dos enantiômeros através da coluna e, assim, a separação é efetivada [25].

Sabe-se que as interações responsáveis pela formação do complexo entre seletor e analito são de diversas naturezas, como: interações iônicas, interações íon-dipolo ou dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, interações de van Der Waals e interações do tipo π - π . As interações iônicas são fortes e estão envolvidas em um “*primeiro contato*” entre o seletor e o analito, ambos os enantiômeros de um soluto ionizado são capazes de formar estas interações, por isso, elas não são capazes de promover a estereosseletividade [25]. A responsabilidade do reconhecimento quiral e, conseqüentemente, a estereosseletividade dos enantiômeros recaem sobre as interações do tipo π - π e as interações de hidrogênio, pois são forças direcionais de curto alcance, capazes de mudar a conformação da estrutura molecular. Além delas, fatores estéreos, ajustes ou não-ajustes do soluto em uma cavidade ou fenda do seletor quiral contribuem para o reconhecimento quiral [25].

1.2. Análise Enantiosseletiva por Eletroforese Capilar

A grande eficiência apresentada em separações por CE faz esta técnica atraente para ser utilizada em separações de moléculas quirais. Dentre as vantagens do uso de CE em separações quirais, destacam-se: (i) possibilidade de alterar facilmente a natureza e a concentração do seletor quiral; (ii) possibilidade de uso de diversos seletores quirais em combinação para melhorar a separação; (iii) baixo consumo de amostra e reagentes, o que permite o uso de seletores quirais mais caros, e; (iv) excelente eficiência e rapidez na separação [26].

Usualmente, a separação quiral por CE é realizada através da adição de seletores quirais no eletrólito de análise. Para ser efetivo, o seletor quiral deve ter diversas características, entre elas: (i) deve ser estereosseletivo e formar complexos diastereoisoméricos transitórios com os estereoisômeros; (ii) deve ser solúvel e quimicamente estável no eletrólito de análise; (iii) não deve interferir na detecção, e; (iv) possuir uma cinética de complexação rápida [26].

Diversas substâncias podem ser utilizadas como seletores quirais em CE, entre elas, ciclodextrinas e derivados, éteres de coroa quirais, antibióticos macrocíclicos, surfactantes quirais, complexos de troca de ligantes e polissacarídeos de cadeia linear [26]. Contudo, a grande maioria das separações são realizadas com o uso de ciclodextrinas (CDs) como seletores quirais e, portanto, esse tipo de seletor será melhor discutido abaixo.

CDs são oligossacarídeos que ocorrem naturalmente na natureza. Compreendem a α , β e γ -CD e são formadas respectivamente por seis, sete e oito unidades de glicopiranosose. As CDs têm o formato de um cone truncado com uma cavidade hidrofóbica e parte externa hidrofílica devido a presença de grupamentos hidroxilas nas aberturas do cone truncado [26]. O mecanismo aceito de enantioresolução com as CDs envolve a inclusão do analito quiral na sua cavidade e a participação de interações secundárias com grupamentos hidroxilas, formando assim um complexo de inclusão. Essas interações diferem entre os estereoisômeros e são responsáveis pelas diferenças nas constantes de formação dos complexos de inclusão [26]. O analito formará complexo de inclusão com a CD somente se a molécula ou pelo menos uma parte dela se encaixar na sua cavidade, embora a inclusão não assegure a enantioseparação. As cavidades das CDs naturais podem ser preenchidas por diversos compostos,

particularmente se eles possuem anéis aromáticos. Apesar das diversas aplicações que existem com essas CDs naturais, seu uso não é muito amplo devido à baixa capacidade enantiosseletiva [27]. Modificações nessas CDs têm levado a um aumento na discriminação quiral com um aumento no grau de assimetria. As CDs neutras modificadas são obtidas pela troca de grupos hidroxilas por alquilas, o que aumenta a solubilidade e flexibilidade das CDs. Esses dois fatores ajudam a acomodar melhor o analito e aumentar a estabilidade do complexo resultante [27], melhorando a capacidade de enantioresolução. Isso se reflete no extensivo uso dos derivados metílicos, como a heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -CD (TM- β -CD) e heptakis (2,6-di-O-metil)- β -CD (DM- β -CD) [28]. A influência do tamanho da cavidade das CDs foi também examinada comparando a TM- α -CD, TM- β -CD e a TM- γ -CD. Os resultados revelaram que a TM- β -CD é superior a outras CDs avaliadas. A melhor capacidade de separação dos estereoisômeros pela TM- β -CD é atribuída a presença de anéis de glicose em número ímpar, o que aumenta a assimetria na CD [26]. Um outro derivado neutro de CDs é a 2-hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD). Essa CD vem resolvendo diversos fármacos, entre eles o nadolol, propanolol e a epinefrina [28].

Apesar do grande número de aplicações, essas CDs neutras só podem resolver analitos carregados [26]. A necessidade em se resolver analitos neutros levou à síntese de CDs carregadas. Assim, foram sintetizadas a carboximetil- β -CD (CM- β -CD), a CD- β -sulfatada (S- β -CD) e a sulfobutiléter- β -CD (SBE- β -CD), sendo todas aniônicas. O representante catiônico desse grupo é a 2-hidroxipropil-trimetilamônio- β -CD (QA- β -CD). A CM- β -CD possui grupos carboxilas que estão protonados em pH abaixo de 4 e dissociados em pH acima

de 4. Essa CD tem sido usada na resolução de diversos fármacos catiônicos. Essa CD pode também resolver compostos ácidos se o pH utilizado for suficiente para manter seus grupamentos carboxílicos dissociados [29]. A interação dessa CD com o analito muda grandemente com o pH, sendo que um analito catiônico pode se comportar como um ânion e migrar em direção ao cátodo se suas interações com a CD forem suficientemente fortes [26]. Em contraste com a CM- β -CD, a S- β -CD está carregada negativamente em qualquer pH usado. Essa CD tem mostrado uma boa capacidade de enantioresolução e, em um estudo onde 56 analitos quirais foram testados, a S- β -CD foi capaz de resolver 46 analitos [30]. A SBE- β -CD também é uma CD aniônica em qualquer pH utilizado. Essa CD vem resolvendo uma variedade de compostos incluindo substâncias ilícitas, estimulantes e agentes de interesse forense [31]. As CDs catiônicas vem sendo pouco utilizadas, sendo seu uso voltado mais para área de bioquímica, na análise de anticoagulantes, peptídeos e ácidos orgânicos [32].

Na análise enantiosseletiva por CE com o uso de seletores quirais adicionados ao eletrólito de análise, dois mecanismos de separação podem ser considerados, um cromatográfico e outro eletroforéticos [33,34]. O reconhecimento estereosseletivo dos enantiômeros pelos seletores quirais é um princípio cromatográfico. Normalmente os seletores quirais estão dissolvidos na solução de análise, formando assim, uma pseudo fase estacionária. Por outro lado, o princípio eletroforético da técnica também influencia a migração do analito, do seletor quiral e do complexo analito-seletor quiral em direção ao detector. Dessa forma, alguns autores chamam essa técnica de eletrocromatografia capilar [33,34].

A resolução dos enantiômeros é baseada em um equilíbrio de

complexação e pode ser descrito de acordo com a Equação 3 [35].

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S \frac{\mu_f + \mu_{cR}K_R[C]}{1+K_R[C]} - \frac{\mu_f + \mu_{cS}K_S[C]}{1+K_S[C]} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde μ_R e μ_S são as mobilidades observadas dos enantiômeros R- e S-, respectivamente; μ_f é a mobilidade dos enantiômeros não-complexados; K_R e K_S são as constantes de equilíbrio de complexação dos enantiômeros R e S com o seletor quiral, respectivamente; μ_{cR} e μ_{cS} são as mobilidades dos respectivos complexos diastereoisoméricos temporários entre o seletor quiral e os enantiômeros R e S; e $[C]$ é a concentração do seletor quiral. Enquanto as mobilidades dos enantiômeros livres são iguais, as constantes de equilíbrio e/ou a mobilidade dos complexos diastereoisoméricos formados podem ser diferentes. Considerando uma separação baseada nas diferenças das constantes de complexação, as mobilidades dos analitos livres e complexados devem ser diferentes para se conseguir a separação dos enantiômeros. Derivando a Equação 3, uma enantioseparação pode ser obtida no caso de constantes diferentes ($K_R \neq K_S$) ou, alternativamente, no caso de mobilidades diferentes dos complexos formados ($\mu_{cR} \neq \mu_{cS}$). No primeiro caso a enantioseparação é somente devido à diferença nas constantes de complexação, de acordo com a Equação 4, abaixo [35]:

$$\Delta\mu = \frac{(\mu_f - \mu_c)(K_R - K_S)[C]}{1 + (K_R + K_S)[C] + K_R K_S [C]^2} \quad \text{(Equação 4)}$$

No caso de mobilidades diferentes do complexo, a Equação 4 pode ser

ainda mais simplificada, de acordo com a Equação 5, abaixo [35]:

$$\Delta\mu = \frac{K[C](\mu_{cR}-\mu_{cS})}{1+K[C]} \quad (\text{Equação 5})$$

Dessa forma, a separação enantiosseletiva dos enantiômeros pode ser alcançada devido a diferentes constantes de ligação ($K_R \neq K_S$) ou devido a diferentes mobilidades do complexo formado ($\mu_{cR} \neq \mu_{cS}$).

1.3. Técnicas de Preparo de Amostra

O preparo de amostras é um pré-tratamento necessário nos casos onde a análise é feita em matrizes com elevado número de interferentes, tais como sangue, plasma, urina, meios de cultura e fragmentos celulares ou em casos onde a concentração do analito é muito pequena, havendo então a necessidade de realizar a pré concentração do mesmo. Seu principal objetivo é extrair, isolar e concentrar os compostos alvo que estão nessas matrizes [36]. A extração e o isolamento dos analitos são necessários para evitar a injeção de contaminantes que podem, além de interferir na análise, adsorver na parede da coluna analítica (proteínas) ou entupi-la (partículas sólidas). A pré-concentração dos analitos é necessária para aumentar o sinal analítico, de maneira a melhorar o limite de detecção/quantificação e, portanto, chegar a um valor aceitável de detectabilidade para o método desejado [37].

Não obstante muitas técnicas convencionais de extração ainda estejam em uso, estão sendo feitos esforços no sentido de: (i) tornar possível o uso de volumes diminutos de amostras suficientes para a determinação e quantificação de analitos em nível de traços; (ii) estimular a seletividade e a diminuição da

extração de interferentes na extração; (iii) melhorar a reprodutibilidade das técnicas pela expansão da capacidade de automação; (iv) desenvolver métodos que produzam menos resíduos químicos e com uso de quantidade mínima ou nenhuma de solventes orgânicos [37].

Nesse sentido, diversas técnicas miniaturizadas de extração e preparo de amostras vêm sendo desenvolvidas; dentre elas, é possível citar a microextração em fase líquida empregando membrana cilíndricas ocas (HF-LPME), a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva.

1.3.1. Microextração em Fase Líquida Empregando Membranas Cilíndricas Ocas (HF-LPME)

A HF-LPME foi desenvolvida em 1999 por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen [38] como uma alternativa para a microextração em gota suspensa (SDME – *Single Drop Microextraction*). A HF-LPME consiste na miniaturização da extração líquido-líquido, no entanto, suportada com uma membrana porosa. A HF-LPME vem se destacando devido a pequena geração de resíduo químico, facilidade operacional, baixo custo, boa seletividade e excelentes valores de recuperação [38,39].

A HF-LPME pode ser empregada com diferentes técnicas cromatográficas e eletroforéticas, tais como (i) cromatografia gasosa (CG), (ii) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e (iii) eletroforese capilar (CE) [40]. Nesse tipo de extração uma membrana capilar (também chamada de fibra) porosa e hidrofóbica é mergulhada em um solvente orgânico por alguns segundos para imobilizar solvente nos seus poros; feito isso, o excesso é removido. O solvente

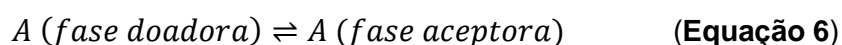
orgânico não deve ser miscível em solução aquosa para garantir a sua retenção nos poros no período da extração sem que ocorra “fuga” de solvente para a solução aquosa; sendo possível, assim, aplicar agitação ao sistema sem perda do solvente orgânico durante o processo de extração. Esse solvente forma uma camada fina na parede da fibra e, portanto, deve ser compatível com ela para que seus poros possam ser preenchidos completamente. No interior dessa fibra, são adicionados microlitros de uma fase aceptora, que pode ser um solvente orgânico ou uma solução aquosa, dependendo do modo empregado [38]. O custo reduzido da membrana viabiliza o seu uso único, o que evita contratempos relacionados a contaminação entre as extrações (efeito memória) [41].

Inicialmente, existiram duas principais “geometrias” que eram utilizadas em microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME): a geometria em “U”, que utiliza duas microseringas ligadas as extremidades da membrana, e a geometria tipo “haste”, em que somente uma microseringa é utilizada na injeção e coleta da fase presente no interior da fibra [41]. Posteriormente, essa técnica foi aperfeiçoada [42,43], e microponteiras empregadas em biologia molecular substituíram as microseringas inicialmente utilizadas. Além disso, a agitação foi realizada empregando-se um agitador orbital de tubos. Essa configuração foi um avanço muito importante, pois tornou possível a extração de diversas amostras ao mesmo tempo, sem a necessidade do uso de microseringas [40].

Uma outra configuração da HF-LPME foi desenvolvida por Pedersen-Bjergaard, Rasmussen (2006) [44], conhecida como extração por eletromembrana (EME – *Electromembrane Extraction*). Essa nova vertente da HF-LPME se fundamenta na migração de compostos carregados (analitos)

quando uma diferença de potencial (ddp) é aplicada. O tipo de solvente orgânico nessa configuração é mais crítico, pois este deve ter uma polaridade adequada ao analito de interesse e uma condutividade elétrica suficiente para não haver perda da corrente durante a ddp. Para analitos com características básicas, a solução doadora deve ser acidificada para que estes estejam protonados; os poros da membrana devem ser dopados com o solvente orgânico adequado e a fase aceptora também deve ser ácida para que os analitos permaneçam carregados, impedindo seu retorno para fase doadora. Um eletrodo positivo é inserido na fase doadora e um eletrodo negativo, na fase aceptora. Após a aplicação da ddp, os analitos que estão carregados positivamente na fase doadora migram para a fase aceptora em direção ao eletrodo negativo. No final do processo, a ddp é encerrada, a fase aceptora é coletada e posteriormente analisada [44]. Esse modo tem mostrado que altos valores de recuperação podem ser alcançados em pouco tempo de extração.

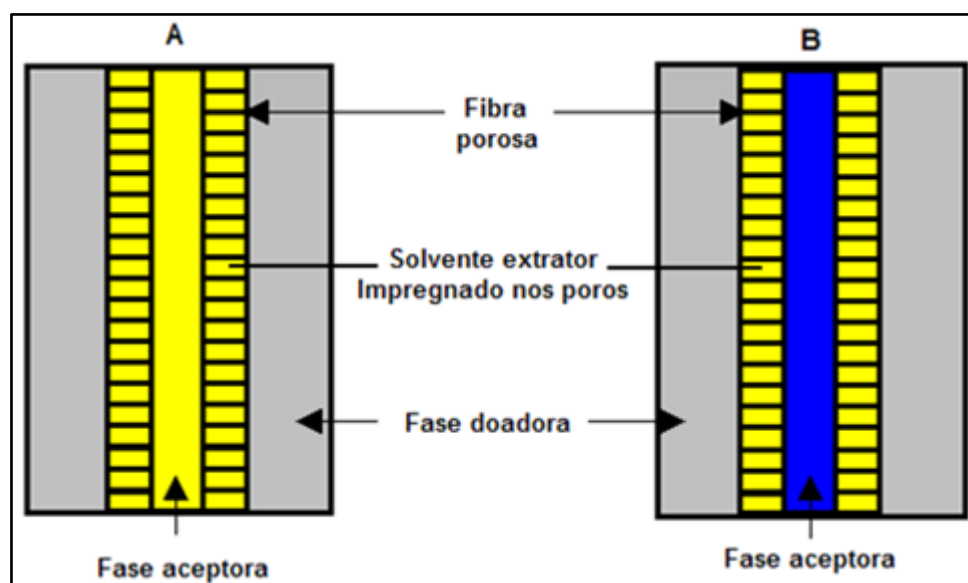
A HF-LPME pode ser realizada em dois modos que se diferenciam pelo número de fases utilizadas nos sistemas: (i) modo duas fases e (ii) modo três fases. No modo duas fases (Figura 2A), o analito presente na solução aquosa (fase doadora) passa por um solvente orgânico hidrofóbico, que é suportado pelos poros da fibra, entrando em contato com o mesmo solvente orgânico (fase aceptora) presente no interior dessa fibra. Este modo é particularmente útil para analitos mais hidrofóbicos e pouco polares. No modo duas fases, a transferência do analito A da fase aquosa (doadora) para a fase orgânica (aceptora) pode ser descrita de acordo com a Equação 6 [41]:



No modo três fases (Figura 2B), o analito está presente na solução aquosa (fase doadora) e passa por um solvente orgânico hidrofóbico que é suportado pelos poros da fibra, entrando em contato com outra solução aquosa que está presente no interior da fibra (fase aceptora), normalmente, com o pH oposto ao da fase doadora (local onde o analito estava inicialmente). Ao atingir a fase aceptora, o analito é des- ou protonado, o que diminui sua afinidade pelo solvente orgânico, impedindo, assim, sua volta para a fase doadora (solução aquosa). Esse tipo de modo é ideal para analitos mais hidrofílicos ou ácidos ou bases conjugadas. No modo três fases, o processo de transferência do analito (A) é definido de acordo com a Equação 7 [41]:

$$A (\text{fase doadora}) \rightleftharpoons A (\text{fase orgânica}) \rightleftharpoons A (\text{fase aceptora}) \quad (\text{Equação 7})$$

Figura 2. Esquema da HF-LPME em duas e três fases.



Fonte: de Oliveira, A. R. M. (2007) [45].

Diferentes fatores necessitam ser otimizados a fim de desenvolver um método por HF-LPME, tais como: ajuste do pH das fases doadora e aceptora,

força iônica do meio, comprimento, diâmetro interno, espessura e tamanho de poro da fibra, volume da amostra, tipo de solvente orgânico, tempo de extração e tipo e velocidade de agitação [41].

As membranas empregadas em HF-LPME devem apresentar elevada hidrofobicidade e não serem solúveis nos solventes usados no processo de extração. Essas características são encontradas nas membranas à base de polipropileno, comercializadas pela empresa Membrana. Destas, a mais empregada apresenta diâmetro interno de 600 μm , parede com espessura de 200 μm e poros com tamanho de 0,2 μm . Esse diâmetro bloqueia a passagem de macromoléculas e outros interferentes para fase aceptora e, ao mesmo tempo, permite o fluxo do analito em estudo para o interior da fibra [41,42].

Um fator importante no desenvolvimento de um método por HF-LPME é a escolha do solvente de extração. Alguns requisitos são essenciais para um solvente orgânico ser utilizado em HF-LPME; dentre eles: elevada hidrofobicidade, impedindo assim a dissolução do solvente na fase aquosa (doadora); moderado a alto ponto de ebulição, evitando assim a volatilização durante o processo de extração; e viscosidade apropriada para uma fácil fixação nos poros da fibra e por fim, o solvente deve apresentar uma polaridade adequada para o analito de interesse [41,42]. Vários solventes orgânicos têm sido utilizados, tais como éter diexílico, *n*-octanol, acetato de hexila, acetato de butila, acetato de dodecila, éter dibutílico ou misturas desses solventes [46]. Na tentativa de diminuir o uso de solventes orgânicos tóxicos, foi desenvolvido um método empregando ácidos graxos e óleos essenciais como solventes extratores [47]. Nesse trabalho os autores avaliaram óleo de amêndoa, óleo de amendoim, óleo de oliva, óleo de soja, óleo de anis, óleo de erva-doce, óleo de

lavanda e óleo de menta como solvente extrator. Apesar de algumas dificuldades técnicas, os autores concluíram que os ácidos graxos e os óleos essenciais avaliados podem ser uma alternativa ao uso dos solventes orgânicos tradicionais empregados em HF-LPME. Em todos os casos, a polaridade do solvente deve ser próxima ou similar à polaridade dos analitos de interesse, o que favorece sua partição e, portanto, a extração [47].

A eficiência da extração na HF-LPME está relacionada com a cinética de transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica e desta para a fase aceptora. Trata-se de uma dinâmica de equilíbrio e, portanto, a eficiência desse processo aumenta com o tempo de extração até atingir um platô máximo, a partir do qual um tempo maior de extração não irá causar um aumento na recuperação dos analitos [46]. Frequentemente, o tempo exigido para atingir o equilíbrio é muito longo; dessa forma, a extração pode ser realizada em um estado fora do equilíbrio, monitorando o tempo de extração e as demais condições experimentais minuciosamente, evitando, assim, perda na repetitividade do procedimento [46]. O tempo de extração está relacionado com o tipo e velocidade de agitação empregada e a temperatura de análise.

A agitação da solução onde está presente o analito de interesse tem como propósito agilizar a extração dos analitos, facilitando sua transferência da fase doadora para o solvente orgânico. A amostra pode ser agitada de diversas maneiras, tais como pelo uso de barras magnéticas de agitação, pela aplicação em banho de ultrassom ou por meio de sistemas de agitação orbital de tubos do tipo Vibrax®. Dentre esses sistemas, o uso de barras de agitação e agitadores orbitais vem se destacando. A agitação do sistema deve ser realizada de maneira cautelosa, a fim de evitar a geração de pequenas bolhas de ar que se

aderem na superfície externa da fibra, prejudicando a manutenção do solvente nos poros da fibra e conseqüentemente levando a uma diminuição da repetibilidade e perda de precisão nas extrações.

O controle do pH da solução onde se encontra o analito de interesse é muito importante para a extração de compostos que podem sofrer protonação (compostos básicos) ou desprotonação (compostos ácidos). O estabelecimento prévio no valor do pH da fase doadora pode melhorar a eficiência da extração, uma vez que o grau de des- ou protonação dos analitos vai depender do pH da amostra [41,42]. É necessário ressaltar que o pH deve ser sempre ajustado para manter o analito em sua forma neutra, exceto quando o uso de par iônico é requerido. Muitas vezes, em razão da alta polaridade de algumas moléculas ionizáveis ou íons, a adição de reagentes para realizar o pareamento iônico desses analitos é requerida. Há duas formas do uso de par iônico na extração por HF-LPME: (1) adição de um reagente aniônico (RA^-) ou (2) adição de um reagente catiônico (RC^+) a solução doadora. Nesses casos, o pH da fase doadora terá um papel fundamental no processo de extração. As aminas quaternárias, utilizadas como RC^+ , vêm sendo bem utilizadas para extração de ácidos carboxílicos [48]. Por outro lado, os ácidos octanoico e decanoico ou sais destes vêm sendo utilizados com êxito como RA^- [49].

A adição de um sal inerte a uma solução aquosa geralmente é responsável por diminuir a solubilidade do analito orgânico na amostra e, ao mesmo tempo, aumentar sua afinidade para a fase orgânica. Esse efeito é denominado *salting-out*. Esse método é empregado principalmente na análise de compostos mais polares, com baixa afinidade pelo solvente orgânico. No entanto, em algumas situações, o efeito da adição de sal pode ser nulo ou até

mesmo prejudicial para extração, pois pode aumentar a viscosidade do meio e diminuir a extração. Além disso, em altas concentrações, as moléculas do sal podem interagir com analitos polares, impedindo, assim, sua partição com o solvente orgânico. Dessa maneira, a adição de sal deve ser avaliada com cautela. Quando a amostra (principalmente de origem biológica, como amostras de urina), precisa ser analisada, é importante que a força iônica do meio seja mantida constante. Nesses casos, o uso de sal pode ajudar na reprodutibilidade da técnica.

Alguns analitos podem estar ligados a proteínas plasmáticas, e essas ligações podem resultar uma baixa eficiência no processo de HF-LPME. Essas ligações podem ser devido a interações hidrofóbicas, polares ou outras. As interações hidrofóbicas podem ser desfeitas pela adição de solventes orgânicos à solução doadora. Alguns solventes, como metanol e acetonitrila têm a habilidade de quebrar essas interações hidrofóbicas e polares [40,41]. Por outro lado, a adição de solvente orgânico na amostra leva a uma modificação na polaridade da solução doadora o que pode reduzir a eficiência da extração, por diminuir a polaridade da solução aquosa e aumentar a solubilidade do analito nessa fase. Além disso, a adição de um solvente orgânico no processo de extração aumenta a quantidade total de solvente empregado na HF-LPME, descaracterizando uma das principais vantagens da técnica que é o uso de quantidade mínima de solventes orgânicos. Dessa forma, se a adição de solventes orgânicos for necessária, o volume adicionado deve ser o mínimo possível.

A escolha de uma fase aceptora no modo três fases, capaz de promover a eficaz des- ou protonação dos analitos, é essencial para que a partição dos

analitos na fase aceptora aquosa ocorra; evitando-se, assim, que os analitos retornem para a fase doadora. Ademais, o analito em sua forma carregada tem menor afinidade pelo solvente orgânico presente nos poros da fibra [50]. Desse modo, a escolha da fase aceptora, assim como a concentração das soluções empregadas deve ser feita de forma bem cautelosa. Em geral, como fase aceptora, vem sendo empregada principalmente solução aquosa de ácidos fracos ou fortes [41,42]. O uso de ácidos ou bases deve ser cauteloso, pois algumas moléculas apresentam instabilidade, dependendo do pH do meio. No modo duas fases, a fase aceptora é o mesmo solvente orgânico que foi utilizado na impregnação dos poros da fibra.

1.3.2. Microextração em Fase Sólida (SPME)

A SPME foi desenvolvida pelo grupo de Pawliszyn em 1990 com o objetivo de extrair os analitos com maior seletividade e rapidez. Além disso, desenvolver um sistema simples e prover uma forma de levar o sistema de extração ao local onde se encontra a amostra para a realização da extração “*in situ*” dos analitos de interesse [51]. A aplicabilidade da técnica vem sendo extensivamente explorada [39] e seu emprego é variado, desde determinação de poluentes em amostras ambientais como ar, água, solo; determinação de fármacos em fluidos biológicos como urina, sangue, cabelos; até mesmo na determinação de compostos aromáticos ou tóxicos presentes em alimentos [52].

A SPME é uma técnica de extração e pré-concentração não exaustiva com base nas condições de equilíbrio ou pré-equilíbrio dos analitos após um determinado tempo de contato entre os analitos e a fase extratora. As extrações são realizadas por polímeros (fase extratora) que estão suportados geralmente

por fibras de sílica fundida. Quanto maior a afinidade do analito pela fase extratora, maior a quantidade de analito extraído [53]. Assim, o processo de extração é controlado pelas características físico-químicas do analito, da amostra e do polímero extrator.

O processo de extração por SPME ocorre por sorção e é governado pela polaridade dos analitos. Portanto, polímeros polares terão maior afinidade em extrair analitos polares e polímeros apolares terão maior facilidade de extrair os analitos com características mais apolares. Outra característica peculiar da SPME é o fato de a possibilidade de suas fibras serem reutilizáveis, melhorando, dessa forma, o custo-benefício do método. Porém, uma desvantagem na reutilização das fibras é o efeito memória (*carryover*), que pode ser detectado neste tipo de extração e, portanto, deve ser considerado no processo de otimização.

A SPME é uma técnica muito versátil, aplicada à análise de compostos voláteis e não-voláteis, podendo ser feita por imersão direta ou por *headspace* [39]. Na extração direta, a fibra entra em contato com a matriz e os analitos são sorvidos na fase extratora até atingir o equilíbrio. Em amostras líquidas, é necessária a agitação para facilitar o transporte dos analitos até a fibra extratora; já em amostras gasosas a convecção do ar é suficiente para carregar os analitos até a fibra. Na configuração *headspace* os analitos voláteis atingem à fibra enquanto as macromoléculas e interferentes não voláteis permanecem em solução. Além disso, a amostra pode possuir características como pH fora da faixa recomendada sem que haja danos à fibra [54]. Se os analitos de interesse tiverem baixa volatilidade e a matriz for complexa e/ou prejudicial à fibra, utiliza-se a extração indireta com uma membrana para proteção da fibra. Além disso, o

uso da membrana pode adicionar certa seletividade ao método apesar de dificultar o transporte dos analitos até a fibra. O equilíbrio é atingido independentemente da posição da fase extratora [54]. Mais recentemente foi desenvolvido o método *in tube* SPME que consiste em um capilar, geralmente de sílica fundida, revestido internamente por uma membrana extratora. Um injetor automático apropriado pode ser adaptado ao sistema para que a amostra entre e saia do capilar até extração satisfatória [54].

O processo de extração frequentemente precisa ser otimizado para melhorar as condições de extração do analito. Os parâmetros que podem ser alterados são: temperatura, força iônica, adição de modificador orgânico, volume da amostra, pH e tempo de extração.

O tempo ótimo de extração é o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio e assim resultar no máximo de recuperação do analito, como mencionado para HF-LPME. Porém, esse tempo depende de vários fatores como, espessura da fibra utilizada, coeficiente de difusão do soluto, agitação e temperatura do sistema e, muitas vezes, a extração é feita antes do equilíbrio ser atingido. A agitação do sistema é utilizada com o objetivo de melhorar a recuperação do analito, diminuir o tempo de extração e de equilíbrio.

O ajuste do pH pode melhorar a extração principalmente de compostos que podem estar protonados ou não. O pH é ajustado com o objetivo de obter o analito na sua forma neutra (considerando uma fibra neutra). Cuidados no ajuste do pH devem ser tomados principalmente no método de extração por imersão direta, já que valores extremos de pH podem deteriorar as fibras extradoras.

A SPME é um processo de equilíbrio, mas frequentemente a extração é finalizada antes do sistema atingir esse equilíbrio. Nesse caso, um aumento na

temperatura pode aumentar a extração, favorecendo que o sistema atinja esse estado de equilíbrio mais rapidamente. Por outro lado, o aumento da temperatura pode diminuir a porcentagem de extração por diminuir a constante de distribuição. Após a extração dos analitos presentes na matriz há necessidade de “liberar” essas substâncias da fibra para serem analisadas. Em CLAE, a dessorção pode ser feita de no modo *online* e *offline*.

No modo *online*, os analitos presentes na matriz são dessorvidos diretamente no sistema cromatográfico através de uma interface conectada ao injetor do cromatógrafo. Após, os analitos seguem diretamente para a coluna e assim são analisados. Existem 2 maneiras de se proceder a dessorção:

i. Modo dinâmico: Nesse modo os analitos são dessorvidos pelo fluxo da fase móvel que passa pela fibra “retirando” os analitos. É utilizado principalmente quando a fase móvel contém altas quantidades de modificador orgânico e quando os analitos eluem rápido para a coluna.

ii. Modo estático: Nesse modo, a câmara de dessorção presente na interface, é previamente preenchida com um solvente apropriado, a fibra é introduzida e, após um tempo pré-determinado, a fase móvel passa pela câmara levando os analitos para a coluna. Esse modo é útil quando o modo dinâmico falha em dessorver os analitos, resultando em recuperações pobres e picos assimétricos. Somente solventes orgânicos miscíveis na fase móvel devem ser utilizados nesse modo de dessorção.

No Modo *offline*, o procedimento de dessorção é realizado separadamente do sistema cromatográfico. A fibra é mergulhada em um frasco contendo o solvente de dessorção e, após algum tempo retraída. Em seguida, o solvente é evaporado e o resíduo dissolvido na fase móvel e injetado na coluna.

Quando o solvente de dessorção é compatível com a análise ou a própria fase móvel pode-se injetar diretamente na coluna sem que haja necessidade de evaporação.

1.3.3. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

A DLLME foi apresentada por Rezaee e colaboradores em 2006 [55]. É uma técnica baseada na dispersão de dois solventes (extrator e dispersor) em uma solução aquosa contendo o analito. Uma mistura dos solventes dispersor e extrator é injetada rapidamente, com auxílio de uma microseringa, na amostra aquosa, causando a turvação do meio (ponto nuvem-PN), o qual passa a conter a dispersão de microgotas [55]. Essas microgotas representam a dispersão do solvente extrator na fase aquosa fornecendo uma grande área superficial o que facilita a partição do analito a ser extraído e, assim, permite que o equilíbrio seja atingido rapidamente. A amostra é então centrifugada e a fase sedimentada é coletada com uma microseringa para ser analisada pelo método escolhido. Vários fatores influenciam a extração por DLLME, como volume e tipo de solventes extrator e dispersor, pH da amostra e tempo de extração (DLLME assistida) [39].

A escolha do solvente extrator é o parâmetro mais importante no desenvolvimento do método. O solvente extrator deve possuir baixa solubilidade na amostra, preferencialmente densidade maior que a água para que se deposite no fundo do tubo e ter afinidade para extrair o analito. Além disso, deve possuir baixa pressão de vapor e alta temperatura de ebulição [56]. A escolha de solvente extrator com maior densidade que a água limita o número de solventes compatíveis para este método. Para superar este inconveniente, pesquisadores

desenvolveram alternativas para utilização de solventes de baixa densidade, como a DLLME com solidificação da gota orgânica flutuante [57]. O volume de solvente extrator deve ser o menor volume capaz de extrair o analito, obtendo-se um alto fator de enriquecimento (E) (Equação 8):

$$E = \frac{V_d R}{100V_{org}} \quad \text{(Equação 8)}$$

Onde V_d é o volume de fase doadora; V_{org} é o volume de fase orgânica e R é a recuperação.

A escolha do solvente dispersor é fundamentada em sua solubilidade tanto no solvente extrator quanto na amostra aquosa, para permitir a dispersão do solvente extrator na fase aquosa. Assim como o solvente extrator, também é desejável que tenha baixa pressão de vapor e alta temperatura de ebulição [58]. O volume de solvente dispersor afeta diretamente a formação do ponto nuvem, o grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa, e conseqüentemente, a eficiência da extração. A variação no volume de solvente dispersor altera também o volume de fase sedimentada [56].

Quando uma matriz contém componentes lipofílicos, a natureza hidrofóbica dos solventes convencionais de extração da DLLME não é capaz de discriminar entre os analitos e as interferências, o que compromete a eficácia e a seletividade do processo. Alternativamente, a distribuição de equilíbrio do analitos entre a água e solvente extrator, poderia melhorar a seletividade da DLLME. Fatores, tais como o pH e força iônica, desempenham um papel crucial na eficiência da extração líquido-líquido [59]. As solubilidades do analito de interesse e o solvente extrator na fase aquosa são diminuídas com o aumento

da força iônica, o que é favorável para se obter altas recuperações. Contudo, com a diminuição da solubilidade do solvente extrator na fase aquosa, a fase sedimentada é aumentada, resultando em um decréscimo na eficiência de extração. Para compostos ionizáveis, a eficiência da DLLME pode ser modulada por ajustes no pH da fase aquosa. Dessa maneira, a forma ionizada é solúvel em água dificultando sua passagem para a fase extratora, enquanto a forma não ionizada é facilmente transferida para o solvente extrator. Dessa forma, o valor de pH é escolhido de forma a tornar o analito menos solúvel na fase aquosa [60].

Na DLLME o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor e a centrifugação. Segundo Rezaee et al. (2006), o tempo de extração tem pouco efeito sobre a eficiência da extração [55]. Este fato é explicado devido à área superficial entre as fases orgânica e aquosa serem infinitamente grande, atingindo assim, o estado de equilíbrio da transição do analito para outra fase quase instantaneamente. A DLLME assistida por vórtex e/ou ultrassom é uma etapa que vem sendo adicionada com sucesso no tempo de extração para se obter um aumento na eficiência da extração dos analitos [61].

A DLLME assistida surgiu recentemente como uma opção para melhorar a extração dos analitos, e são elas: a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (USADLLME – *Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex (VADLLME – *Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*). A USADLLME difere da DLLME convencional, pois pode não utilizar solvente dispersor. A energia do ultrassom é aplicada como meio de promover a dispersão do solvente extrator, formando uma emulsão. O analito é então

extraído para a fase orgânica. Contudo, o uso do ultrassom pode ocasionar alguns problemas, como degradação do analito. Como alternativa, vem se destacando a VADLLME, onde a dispersão do solvente extração é aumentada pela mistura em agitadores tipo vórtex. Com esta técnica, estão eliminados os problemas de degradação dos analitos [62].

CAPÍTULO 2 – ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO* DE FÁRMACOS QUIRAIS EMPREGANDO FUNGOS COMO AGENTES CATALISADORES

2.1. Introdução

Transformações microbianas de compostos orgânicos frequentemente têm aplicações práticas na síntese de fármacos. A síntese de muitos compostos de difícil obtenção, por métodos químicos, pode ser realizada por tecnologia microbiana [63]. Micro-organismos, especialmente fungos, têm sido considerados uma fonte importante de metabólitos ativos com atividade antibacteriana, antimicótica e antiviral [64]. O uso de modelos microbiológicos na busca de metabólitos oferece diversas vantagens, como simplicidade, baixo custo, possibilidade de realizar uma triagem (*screening*) com grande variedade de micro-organismos e os metabólitos formados são facilmente detectados, isolados e identificados. Além disso, em muitos casos essas reações são estereosseletivas, o que exclui futuros complexos processos de purificação [65]. As reações de biotransformação podem ser realizadas empregando enzimas isoladas, ou células íntegras de organismos vivos, ou micro-organismos (leveduras, bactérias e fungos). As bactérias e fungos possuem uma ampla diversidade de espécies, no entanto, esses modelos ainda são pouco estudados considerando proporcionalmente o número de espécies existentes [66].

Em processos de biotransformação, os fungos são usados com maior frequência, pois são capazes de realizar diversos tipos de reações, como oxidação, redução e hidrólise, o que torna possível a obtenção de uma grande variedade de produtos. Além disso, o crescimento é rápido, o cultivo é barato e

**Nesse texto, o termo biotransformação foi adotado para indicar as reações promovidas pelos fungos*

processos em escala ampliada podem ser facilmente atingidos [67]. Este modelo biomimético é capaz de gerar quantidades significativas de metabólitos, os quais são, muitas vezes, iguais aos gerados por humanos e animais, como também a formação de novos metabólitos. Dessa forma, nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos de biotransformação de fármacos, cujos metabólitos são quirais e farmacologicamente ativos, empregando fungos como agentes catalisadores. A principal hipótese é a possibilidade da obtenção de um fármaco enantiomericamente puro a partir de outro fármaco. Contudo anterior aos estudos de biotransformação, todo o desenvolvimento do método analítico é realizado (desenvolvimento da separação enantiosseletiva e do preparo da amostra e finalmente a validação do método). Para tanto, as análises enantiosseletivas vem sendo realizadas empregando a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como técnicas de análise. Além disso, nesses estudos, utilizamos técnicas miniaturizadas de preparação de amostras, tais como a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas (HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).

2.2. Objetivos

O objetivo desse capítulo é apresentar os resultados e a evolução dessa linha de pesquisa a qual está relacionada ao desenvolvimento de métodos enantiosseletivos cromatográficos e eletroforéticos (eletroforese capilar) para posterior realização de estudos de biotransformação de fármacos. Para tanto foram selecionados e discutidos os resultados dos trabalhos envolvendo os fármacos risperidona (Doc IV 3.3.1.5 e Doc IV 3.3.1.8), alendazol (Doc IV

3.3.1.6 e Doc IV 3.3.1.9) e zopiclona (Doc IV 3.3.1.29).

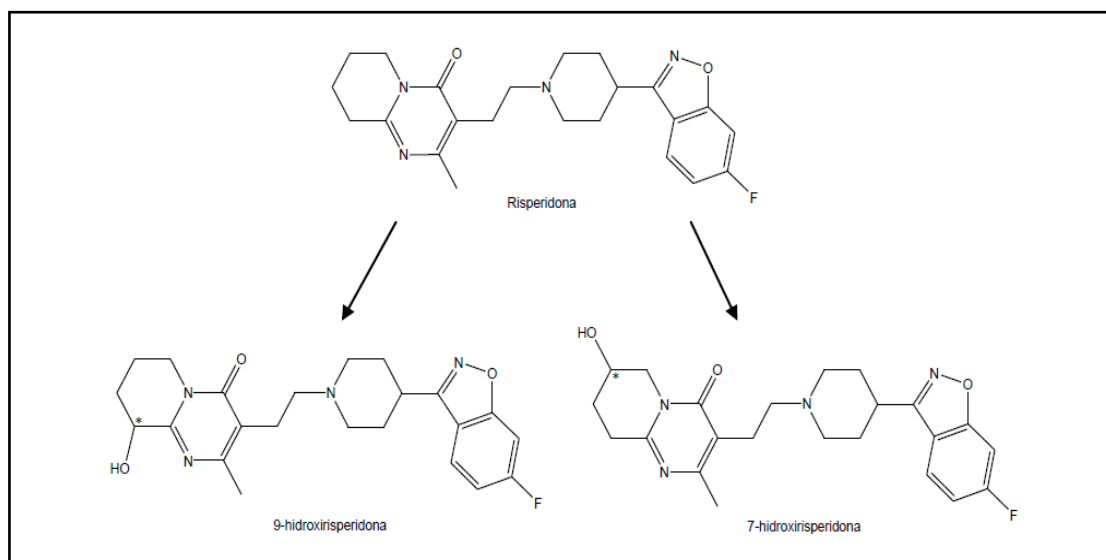
2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Estudos de Biotransformação da Risperidona

A risperidona (RISP) é um agente antipsicótico usado no tratamento de distúrbios psiquiátricos como déficit de atenção; hiperatividade em crianças e esquizofrenia [68]. Após sua administração via oral, a RISP é absorvida pelo trato gastrointestinal e sofre metabolismo mediado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450), resultando nos metabólitos quirais 9-hidroxisperidona (9-RispOH) e com menor predominância, a 7-hidroxisperidona (7-RispOH) [69] (Figura 3). O principal metabólito, 9-RispOH, apresenta as mesmas atividades farmacológicas que a RISP [70] e, por isso, já é comercializado como um fármaco com o nome genérico de paliperidona.

O principal objetivo foi avaliar se fungos seriam capazes de metabolizar a risperidona em seu metabólito ativo, 9-hidroxisperidona, e se esse processo era enantiosseletivo. Para isso, dois métodos analíticos foram desenvolvidos.

A análise enantiosseletiva da risperidona e seus metabólitos foi realizada por CLAE e por CE. Na análise da risperidona por eletroforese capilar foi utilizado como técnica de preparo de amostras a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME). A microextração em fase sólida (SPME) foi empregada quando a análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 3. Estrutura química da risperidona e seus metabólitos.

*Centro quiral.

A estratégia na análise desse substrato (risperidona) foi utilizar duas técnicas analíticas de separação e duas técnicas miniaturizadas de preparo de amostras e assim realizar uma comparação. Inicialmente foi avaliado a HF-LPME, técnica miniaturizada de preparação de amostras cuja capacidade de pré concentração é alta e compatível com a eletroforese capilar. Dessa forma, utilizamos a HF-LPME, pois além de resultar em elevados valores de recuperação, o extrato resultante é aquoso e compatível com a injeção direta no equipamento. Portanto, já avaliaríamos também nesse projeto a eliminação de uma etapa durante o preparo da amostra (eliminação da etapa de evaporação do extrato). Quase que simultaneamente outro aluno iniciou os estudos de biotransformação da risperidona empregando a SPME como técnica de preparo de amostras e análise por LC-MS/MS. Mais uma vez desenvolvemos o método com o objetivo de injetar diretamente o extrato obtido após a extração. Portanto, durante a avaliação da separação quiral do fármaco, foi dado ênfase ao desenvolvimento de um método cromatográfico no modo polar-orgânico, cuja

fase móvel é constituída apenas por solvente orgânico o que facilitaria a dessorção dos analitos da fibra. Dessa forma, a dessorção do fármaco da fibra de SPME poderia ser realizado diretamente na fase móvel e, posteriormente, injetada na coluna cromatográfica.

Além desses desafios analíticos acerca da preparação das amostras, a separação quiral do substrato e seus dois metabólitos (portanto 6 enantiômeros) foi um grande desafio. Na eletroforese capilar o grande desafio foi obter uma separação quiral adequada dos metabólitos pois, além de serem enantiômeros, são isômeros (7- e 9-RispOH). Portanto, a separação simultânea desses analitos só foi obtida após a adição de dois seletores quirais ao eletrólito de análise, a ciclodextrina- α -sulfatada e a carboximetil- β -ciclodextrina. Em relação a separação enantiosseletiva por LC-MS/MS, o modo polar-orgânico foi utilizado preferencialmente, apesar de sido avaliado o modo reverso e normal durante a avaliação da separação. O modo polar-orgânico apresenta algumas vantagens quando comparado ao normal (como por exemplo uma boa compatibilidade com o espectrômetro de massas) e ao modo reverso (análises mais rápidas). Contudo devido à grande quantidade de solventes orgânicos polares na fase móvel a retenção do analito costuma ser pequena e, portanto, o uso da espectrometria de massas é de grande valia, pois em muitos casos ocorre a coeluição dos analitos. Diante desses desafios iniciais os estudos foram conduzidos e, anterior aos estudos de biotransformação, todos os parâmetros que influenciam a separação enantiosseletiva e a extração dos analitos, foram avaliados visando uma análise rápida e com reprodutibilidade adequada.

2.3.1.1. Análise Enantiosseletiva da RISP por Eletroforese Capilar após Extração por HF-LPME

Até aquele momento não havia sido descrito na literatura um método para análise enantiosseletiva simultânea da risperidona e seus metabólitos 7-RispOH e 9-RispOH por eletroforese capilar. Portanto, o foco inicial foi desenvolver uma separação com resolução adequada entre os enantiômeros num curto de tempo de análise. Inicialmente, antes de uma otimização mais detalhada foi avaliado a capacidade em se reproduzir uma separação previamente descrita na literatura [71]. Nesse trabalho os autores separam somente os enantiômeros da 9-RispOH empregando uma solução tampão fosfato pH 3,0 acrescido da ciclodextrina- α -sulfatada e 2-hidroxiopropil- β -CD (2-OH- β -CD) em polaridade reversa. Como o objetivo do presente trabalho era separar também a 7-RispOH foi realizado pequenas modificações no método descrito nos estudos iniciais. No início, não foi empregada a 2-OH- β -CD e foi notado que tal ciclodextrina não era necessária para separação da 9-RispOH. Em seguida, foi adicionado a carboximetil- β -CD (0,2% m/v) e foi constatado que houve uma pequena separação dos enantiômeros da 7-RispOH sem prejudicar a separação dos enantiômeros da 9-RispOH. Partindo dessa mistura de CDs e utilizando solução tampão fosfato foi realizado uma otimização completa da separação dos enantiômeros dos metabólitos. Os fatores avaliados na CE foram tipo de seletores quirais, tipo de eletrólito de análise, temperatura do capilar, tensão aplicada e injeção aplicada. Entre todos esses parâmetros, a avaliação do seletor quiral foi o mais importante no desenvolvimento do método. A CD- α -sulfatada e a carboximetil- β -CD são consideradas ciclodextrinas aniônicas, e são principalmente utilizadas para a separação de compostos neutros e básicos. A carboximetil- β -CD possui grupos

carboxílicos, e a carga desses grupos depende do pH do meio [72]. Em pH inferior a 4, a carboximetil- β -CD não tem carga, portanto a mesma apresenta-se como uma ciclodextrina neutra, enquanto que em pH superior 4, apresenta-se como uma CD aniônica. Já a CD- α -sulfatada possui carga negativa em qualquer pH [73].

Assim, em pH 3,0 (ácido) e no modo analisado (polaridade reversa) existem vários fenômenos que podem favorecer a resolução dos enantiômeros. Nesse pH, os analitos em sua forma catiônica [74], podem interagir com as CDs aniônica (CD- α -sulfatada) e neutra (carboximetil- β -CD) [75]. Além disso, devido suas cargas positivas, a tendência desses analitos é migrarem para o cátodo, local da injeção, ao passo que as CDs aniônicas migram em direção oposta, em direção ao ânodo (local de detecção). Portanto esses fenômenos opostos e a presença de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com a CD neutra podem favorecer a enantioseparação [76]. Este fato reflete a complexidade dos mecanismos de inclusão e enantioseparação entre os enantiômeros e as CDs.

Na otimização desse parâmetro, primeiramente variou-se a quantidade de CD- α -sulfatada, sem a adição da carboximetil- β -CD. As concentrações utilizadas foram de 1,0%, 2,0% e 3,0% (m/v). As demais condições foram mantidas constantes, tais como: injeção em 0,5 psi por 10 s, temperatura de análise 20°C, solução tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3,0 e tensão de -10 kV. A Tabela 1 apresenta os resultados da variação da CD- α -sulfatada na resolução dos enantiômeros da 9-RispOH.

Tabela 1. Efeito da variação da concentração da CD- α -sulfatada na resolução dos enantiômeros da 9-RispOH.

| CD- α -sulfatada (% m/v) | Tempo Total (min) | Resolução |
|---------------------------------|-------------------|-----------|
| 1,0 | 13,49 | 1,14 |
| 2,0 | 19,82 | 1,61 |
| 3,0 | 20,41 | 2,36 |

Fonte: de Jesus, L. I. (2013) [77].

Com o aumento da quantidade da CD- α -sulfatada, a resolução entre os enantiômeros da 9-RispOH aumenta, mas diminui a resolução aquiral entre a 7-RispOH e 9-RispOH. Dessa forma, optou-se em utilizar em 2,0% (m/v) a concentração da CD- α -sulfatada. Após a otimização da quantidade de CD- α -sulfatada, foi avaliado a concentração de carboximetil- β -CD adicionada juntamente a CD- α -sulfatada 2,0% (m/v). Para otimização desse parâmetro todas as condições foram mantidas idênticas as condições anteriores e sua concentração foi variada entre 0,50, 1,0, 2,0 e 3,0% (m/v). A Tabela 2 apresenta os valores de resolução dos enantiômeros da 7-RispOH frente a quantidade de carboximetil- β -CD.

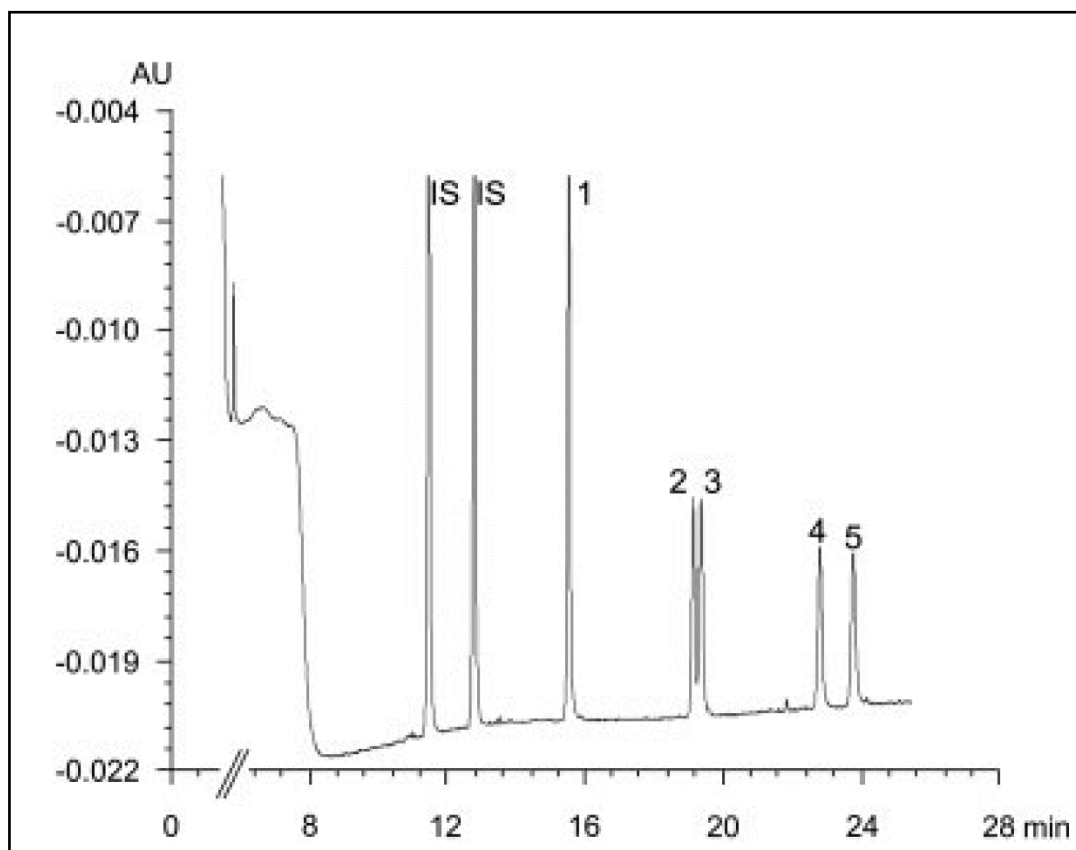
Tabela 2. Efeito da variação da concentração da carboximetil- β -CD na resolução da 7-RispOH.

| Carboximetil- β -CD (%) | Tempo Total (min) | Resolução |
|-------------------------------|---|-----------|
| 0,5 | 27,20 | 1,19 |
| 1,0 | 33,40 | 1,18 |
| 2,0 | Não houve migração dos picos em até 40 min de análise | |
| 3,0 | Não houve migração dos picos em até 40 min de análise | |

Fonte: de Jesus, L. I. (2013) [77].

A adição de seletores quirais na solução eletrolítica pode alterar a viscosidade da solução e, conseqüentemente, a mobilidade eletroforética dos

analitos [78]. Em concentrações elevadas, o tempo de análise torna-se muito longo, possivelmente devido ao aumento da viscosidade da solução contribuindo assim para um menor fluxo eletroforético e menor velocidade de migração aparente dos analitos. Além disso, pode haver uma interação na cavidade hidrofóbica carboximetil- β -CD muito forte e/ou interação do mesmo com a CD- α -sulfatada, impedindo a migração dos analitos. Portanto, a concentração selecionada de carboximetil- β -CD foi de 0,50% (m/v). Como condição final, a separação eletroforética dos analitos foi realizada empregando um capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno. Solução tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3,0 contendo CD- α -sulfatada 2,0% (m/v) e carboximetil- β -CD 0,5% (m/v) como seletores quirais. Todos os experimentos foram realizados em polaridade reversa 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. O método de separação desenvolvido não se mostrou rápido, porém foi o primeiro a relatar a separação enantiosseletiva dos dois metabólitos da risperidona simultaneamente por CE (Figura 4).

Figura 4. Eletroferograma da risperidona e seus metabólitos.

Solução tampão de análise: solução tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ contendo CD- α -sulfatada 2% (m/v) + carboximetil- β -CD 0,50 %, pH 3,0, temperatura de análise 20 °C, tensão aplicada: -10 kV, injeção hidrodinâmica: 0,50 psi durante 8 s, comprimento efetivo do capilar: 40 cm e detecção em 200 nm. IS- padrão interno (*rac*-mirtazapina) (1)- risperidona; (2)-7-RispOH E1; (3)-7-RispOH E2; (4)-(+)-9-RispOH; (5)-(-)-9-RispOH.. E1, primeiro enantiômero a migrar. E2, segundo enantiômero a migrar. *Centro quiral. Fonte: de Jesus et al. (2011) [79], com permissão.

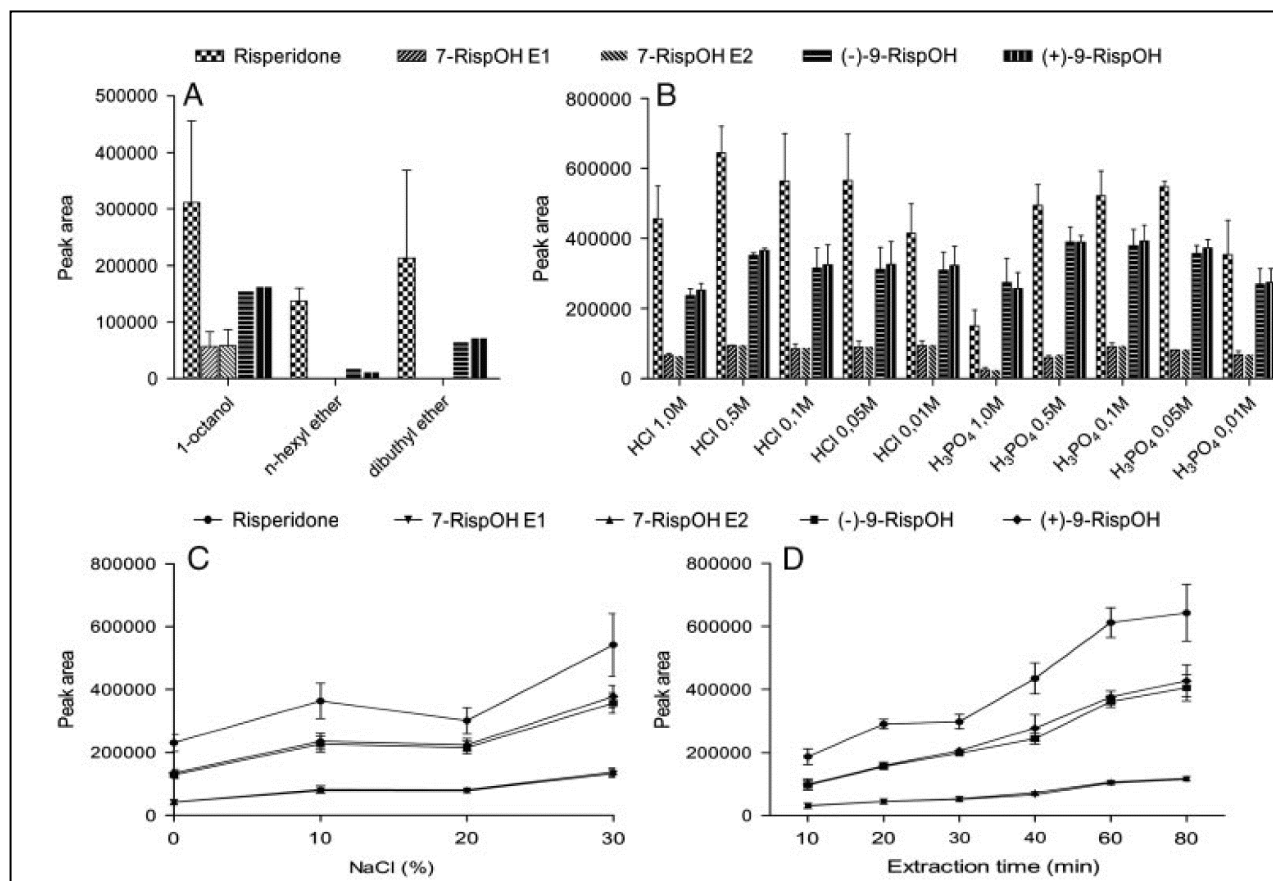
Após estabelecer as condições de separação, o próximo passo foi determinar as condições de extração dos analitos do meio de cultura por HF-LPME.

Devido à característica dos analitos (molécula básica e valor de pKa de 7,8) foi empregado HF-LPME no modo de 3 fases, mantendo a fase doadora alcalina e fase aceptora ácida. Partindo-se desse princípio, foi realizada a extração utilizando HF-LPME no modo três fases e meio de cultura líquido como matriz. Os parâmetros avaliados foram tipo de solvente orgânico, composição da

fase doadora, composição da fase aceptora e tempo de extração. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente empregando fibras de extração de 15 cm de comprimento. A velocidade de agitação foi estabelecida em 1500 rpm e o tempo de impregnação do solvente 10 s. A Figura 5 apresenta os gráficos relativos aos parâmetros avaliados.

Entre os parâmetros avaliados, a seleção do solvente orgânico apropriado para a HF-LPME é decisiva para uma eficiente extração do composto alvo. O solvente deve possuir algumas propriedades como ser imiscível em solução aquosa, ter alto ponto de ebulição impedindo sua evaporação durante a extração, ser compatível com a fibra hidrofóbica e possuir polaridade semelhante ao analito. Solventes poucos viscosos não são utilizados devido à sua alta volatilidade e à possível perda de solvente durante o processo de extração.

Figura 5. Parâmetros avaliados na HF-LPME.



(A) Efeito do solvente de extração. Condições de extração: solução de HCl 10 mmol L⁻¹ como fase aceitadora e 30 min de extração. (B) Efeito da composição da fase aceitadora. Condições de extração: n-octanol como solvente orgânico e 30 min de extração. (C) Efeito 'salgando'. Condições de extração: n-octanol como solvente orgânico, solução de HCl 10 mmol L⁻¹ como fase aceitadora e 30 min de extração. (D) Efeito do tempo de extração. Condições de extração: n-octanol como solvente orgânico, solução de HCl 10 mmol L⁻¹ como aceitador fase e NaCl a 20% (m/v). Fonte: de Jesus et al. (2011) [79], com permissão.

Nesse sistema, deve-se considerar o coeficiente de partição entre a fase orgânica e a fase doadora bem como entre a fase aceptora e a fase orgânica (Equação 7). Portanto, o analito deve ter uma alta afinidade pelo solvente de extração e após atingir a fase aceptora uma alta afinidade por esta fase e baixa afinidade pelo solvente de extração. Isso é facilmente conseguido no modo 3 fases devido a ionização do analito após atingir a fase aceptora. Na análise da risperidona e seus metabólitos foram avaliados os seguintes solventes: acetato de hexila, éter-*n*-hexílico, 1-octanol, acetato de dodecila e éter dibutílico.

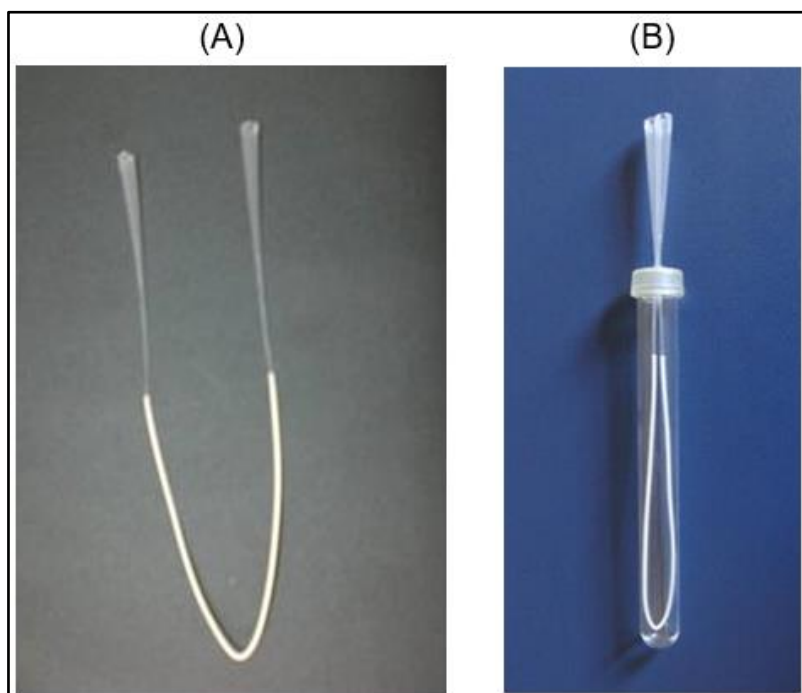
Conforme apresentado na Figura 5, somente o 1-octanol mostrou-se eficiente na extração dos analitos do meio de cultura. Este solvente apresentou um melhor resultado de recuperação para todos os analitos, especialmente para a 9-RispOH. O éter-*n*-hexílico e o éter dibutílico apresentou uma boa recuperação para a risperidona e moderada para a 9-RispOH, porém não foi capaz de extrair a 7-RispOH. Os demais solventes empregados não mostraram eficiência na extração da risperidona e metabólitos. A condição final estabelecida para extração dos analitos do meio de cultura foi emprego do modo de três fases utilizando uma fibra de polipropileno impregnada com 1-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 500 mmol L⁻¹ pH 12,0. O emprego da técnica miniaturizada HF-LPME nesse estudo mostrou-se muito promissora, pois apresentou uma excelente capacidade de limpeza da amostra e uma boa eficiência de extração pois o limite de quantificação do método ficou em 50 ng mL⁻¹ para os metabólitos e 100 ng mL⁻¹ para risperidona. Além disso, o método foi validado* empregando meio de cultura como matriz e apresentou uma faixa linear entre 50 – 1000 ng mL⁻¹ para os metabólitos e 100 – 5000 ng

**As tabelas com os dados da validação dos métodos serão omitidas neste texto. Essas informações estão disponíveis nos artigos anexos a documentação do memorial*

mL⁻¹ para a risperidona. Esse trabalho marcou o início dessa linha de pesquisa no grupo e o trabalho completo pode ser encontrado no periódico *Electrophoresis* [79] (<https://doi.org/10.1002/elps.201100328>).

Em termos gerais, a principal limitação em relação ao uso da HF-LPME foi na confecção do sistema de extração, que era todo manual. Assim, as fibras eram cortadas no tamanho pré definido e depois suas extremidades eram presas nas extremidades de ponteiros empregadas em biologia molecular. Além disso, após impregnação do solvente na fibra, era necessário remover o excesso do solvente em banho ultrassônico. Todas essas etapas resultavam em um tempo total de extração um pouco longo. Por outro lado, o sistema utilizado para agitação das amostras (Vibrax®) permitia a realização de 36 extrações ao mesmo tempo. A Figura 6 apresenta fotos da membrana e da unidade de extração. Diante dos resultados promissores e limitações observadas, principalmente do ponto de vista analítico, a risperidona foi utilizada como substrato no desenvolvimento de outro método, utilizando uma técnica de análise mais sensível e seletiva (LC-MS/MS) e outra técnica miniaturizada de extração, a SPME.

Figura 6. Representação da HF-LPME.



(A) Fibra de polipropileno conectada a duas ponteiras; (B) Recipiente de extração contendo a fibra com as ponteiras e o sistema vedado com tampa de poliuretano. Fonte: de Jesus, L. I. (2013) [77].

2.3.1.2. Análise Enantiosseletiva da RISP por LC-MS/MS após Extração por SPME

O objetivo principal nesse trabalho foi realizar a separação simultânea da RISP e dos enantiômeros da 7-RispOH e 9-RispOH utilizando uma mesma coluna e em condições ainda não descritas na literatura. Até o momento da publicação do nosso trabalho, não havia dados na literatura relatando o uso do modo polar-orgânico na separação quiral desses analitos. Dessa forma, esse modo foi avaliado preferencialmente. Para tanto, foram avaliadas sete tipos de colunas quirais: Chirobiotic T, Chiralpak AD, Chiralpak AD-RH, Chiralcel OD-R, Chiralcel OJ-H, Chiralcel OJ e Chiralcel OD-H. Além disso, o uso do aditivo orgânico, trietilamina (TEA), também foi avaliado em diferentes proporções nas fases móveis empregadas. Entre todas as colunas avaliadas, a única capaz de

separar os analitos foi a coluna Chiralcel OJ-H. A Tabela 3 apresenta os resultados. Portanto, a condição final para a separação foi o emprego da coluna Chiralcel OJ-H (tris-4-metilbenzoato de celulose; 150 mm × 4.6 mm, 5 µm) e metanol: etanol (50:50, v/v) + 0,2% de trietilamina como fase móvel. A vazão e temperatura utilizadas foram 0,8 mL min⁻¹ e 25 °C, respectivamente. A Figura 7 apresenta os cromatogramas relativos à separação dos analitos.

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos com a coluna Chiralcel OJ-H para diferentes fases móveis.

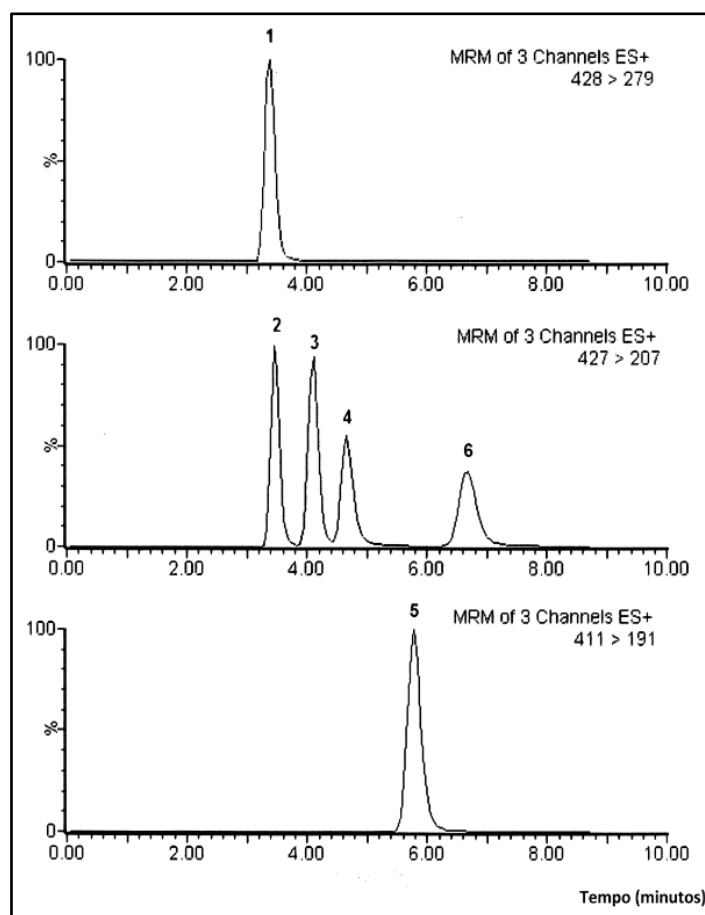
| Fase móvel | Vazão (mL min ⁻¹) | t _R (min) | R _{S1} | R _{S2} | R _{S3} | R _{S4} |
|--|----------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Metanol: isopropanol (80:20, v/v) +0,2% TEA | 0,4 | 16 | 2,6 | 1,4 | 3,5 | 1,9 |
| Etanol 100% + 0,2% TEA | 0,4 | 20 | 2,0 | 2,1 | 2,2 | 3,3 |
| Metanol: etanol (50:50, v/v) + 0,2% TEA | 0,4 | 16 | 2,3 | 1,5 | 3,2 | 2,3 |
| Metanol: etanol (50:50, v/v) + 0,2% TEA | 0,8 | 6,9 | 2,2 | 1,6 | 3,2 | 2,4 |

t_R: Tempo de retenção do último analito a eluir. TEA, trietilamina. Fonte: Bocato, M. Z. (2012) [80].

A coluna Chiralcel OJ-H é constituída pelo derivado de celulose tris (4-metilbenzoato), com partículas de sílica de 5 µm de diâmetro e comprimento de 15 cm. A separação cromatográfica de enantiômeros em colunas quirais é baseada em mecanismos que envolvam a formação de complexos diastereoisoméricos transitórios destes compostos [81]. Sabe-se que nas colunas derivadas de tris (4-metilbenzoato), os grupos carbonila dos ésteres, próximos aos resíduos de sílica, podem interagir com os enantiômeros por meio de ligações de hidrogênio e interações do tipo dipolo-dipolo. As ligações de hidrogênio podem ocorrer entre os grupos carbonila dos ésteres com as funções

hidroxila dos metabólitos, ou então, entre o hidrogênio da função amida do seletor quiral com as carbonilas, presentes tanto na estrutura da risperidona quanto nos metabólitos. Além disso, complexos de inclusão podem ser formados decorrentes do encaixe da porção aromática dos analitos nas cavidades quirais da fase estacionária [81].

Figura 7. Separação dos analitos na coluna Chiralcel OJ-H e análise por LC-MS/MS.



Cromatograma MRM de 3 canais; 1° canal corresponde à transição de m/z 428>279 para o padrão interno ranolazina; 2° canal corresponde à transição de m/z 427>207 para os metabólitos e o 3° canal corresponde à transição de m/z 411>191 para a risperidona. 1) ranolazina 2) 7-RispOH (E1); 3) 7-RispOH (E2); 4) (+)-9-RispOH; 5) RISP e 6) (-)-9-RispOH. Fonte: adaptado de Bocato et al. (2012) [82], com permissão.

É importante ressaltar que o mecanismo de interação entre os analitos e a fase estacionária, neste caso, é dependente também da fase móvel escolhida

e da natureza dos compostos separados [83]. No modo polar-orgânico utilizado, a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, sendo assim, os analitos mais polares serão mais facilmente eluídos pela fase móvel, interagindo menos com a fase estacionária e, portanto, terão um tempo de retenção menor [19]. A presença do aditivo orgânico TEA na fase móvel contribui com um mecanismo adicional de interação com os grupos silanóis residuais da sílica, deixando os analitos mais livres desta interação com os grupos silanóis. Isto proporciona uma melhor resolução cromatográfica, evitando possíveis interações secundárias com a sílica e assimetria caudal causada por este tipo de interação [19].

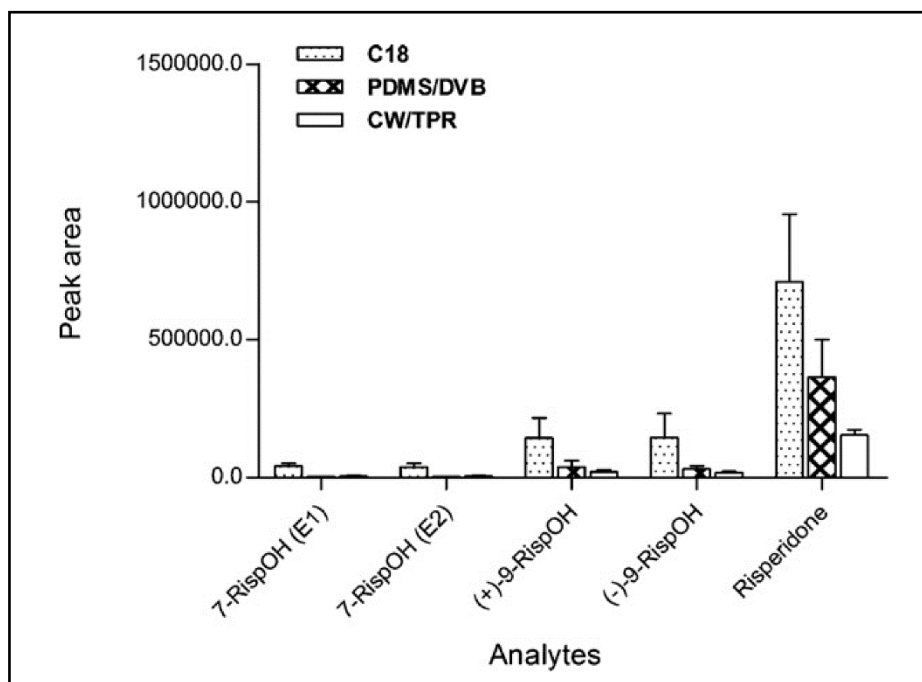
Após estabelecer as condições de separação, a próxima etapa foi estabelecer uma condição para extração da risperidona e seus metabólitos do meio de cultura por SPME. A SPME é uma técnica que consiste em extrair de uma amostra analitos, durante um tempo pré-determinado, por um fino recobrimento polimérico presente em um capilar de sílica fundida [84]. A extração inicia-se imediatamente após a fibra ser exposta à amostra e termina quando o equilíbrio entre a concentração dos analitos presentes no polímero e a concentração dos analitos presentes na amostra for atingido. Esta afirmação implica que quando o equilíbrio é atingido, a quantidade de analito extraído pela fibra é constante, por isso, o máximo de extração é atingido nas condições de equilíbrio [53,54].

A Equação 9 que demonstra as condições de equilíbrio entre a fibra e a matriz é expressa pela constante de distribuição K_{es} :

$$K_{es} = \frac{c_e^\infty}{c_s^\infty} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde, C_e^∞ é a concentração do analito presente na fibra extratora em condições de equilíbrio e, C_s^∞ é a concentração do analito presente na amostra, no equilíbrio.

As condições de extração que podem influenciar na constante de distribuição e, assim, afetar a SPME são: temperatura, agitação do sistema, espessura do filme polimérico, pH e força iônica da amostra. Por isso, estes fatores devem ser avaliados durante a técnica. Entre esses fatores, o tipo de fibra utilizado é muito importante, e normalmente, é o primeiro parâmetro a ser avaliado. As condições iniciais empregadas foram extração por 45 min em temperatura ambiente e agitação de 900 rpm; 2,0 mL meio de cultura e 2,0 mL solução tampão fosfato pH 7,0, 0.5 mol L⁻¹, acrescidos de 30% (m/v) de NaCl, dessorção em fase móvel etanol: metanol (50:50, v/v) + 0,2% TEA a 25 °C por 5 min. A Figura 8 mostra que os melhores resultados foram obtidos com a fibra C18.

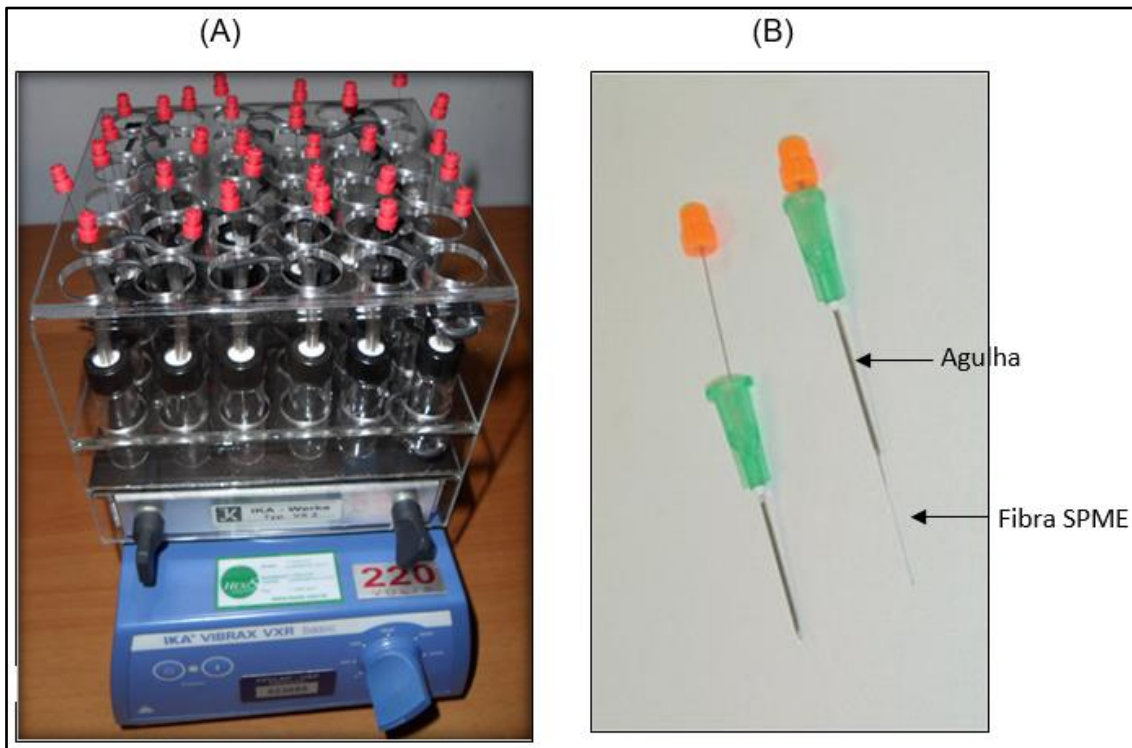
Figura 8. Fibras avaliadas na extração dos analitos

Comparação da eficiência de extração da RISP e seus metabólitos (9-RispOH e 7-RispOH) em meio de cultura Czapek entre as fibras CW-TPR, C18 e PDMS-DVB. Extração 45 min a 23 ± 2 °C e agitação de 900 rpm; 2 mL meio de cultura e 2 mL solução tampão fosfato pH 7,0, 0,5 mol L⁻¹, acrescidos de 30% (m/v) de NaCl, dessorção em fase móvel etanol: metanol (50:50, v/v) + 0,2% TEA a 25 °C por 5 min. Fonte: Bocato et al. (2012) [82], com permissão.

Deve-se conhecer as propriedades físico-químicas dos analitos para a escolha das fibras, uma vez que as fibras possuem faixas de pH adequadas de trabalho e para se garantir que durante o processo de extração, os analitos sejam extraídos, preferencialmente, em sua forma neutra. Tanto a RISP, quanto seus metabólitos apresentam caráter básico com pKa próximo de 8,6 [74] e, portanto, pode-se concluir que a extração com a fibra C18 acontece devido ao processo de adsorção e de absorção. As fibras do tipo C18 apresentam formato diferenciado das outras fibras. É uma fibra interna a uma agulha hipodérmica e, desta forma, ela não é exposta por suporte apropriado como no caso das outras fibras, inicialmente desenvolvidas. O formato em agulha desta fibra (Figura 9), sem a necessidade de um suporte apropriado, possibilitou que várias fibras (36

unidades) pudessem ser utilizadas ao mesmo tempo, utilizando como agitador, um equipamento agitador do tipo Vibrax® (Figura 9).

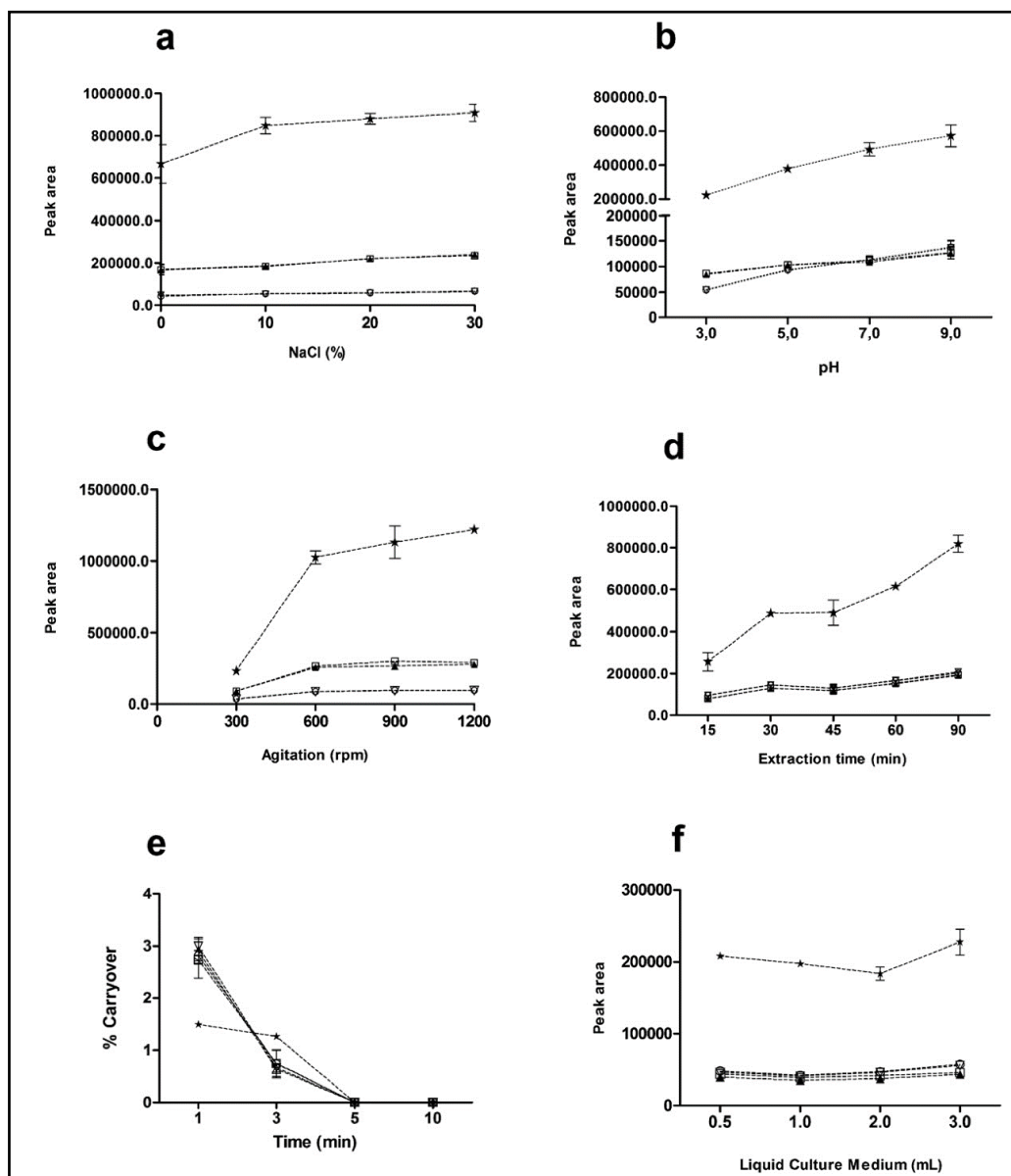
Figura 9. Representação da SPME.



(A) Agitador com as várias unidades de SPME para extração. (B) Fibra para SPME C18. Fonte: Bocato, M. Z. (2012) [80].

A Figura 10 apresenta os demais parâmetros avaliados na SPME. A condição estabelecida para extração por SPME foi utilizar uma fibra C18 mergulhando diretamente a fibra na amostra por 30 min e dessorvendo a fibra diretamente na fase móvel por 5 min.

Figura 10. Parâmetros avaliados na SPME



Solvente de dessorção: fase móvel; tempo de dessorção: 5 min. Temperatura de extração: 25 °C (± 2 °C). a) adição de sal; (b) efeito do pH; (c) agitação; (d) tempo de extração; (e) porcentagem de carryover; (f) volume da amostra (n = 3). Risperidona (*); (+) - 9-RispOH (\blacktriangle); (-)-9-RispOH (\square); 7-RispOH E1 (\circ); 7-RispOH; E2 (∇). Fonte: Bocato et al. (2012) [82], com permissão.

Esse método apresentou algumas vantagens frente ao método anteriormente desenvolvido por nós, por eletroforese capilar, como, por exemplo, um menor tempo de análise 8 min *versus* 22 min. Além disso, foi possível diminuir o limite de quantificação dos metabólitos para 25 ng mL⁻¹. Contudo, o destaque

maior desse método foi a possibilidade de fazer até 36 extrações ao mesmo tempo utilizando a SPME. A fibra de SPME empregada nesse estudo foi uma fibra C18 comercializada no interior de uma agulha hipodérmica. Assim, nesse caso não era necessário um *holder* para suportar a fibra. Simplesmente o septo do *vial* era suficiente para isso. Dessa forma, apesar do tempo de extração ser relativamente longo (30 min), com o uso desse sistema, a possibilidade de realizar 36 extrações ao mesmo tempo, compensava, de certa forma, o longo tempo de extração. Essa adaptação nos deixou bem empolgados, porque quando trabalhei com a SPME no meu doutorado eu realizava uma extração por vez, o que é inviável quando se deseja realizar centenas de extrações.

Esse trabalho mostrou pela primeira vez o emprego da SPME na análise de fármacos em meio de cultura por imersão direta e o trabalho completo pode ser encontrado no periódico *Analytica Chimica Acta* [82] (<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.056>). Estabelecida as condições de extração, o processo de SPME foi muito simples, sendo que após dessorver a fibra na fase móvel, o extrato era diretamente injetado no sistema cromatográfico. A técnica promoveu um ótimo *clean up* na amostra sendo que não foi observado fenômenos de supressão da ionização durante as análises por LC-MS/MS. Além disso, a separação quiral dos analitos no modo polar-orgânico ainda não tinha sido reportado na literatura e apresentou vantagens frente a outros métodos já descritos, principalmente em relação ao tempo de análise [71,85].

2.3.1.3. Estudos Enantiosseletivos de Biotransformação da RIS

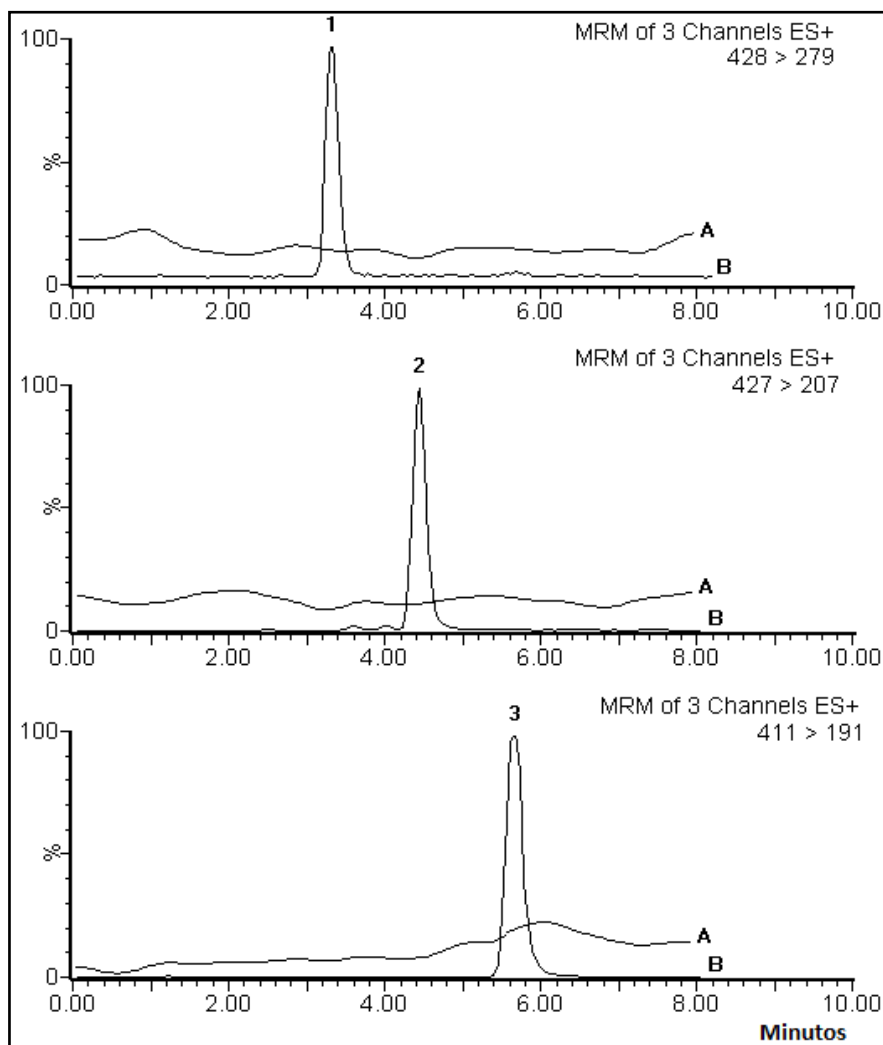
Os estudos de biotransformação da risperidona foram realizados com

fungos endofíticos e de solos cedidos pela Profas. Mônica T. Pupo e. Niede A. C. Furtado da FCFRP-USP. Contudo, os fungos que apresentaram um potencial em metabolizar a risperidona foram os fungos do gênero *Cunninghamella* obtidos da ATCC e cedidos pela Profa. Mônica. Os fungos filamentosos *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans*: NRRL 1393 ATCC 10028B foram capazes de biotransformar estereosseletivamente a RISP em seu metabólito ativo 9-RispOH. A formação dos enantiômeros da 7-RispOH não foi observada. O fungo *Cunninghamella echinulata* foi capaz de biotransformar estereosseletivamente a RISP no enantiômero (+)-9-RispOH com uma razão enantiomérica de 100% (Figura 11). O fungo *Cunninghamella elegans* também foi capaz de biotransformar estereosseletivamente a RISP em ambos enantiômeros da 9-RispOH, porém o enantiômero (+)-9-RispOH foi produzido com maior intensidade que o enantiômero (-)-9-RispOH. A Tabela 4 mostra razão enantiomérica (re) para cada gênero *Cunninghamella* e a concentração obtida em cada período.

Tabela 4. Estudos de biotransformação empregando fungos do gênero *Cunninghamella*.

| Horas | <i>Cunninghamella echinulata</i> | | <i>Cunninghamella elegans</i> | | |
|-------|-------------------------------------|--------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------|
| | (+)-9-RispOH ng mL ⁻¹ | re (%) | (+)-9-RispOH ng mL ⁻¹ | (-)-9-RispOH ng mL ⁻¹ | re (%) |
| 96 | 147 | 100 | ND | ND | - |
| 120 | 577 | 100 | ND | ND | - |
| 144 | 1094 | 100 | ND | ND | - |
| 168 | 1558 | 100 | 26 | 19* | 15 |
| 192 | 968 | 100 | 38 | 25 | 21 |
| 216 | 1506 | 100 | 58 | 40 | 18 |

ND = valor inferior ao LQ. *Valor inferior ao LQ mas empregado para estimar a razão enantiomérica. Fonte: adaptado de Bocato et al. (2012) [82], com permissão.

Figura 11. Cromatogramas representativos dos estudos de biotransformação.

A) Cromatograma representativo de meio de cultura líquido Czapek incubado com o *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A (controle) mostrando que este fungo não produz quaisquer metabólitos secundários no tempo de retenção dos analitos. B) Cromatograma representativo de 3 canais em modo MRM do fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A, após 168 h de incubação. Padrão interno (1), (+)-9-RispOH (2) e RISP (3). Fonte: adaptado de Bocato et al. (2012) [82], com permissão.

Os resultados de biotransformação foram bem promissores considerando a estereosseletividade no processo (100% de razão enantiomérica), além de que as técnicas miniaturizadas estavam se mostrando uma boa alternativa as técnicas convencionais devido a simplicidade e menor produção de resíduo químico. Portanto, os resultados desses projetos marcaram o início dessa linha de pesquisa no nosso grupo e serviu como base para os demais projetos que

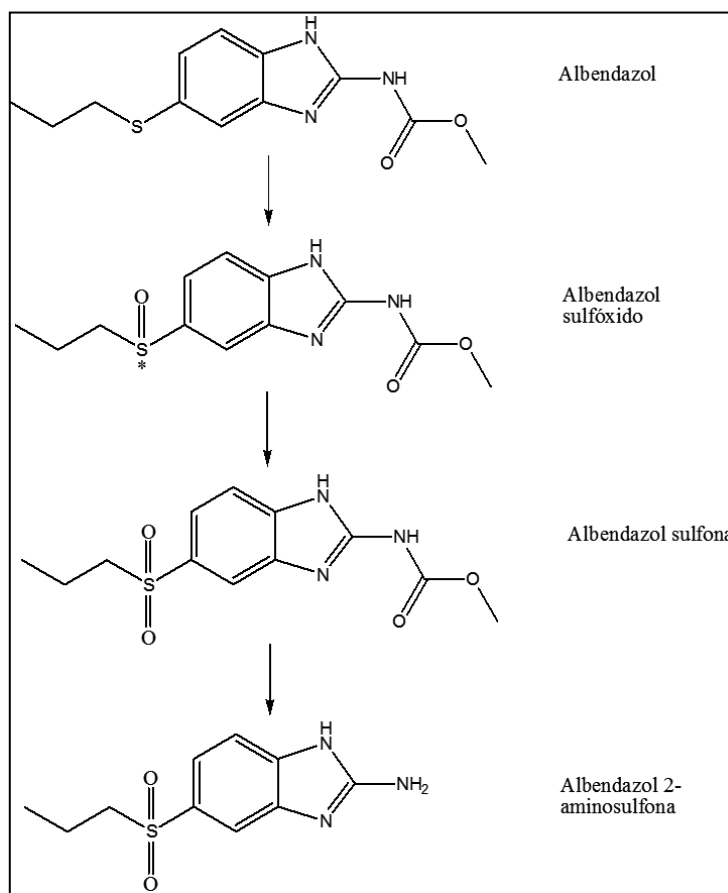
foram sendo implementados com a chegada de novos alunos.

2.3.2. Estudos de Biotransformação do Albendazol

Outro substrato que utilizamos no início do desenvolvimento dessa linha de pesquisa foi o albendazol (ABZ). O albendazol é vendido mundialmente para o controle de helmintíases [86]. Este fármaco é biotransformado pelas enzimas do CYP450 e pelas flavinas mono oxigenases para exercer sua atividade citotóxica. Depois de administrado, o ABZ é extensivamente metabolizado em seu metabólito quiral e ativo, o albendazol sulfóxido (ABZSOX). Em seguida, o ABZSOX é oxidado a albendazol sulfona (ABZSO₂), metabólito inativo, em um processo catalisado pelo CYP450 e, finalmente, em menor proporção, pela N-desacetilação do ABZSO₂, forma-se o albendazol 2-aminosulfona (ABZ-2-NH₂SO₂), também farmacologicamente inativo (Figura 12). Atualmente o metabólito ativo já é comercializado como mistura racêmica com o nome genérico de ricobendazol.

Diante disso, nosso grupo de pesquisa decidiu investigar se o albendazol seria biotransformado em seu metabólito ativo, o ABZSOX, e se esse processo seria enantiosseletivo.

No desenvolvimento desse projeto foi adotado a mesma estratégia adotada para análise da risperidona. Assim duas técnicas de separação foram empregadas para análise desse substrato, a CLAE e a CE. Contudo, a técnica de preparo de amostra foi a mesma, a HF-LPME.

Figura 12. Estrutura química do albendazol e de seus metabólitos.

* centro quiral.

A análise do ABZ e seus metabólitos mostrou bem enriquecedora do ponto de vista científico, porque foi uma molécula mais complicada de trabalhar. O ABZ é pouco solúvel em água, portanto as análises por eletroforese capilar seriam mais difíceis de serem realizadas. Apesar de surfactantes tornarem possível a análise de moléculas pouco polares por eletroforese capilar (nesse caso, por cromatografia eletrocínica micelar), muitas vezes a adição desses agentes prejudica a separação quiral. Além da pouca solubilidade em água, o ABZ sofre oxidação muito facilmente, além de ser fotossensível. Portanto, durante todo o desenvolvimento dos métodos foi levado em conta essas características intrínsecas (e bem interessantes do ponto de vista analítico) dessa molécula.

2.3.2.1. Análise Enantiosseletiva do ABZSOX por Eletroforese Capilar

Apesar do tentativas quanto o uso de solventes e tensoativos, a análise do ABZ não foi possível nesse estudo. Portanto, somente os enantiômeros do ABZSOX foram analisados. Mesmo assim, durante toda a avaliação da separação do ABZSOX, foram adicionadas quantidades de ABZ iguais às dos metabólitos, de maneira a avaliar a influência do mesmo durante a separação e posteriormente a extração. Todo procedimento de otimização inicial para separação dos metabólitos do albendazol foi realizado utilizando um capilar de sílica fundida não-recoberto de 75 μm de diâmetro interno e 54 cm de comprimento efetivo. Nessa etapa inicial, a temperatura foi fixada em 20 °C e a tensão ajustada para que a corrente não ultrapassasse 80 μA . Para tanto, as seguintes soluções tampão foram utilizadas:

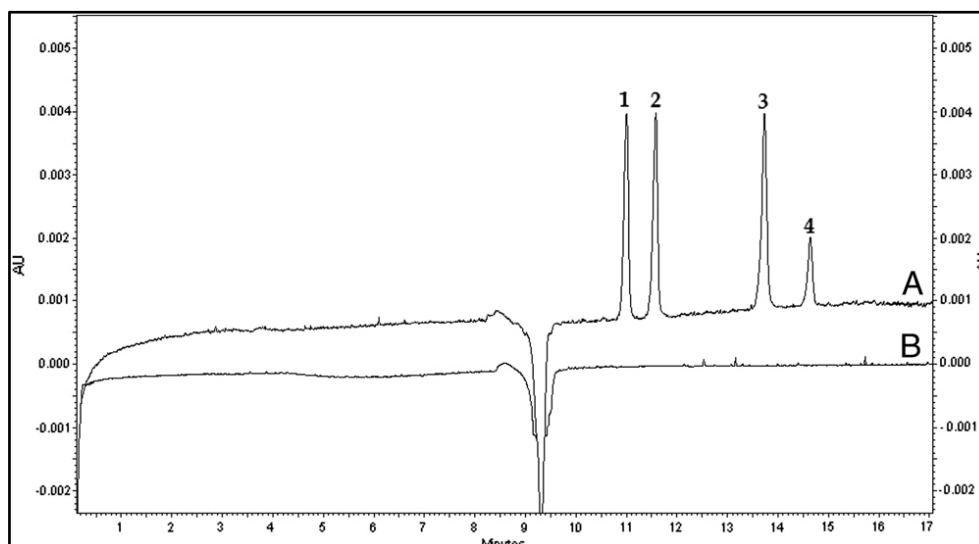
- Solução tampão fosfato 25 mmol L^{-1} , pH = 2,0
- Solução tampão tris 25 mmol L^{-1} , pH = 7,0 e 9,3
- Solução tampão borato 25 mmol L^{-1} , pH = 9,0

Empregando essas soluções foram avaliadas as seguintes ciclodextrinas e seus derivados: CDs neutras [2-hidroxipropil- β -CD e heptakis(2,6-di-O-metil)- β -CD] avaliadas entre 10 – 50 mmol L^{-1} e as CDs carregadas (sulfobutiéter- β -CD, CD- β -sulfatada, carboximetil- β -CD) entre 0,5-5% (m/v). A Tabela 5 abaixo relaciona as melhores condições iniciais de análise obtidas:

Tabela 5. Comparação dos melhores resultados inicialmente obtidos.

| Ciclodextrinas | Solução Tampão (mmol L ⁻¹) | Resolução (ABZSOX) |
|--|---|-----------------------|
| carboximetil-β-CD (0,5%) + CD-β-sulfatada (1,0%) | Borato 25 (pH = 9,0) | 0,67 |
| carboximetil-β-CD (2,0%) | Borato 25 (pH = 9,0) | 0,73 |
| sulfobutiléter-β-CD (4,0%) + 10% acetonitrila | Tris 25 (pH = 9,3) | 1,71 |
| CD-β-sulfatada (2,0%) | Tris 25 (pH = 9,3) | 2,51 |

A CD-β-sulfatada apresentou o melhor resultado e, portanto, foi escolhida como o seletor quiral para realizar uma otimização mais detalhada das condições de separação. O ABZSOX é uma molécula anfótera com dois valores de pKa 9,79 e 0,2 [87]. Nesse intervalo de pH, o ABZSOX comporta-se como uma molécula neutra podendo formar complexos de inclusão com a CD carregada [87–89]. Como condição final de análise foi utilizado solução tampão tris 50 mmol L⁻¹ pH 9,3 contendo CD-β-sulfatada 3% (m/v). A temperatura de análise e a tensão aplicada foram de 20 °C e +15 kV, respectivamente. O comprimento efetivo do capilar foi de 40 cm e foi aplicado uma injeção hidrodinâmica de 0,5 psi durante 10 seg. A Figura 13 apresenta um eletroferograma referente a análise simultânea dos enantiômeros do ABZSOX e dos metabólitos, albendazol sulfona e aminosulfona. Essa condição final de separação dos metabólitos do albendazol por eletroforese capilar apresentou três grandes vantagens frente às outras que já tinham sido publicadas [87,90–92]: uma melhor resolução (Rs) de separação dos enantiômeros do ABZSOX (Rs = 2,60) utilizando CD-β-sulfatada, a separação dos enantiômeros do albendazol sulfóxido em menor tempo e a análise do metabólito albendazol aminosulfona que não tinha sido reportada em nenhum método anterior de análise quiral dos metabólitos do albendazol.

Figura 13. Eletroferogramas representativos da análise dos metabólitos do ABZ

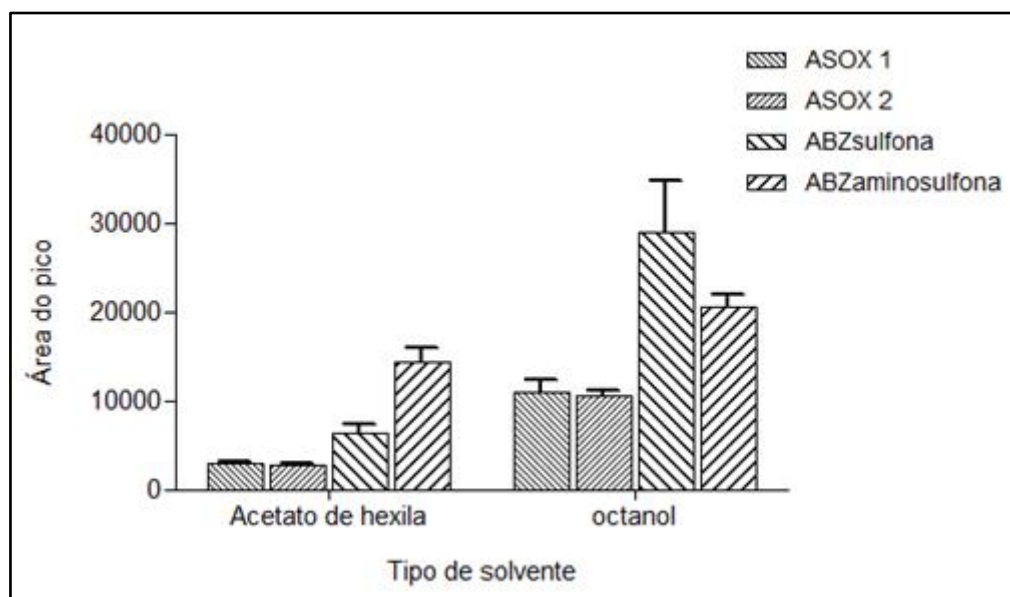
(A) Eletroferograma referente a análise dos metabólitos do ABZ. (B) branco de meio de cultura. Solução tampão tris(hidroximetilaminometano) 50 mmol L⁻¹ contendo β-sulfatada-CD 3% (m/v), pH 9,3, temperatura de análise 20 °C, voltagem aplicada: +15 kV, injeção hidrodinâmica: 0,5 psi durante 10 s, comprimento efetivo: 40 cm e detecção em 220 nm. (1 – albendazol sulfóxido enantiômero 1 (ABZSOX 1); 2 – albendazol sulfóxido enantiômero 2 (ABZSOX 2); 3 – albendazol sulfona; 4 – albendazol aminosulfona). Fonte: Carrão et al. (2011) [3], com permissão.

Seguindo o mesmo raciocínio do método desenvolvido para análise da risperidona, nesse caso foi também utilizado a HF-LPME como técnica de preparação de amostras pois a compatibilidade do extrato final obtido com as análises por eletroforese capilar é de grande valia.

Partindo-se desse princípio foi realizada uma otimização da extração utilizando HF-LPME no modo três fases e meio de cultura líquido como matriz. Os seguintes parâmetros de extração foram avaliados: tipo de solvente de extração, tempo de extração, adição de cloreto de sódio, composição da fase doadora e composição da fase aceptora. Durante toda otimização da HF-LPME utilizou-se uma fibra de 15 cm de comprimento, agitação em 1500 rpm e temperatura de análise 25 °C. O primeiro parâmetro avaliado foi o tipo de solvente e foram escolhidos para serem avaliados os seguintes solventes:

acetato de hexila, acetato de dodecila, *n*-octanol, éter butílico e éter *n*-hexílico. Observou-se que somente o acetato de hexila e o *n*-octanol se mostraram eficientes na extração dos metabólitos. Nota-se também que o *n*-octanol apresentou melhores valores de recuperação em relação ao acetato de hexila (Figura 14). O acetato de dodecila, o éter butílico e o éter *n*-hexílico não demonstraram ser capazes de extrair os analitos, possivelmente devido ao baixo coeficiente de partição desses com o analito frente a esses solventes.

Figura 14. Avaliação do tipo solvente orgânico utilizado na HF-LPME.



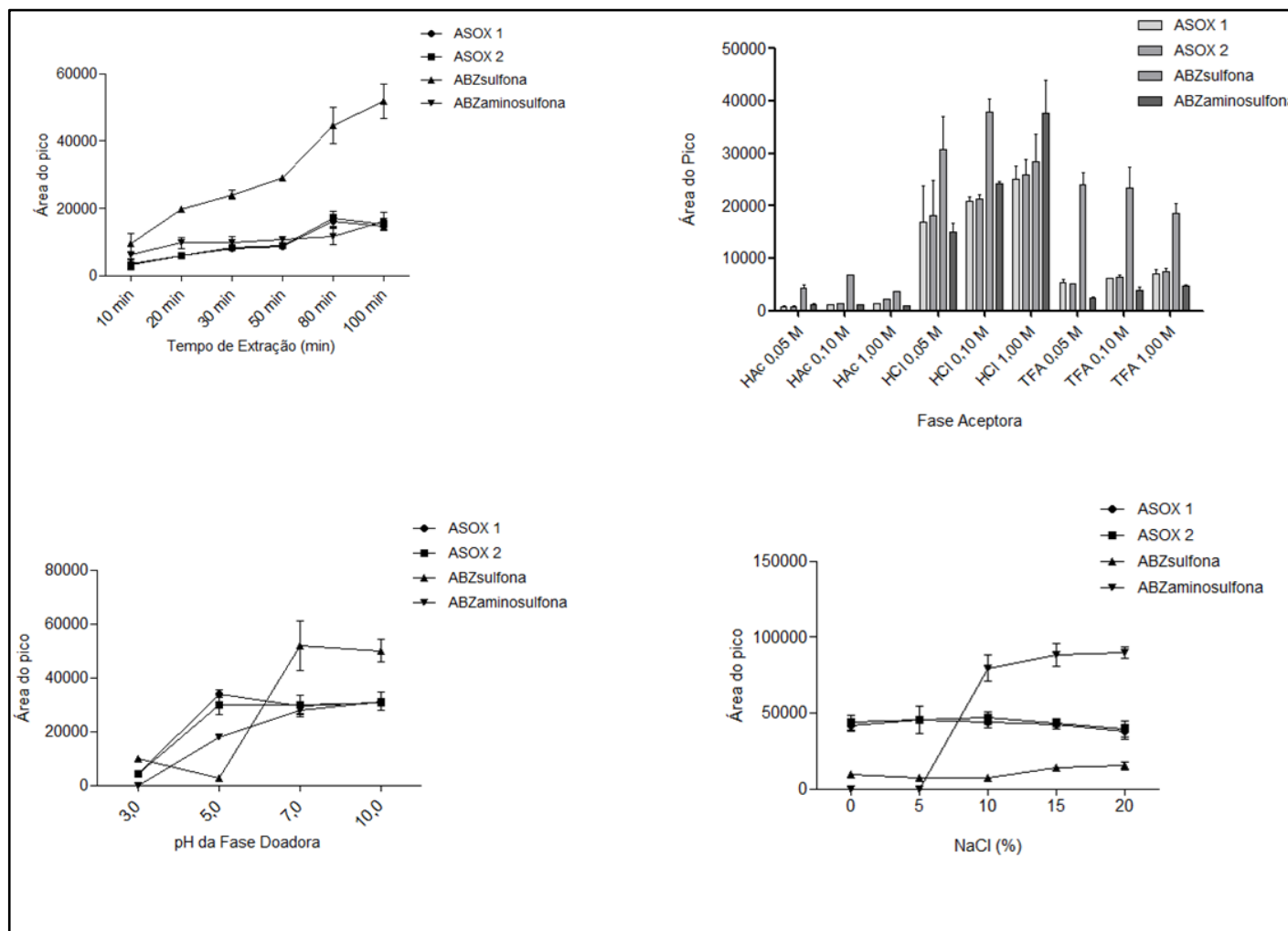
Temperatura de extração 25 °C; tempo de extração 40 min, comprimento da fibra de extração 15 cm; pH da fase doadora 10; fase acceptora HCl 100 mmol L⁻¹. Fonte: adaptado de Carrão et al. (2011) [3], com permissão.

A Figura 15 apresenta os demais parâmetros avaliados na HF-LPME. Por conseguinte, as condições de extração foram definidas: solvente de extração: 1-octanol, tempo de extração: 50 min, composição da fase doadora: 1,0 mL de meio de cultura; solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH=10,0), concentração de cloreto de sódio: 10% (m/v), composição da fase acceptora: ácido clorídrico

1,0 mol L⁻¹, velocidade de agitação: 1500 rpm.

Um grande aprendizado no desenvolvimento desse método foi relacionado a instabilidade do albendazol. Portanto, durante o processo de extração foi adicionado ao meio metabissulfito de sódio com o objetivo de prevenir a oxidação do ABZ durante o procedimento. Além disso, mais uma vez a HF-LPME mostrou ser uma técnica adequada para ser utilizada junto a eletroforese capilar, pois a injeção direta do extrato obtido deixa o método muito atrativo, principalmente quando várias amostras são analisadas. Deve ser destacado que anterior a injeção, 50 µL do extrato foi diluído com água: solução tampão de análise: metanol (6,0:3,9:0,1 v/v/v) para evitar o efeito *anti-stacking* dos eletrólitos presentes no extrato. O método foi todo validado e apresentou uma faixa linear de 250 – 5000 ng mL⁻¹ para análise do ABZSOX e limite de quantificação de 250 ng mL⁻¹. Esse foi o primeiro método descrito na literatura que emprega o uso da HF-LPME para extração dos metabólitos do ABZ além de ser o primeiro a relatar estudos de biotransformação do ABZ e análise por eletroforese capilar. O trabalho completo pode ser encontrado na *Electrophoresis* [3] (<https://doi.org/10.1002/elps.201000658>) tendo sido publicado na edição especial *Enantioseparations*.

Figura 15. Parâmetros avaliados na HF-LPME para extração dos metabólitos do ABZ do meio de cultura.



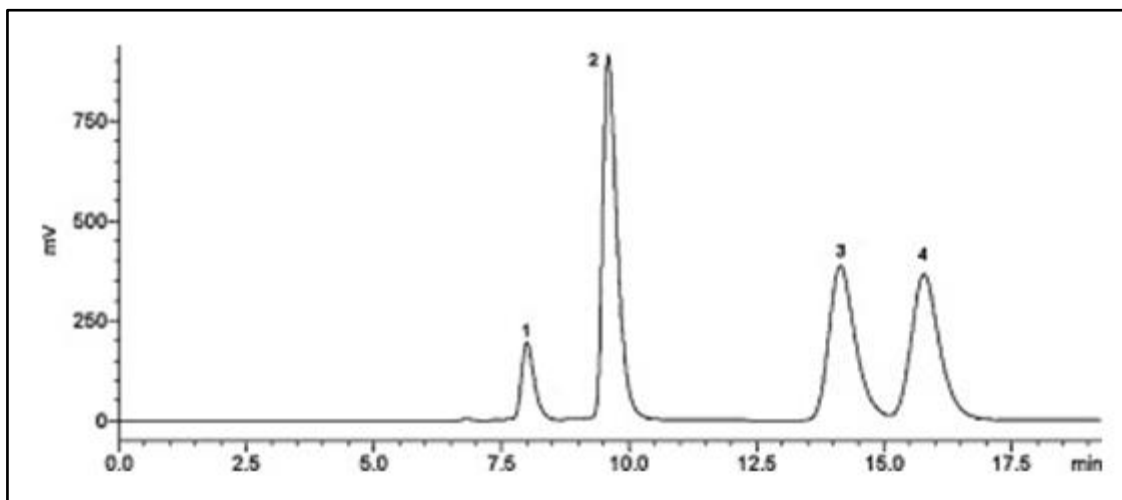
Fonte: adaptado de Carrão et al. (2011) [3], com permissão.

2.3.2.2. Estudos Enantiosseletivos do ABZ por CLAE

Os estudos de biotransformação do ABZ empregando a eletroforese capilar como técnica de análise foram limitados, uma vez que, não foi possível atingir um limite de quantificação adequado para avaliação de diferentes fungos, pois em muitos casos a quantidade de metabólitos formados é pequena. Diante disso, desenvolvemos outro método para análise do ABZSOX empregando a CLAE como técnica de análise. Nesse caso, utilizamos a HF-LPME como técnica de preparo de amostras, pois o procedimento já estava otimizado.

Diferentes colunas cromatográficas quirais foram avaliadas e sempre priorizando o modo polar-orgânico de eluição. Entre as diversas condições avaliadas, a melhor condição para a separação dos enantiômeros do albendazol sulfóxido, do ABZ e do albendazol sulfona foi obtida utilizando a coluna Chiralpak AS (tris-[(S)- α -metilbenzilcarbamato de amilose; 250 mm x 4,6 mm; 10 μ m) e acetonitrila: etanol (97:03 v/v + 0,20% de ácido acético e 0,20% de trietilamina) foi empregada como fase móvel. A vazão foi ajustada para 0,50 mL min⁻¹ e a temperatura de análise de 23 \pm 2 °C (temperatura ambiente).

Com essas condições conseguiu-se uma resolução entre os enantiômeros do ABZSOX de 1,60; além disso, o ABZ e seu metabólito, albendazol sulfona, foram resolvidos na mesma corrida, empregando a mesma fase móvel (Figura 16). Até aquele momento, não havia dados na literatura que empregam esse modo de eluição, para a análise desses analitos, sendo o mais rápido descrito para análises por CLAE empregando o detector UV-Vis.

Figura 16. Separação do albendazol e seus metabólitos.

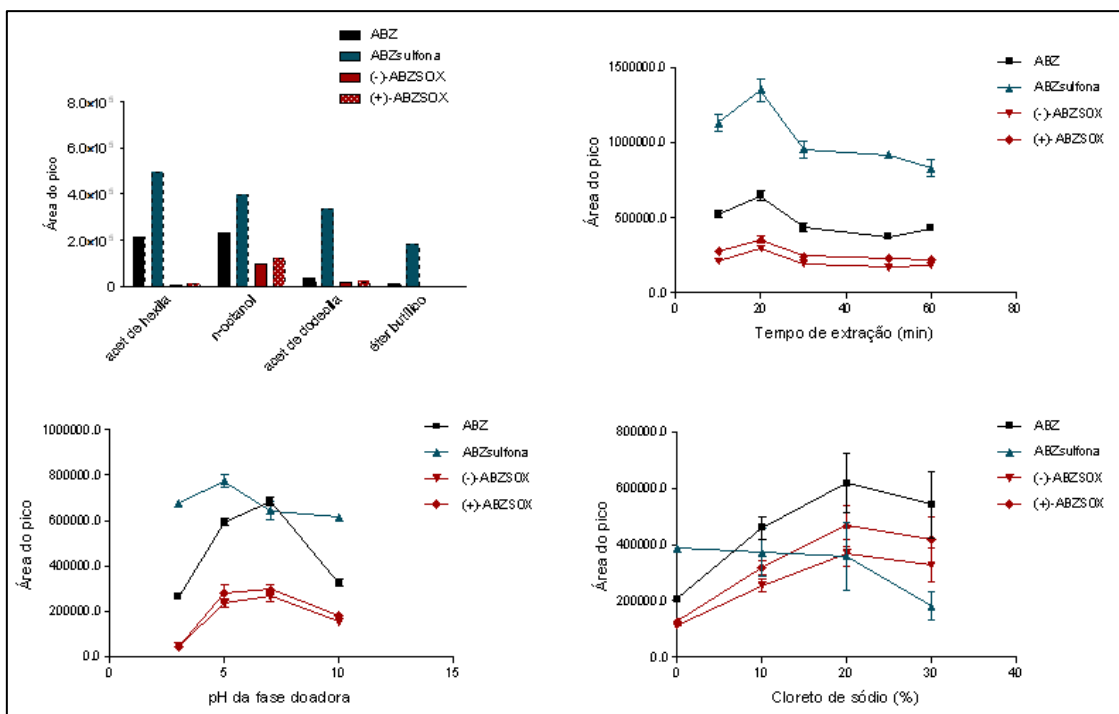
Coluna Chiralpak AS. (1) ABZSO₂, (2) ABZ (3) (-)-ABZSOX, (4) (+)-ABZSOX. Fase móvel: acetonitrila: etanol (97:03, v/v) + 0,2% de ácido acético + 0,2% de trietilamina; vazão 0,5 mL min⁻¹. Concentração de cada analito: ABZSO₂, 5,0 µg mL⁻¹; ABZ, 5,0 µg mL⁻¹; (-)-ABZSOX, 2,5 µg.mL⁻¹; (+)-ABZSOX 2,5 µg.mL⁻¹. Fonte: Hilário et al. (2012) [93], com permissão.

O grande destaque da separação desses compostos foi o uso, simultâneo, dos aditivos ácido (ácido acético) e básico (trietilamina) na fase móvel. Esse tipo de associação não é muito realizado devido a possibilidade de precipitação de sais e conseqüentemente entupimento de linhas no sistema CLAE ou na coluna, contudo, somente após a adição desses 2 modificadores, a separação foi obtida com resolução adequada entre os analitos. Alguns trabalhos têm demonstrado que aditivos ácidos e básicos podem ser empregados para diminuir as interações indesejadas entre solutos polares e a fase estacionária [83,93]. O efeito de tal melhoria pode ser resultado do modificador isolado ou uma soma dos dois modificadores. A influência de aditivos ácidos pode ser atribuída à minimização de interações inespecíficas com partes não seletivas do polímero ou ao suporte de sílica ou ao aumento da retenção dos analitos que podem interagir com o aditivo (formação de pares iônicos) e levar a uma melhor interação com a fase estacionária. O efeito do

aditivo amina foi atribuído a uma restrição de acesso causada pelo modificador impedindo dessa forma o acesso do analitos aos grupos silanóis livres [83,93]. Além disso, o aumento da concentração iônica da fase móvel pode também ter influenciado a resolução dos analitos.

Apesar da HF-LPME já ter sido desenvolvida no método anterior, nesse estudo foi avaliado o uso da HF-LPME no modo 2 fases. Considerando que no modo 2 fases a fase aceptora é um solvente orgânico, nós levantamos a hipótese de que esse modo poderia ser compatível com a injeção direta no sistema CLAE. Dessa forma, os diferentes parâmetros que influenciam a HF-LPME no modo duas fases foram avaliados (Figura 17).

Figura 17. Avaliação do modo 2 fases na extração do ABZ e seus metabólitos.



Extrações realizadas a 25° C empregando fibras de polipropileno de 15 cm de comprimento com 600 µm de diâmetro interno e tamanho de poros de 0,2 µm. n = 3. Concentração de cada analito: ABZ 5,0 µg mL⁻¹; ABZsulfona 5,0 µg mL⁻¹; (-)-ABZsulfóxido 2,5 µg mL⁻¹; (+)-ABZsulfóxido 2,5 µg mL⁻¹.

Nesse caso, apesar do modo ter sido compatível com o sistema de análise e, portanto, injeção direta no sistema CLAE, a recuperação obtida para o metabólito ABZSOX foi muito baixa, o que inviabilizaria os estudos de biotransformação. Além disso, no decorrer das injeções, nós notamos, uma moderada falta de reprodutibilidade nos tempos de retenção dos analitos, provavelmente, algum efeito secundário na coluna, devido a injeção dos solventes avaliados. Portanto, os estudos foram realizados com a HF-LPME no modo 3 fases, anteriormente desenvolvido.

Anterior aos estudos de biotransformação o método foi validado e nesse caso foi obtido valores de limite de quantificação mais adequados aos estudos. O limite de quantificação para análise de cada enantiômero do ABZSOX foi de 25 ng mL⁻¹.

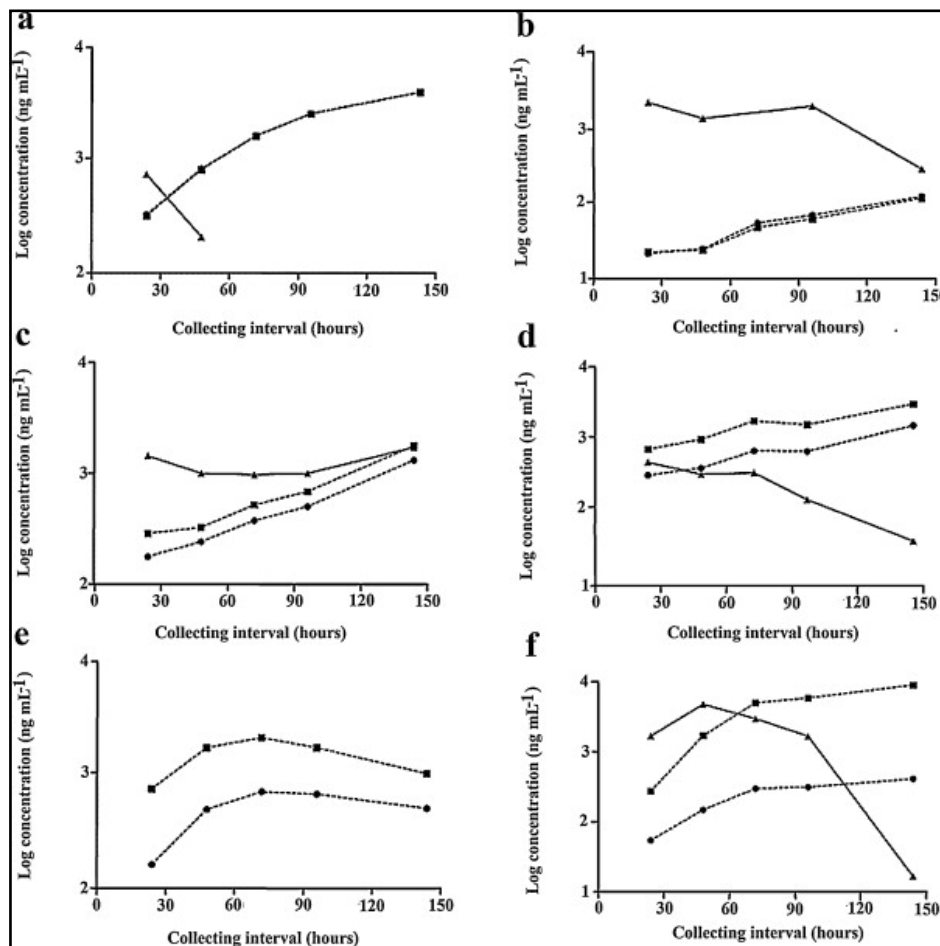
Os resultados observados no caso da análise do albendazol ilustram algumas limitações da eletroforese capilar, como a dificuldade em atingir baixos valores de limite de quantificação (empregando um detector UV-Vis) e análise de moléculas pouco polares. As dificuldades em atingir baixos valores de limite de quantificação reside no pequeno diâmetro interno do capilar (75 µL), pois o detector UV-Vis está limitado a lei de Lambert-Beer, ou seja, a pequena resposta acontece devido ao diminuto caminho óptico do capilar. Além disso, o pequeno volume injetado (≈ 20 nL) contribui também para resposta pouco intensa, já que uma quantidade muito pequena do analito atinge o detector. Técnicas de pré concentração online, como o *stacking* mediado por força iônica pode ser utilizado na tentativa de diminuir o limite de quantificação e no nosso caso, foi adicionado ao extrato água e metanol (conforme descrito anteriormente) contudo, o limite atingido foi superior aos limites relatados para a análise por CLAE.

2.3.2.3. Estudos Enantiosseletivos de Biotransformação do ABZ

Os estudos de biotransformação do ABZ foram realizados em quase sua totalidade por CLAE. Com o uso dessa técnica, os resultados de biotransformação por vários fungos puderam ser analisados. Vários fungos endofíticos e o fungo de solo *Mucor rouxii* foram capazes de biotransformar o ABZ em ABZSOX de forma enantiosseletiva, contudo, em nenhum caso foi observado 100% de razão enantiomérica. A Figura 18 ilustra o perfil de biotransformação pelos fungos avaliados.

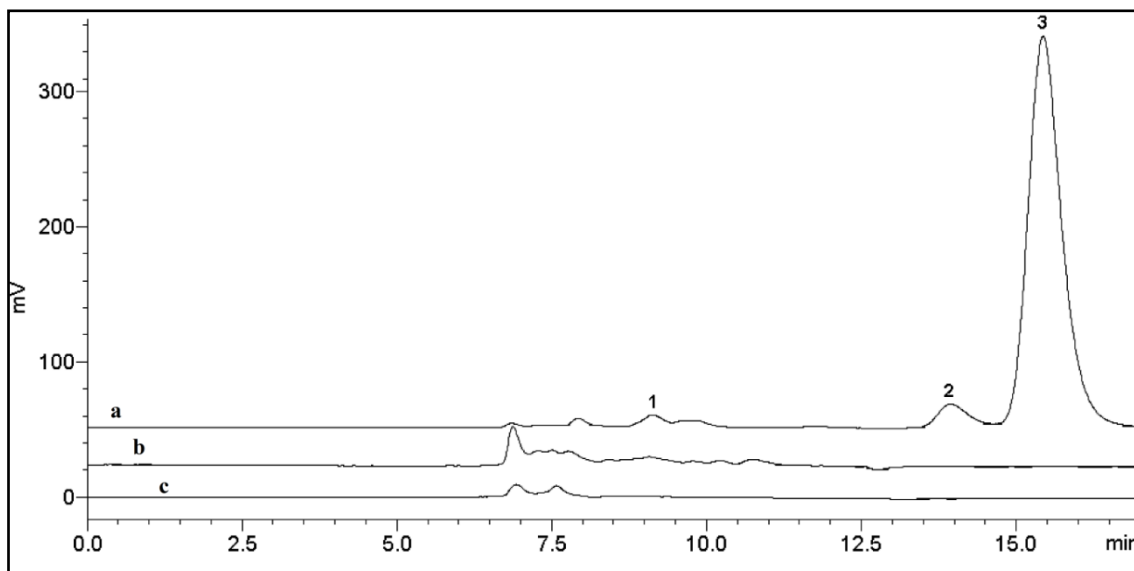
Entre os fungos analisados, destaca-se a biotransformação mediada pelo fungo *Mucor rouxii* que consumiu quase todo albendazol do meio de cultura. Esse fungo apresentou a maior razão enantiomérica para o (+)-ABZSOX, bem como a maior eficiência de biotransformação entre os fungos estudados. A Figura 18F mostra que as concentrações do (+)/(-)-ABZSOX aumentaram até 144 h, quando foi identificado 91,2 % de excesso enantiomérico. A Figura 19 mostra o cromatograma obtido com a biotransformação empregando o fungo *Mucor rouxii*.

Figura 18. Gráfico da concentração logarítmica *versus* tempo de incubação referente ao processo de biotransformação da ABZ por fungos.



(a) *Glomerella cingulata* (VA1), (b) *Fusarium oxysporum* (SS50), (c) *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) EW Mason (SS67), (d) *Pestalotiopsis foedans* (VR8), (e) *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) e (f) *Mucor rouxii* (NRRL 1894). (▲) -ABZ; (■) - (+) - ABZSOX; (●) - (-) - ABZSOX. Fonte: Hilário et al. (2012) [93], com permissão.

Figura 19. Cromatograma relativo à biotransformação do ABZ, após 144 h de incubação, pelo fungo *Mucor rouxii*.



(a) nas condições otimizadas; (b) branco do fungo, sem o fármaco; e (c) corresponde ao branco do meio de cultura. (1) ABZ, (2) (-)-ABZSOX, (3) (+)-ABZSOX. Fonte: Hilário et al. (2012) [93], com permissão.

O trabalho completo acerca da separação enantiosseletiva no modo polar-orgânico e os resultados obtidos com os estudos de biotransformação podem ser encontrados no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [93] (<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.012>).

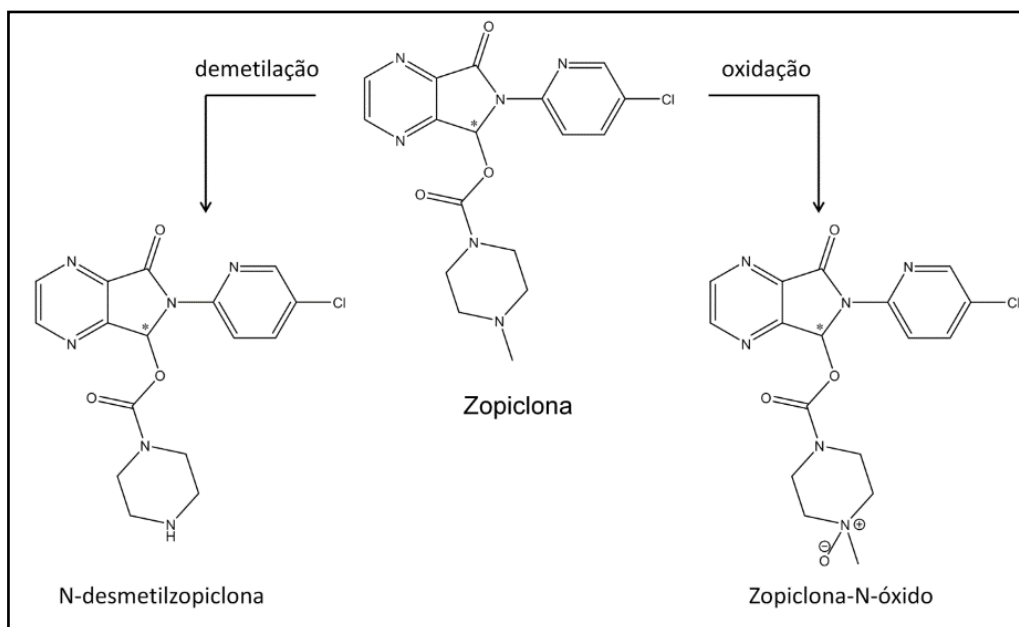
Acredito que os resultados obtidos com os estudos envolvendo a risperidona e o albendazol vinha por estabelecer, de fato, essa linha de pesquisa no nosso grupo de pesquisa. Diante disso, com a chegada de mais alunos ao grupo, mais projetos foram desenvolvidos nessa temática. Contudo, com objetivo de continuar explorando o uso técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na extração de fármacos meio de cultura, demos início a utilização da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Com o uso dessa técnica, foram realizados estudos de biotransformação da zopiclona, hidroxizina, bambuterol, fexofenadina e venlafaxina. A fim de ilustrar o emprego dessa

técnica, abaixo descrevo os resultados acerca dos estudos de biotransformação da zopiclona (Doc IV 3.3.1.29).

2.3.3. Estudos de Biotransformação da Zopiclona

A zopiclona (ZO) é um fármaco quiral (Figura 20) e é indicada para o tratamento a curto prazo da insônia e, quando as atividades farmacodinâmicas dos enantiômeros são avaliadas separadamente, observa-se que o (+)-(S)-ZO apresenta atividade farmacológica significativamente maior que o (-)-(R)-ZO [94]. O metabolismo da ZO nos seres humanos resulta em dois metabólitos o *N*-desmetilzopiclona (N-Des) e a zopiclona *N*-óxido (N-Ox) (Figura 20).

Figura 20. Metabolismo da zopiclona.



*Centro quiral.

A atividade ansiolítica do metabólito N-Des foi comprovada em 2001 em um estudo realizado por Carlson et al (2001) [94]. Nesse estudo verificou-se que a (+)-(S)-N-Des apresenta efeito ansiolítico em todas as doses testadas, sem

causar depressão relevante no sistema nervoso central. Este fato indica que este metabólito tem grande potencial de ser utilizado para o tratamento clínico de ansiedade [95].

Baseado no exposto, nesse trabalho avaliamos se os fungos seriam capazes de biotransformar a ZO em seu metabólito N-Des de maneira enantiosseletiva.

Conforme relatado anteriormente utilizamos tanto a eletroforese capilar quanto a cromatografia líquida de alta eficiência para análise enantiosseletiva. Após uma consulta na literatura, percebemos que não havia método descrito para análise da ZO e seus metabólitos empregando a DLLME como técnica de preparo de amostras e havia somente um método para análise enantiosseletiva da ZO e seus 2 metabólitos, simultaneamente, por eletroforese capilar [96] com um tempo de análise de 17 min. Portanto, decidimos avaliar a DLLME junto com a CE e desenvolver um método mais rápido de análise.

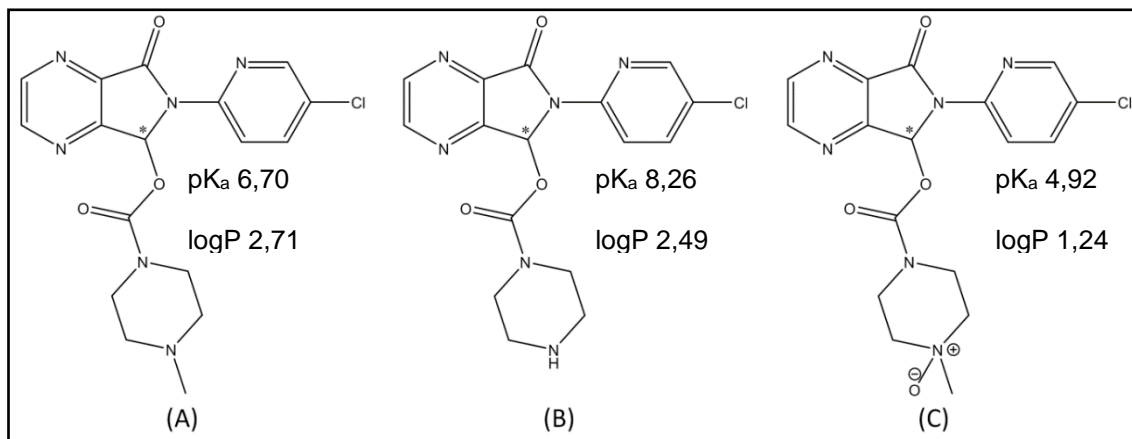
Para a otimização da separação enantiomérica da ZO e seus metabólitos N-Des e N-Ox foram adaptadas as condições do método desenvolvido por Tonon et al (2012) [97], que apresenta separação quiral da ZO e suas impurezas (N-Ox e 2-amino-5-cloropiridina) em comprimidos farmacêuticos. Baseado neste trabalho, a condição eletroforética inicial utilizada foi: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 2,5 acrescido com 1% de carboximetil-β-CD; tensão de +20 kV, temperatura do capilar 25 °C e 50 cm de comprimento total. Os parâmetros que mais influenciaram a separação da ZO e seus metabólitos foram o tipo de seletor quiral e o pH do eletrólito de análise. Portanto, será dada uma maior ênfase na discussão desses fatores.

A separação dos enantiômeros da ZO, N-Des e N-Ox foi avaliada com as

ciclodextrinas nativas (α -CD e β -CD), neutras (hidroxipropil- β -CD) e aniônicas (carboximetil- β -CD, α -CD sulfatada, β -CD sulfatada e β -CD fosfatada), bem como algumas combinações (carboximetil- β -CD + β -CD, carboximetil- β -CD + hidroxipropil- β -CD e hidroxipropil- β -CD + β -CD). As melhores separações entre os enantiômeros foram obtidas com a CM- β -CD, a mistura de CM- β -CD + β -CD e CM- β -CD + HP- β -CD. No entanto, a CM- β -CD foi o seletor quiral de escolha devido a melhor simetria dos picos, menor tempo de análise e habilidade de separar todos os enantiômeros, incluindo o metabólito N-Des, que não havia sido separado. A CM- β -CD possui grupos carboxílicos e sua carga e comportamento dependem do pH da solução de análise. Conforme relatado anteriormente, em valores de pH ($\approx 2,5$), essa CD encontra-se protonada e comporta-se como CD neutra. Em valores de pH maior que 5, essa CD encontra-se completamente ionizada agindo como CD aniônica [75].

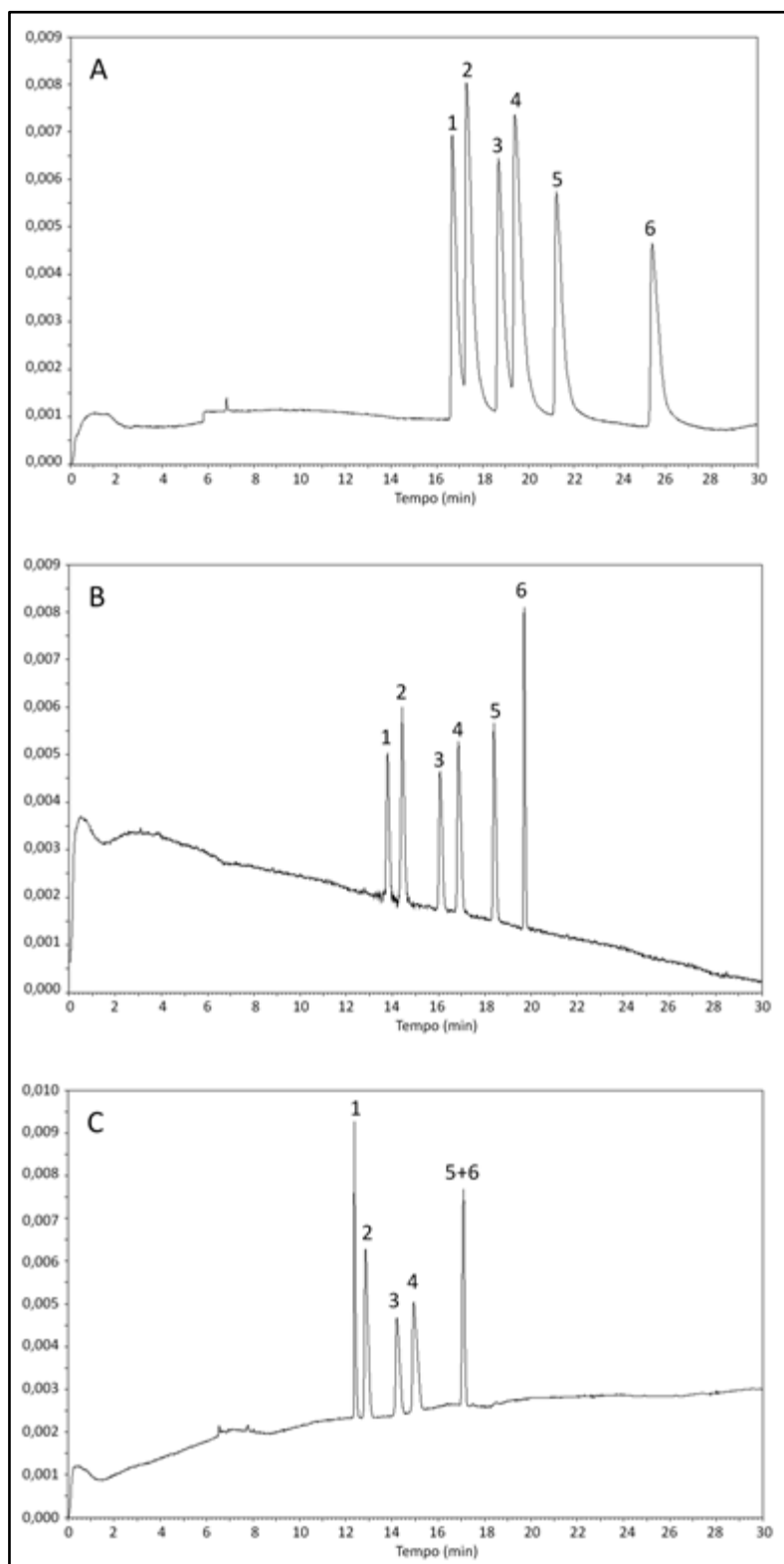
O pH da solução tampão é um importante parâmetro a ser definido, pois influencia o fluxo eletroforético dos analitos e com o fluxo eletrosmótico da solução [98]. Para o caso de CD ionizáveis, como a CM- β -CD, o pH influencia também na carga da CD, na força de ligação e na mobilidade do complexo formado [99]. Para determinar a faixa de pH a ser avaliado de modo a garantir a ionização dos analitos, as propriedades físico-químicas destes devem ser consideradas. O fármaco ZO e seus metabólitos apresentam características básicas, conforme demonstrado nas estruturas da Figura 21.

Os valores de pK_a e $\log P$ foram obtidos pela base de dados Scifinder WEb. Para garantir a protonação de compostos básicos optou-se por trabalhar em pH ácido. Os seguintes valores de pH foram avaliados: 2,0; 2,5 e 3,0, utilizando, para tanto, solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹.

Figura 21. Estrutura química e valores de pKa e logP.

A) Zopiclona, (B) N-desmetilzopiclona e (C) Zopiclona-N-óxido. *Centro quiral. Fonte: de Albuquerque, N C. P. (2014) [100].

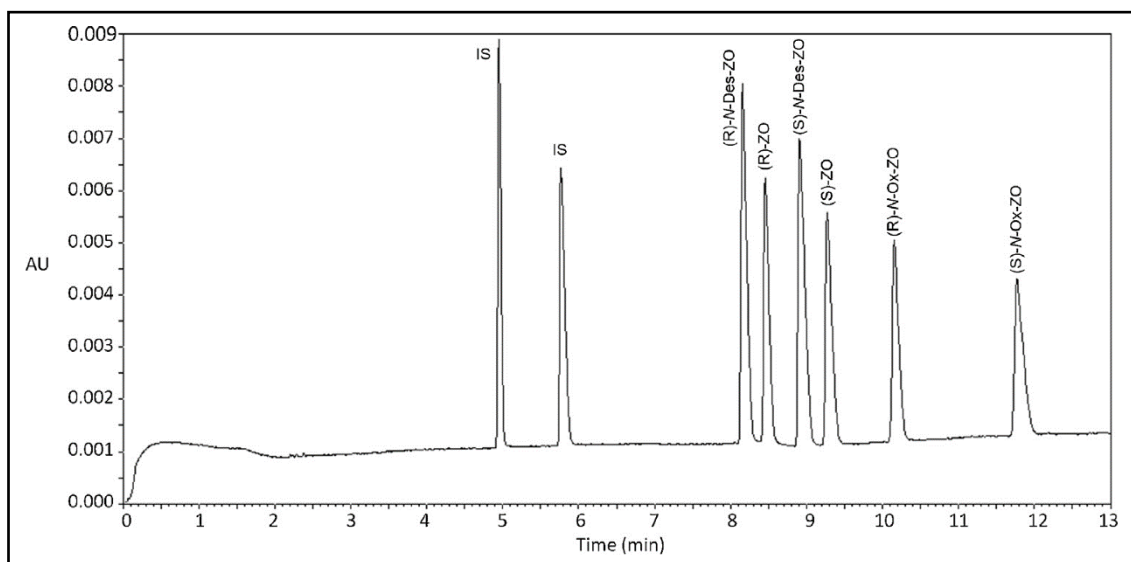
A Figura 22 apresenta os eletroferogramas obtidos em cada valor de pH avaliado e mostra como as separações em eletroforese capilar são sensíveis a pequenas mudanças do pH. Pequenas variações no pH já promove alterações nos equilíbrios ácido-base das espécies que influenciam a separação como os grupamentos silanóis residuais presentes nos capilares de sílica fundida e nos equilíbrios dos analitos (alterando as espécies ionizadas). Tais fatores influenciam na velocidade eletroforética do analito, mobilidade eletrosmótica da solução e na interação com as CDs. A melhor resolução e simetria dos picos foi obtida em pH 2,5. Nesse valor de pH, o fluxo eletrosmótico é reduzido, a CM- β -CD comporta-se uma CD neutra, enquanto os analitos estão protonados (carga positiva) e migram em direção ao cátodo.

Figura 22. Influência do valor de pH na separação da ZO, N-Des e N-Ox.

Condições de análise: solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ acrescida de 1% de CM- β -CD, tensão aplicada de +20 kV, temperatura do capilar 25 °C, capilar de 50 cm de comprimento total, injeção hidrodinâmica por 10 s a 1 psi. (A) pH 2,0, (B) pH 2,5, (C) pH 3,0. (1) e (3) enantiômeros da N-Des; (2) e (4) enantiômeros da ZO; (5) e (6) enantiômeros da N-Ox. Fonte: de Albuquerque, N C. P. (2014) [100].

A condição final para separação quiral da ZO, N-Des e N-Ox foi estabelecida usando um capilar de sílica fundida (75 μm de diâmetro interno, 42 cm de comprimento efetivo e 50 cm de comprimento total). O eletrólito de análise usado foi uma solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 2,5 acrescido de 0,5% (m/v) de carboximetil- β -CD. A tensão aplicada foi de +25 kV e a temperatura do capilar foi 20 °C. A injeção hidrodinâmica foi empregada aplicando uma pressão de 1 psi por 8 s. Desta forma, uma resolução aceitável entre todos os enantiômeros foi obtida em 12 min de análise. Portanto, a separação desenvolvida já apresentava um tempo de análise menor do que o relatado por HEMPEL e BLASCHKE (1996) [96]. A Figura 23 mostra um eletroferograma da ZO e seus metabólitos nas condições acima descritas.

Figura 23. Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva da ZO, N-Des e N-Ox. padrão interno mirtazapina.



Fonte: de Albuquerque et al. (2015), [101], com permissão.

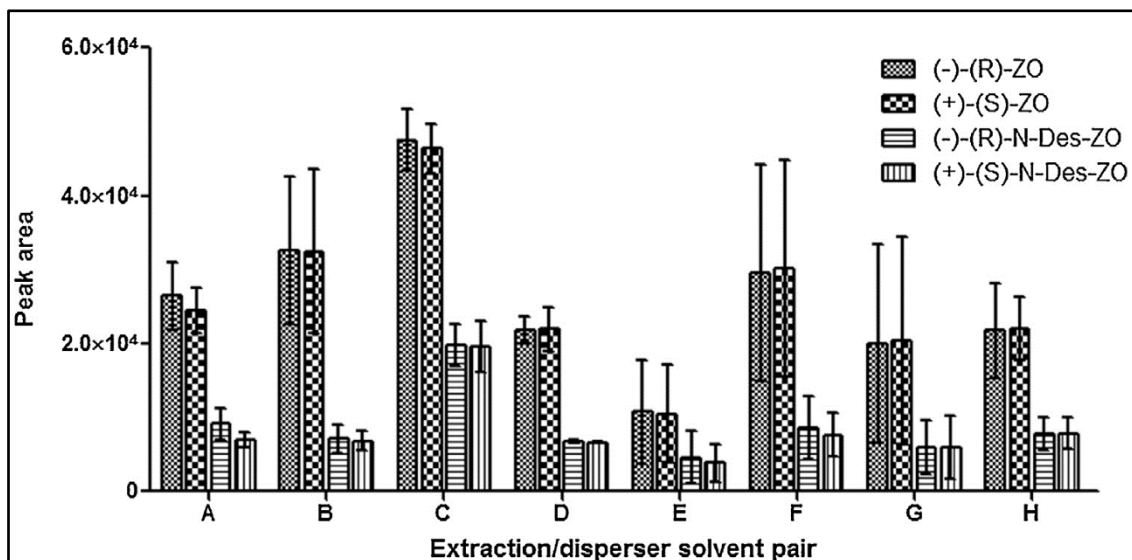
Após otimização da separação quiral, um método de preparo de amostras miniaturizado foi desenvolvido para análise da ZO e seus metabólitos em meio de cultura. Para tanto foi empregado a microextração líquido-líquido dispersiva

(DLLME). As condições iniciais de extração foram: 2,0 mL de meio de cultura líquido, 2,0 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5, formação do ponto nuvem com a mistura de 100 µL de solvente extrator e 500 µL de solvente dispersor. O pH da fase doadora foi ajustado para manter os analitos em suas formas neutras e facilitar a partição destes para a fase extratora. Por esta razão, o pH foi fixado em 9,5 utilizando solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, o que garante que todos os analitos não estejam ionizados.

A escolha dos solventes extrator e dispersor é o parâmetro mais importante no desenvolvimento da DLLME. O solvente extrator deve ser preferencialmente mais denso que a água, ter capacidade de solubilizar o analito de interesse, apresentar baixa miscibilidade com a amostra aquosa e baixa pressão de vapor. A escolha do solvente dispersor deve ser feita com base em sua miscibilidade com a amostra aquosa e com o solvente extrator, e também deve apresentar baixa pressão de vapor [58]. Os seguintes solventes extratores (clorofórmio, diclorometano, dicloro-1,2-etano e tetracloreto de carbono) e dispersores (acetona, acetonitrila, metanol, etanol e isopropanol) foram avaliados. Para a escolha do melhor par de solventes extrator/dispersor, foram avaliadas todas as combinações possíveis (20 combinações) entre eles.

Na Figura 24 estão representados os valores de área dos analitos referentes às extrações realizadas. O par tetracloreto de carbono/acetona não formou fase sedimentada. As demais combinações que não estão representadas na Figura 24 não foram capazes de extrair os analitos.

Figura 24. Avaliação da combinação de solventes extrator/dispersor na extração da ZO e N-Des em meio de cultura líquido.

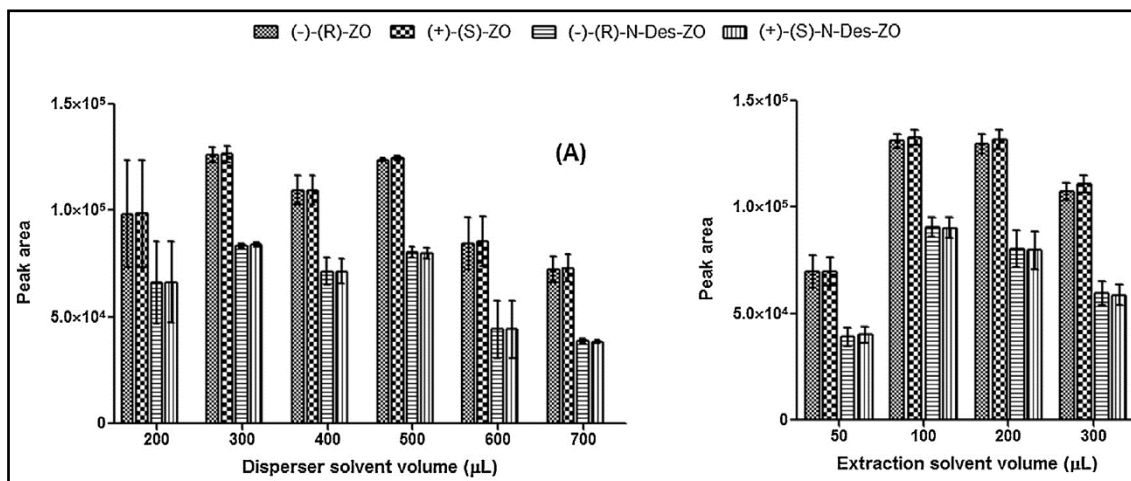


A: Dicloroetano / Etanol; B: Dicloroetano / Metanol; C: Clorofórmio / Metanol; D: Dicloroetano / Acetonitrila; E: Diclorometano / Acetonitrila; F: Dicloroetano / Acetona; G: Diclorometano / Acetona; H: Clorofórmio / Acetona. Condições de extração: 2,0 mL de amostra, 2,0 mL de solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 9,5, 200 µL de solvente extrator, 500 µL de solvente dispersor e 5 min de centrifugação a 1800 x g a 20 °C. Fonte: de Albuquerque et al. (2015), [101], com permissão.

O metabólito N-Ox apresenta maior polaridade, por esta razão, apresenta menor miscibilidade em solventes orgânicos. Como pode ser observado na Figura 24, não houve combinação de solvente extrator e dispersor capaz de extrair o metabólito N-Ox. Portanto, a melhor combinação foi obtida empregando metanol como solvente dispersor e clorofórmio como solvente extrator.

Os próximos parâmetros avaliados foram os volumes dos solventes dispersores e extratores, conforme apresentado na Figura 25. A melhor recuperação ocorreu com 300 µL de metanol (solvente dispersor) e 100 µL de clorofórmio (solvente extrator).

Figura 25. Avaliação dos volumes dos solventes extrator e dispersor na extração dos analitos do meio de cultura.



Fonte: de Albuquerque et al. (2015), [101], com permissão.

Após a avaliação de todos os parâmetros que afetam a eficiência em DLLME, as condições finais para extração da ZO e seu metabólito N-Des foram: 2,0 mL de meio de cultura líquido Czapek, 2,0 mL de solução tampão tris-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5. Os solventes, extrator e dispersor foram, respectivamente, clorofórmio ($100 \mu\text{L}$) e metanol ($300 \mu\text{L}$). A extração foi realizada apenas com a formação do ponto nuvem sem necessidade de agitação mecânica. Após esta etapa, a solução foi centrifugada a $1800 \times g$ por 5 min a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, e a fase sedimentada foi coletada, evaporada sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi solubilizado em $100 \mu\text{L}$ de uma solução de água: acetonitrila (9:1, v/v) para posterior análise por eletroforese capilar.

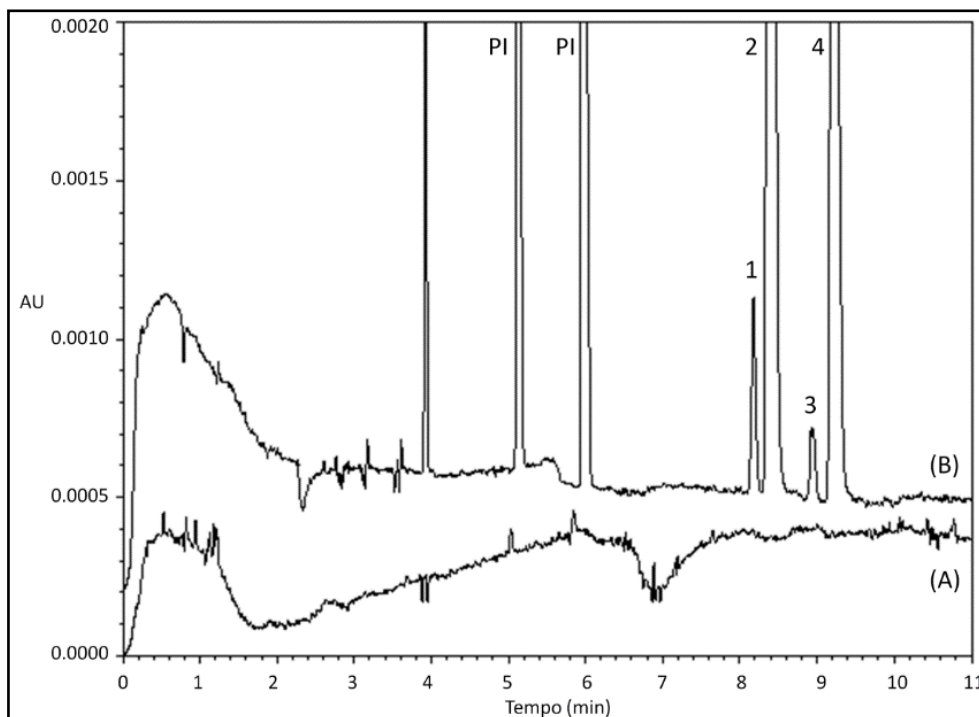
O emprego da DLLME me surpreendeu muito nesse estudo. Conforme apresentado nos parágrafos anteriores, a otimização do método é bem mais simples quando comparada a SPME e HF-LPME pois são menos os fatores que influenciam na extração. Além disso, a técnica é extremamente simples, tem altos valores de recuperação, uma boa limpeza da amostra e o tempo de execução é muito curto. Contudo, conforme mencionado anteriormente, o

metabólito N-Ox não pode ser extraído devido a sua alta polaridade. Assim, uma limitação da DLLME já é apresentada nesse exemplo. Poderíamos ter avaliado a adição de par-iônico ao meio a tentativa de extrair esse metabólito, porém o nosso foco estava voltado para o metabólito ativo, N-Des e, portanto, não foi investido mais tempo para extração desse metabólito. Assim, apesar da DLLME ser uma técnica muito atrativa apresenta como limitação a extração de moléculas altamente polares. Posteriormente, o método foi validado e apresentou um intervalo linear de 90 – 6000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da ZO e 50 – 1000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da N-Des.

Seguindo para os estudos de biotransformação, estávamos bem animados com os resultados obtidos para análise da risperidona, pois tinha sido observado um valor de razão enantiomérica de 100%. Além disso, o potencial de biotransformação apresentado pelos fungos endofíticos e pelo fungo *Mucor rouxii* no estudo do albendazol mostraram-se muito promissores. Porém, empregando a zopiclona como substrato, não foi observado o mesmo sucesso obtido anteriormente.

No estudo envolvendo a zopiclona, somente os fungos do gênero *Cunninghamella* foram capazes de metabolizar a zopiclona em seu metabólito N-Des e o melhor resultado foi obtido com o fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A (Figura 26). Após 360 h de incubação, a máxima concentração dos metabólitos foi alcançada. As concentrações obtidas foram de 508 ng mL⁻¹ para o (-)-(R)-N-Des e 221 ng mL⁻¹ para o (+)-(S)-N-Des. Estas concentrações representaram uma razão enantiomérica de 39% de (-)-(R)-N-Des.

Figura 26. Eletroferograma representativo da biotransformação da ZO pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A após 360 h de incubação.



(A) Extração do meio de cultura com o fungo na ausência do fármaco (controle do fungo); (B) Análise após 360 h de incubação. (PI) Padrão interno (*rac*-mirtazapina); (1) (-)-(R)-N-Des; (2) (-)-(R)-ZO; (3) (+)-(S)-N-Des; (4) (+)-(S)-ZO. Fonte: de Albuquerque et al. (2015), [101], com permissão.

O desenvolvimento desse projeto relatou pela primeira vez o estudo de biotransformação enantiosseletiva por fungos da zopiclona e análise por CE. Além do método descrito por Hempel e Blaschke (1996) [96], os trabalhos de Fernandez et al. (1993) [102] e Tonon et al (2012) [97] relatam a separação enantiosseletiva da zopiclona e seus metabólitos, sendo que o nosso método, quando comparado aos relatados acima, mostrou ser o mais rápido. Os dados relativos a esse trabalho podem ser encontrados no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [101] (<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.039>).

2.3.4. Considerações Críticas Quanto os Estudos de Biotransformação Desenvolvidos por Nosso Grupo de Pesquisa

Nessa temática trabalhamos com diferentes substratos e diferentes técnicas analíticas. As técnicas de análise empregadas foram a eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência. No desenvolvimento dos trabalhos a eletroforese capilar foi a técnica mais utilizada pois apresenta uma melhor versatilidade o que possibilita uma maior probabilidade de sucesso na separação enantiosseletiva. Existem diversos seletores quirais que podem ser utilizados e são, relativamente, baratos, quando comparados uma coluna cromatográfica quiral. Além disso, os diversos parâmetros que podem ser variados em eletroforese capilar [tipo, pH e concentração do eletrólito de análise; adição de modificadores ao eletrólito de análise (por exemplo solventes, tensoativos); tensão aplicada, comprimento do capilar, temperatura do capilar, tipos de injeção e modos de análise (polaridade reversa ou normal)] faz com que aumente as possibilidades de sucesso na separação enantiosseletiva. Por outro lado, atingir limites de quantificação muito baixo é uma tarefa árdua quando a eletroforese capilar é empregada. Devido ao baixo volume injetado e ao pequeno diâmetro interno do capilar, o sinal analítico torna-se baixo o que limita algumas aplicações da técnica (considerando um detector UV-Vis). Os trabalhos envolvendo o albendazol ilustraram bem isso. Além disso, moléculas pouco polares são mais difíceis de serem analisadas nessa modalidade empregada. Nesse caso o uso de tensoativos ou solventes podem ser adicionados ao eletrólito de análise, porém sem que haja prejuízos na separação enantiosseletiva. Nesse sentido, nosso grupo tentou desenvolver um método por eletroforese capilar para análise do albendazol e seu metabólito quiral,

albendazol sulfóxido (ricobendazol). Contudo, devido à baixa polaridade do albendazol, o método desenvolvido somente foi capaz de analisar os enantiômeros do albendazol sulfóxido. Poderíamos ter insistido mais avaliando a adição de tensoativos quirais no eletrólito de análise, não dispúnhamos desse tipo de reagente em nosso laboratório.

Em relação as técnicas de preparo de amostras, diferentes técnicas miniaturizadas foram empregadas. Assim, foi utilizado a SPME (risperidona), a HF-LPME (albendazol, risperidona) e a DLLME (zopiclona). Entre essas técnicas, a DLLME mostrou-se muito atrativa pois não há necessidade do uso de fibras (como acontece na SPME ou HF-LPME), a extração é muito rápida e simples [equipamentos comuns (centrífuga, tubos de ensaio) de laboratório são utilizados], apresenta uma boa capacidade de pré concentração dos analitos e um bom *clean-up* da amostra. Contudo a extração de moléculas polares é um pouco mais complicada. Nesse sentido, nosso grupo vivenciou essa situação conforme relatado para extração do metabólito zopiclona *N*-óxido. Uma outra característica indesejável dessa técnica é a ainda uma pequena quantidade de resíduo químico gerada devido os solventes extratores e dispersores utilizados. O volume desses solventes vai depender do volume da amostra e, portanto, quanto maior o volume da amostra, maior será a geração de resíduo químico.

Entre os substratos avaliados o maior rendimento foi obtido no após biotransformação do albendazol pelo fungo *Mucor rouxii*. Nos demais casos, o rendimento foi baixo nas condições de biotransformação empregadas. Em relação a enantiosseletividade no processo, a biotransformação da risperidona pelo fungo *Cunninghamella echinulata var. elegans* ATCC 8688A apresentou uma razão enantiomérica de 100%. Para os demais substratos avaliados e

descritos nesse texto não foi observado esse alto excesso enantiomérico. Algumas condições de incubação foram alteradas no decorrer do experimento, contudo, devido o pouco tempo que tivemos no desenvolvimento desses projetos, as poucas alterações que realizamos (mudança de meio de cultura, aumento do tempo de biotransformação) não foram suficientes para promover alterações no perfil de biotransformações dos substratos avaliados.

CAPÍTULO 3 – ESTUDOS DE METABOLISMO IN VITRO*, CORRELAÇÃO IN VITRO-IN VIVO E PREDIÇÃO DE INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA DE PRAGUICIDAS QUIRAIS

3.1. Introdução

O Brasil é o quinto maior consumidor de praguicidas no mundo, sendo que, aproximadamente, 76 mil toneladas de praguicidas são utilizadas anualmente [103]. A grande quantidade de praguicidas empregada, aliada ao fato de que apenas 2% de todo o praguicida utilizado atinge os organismos alvos [103], faz com que o risco de contaminação de organismos não-alvos, principalmente humanos, seja extremamente grande, uma vez que os praguicidas além de contaminar o ar, a água e o solo, podem estar presente nos alimentos [104,105]. Os praguicidas por serem tóxicos para os organismos alvos, podem também ser tóxicos para os organismos não alvos, incluindo os seres humanos [106]. A contaminação pode ser oriunda de exposição ocupacional ou ao longo da vida, devido a bioacumulação de praguicidas no ar, na água, no solo e nos alimentos [104]. A exposição aos praguicidas está associada a diversas complicações na saúde do indivíduo, como câncer [107], doença de Alzheimer [108], mortalidade infantil [109], neurotoxicidade [110], diabetes [111], entre outras.

Atualmente, dentre os praguicidas registrados para uso no mundo, aproximadamente, 30% são compostos quirais [112]. Os enantiômeros de praguicidas quirais podem apresentar diferenças de atividade, bioacumulação, metabolismo e toxicidade [112,113]. No entanto, a maioria dos praguicidas quirais são produzidos e comercializados na forma de racemato [114], sendo que

**Nesse texto, o termo metabolismo in vitro foi adotado para indicar as reações promovidas pelas enzimas do CYP450 presentes nos microssomas hepático de humanos*

apenas 7% dos mesmos são vendidos como enantiômeros puros ou misturas enriquecidas de um dos enantiômeros [114]. Portanto, compreender o metabolismo de praguicidas será essencial na avaliação de riscos por permitir estimar a estabilidade do composto no organismo, identificar as rotas metabólicas e as enzimas responsáveis pelo metabolismo assim como seu efeito nas principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos.

3.2. Objetivos

O objetivo desse capítulo é apresentar os resultados e a evolução do nosso grupo nessa linha de pesquisa a qual está relacionada ao desenvolvimento de métodos cromatográficos enantiosseletivos para posterior realização de estudos de metabolismo e inibição enzimática *in vitro* de praguicidas. Para tanto foram selecionados os resultados dos trabalhos envolvendo os praguicidas fenamifós (Doc IV 3.3.1.39), fipronil (Doc 3.3.1.51 e Doc IV 3.3.1.58), miclobutanil (Doc IV 3.3.1.56) e etofumesato (Doc IV 3.3.1.53 e Doc IV 3.3.1.63).

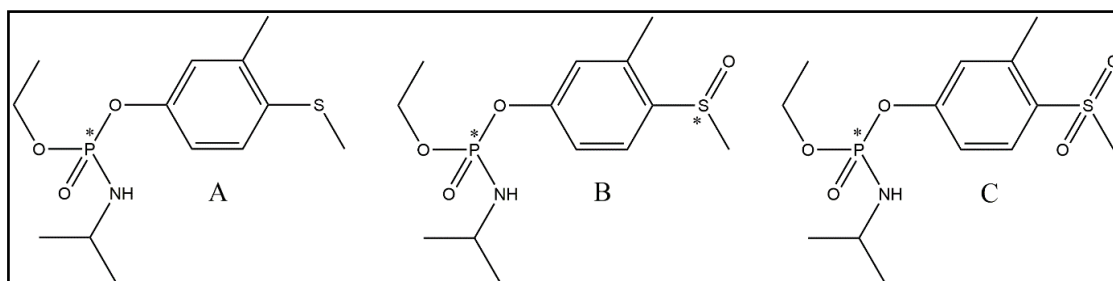
3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Estudos In Vitro de Metabolismo e Inibição Enzimática do Fenamifós

O fenamifós (FS) vem sendo amplamente empregado em mais de 60 países, inclusive no Brasil, para o controle de nematoides (nematicida) em culturas de banana, citros, cebola, batata, morango, tomate, entre outros [115]. O fenamifós (Figura 27) é um organofosforado e apresenta um centro de assimetria no átomo de fósforo. Em condições ambientais, o fenamifós pode ser facilmente oxidado para fenamifós sulfóxido (FSO) e, em seguida, lentamente

oxidado para fenamifós sulfona (FSO₂) (Figura 27) [116]. Estes dois metabólitos também são quirais, ambos com o centro de assimetria no átomo de fósforo, e o fenamifós sulfóxido com um centro de assimetria adicional no átomo de enxofre.

Figura 27. Estrutura química do fenamifós e seus metabólitos.



(A) Fenamifós; (B) Fenamifós sulfóxido; (C) Fenamifós sulfona. Fonte: autoria própria.

Apesar do fenamifós ser um praguicida utilizado há décadas, ainda são poucas as informações relacionadas a ação deste praguicida no homem, e ainda mais escassas no que diz respeito às suas propriedades estereosseletivas. Damianys et al (2013) avaliaram o metabolismo estereosseletivo do fenamifós pela esterase paraoxonase 1 (PON1) de soro humano de adultos e crianças. Este ensaio comprovou que o fenamifós é muito pouco hidrolisado por esta enzima, o que sugere que a PON1 não contribui de maneira significativa para a detoxificação do fenamifós no organismo humano [117]. Worek et al (2004) avaliaram a inibição da enzima acetilcolinesterase de eritrócitos humanos pelo fenamifós. Além da inibição da acetilcolinesterase humana pelo fenamifós, este trabalho também observou que não houve reativação espontânea desta enzima após a sua inibição pelo nematicida, e que as enzimas inibidas pelo fenamifós apresentaram elevada resistência a reativação por oximas [118]. Estes estudos evidenciam o potencial tóxico do fenamifós sobre o homem, e reforçam a importância de realizar mais ensaios a fim de compreender os riscos da

exposição da população a este nematicida.

A fim de avaliar o metabolismo estereosseletivo *in vitro* do praguicida quiral FS, primeiramente, se fez necessário desenvolver um método para análise dos estereoisômeros do FS e de seus principais metabólitos. Conforme pode ser observado na Figura 27, cada composto possui um centro de assimetria no átomo de fósforo do grupamento. Além disso, o metabólito FSO possui um centro de assimetria adicional no átomo de enxofre do grupamento sulfóxido. Portanto, devido ao elevado número de analitos (total de oito estereoisômeros) que se deseja analisar, o desenvolvimento deste método para análise quiral do FS e seus metabólitos FSO e FSO₂ tornou-se de elevada complexidade, surgindo aí o primeiro desafio analítico no desenvolvimento desse estudo.

Portanto foi dado início a triagem e avaliação de diversas colunas quirais visando a separação enantiosseletiva do FS, FSO e FSO₂, simultaneamente, pois estávamos desenvolvendo o método utilizando um sistema com detecção UV-Vis. As seguintes colunas quirais foram avaliadas: Chiralpak AD, Chiralpak AD-H, Chiralpak AS, Chiralpak AS-H, Chiralcel OJ, Chiralcel OJ-H, Chiralcel OD-H, Chirobiotic T, Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-2 e Lux Amylose-2. A separação foi avaliada em modo normal e polar-orgânico.

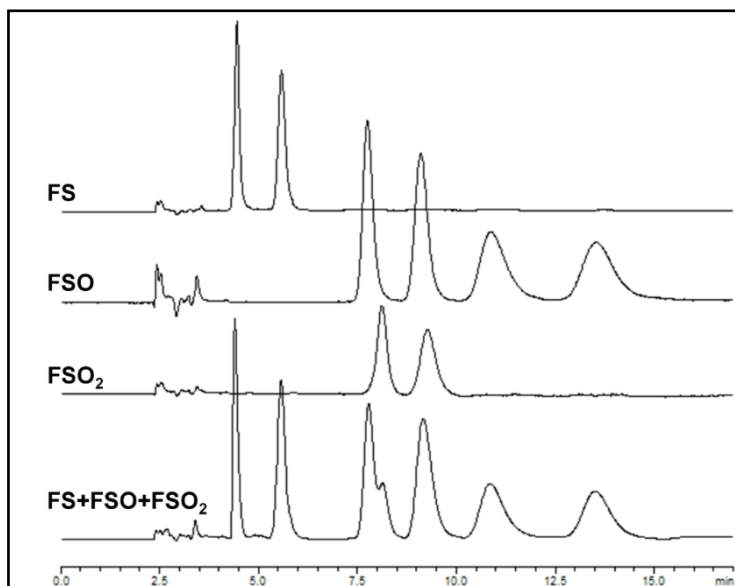
Entre todas as condições de análise avaliadas na triagem inicial, os resultados obtidos empregando a coluna Chiralpak AS-H (tris-(S)- α -metilbenzilcarbamato de amilose; 150 mm x 4,6 mm; 5 μ m) em modo normal foram os mais promissores. Conforme mencionado no Capítulo 2, sempre optamos por usar o modo polar-orgânico, contudo, para a separação desses estereoisômeros, somente o modo normal apresentou potencial para resolução simultânea de todos os estereoisômeros. Esse modo sempre foi muito utilizado

em cromatografia líquida quiral, sendo possivelmente, o modo mais utilizado na separação de enantiômeros. Porém, o elevado consumo de hexano vem inviabilizando seu uso. Ao final desta etapa, a melhor condição de análise foi obtida empregando hexano: etanol: metanol (85:12:3, v/v/v) como fase móvel e vazão de 0,8 mL min⁻¹.

Conforme pode ser observado na Figura 28, nestas condições, houve a completa separação de todos os estereoisômeros do FS, FSO e FSO₂ quando analisados separadamente, mas ocorreu coeluição dos estereoisômeros do FSO com os enantiômeros do FSO₂ quando analisados simultaneamente.

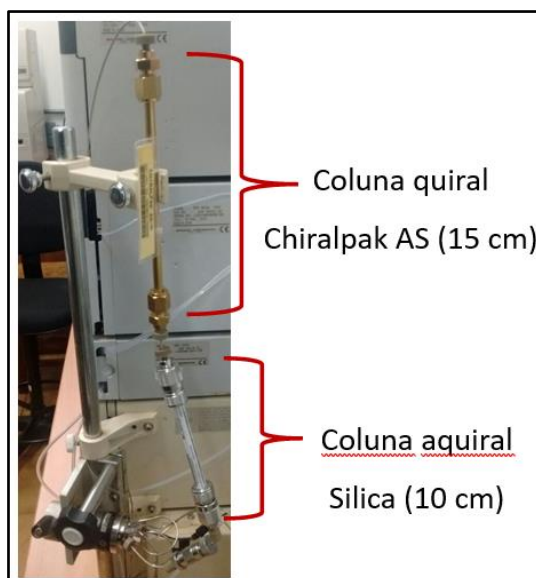
Quando uma mistura complexa de diversos pares de enantiômeros não pode ser resolvida por apenas uma coluna devido à coeluição dos picos, uma alternativa pode ser a cromatografia líquida em duas dimensões empregando estratégia foi utilizada a fim de resolver os problemas de coeluição dos estereoisômeros do FSO e do FSO₂. A mistura do FS, FSO e FSO₂ foi submetida a dois mecanismos de separação, primeiro ocorreu a separação em uma coluna aquiral de sílica, seguido da separação do racemato de cada composto na coluna quiral (Figura 28), empregando a mesma fase móvel descrita anteriormente (hexano: etanol: metanol, 85:12:3, v/v/v).

Figura 28. Cromatograma referente à análise quiral do fenamifós, fenamifós sulfóxido e fenamifós sulfona empregando a coluna Chiralpak AS-H em fase normal.



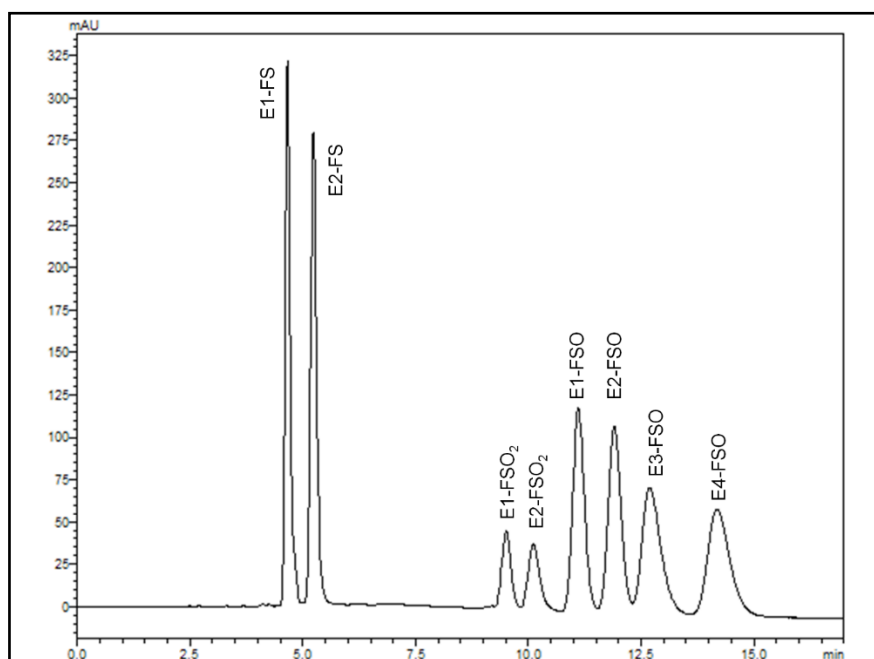
Concentração dos analitos: fenamifós ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$), fenamifós sulfóxido ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e fenamifós sulfona ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AS-H, fase móvel composta de hexano: etanol: metanol (85:12:3, v/v/v) com vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura fixada em $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção em 250 nm , volume injetado de $20 \mu\text{L}$. “E” = estereoisômero; “FS” = fenamifós; “FSO” = fenamifós sulfóxido; “FSO₂” = fenamifós sulfona. Fonte: de Albuquerque et al. (2016) [4], com permissão.

Figura 29. Foto do acoplamento *in-line* das colunas quiral e aquiral para análise do FS e seus metabólitos.



A Figura 30 apresenta a separação dos analitos após acoplamento das colunas. Como pode ser observado foi possível obter uma resolução adequada entre todos os analitos, com tempo de análise inferior a 15 min. Neste caso, o acoplamento das duas colunas foi uma alternativa viável a cromatografia multidimensional com elevada simplicidade. Além disso, este acoplamento tornou possível analisar misturas do FS, FSO e FSO₂ utilizando o detector UV-Vis, uma vez que a coluna aquiral possibilitou a separação dos analitos antes de chegarem na coluna quiral.

Figura 30. Cromatograma referente à análise quiral do FS, FSO e FSO₂ empregando as colunas Chiralpak AS-H e Lichrosorb Si60 em fase normal.



Concentração dos analitos: FS ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$), FSO ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e FSO₂ ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna de sílica (Lichrosorb Si60) acoplada *in-line* com a coluna Chiralpak AS-H, fase móvel: hexano: etanol: metanol (85: 12: 3, v/v/v) e vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, volume injetado de $20 \mu\text{L}$. “E” = estereoisômero; “FS” = fenamifós; “FSO” = fenamifós sulfóxido; “FSO₂” = fenamifós sulfona. Fonte: de Albuquerque et al. (2016) [4], com permissão.

Como pode ser observado a separação quiral do praguicida e seus metabólitos foi obtida com sucesso, porém foi uma grande dificuldade atingir essa condição ideal. Esse foi o primeiro trabalho no nosso grupo de pesquisa que utilizou o acoplamento *inline* de duas colunas (aquiral-quiral) para separação quiral e pode ser encontrado no *Journal of Chromatography A* [4] (<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.039>). Comparando a separação quiral do FS e seus metabólitos obtida no presente trabalho com as separações descritas na literatura por eletroforese capilar (EC) [119] ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [120], pode-se destacar que o método aqui apresentado foi o mais rápido já descrito para análise quiral simultânea do FS, FSO e FSO₂, com um tempo total de análise de 15 min.

Após desenvolvimento da separação cromatográfica a próxima etapa foi estabelecer de uma técnica de preparo de amostras para análise desses analitos em microssomas hepáticos de humanos. Ao contrário do que mencionado no Capítulo 2, nesses estudos não utilizamos técnicas miniaturizadas de preparação de amostras. Apesar das grandes vantagens inerentes a essas técnicas, principalmente relacionada a pequena geração de resíduos químicos, nesses estudos optamos por utilizar a extração líquido-líquido “miniaturizada”. O uso da HF-LPME ou SPME não se mostraram viáveis nesses estudos porque são centenas de amostras que analisamos para a determinação dos parâmetros enzimáticos (os estudos são realizados com a mistura racêmica e com os enantiômeros isolados, portanto, 3 analitos). Por outro lado, poderíamos continuar trabalhando com a DLLME, contudo os estudos iniciais se mostraram pouco atrativos devido a formação de 3 fases no tubo e dificuldades na coleta da fase sedimentada. Dessa forma, nesses estudos, estamos utilizando a extração

líquido-líquido (com um volume entre 500-1000 μL) e na maioria dos casos, o acetato de etila vem sendo empregado como solvente extrator. Além disso, o uso da extração líquido-líquido possibilita uma maior agilidade ao processo pois o metabolismo in vitro é realizado em tubos do tipo Eppendorf® de 2,0 mL. Assim, utilizamos o solvente extrator para parar a reação metabólica sendo que em seguida a amostra já é agitada e posterior centrifugada, no próprio tubo Eppendorf®. Considerando que em cada processo são processadas ao redor de 120 amostras, o processo como um todo fica bem mais simples.

Anterior a determinação dos parâmetros enzimáticos o método é validado pela avaliação dos parâmetros seletividade, limite inferior de quantificação, linearidade, efeito residual, precisão, exatidão e estabilidade. Como critério de aceitabilidade usamos os valores descritos do guia para validação de métodos bioanalíticos do *European Medicines Agency* [121]. O assunto referente a necessidade ou não da validação do método para esse tipo de aplicação é bem controverso pois não há um guia específico para validação de métodos visando estudos de metabolismo in vitro. No *29th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, que aconteceu em Leuven na Bélgica, em 2018, foi realizada uma apresentação que versava sobre esse tema, ou seja, como proceder a validação de métodos para aplicações voltadas para pesquisa, já que os guias oficiais que existem são para indústria. De acordo com o palestrante, a decisão é do pesquisador e fica a seu cargo a justificativa para a realização de tal procedimento. Dessa forma, sendo o nosso objetivo a posterior determinação de parâmetros enzimáticos que serão utilizados na determinação de clearance intrínseco e depois no clearance hepático e taxa de extração hepática, nosso grupo optou por continuar validando os métodos desenvolvidos

pela avaliação dos parâmetros descritos acima.

Portanto o método foi validado e todos os parâmetros corroboraram com as exigências do EMA (2011) [121]. Posteriormente foram determinados os parâmetros cinéticos do metabolismo estereosseletivo do FS pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450) na faixa de concentração de 6,0 a 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Durante os ensaios de metabolismo não foi observado racemização dos enantiômeros do FS e apenas o metabólito FSO foi formado. Nesse sentido, eu chamo a atenção para a importância da avaliação da racemização nesses estudos. Como pretendemos realizar os estudos com os enantiômeros isolados é fundamental conhecer sua estabilidade quiral a fim de interpretar os resultados de maneira correta.

Os parâmetros cinéticos (K_M e V_{MAX}) para o metabolismo do FS foram determinados por análise de regressão não linear da velocidade de formação do metabólito FSO. O clearance intrínseco (CL_{int}) foi determinado pela relação V_{MAX}/K_M (Tabela 6).

Em seguida, a fim de prever a eliminação dos enantiômeros do FS do organismo, foi calculado o clearance intrínseco in vivo de acordo com a Equação 10 [122].

$$CL_{int,in vivo} = CL_{int,in vitro} \cdot \frac{40 \text{ mg microsossoma}}{1 \text{ g de fígado}} \cdot \frac{21,4 \text{ g de fígado}}{1 \text{ kg corporal}} \quad \text{(Equação 10)}$$

Tabela 6. Parâmetros enzimáticos do metabolismo enantiosseletivo do fenamifós empregando microsomas hepático de humanos.

| Substrato | Metabólito | $V_{m\acute{a}x}$ ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) | K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | CL_{int} ($\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$) |
|-----------|------------|--|-------------------------------------|---|
| (+) -FS | (-) -a-FSO | 1982 ± 96 | 157 ± 15 | 12632 ± 1825 |
| | (+) -a-FSO | 2253 ± 250 | 441 ± 70 | 5103 ± 1380 |
| (-) -FS | (-) -b-FSO | 1534 ± 130 | 346 ± 45 | 4437 ± 955 |
| | (+) -b-FSO | 1363 ± 138 | 391 ± 59 | 3487 ± 880 |
| rac-FS | (-) -a-FSO | 998 ± 43 | 89 ± 10 | 11264 ± 1733 |
| | (+) -a-FSO | 571 ± 41 | 194 ± 26 | 2939 ± 615 |
| | (-) -b-FSO | 783 ± 39 | 150 ± 17 | 5238 ± 813 |
| | (+) -b-FSO | 749 ± 50 | 169 ± 22 | 4440 ± 879 |

Valores expressos como média ± desvio padrão, n = 3. Fonte: de Albuquerque, N. C. P. (2019) [123].

Posteriormente foi realizada a extrapolação do modelo in vitro para in vivo e para tanto foram calculados os valores de clearance hepático (Equação 11) e a taxa de extração hepática (Equação 12) do metabolismo do racemato e de cada enantiômero isolado do FS (Tabela 7).

$$CL_H = \frac{Q_H \cdot \frac{f_{u,p}}{f_{u,mic}} \cdot CL_{int,in vivo}}{Q_H + \frac{f_{u,p}}{f_{u,mic}} \cdot CL_{int,in vivo}} \quad (\text{Equação 11})$$

$$E = \frac{CL_H}{Q_H} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde $f_{u,p}$ = fração livre do analito em plasma; $f_{u,mic}$ = fração livre do analito em meio microsomal; Q_H = fluxo sanguíneo hepático [122].

Tabela 7. Parâmetros toxicocinéticos in vivo preditos do metabolismo estereosseletivo do fenamifós.

| Substrato | Metabólito | CL _H (mL min ⁻¹ Kg ⁻¹) | %E _H (adimensional) |
|----------------|------------|---|-----------------------------------|
| (+) -FS | (-) -a-FSO | 1,93 | 9,63 |
| | (+) -a-FSO | 0,83 | 4,13 |
| (-) -FS | (-) -b-FSO | 0,72 | 3,61 |
| | (+) -b-FSO | 0,57 | 2,86 |
| <i>rac</i> -FS | (-) -a-FSO | 1,74 | 8,68 |
| | (+) -a-FSO | 0,48 | 2,42 |
| | (-) -b-FSO | 0,85 | 4,23 |
| | (+) -b-FSO | 0,72 | 3,61 |
| (+) -FS | a-FSO | 2,60 ^a | 13,02 ^a |
| (-) -FS | b-FSO | 1,25 ^b | 6,27 ^b |
| <i>rac</i> -FS | a-FSO | 2,14 ^a | 10,71 ^a |
| <i>rac</i> -FS | b-FSO | 1,51 ^b | 7,55 ^b |
| <i>rac</i> -FS | FSO | 3,36 ^c | 16,78 ^c |

(a) Somatória dos parâmetros determinados para (-)-a-FSO e (+)-a-FSO; (b) Somatória dos parâmetros determinados para (-)-b-FSO e (+)-b-FSO; e (c) Somatória dos parâmetros determinados para (-)-a-FSO, (+)-a-FSO, (-)-b-FSO e (+)-b-FSO. Fonte: de Albuquerque, N. C. P. (2019) [123].

Os valores de clearance hepático (CL_H) determinados fornecem informações sobre a colaboração do fígado para eliminação de um xenobiótico do organismo. O CL_H tem valor máximo de 20 mL min⁻¹ Kg⁻¹ [124]. Para os ensaios realizados utilizando o *rac*-FS, (+)-FS e (-)-FS, os valores de CL_H obtidos indicam que o fígado é um órgão capaz de colaborar para eliminação deste praguicida do organismo, embora os dados sugerem que apenas uma pequena parcela do sangue perfundido pelo fígado foi depurado do fenamifós pela ação das enzimas hepáticas (menor do que 4 mL min⁻¹ Kg⁻¹). A taxa de extração hepática (E_H) se refere a parcela de xenobiótico que foi eliminado pelo fígado durante a primeira passagem (considerando a ingestão do mesmo), e tem

valor máximo de 1, que corresponde a situação em que todo composto é eliminado pelo fígado durante a primeira passagem [125]. No caso do fenamifós, mistura racêmica e enantiômeros isolados, os valores apresentados na Tabela 7 demonstram que o fígado é capaz de eliminar o praguicida, mas não por completo durante a primeira passagem. Este fato indica que o fenamifós poderá circular pelo organismo e ainda estará disponível para sofrer metabolismo pela ação de outros órgãos, ou ser sequencialmente eliminado pelo fígado no decorrer do tempo.

Outra informação importante acerca do metabolismo de xenobióticos diz respeito as enzimas que são responsáveis pelo metabolismo, uma vez que, alteração na atividade dessas enzimas (por exemplo por inibição) pode haver o acúmulo do praguicida no organismo. Portanto, 2 métodos foram utilizados para determinação das isoformas do CYP450 envolvidas no metabolismo do fenamifós, o método empregando microsomas hepáticos de humanos na presença de inibidores químicos seletivos expresso em função da porcentagem de inibição (%) (Equação 13) e o metabolismo por enzimas CYP humanas recombinantes (Supersomas[®]) expresso em função da porcentagem da razão normalizada total (%RNT) (Equação 14). Os resultados estão apresentados na Figura 31.

$$\%I = \frac{V_0 - V_i}{V_0} \quad \text{(Equação 13)}$$

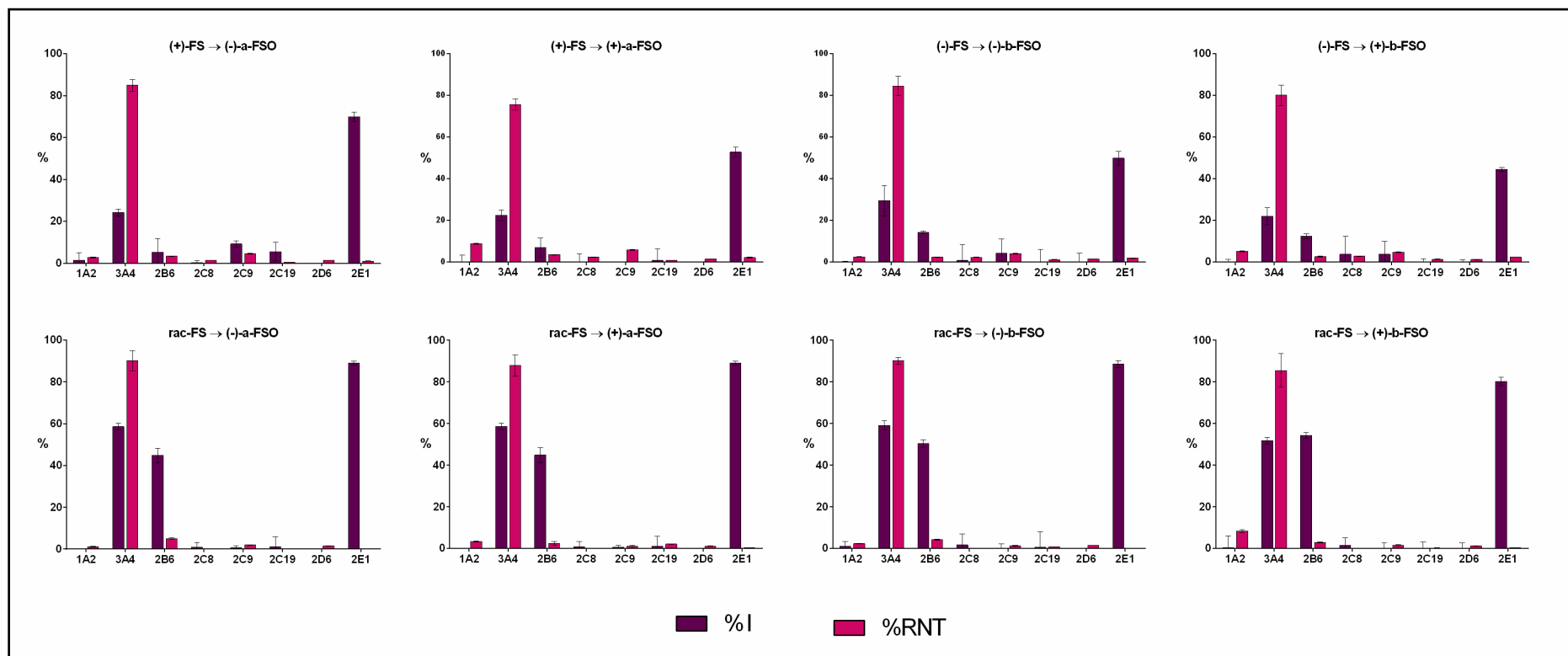
Onde: %I = porcentagem de inibição; V_0 = velocidade da reação na ausência de inibidor; V_i = velocidade de reação na presença do inibidor [126].

$$\%RNT = \frac{RN}{RNT} \cdot 100 \quad (\text{Equação 14})$$

Onde a velocidade da reação de formação do metabólito foi multiplicada pela média da concentração da isoforma em microsomas hepáticos de humanos, obtendo-se a razão normalizada (RN). Em seguida, a RN de todas as isoformas avaliadas foram somadas, obtendo-se a razão normalizada total (RNT) [126].

Conforme pode ser observado na Figura 31 (abaixo), os resultados obtidos para o metabolismo de cada enantiômero separadamente sugerem que as mesmas isoformas do CYP são responsáveis pela formação dos quatro estereoisômeros do FSO, a CYP3A4 e a CYP2E1. Quando o ensaio foi realizado empregando os microsomas hepáticos de humanos com os inibidores químicos seletivos a isoforma com maior contribuição para a formação do FSO foi a CYP2E1, e em menor proporção, a CYP3A. Por outro lado, quando o ensaio foi realizado empregando os Superssomas[®], o metabolismo dos enantiômeros do FS foi catalisado predominantemente pela CYP3A4. As diferenças nos resultados obtidos pelos dois métodos podem ser compreendidas pelas limitações de cada um. O fato de mais do que uma isoforma do CYP ser capaz de metabolizar o fenamifós diminui os riscos deste praguicida permanecer no organismo mesmo em uma situação em que o indivíduo está exposto a compostos que possam inibir a atividade de algumas enzimas, como fármacos ou outros praguicidas, pois quanto mais isoformas estiverem envolvidas no metabolismo de um composto maior serão as vias de eliminação.

Figura 31. Contribuição das isoformas do CYP450 no metabolismo do fenamifós.



(■) Porcentagem de inibição (%I) da atividade de cada isoforma avaliada empregando inibidores químicos seletivos em microsomas hepáticos de humanos; (■) porcentagem da razão normalizada total (%RNT) correspondente a cada isoforma utilizando enzimas CYP humanas recombinantes. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Fonte: de Albuquerque, N. C. P. (2019) [123].

A fim de complementar as informações sobre o risco da exposição humana ao FS, avaliou-se a possibilidade de ocorrência de interações fármaco-praguicida devido ao potencial deste praguicida inibir as principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos. Os ensaios de inibição foram realizados com a mistura racêmica do FS e com cada enantiômero isolado. Inicialmente foi realizado o ensaio de IC_{50} a fim de avaliar se alguma enzima do CYP450 seria inibida pelo FS e seus enantiômeros. As reações específicas para cada isoforma avaliada e os valores de IC_{50} do *rac*-FS, (+)-FS e (-)-FS sobre cada isoforma estão resumidas na Tabela 8. O FS (racemato ou cada enantiômero isolado) apresentou inibição fraca sobre as isoformas CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A. Em contrapartida, a CYP1A2 foi fortemente inibida pelo *rac*-FS. Com relação aos enantiômeros isolados, a inibição causada pelo enantiômero (+)-FS pode ser considerada moderada ($IC_{50} = 84,7 \mu\text{mol L}^{-1}$), em contraste com a forte inibição causada pelo enantiômero (-)-FS. Os valores de IC_{50} apontaram para uma extensa estereosseletividade na inibição da isoforma CYP1A2 pelos enantiômeros do FS [(-)-FS foi um inibidor 10 vezes mais potente que o (+)-FS]. Com relação a CYP3A, nos ensaios realizados empregando o midazolam como substrato, houve inibição moderada da CYP3A pelo praguicida FS. Quando os enantiômeros foram avaliados separadamente, o (+)-FS foi um inibidor aproximadamente duas vezes mais forte que o (-)-FS para a CYP3A. Assim, a fim de melhor compreender as interações do praguicida com as enzimas do CYP450, foram avaliados os mecanismos de inibição das isoformas que foram inibidas de maneira significativa por ele ($IC_{50} < 100 \mu\text{mol L}^{-1}$): CYP1A2, CYP2C19 e CYP3A.

Tabela 8. Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) do fenamifós frente a diferentes isoformas do CYP450

| Isoforma | Reação específica | IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) | | |
|----------|--------------------------------|--|--------|--------|
| | | <i>rac</i> -FS | (+)-FS | (-)-FS |
| CYP1A2 | O-deetilação da fenacetina | 6,4 | 84,7 | 8,8 |
| CYP2C9 | 4'-hidroxilação do diclofenaco | >100 | >100 | >100 |
| CYP2D6 | 1'-hidroxilação do bufuralol | >100 | >100 | >100 |
| CYP2E1 | 6-hidroxilação da clorzoxazona | >100 | >100 | >100 |
| CYP3A | 1'-hidroxilação do midazolam | 45,8 | 24,0 | 50,0 |
| CYP3A | oxidação da nifedipina | >100 | >100 | >100 |

Fonte: de Albuquerque, N. C. P. (2019) [123].

Portanto, após confirmar que o fenamifós e seus enantiômeros isolados seriam capazes de inibir algumas isoformas do CYP450, a próxima etapa foi determinar os mecanismos e as constantes de inibição (Tabela 9). Como pode ser observado os valores de K_i obtidos foram baixos e a inibição da CYP1A2 mostrou ser enantiosseletiva.

Tabela 9. Constantes de inibição das isoformas CYP1A2, CYP2C19 e CYP3A pelo praguicida fenamifós empregando microsomas hepáticos de humanos e predição in vivo.

| Isoforma | <i>rac</i> -FS | (+)-FS | (-)-FS |
|----------------------|--|--|--|
| | K _i (μmol L ⁻¹) | K _i (μmol L ⁻¹) | K _i (μmol L ⁻¹) |
| CYP1A2 ^a | 1,8 | 28,1 | 3,6 |
| CYP2C19 ^b | 2,6 | 4,6 | 1,0 |
| CYP3A ^c | 1,4 | 7,1 | 1,7 |

Reação monitorada: ^(a) O-deetilação da fenacetina; ^(b) 4'-hidroxilação da S-mefenitoína; e ^(c) 1'-hidroxilação do midazolam. Fonte: de Albuquerque, N. C. P. (2019) [123].

Esses dados indicam que caso o indivíduo esteja fazendo o uso de algum medicamento que seja metabolizado pela CYP1A2, CYP2C19 ou CYP3A e for exposto ao fenamifós poderá haver um aumento na concentração sanguínea

desses fármacos o que pode levar a possíveis efeitos tóxicos. Exemplos de fármacos metabolizados por essas isoformas são carbamazepina, midazolam (CYP3A), citalopram, amitriptilina (CYP2C19) e tacrina, duloxetina (CYP1A2) [127].

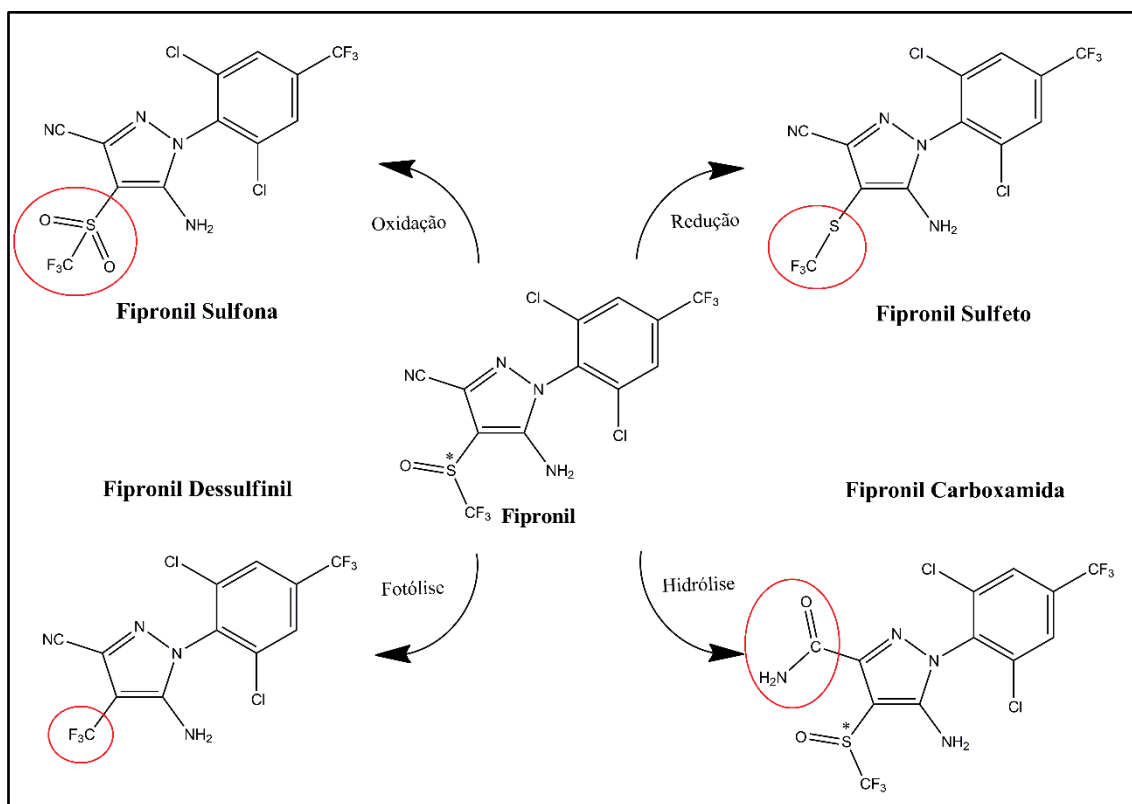
Esse trabalho relatou pela primeira vez um estudo de metabolismo in vitro estereosseletivo do praguicida fenamifós e marcou o início do nosso grupo de pesquisa nessa temática. O método cromatográfico desenvolvido foi o mais rápido descrito na literatura para análise quiral do fenamifós e seus metabólitos além de propor o uso de colunas acopladas em série para análise de estereoisômeros. A validação do método anterior a determinação dos parâmetros enzimáticos é fundamental pois os dados toxicocinéticos de extrapolação obtidos são empregados para obtenção dos valores de clearance que por sua vez está relacionado com o K_M e V_{MAX} . Portanto, a determinação errônea desses valores devido ao desenvolvimento inapropriado do método analítico inviabilizaria toda a discussão acerca da correção in vitro-in vivo realizada. Outra característica muito importante que avaliamos no decorrer do trabalho é a estabilidade e a solubilidade do substrato (não apresentado nesse texto, mas disponível nos arquivos em anexo) anterior aos estudos de metabolismo in vitro. O fenamifós (assim como o albendazol, descrito no Capítulo 2) sofre oxidação muito facilmente e durante o preparo da amostra foi também adicionado metabissulfito ao meio para minimizar esse processo. O fenamifós mostrou ser bem solúvel em pH 7,4 contudo temos trabalhado com outros praguicidas que são pouco solúveis no meio e diferentes estratégias vem sendo empregadas nesses casos, como por exemplo o uso de tensoativos em concentrações apropriadas. Caso o praguicida precipite no meio, os estudos de

cinética enzimática ficam inviabilizados.

3.3.2. Estudos *In Vitro* de Metabolismo e Inibição Enzimática do Fipronil

O fipronil (FP) (Figura 32) é um inseticida quiral de uso sistêmico pertencente a classe dos fenilpirazóis [128]. No Brasil, o fipronil é amplamente empregado em culturas de algodão, amendoim, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, eucalipto, feijão, milho, sorgo, soja e trigo; além de ser utilizado no controle urbano de formigas e outros insetos [129]. Entre os produtos de degradação ou metabólitos reportados na literatura, destacam-se o fipronil sulfeto, o fipronil dessulfenil, o fipronil sulfona e o fipronil carboxamida (Figura 32) [130].

Figura 32. Reações de degradação e estruturas químicas dos principais metabólitos do fipronil.



* Centro quiral.

Conforme relatado para o fenamifós, a primeira etapa consistiu em estabelecer um método cromatográfico para análise do fipronil e de seus possíveis metabólitos, fipronil sulfeto, fipronil sulfona e fipronil desulfínil. Entre esses analitos, somente o fipronil é quiral. Dessa forma, a estratégia inicial foi estabelecer uma separação quiral para análise do fipronil e posteriormente avaliar a influência dos “metabólitos” na resolução dos enantiômeros. Para isso, um procedimento sistemático de triagem empregando CLAE nos três modos de eluição foi realizado. A Tabela 10 apresenta as melhores condições analíticas que permitiram a separação dos enantiômeros do fipronil.

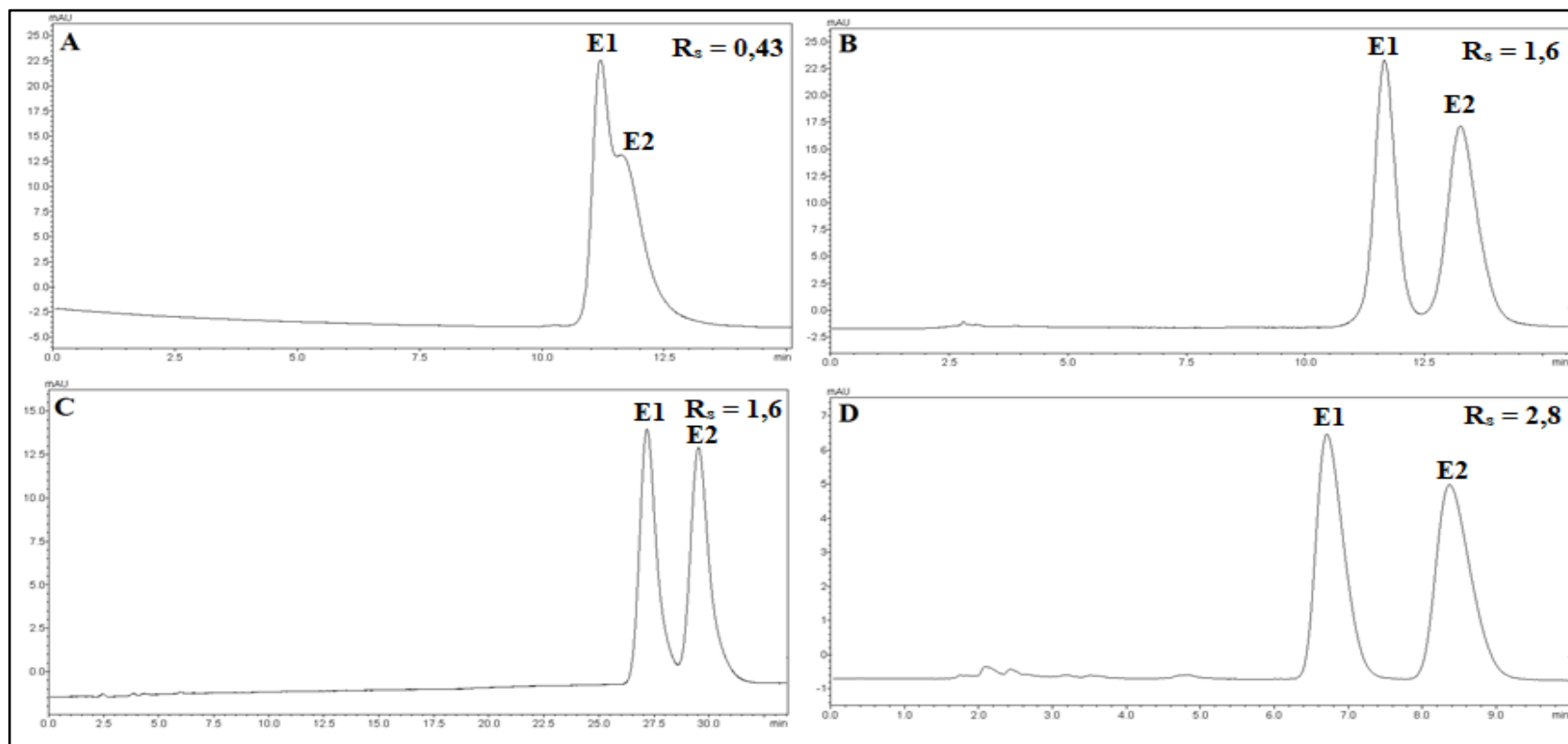
Tabela 10. Melhores condições analíticas para separação enantiosseletiva do fipronil.

| Coluna | Modo | Fase Móvel | Vazão (mL min ⁻¹) | R _s | Tempo de Análise (min) |
|----------------|----------------|--|----------------------------------|----------------|---------------------------|
| Chiralcel OJ | Polar orgânico | isopropanol (100%) + 1% ácido acético | 0,2 | 0,43 | 13 |
| Chiralpak AD-H | Fase reversa | acetonitrila: água (45:55, v/v) | 0,5 | 1,6 | 14 |
| Chiralpak AS | Fase reversa | acetonitrila: água (40:60, v/v) | 0,8 | 1,6 | 32 |
| Chiralcel OD-H | Fase normal | hexano: isopropanol (90:10, v/v) | 1,0 | 2,8 | 10 |

Rs: resolução.

Apesar de terem sido avaliadas colunas quirais derivadas de polissacarídeos e de antibióticos macrocíclicos, apenas as do primeiro tipo foram capazes de separar os enantiômeros do fipronil. A Figura 33 apresenta os cromatogramas representativos das análises empregando as colunas Chiralcel OJ (modo polar orgânico), Chiralpak AD-H (modo fase reversa), Chiralcel AS (fase reversa) e Chiralcel OD-H (modo fase normal)

Figura 33. Cromatogramas representativos das melhores condições analíticas obtidas para análise dos enantiômeros do fipronil.

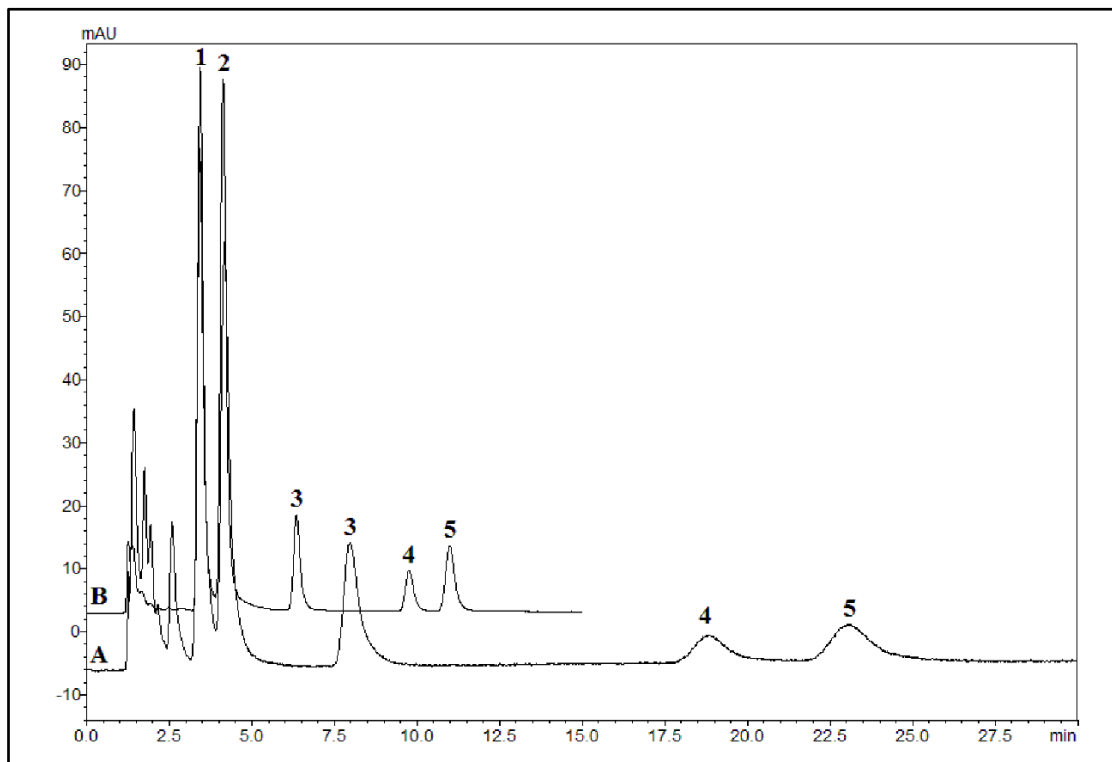


A) Modo: polar orgânico, coluna: Chiralcel OJ (250 mm × 4,6 mm, 10 μm), fase móvel: isopropanol (100%) + 1% ácido acético, vazão: 0,2 mL min⁻¹, B) Modo: fase reversa, coluna: Chiralpak AD-H (150 mm × 4,6 mm, 5 μm), fase móvel: acetonitrila: água (45:55, v/v), vazão: 0,5 mL min⁻¹, C) Modo: fase reversa, coluna: Chiralpak AS (250 mm × 4,6 mm, 10 μm), fase móvel: acetonitrila: água (40:60, v/v), vazão: 0,8 mL min⁻¹ e D) Modo: fase normal, coluna: Chiralcel OD-H (150 mm × 4,6 mm, 5 μm), fase móvel: hexano: isopropanol (90:10, v/v), vazão: 1,0 mL min⁻¹. Para todas as condições a temperatura de análise foi de 22 ± 2 °C, volume de injeção de 20 μL da solução padrão de fipronil na concentração de 50 μmol mL⁻¹ e detecção em 280 nm. E1: primeiro enantiômero do fipronil a eluir, E2: segundo enantiômero do fipronil a eluir e R_s : resolução cromatográfica. Fonte: adaptado de Carrão et al. (2019), com permissão [131].

Na condição empregando a coluna Chiralcel OD-H, o tempo de análise foi de 10 min e a resolução cromatográfica foi de 2,8. Apesar de que no modo fase normal espera-se que os metabólitos do fipronil, apresentem maior tempo de retenção em comparação ao mesmo, a maior resolução cromatográfica dessa condição possibilita modificações no método para a diminuição do tempo de análise. Dessa forma, devido ao maior potencial de apresentar condição de separação adequada em menor tempo de análise, a condição analítica empregando a coluna Chiralcel OD-H no modo fase normal foi a escolhida. Após selecionar a condição cromatográfica adequada para a análise dos enantiômeros do fipronil, a separação dos seus metabólitos (fipronil sulfona, fipronil dessulfínil e fipronil sulfeto) foi avaliada empregando essa condição. A condição cromatográfica obtida empregando a coluna Chiralcel OD-H no modo fase normal, foi capaz de separar de maneira eficiente os metabólitos do fipronil, sem que os mesmos coeluissem com os enantiômeros do fipronil (Figura 34A). Entretanto, o tempo de análise foi superior a 30 min e optou-se por realizar alguns ajustes na condição cromatográfica, de maneira a diminuir o tempo de análise, sem que houvesse prejuízo na resolução entre os analitos e não inviabilizasse o emprego dela. Dessa forma, optou-se por utilizar a eluição por gradiente, já que o aumento gradativo e adequado da força cromatográfica possibilita a diminuição do tempo de análise sem que haja prejuízo significativo na separação cromatográfica. Além disso, de maneira a também diminuir o tempo de análise, a vazão da fase móvel foi aumentada de 1,0 para 1,5 mL min⁻¹ e a temperatura de análise de 22 °C para 30 °C. A combinação dessas mudanças no método analítico possibilitou a diminuição do tempo de análise sem prejuízo na separação cromatográfica. O gradiente de eluição final foi: 10%

isopropanol (em 0,01 min), 30% isopropanol (em 12 min), 10% isopropanol (em 12,5 min) e 10% isopropanol (em 15 min) (Figura 34B). A Figura 34 apresenta a separação quiral do fipronil juntamente com seus possíveis metabólitos.

Figura 34. Cromatograma representativo da análise enantiosseletiva do fipronil e seus metabólitos.



Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD-H (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m), fase móvel hexano: isopropanol, volume de injeção de 50 μ L e temperatura de análise de 30 $^{\circ}$ C. (1) – *R*-fipronil, (2) – *S*-fipronil, (3) – fipronil sulfona, (4) – PI (carbamazepina), (5) – fipronil dessulfínil e (6) – fipronil sulfeto. A) eluição por isocrática (10% isopropanol) com vazão de 1,0 mL min^{-1} e temperatura de análise de 22 $^{\circ}$ C e eluição por gradiente (10% isopropanol em 0,01 min, 30% isopropanol em 12 min, 10% isopropanol em 12,5 min e 10% isopropanol em 15 min com vazão de 1,5 mL min^{-1} e temperatura de análise de 30 $^{\circ}$ C B). Fonte: adaptado de Carrão et al. (2019) [131], com permissão.

A análise do fipronil e seus metabólitos usando eluição por gradiente e modo normal marcou uma nova forma de eluição de enantiômeros no meu grupo de pesquisa. Eu tenho trabalhado com análise enantiosseletiva desde 2003 e

até esse momento não havíamos utilizado eluição por gradiente em fase normal, pois o tempo de reequilíbrio da coluna para a análise seguinte costuma ser um pouco elevado. Nesse método o tempo de reequilíbrio foi bem adequado, de 2,5 min, não inviabilizando, portanto, o desenvolvimento do método. Para avaliar a reprodutibilidade dos tempos de retenção na eluição por gradiente, o teste de conformidade do sistema (*system suitability*) do método analítico foi avaliado (Tabela 11). O baixo valor de coeficiente de variação obtido para os parâmetros cromatográficos comprova que o método enantiosseletivo separação por eluição com gradiente possui reprodutibilidade adequada para ser utilizado.

Tabela 11. *System suitability* do método analítico desenvolvido (n = 6).

| Parâmetro | S-Fipronil | R-Fipronil | Fipronil Sulfona | PI | Fipronil Dessulfinil | Fipronil Sulfeto |
|------------------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------------|------------------|
| Tempo de retenção (min) (CV) | 3,43 (0,2%) | 4,12 (0,1%) | 6,36 (0,1%) | 8,21 (0,1%) | 9,77 (0,1%) | 11,00 (0,1%) |
| Resolução (CV) | - | 2,1 (3%) | 6,2 (2%) | 3,7 (1%) | 2,9 (1%) | 2,4 (1%) |
| Número de pratos (CV) | 1951 (4%) | 2486 (5%) | 4376 (3%) | 3034 (1%) | 6821 (1%) | 6698 (1%) |
| Fator de assimetria (CV) | 1,4 (2%) | 1,4 (4%) | 1,4 (2%) | 1,6 (2%) | 1,2 (1%) | 1,3 (1%) |

CV – Coeficiente de Variação. Fonte: adaptado de Carrão et al. (2019) [131], com permissão.

O método desenvolvido nesse trabalho para análise simultânea dos enantiômeros do fipronil e dos metabólitos fipronil sulfona, fipronil dessulfinil e fipronil sulfeto apresenta o menor tempo de análise (15 min) quando comparado aos outros métodos reportados na literatura [128,132–141].

Empregando o método analítico enantiosseletivo validado, foram realizados os estudos de metabolismo in vitro do *rac*-FP, *S*-FP e *R*-FP

empregando microsomas hepático de humanos. Nos ensaios de metabolismo in vitro não foi observada a racemização dos enantiômeros do FP e observou-se apenas a formação do metabólito fipronil sulfona (FPO). Os parâmetros cinéticos enzimáticos (K_M e V_{MAX}) para a reação de metabolismo do *rac*-FP, *S*-FP e *R*-FP em FPO foram determinados e, a seguir, os valores de clearance intrínseco foram calculados (Tabela 12).

Tabela 12. Parâmetros enzimáticos do metabolismo in vitro enantiosseletivo e predição dos parâmetros toxicocinéticos in vivo do fipronil.

| Reação de metabolismo | K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | V_{MAX} ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) | $CL_{INT, \text{ in vitro}}$ ($\text{mL min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--|---|
| fipronil → fipronil sulfona | 22 ± 2 | 0,28 ± 0,01 | 12 ± 1 |
| <i>R</i> -fipronil → fipronil sulfona | 25 ± 2 | 0,300 ± 0,008 | 11,9 ± 0,8 |
| <i>S</i> -fipronil → fipronil sulfona | 45 ± 3 | 0,45 ± 0,02 | 10,0 ± 0,9 |

Valores expressos como média ± desvio padrão. Fonte: adaptado de Carrão et al. (2019) [131], com permissão.

Os valores de K_M e V_{MAX} obtidos para a reação de metabolismo do *rac*-FP e do *R*-FP foram similares, porém ambos os parâmetros apresentaram valores aproximadamente 1,5 vezes maiores para a reação de metabolismo do *S*-FP. Apesar disso, os valores de clearance intrínseco (CL_{INT}) para o metabolismo do *R*-FP e do *S*-FP foram, respectivamente, 0,96 e 0,80 vezes o valor do CL_{INT} para o metabolismo do *rac*-FP (Tabela 12). Em seguida, a partir dos parâmetros cinéticos enzimáticos obtidos, foi realizada a extrapolação dos resultados in vitro para in vivo (de acordo com as Equações 10, 11 e 12), para a predição dos parâmetros toxicocinéticos in vivo de eliminação dos enantiômeros do FP, clearance hepático (CL_H) e taxa de extração hepática (E) (Tabela 13).

Tabela 13. Parâmetros toxicocinéticos in vivo preditos.

| Reação de metabolismo | CL _H (mL min ⁻¹ kg ⁻¹) | E _H (%) |
|-------------------------------|--|--------------------|
| Fipronil → fipronil sulfona | 1,02 | 5,1 |
| R-fipronil → fipronil sulfona | 0,98 | 4,9 |
| S-fipronil → fipronil sulfona | 0,83 | 4,1 |

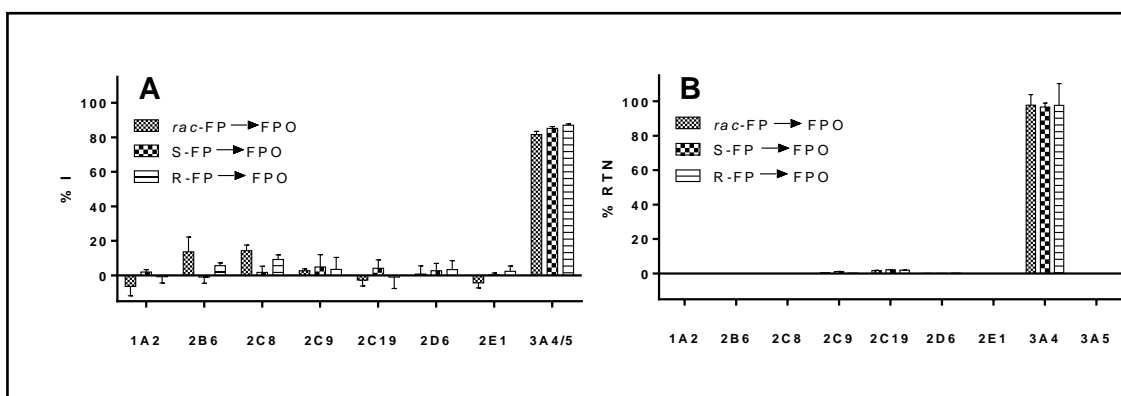
Fonte: adaptado de Carrão et al. (2019) [131], com permissão.

Para ambos os parâmetros toxicocinéticos in vivo preditos, os resultados não indicaram enantiosseletividade no metabolismo do fipronil pelas enzimas do CYP450. Valores de CL_H próximos ao valor do fluxo sanguíneo hepático humano (20 mL min⁻¹ kg⁻¹) podem indicar que o xenobiótico é altamente depurado pelo fígado [142]. Os valores de CL_H obtidos para o fipronil, R-fipronil e S-fipronil foram próximos a 1, o que pode indicar que os xenobióticos são metabolizados pelo fígado, porém mais lentamente. Valores de E_H próximos a 100% podem indicar que o xenobióticos sofrerá o efeito de primeira passagem pelo fígado [143]. Os valores de E_H obtidos para o fipronil, R-fipronil e S-fipronil foram próximos a 5%, o que pode indicar que os xenobióticos não são significativamente metabolizados pelo efeito de primeira passagem pelo fígado. Dessa forma, se o fipronil for ingerido, ele será metabolizado pelo fígado de maneira não extensiva e o efeito de primeira passagem não irá diminuir significativamente a sua concentração no sangue. A predição dos parâmetros toxicocinéticos in vivo enantiosseletivos do fipronil fornecem informações valiosas acerca da avaliação de risco do praguicida em humanos. Embora não tenha sido observado nenhuma diferença enantiosseletiva significativa, os resultados podem indicar que qualquer dano na função hepática ou inibição das enzimas do CYP450 por outros compostos podem resultar no acúmulo de fipronil no corpo, o que pode ocasionar intoxicação humana. Os resultados acerca do metabolismo in vitro do fipronil por

microsomas humanos podem ser encontrados no periódico *Food and Chemical Toxicology* [131] (<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.060>).

A seguir, as principais isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do *rac*-FP, S-FP e R-FP foram determinadas por dois métodos distintos. Os resultados obtidos em ambos os métodos indicaram que a isoforma CYP3A4, dentre as isoformas do CYP450 avaliadas, é a única isoforma significativamente responsável pelo metabolismo do *rac*-FP, do S-FP e do R-FP em FPO (Figura 35).

Figura 35. Determinação das principais isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do *rac*-fipronil, S-fipronil e R-fipronil.



(A) inibidores químicos seletivos do CYP450 e (B) isoformas recombinante da CYP450. Fonte: adaptado de Carrão et al. (2019) [131].

Finalmente, o potencial de inibição enzimática sobre as principais isoformas do CYP450 foi avaliado, com o intuito de avaliar a ocorrência de interações praguicida-fármaco, devido à inibição da atividade das enzimas do CYP450 ocasionada pela presença do praguicida. Para isso, foram realizados ensaios de inibição enzimática com a mistura racêmica do FP, com seus enantiômeros isolados. A Tabela 14 apresenta todas as isoformas do CYP450 que foram avaliadas, assim como cada reação específica monitorada. Os valores

de IC₅₀, para cada isoforma da CYP450 encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de IC₅₀ do *rac*-fipronil, *S*-fipronil, *R*-fipronil para diferentes isoformas do CYP450.

| Isoforma | IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) | | | |
|------------|--|------------|------------|------------------|
| | Fipronil | R-fipronil | S-fipronil | Fipronil sulfona |
| CYP1A2 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| CYP2C9 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| CYP2C19 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| CYP2D6 | 35 ± 3 | 23 ± 3 | 14,3 ± 0,7 | 21 ± 5 |
| CYP2E1 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| CYP3A4/5 M | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| CYP3A4/5 N | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |

3A4/5 M: substrato padrão: midazolam e 3A4/5 N: substrato padrão: nifedipina. Fonte: Carrão et al. (2019) [144], com permissão.

Os resultados obtidos para os valores de IC₅₀ indicam que, para as isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 e CYP3A4/5 (tanto para a reação de hidroxilação do midazolam, quanto para a reação de oxidação da nifedipina), o *rac*-FP, o *S*-FP, o *R*-FP são inibidores fracos (IC₅₀ > 100 μmol L⁻¹). No entanto, para CYP2D6 a mistura racêmica do FP e seus enantiômeros isolados apresentaram potencial moderado de inibição (10 μmol L⁻¹ < IC₅₀ < 100 μmol L⁻¹). O valor de IC₅₀ obtido empregando o *rac*-FP foi de aproximadamente 2,1 e 1,4 vezes maior do que empregando o *S*-FP e o *R*-FP, respectivamente, o que pode sugerir um maior potencial de inibição da CYP2D6 pelos enantiômeros puros do que pela mistura racêmica do FP.

Para compreender melhor o potencial de inibição enzimática do fipronil, *R*-fipronil, *S*-fipronil e fipronil sulfona frente às enzimas do CYP450, foram realizados ensaios de determinação mecanismo de inibição enzimática e da

constante de inibição enzimática para as isoformas do CYP450 que apresentaram inibição significativa (IC_{50} menor do que $100 \mu\text{mol L}^{-1}$), ou seja, para a isoforma CYP2D6. A Tabela 15 sumariza os resultados obtidos nos estudos de inibição enzimática das isoforma CYP2D6 pelo fipronil, *R*-fipronil, *S*-fipronil e fipronil sulfona.

Tabela 15. Mecanismo e constante de inibição enzimática da CYP2D6

| Inibidor | IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | IC_{50} <i>shift</i> | Mecanismo de Inibição Enzimática | K_i ($\mu\text{mol L}^{-1}$) |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Fipronil | 35 ± 3 | 0,9 | Competitiva | 25 ± 2 |
| <i>R</i> -fipronil | 23 ± 3 | 1,3 | Competitiva | 46 ± 6 |
| <i>S</i> -fipronil | $14,3 \pm 0,7$ | 0,9 | Competitiva | 37 ± 6 |
| Fipronil sulfona | 21 ± 5 | 0,6 | Competitiva | $5,1 \pm 0,8$ |

K_i – constante de inibição enzimática. Fonte: Carrão et al. (2019) [144], com permissão.

As constantes de inibição enzimática (K_i) obtidas para o fipronil, *R*-fipronil e *S*-fipronil avaliados indicam que há um risco moderado da existência de interações praguicida-fármaco para a isoforma CYP2D6. No entanto, os valores de K_i obtidos indicam que não há enantiosseletividade significativa na inibição da atividade enzimática da isoforma CYP2D6 pelo praguicida fipronil. Apesar disso, o valor de K_i obtido para o fipronil sulfona, indica que esse metabólito apresenta maior potencial de inibição enzimática do que o fipronil, sendo um inibidor forte da CYP2D6 [145]. Esse resultado pode sugerir que o metabolismo do fipronil em fipronil sulfona pelas enzimas do CYP450, aumenta a possibilidade da ocorrência de interações xenobiótico-fármaco na atividade enzimática da isoforma CYP2D6.

A isoforma CYP2D6 corresponde a apenas 2% das enzimas do CYP450 expressas no fígado [146], porém é responsável pelo metabolismo de 25% dos

fármacos presentes no mercado, o que aumenta significativamente o potencial de interação xenobiótico-fármaco [147]. Entre os 200 fármacos mais prescritos nos Estados Unidos em 2011, 29% dos mesmos são metabolizados pela isoforma CYP2D6 [146]. Entre os fármacos metabolizados pela CYP2D6 podem-se citar: a clorpromazina (antipsicótico), o dextrometorfano (antitussígeno), a fluoxetina (antidepressivo), o metoprolol (anti-hipertensivo), o propranolol (anti-hipertensivo), a risperidona (antipsicótico), o tamoxifeno (anticâncer de mama), a venlafaxina (antidepressivo), entre outros [146]. O dextrometorfano, o metoprolol e a venlafaxina são metabolizados pela CYP2D6 e podem ter sua farmacocinética facilmente alterada pela presença de um inibidor da CYP2D6, dessa forma, a inibição enzimática da CYP2D6 pode acarretar efeitos intensificados para esses fármacos [146]. Os resultados acerca da inibição enzimática do fipronil na CYP2D6 podem ser encontrados no periódico *Toxicology Letters* [144] (<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.07.005>)

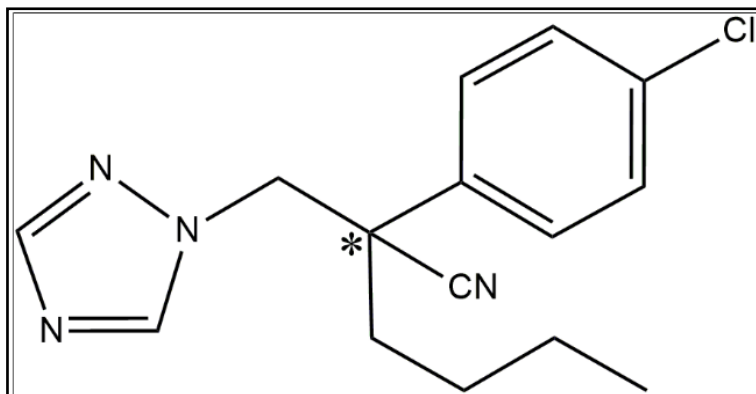
Portanto, pode-se concluir que a exposição dos seres humanos ao fipronil pode ocasionar interações xenobiótico-fármaco indesejadas. O fipronil e seus enantiômeros são inibidores moderados, e o fipronil sulfona é inibidor forte da atividade enzimática da isoforma CYP2D6. Devido às especificidades dessa isoforma, essas interações podem ocasionar a diminuição significativa da atividade enzimática e, conseqüentemente, levar ao aumento da concentração de fármacos metabolizados pela CYP2D6, o que pode acarretar efeitos tóxicos. Esses resultados destacam a importância da avaliação do potencial de inibição enzimática de praguicidas, uma vez que por estarmos expostos a esses compostos, as interações praguicida-fármaco na atividade enzimática do CYP450 necessitam ser avaliadas para a avaliação de risco do praguicida a

saúde humana.

3.3.3. Estudos *In Vitro* de Metabolismo e Inibição Enzimática do Miclobutanil

O miclobutanil (Figura 36) é um fungicida quiral da família dos triazóis, amplamente utilizado no Brasil e no mundo, sendo aplicado como foliar nas culturas de arroz, batata, café, maçã, melão, soja e uva, e atuando no controle de diversas doenças da planta, como ferrugem e cancro. Sua ação está envolvida com a inibição da enzima esterol 14-dimetilase, responsável pela produção de ergosterol, um dos principais compostos envolvido na formação da parede celular do fungo [148].

Figura 36. Estrutura química do miclobutanil.



*centro de assimetria.

Embora os enantiômeros do miclobutanil apresentem as mesmas propriedades físico-químicas, estes diferem entre si em termos de atividade, uma vez que o (+)-miclobutanil apresenta uma maior atividade fúngica contra a espécie alvo quando comparado ao outro enantiômero [149]. Essa diferença de atividade entre os enantiômeros do miclobutanil foi observada também avaliando

o efeito deste sobre as espécies *Cercospora arachidicola*, *Fulvia fulvae* e *Phytophthora infestans*, sendo que o (+)-miclobutanil foi de 1,8 a 1,9 vezes mais ativo do que o (-)-miclobutanil [150].

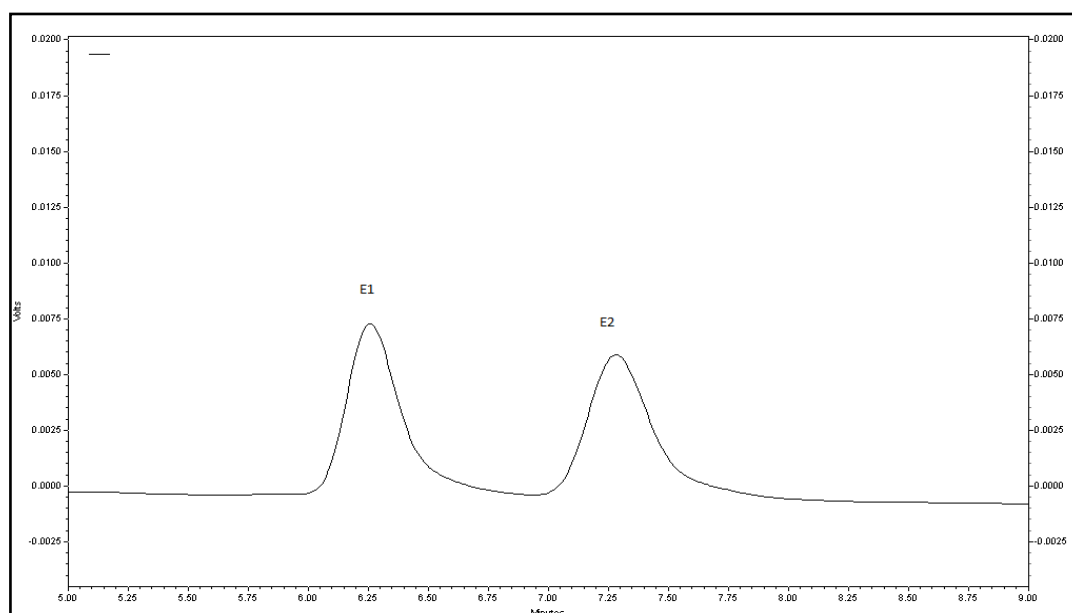
Conforme relatado anteriormente, a primeira etapa no desenvolvimento do trabalho envolveu o estabelecimento de um método enantiosseletivo de análise do miclobutanil. Diferente do fenamifós e do fipronil, ainda não há relato na literatura de metabólitos do miclobutanil. Dessa forma, o desenvolvimento do método foi voltado apenas para separação quiral do praguicida. Além disso, nesse trabalho foi empregado a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Primeiramente, as colunas foram avaliadas no modo normal, utilizando-se como fase móvel hexano: isopropanol ou hexano: etanol, na proporção 80:20 (v/v) e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Após a realização desse experimento inicial, foi observado que a coluna Chiralcel OJ apresentou uma melhor resolução entre os enantiômeros do miclobutanil, sendo então otimizadas outras condições cromatográficas, como a força cromatográfica e a vazão da fase móvel. A condição de análise que resultou na melhor resolução no modo normal é descrita na Tabela 16. O cromatograma relativo a essa separação é apresentado na Figura 37.

Tabela 16. Condição para análise enantiosseletiva do miclobutanil no modo normal.

| Parâmetro | Condição Otimizada |
|---------------------------------|--------------------|
| Coluna | Chiralcel OJ |
| Modo | Normal |
| Fase Móvel | Hexano: etanol |
| Proporção (v/v) | 82:18 |
| Vazão (mL min ⁻¹) | 0,8 |
| Resolução entre os enantiômeros | 2,4 |

Fonte: Fonseca (2018) [151].

Figura 37. Cromatograma referente a separação enantiosseletiva do miclobutanil.

Condições cromatográficas: Coluna Chiralcel OJ, fase móvel hexano:etanol (82:18 v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹, detecção em 223 nm, coluna em temperatura ambiente e volume de injeção 20 µL. E1: primeiro enantiômero a eluir. E2: segundo enantiômero a eluir. Fonte: Fonseca, F.S. (2018) [151].

Buscando-se uma condição de análise que pudesse ser mais facilmente acoplada ao sistema LC-MS/MS, foi realizada uma segunda triagem com as colunas quirais, porém no modo polar orgânico, na qual, foram avaliadas como fase móvel os solventes etanol, metanol e acetonitrila, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹. A coluna que apresentou melhor resolução entre os enantiômeros do

miclobutanil foi a Chiralpak AD-H empregando 100% de metanol como fase móvel. Posteriormente foi otimizada a vazão, visando um menor tempo de análise, porém sem prejudicar a resolução entre os picos.

A Tabela 17 apresenta as condições estabelecidas para análise enantiosseletiva do miclobutanil e a Figura 38 apresenta um cromatograma relativo a essa separação.

Tabela 17. Condições estabelecidas para análise enantiosseletiva do miclobutanil.

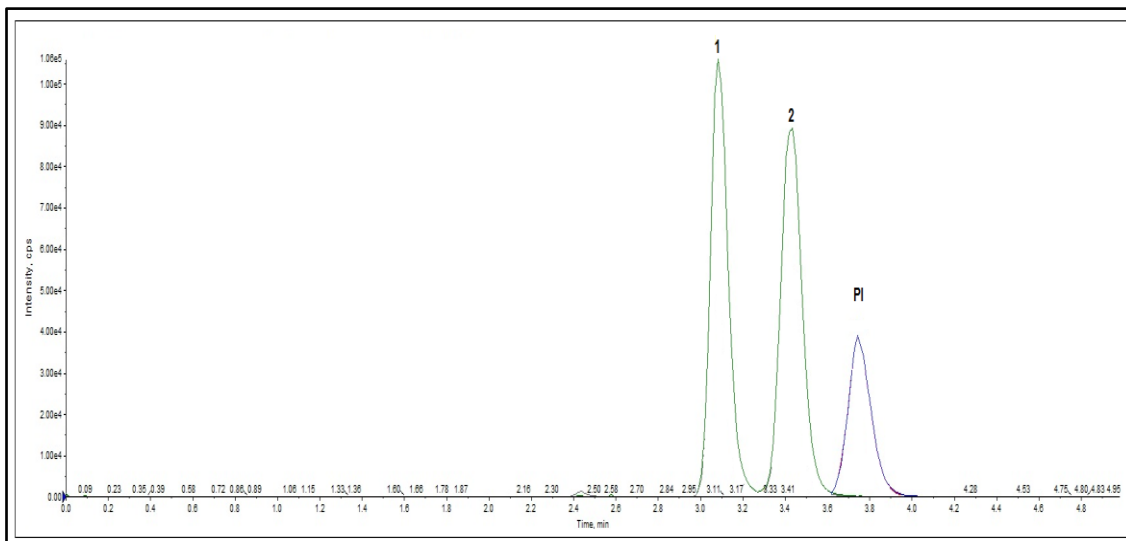
| Parâmetro | Condição Otimizada |
|----------------------------|--|
| Coluna | Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm, 5 µm) |
| Fase Móvel | Metanol + Ácido Fórmico 0,1% |
| Vazão | 0,9 mL min ⁻¹ |
| Temperatura de Análise | 35 °C |
| Volume de Injeção | 10 µL |
| Energia de Colisão | 35 eV |
| Miclobutanil (transição) | <i>m/z</i> 289 > 70 (quantificação) e <i>m/z</i> 289 > 125 (confirmação) |
| Padrão Interno (transição) | <i>m/z</i> 285 > 193 (quantificação) e <i>m/z</i> 285 > 154 (confirmação) |

Fonte: Fonseca (2018) [151].

O método desenvolvido no presente estudo apresenta vantagens quando comparada aos métodos enantiosseletivos para análise do miclobutanil descritos na literatura, uma vez que combina os ganhos da cromatografia líquida em modo polar orgânico, com resolução satisfatória, redução no tempo total de análise (4 min) e maior facilidade de evaporação do solvente utilizado (ausência de água). No trabalho de [148] foi desenvolvido um método empregando a cromatografia líquida em fase reversa, com tempo total de análise de 35 min, enquanto que no trabalho de [152], um método também foi desenvolvido empregando a

cromatografia líquida em modo fase reversa, porém com tempo total de análise de 13 min.

Figura 38. Cromatograma referente a análise enantiosseletiva do miclobutanil por LC-MS/MS no modo MRM.



(+)-miclobutanil, 2: (-)-miclobutanil e PI: diazepam. Concentração de miclobutanil: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Volume de injeção: $10 \mu\text{L}$. Fonte: Adaptado de Fonseca et al. (2019) [153], com permissão.

Após estabelecer a condição cromatográfica de análise o método foi validado e posteriormente os estudos de metabolismo e inibição enzimática in vitro assim como a correlação in vitro-in vivo foram determinadas.

O perfil cinético observado para o (+)-miclobutanil foi melhor descrito pelo modelo de Michaelis-Menten. Os valores de V_{MAX} e K_{M} foram de $66 \pm 5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $3,6 \pm 0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, quando o substrato foi o racemato e de $305 \pm 18 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $7 \pm 1 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, quando o substrato foi o (+)-miclobutanil. Após a determinação dos parâmetros enzimáticos é possível concluir que o metabolismo do miclobutanil frente as enzimas do CYP450 é enantiosseletivo, uma vez que o (-)-miclobutanil não foi metabolizado. Além disso, comparando os resultados obtidos, nota-se valores

maiores de V_{MAX} e K_M empregando o (+)-miclobutanil em relação ao emprego do racemato como substrato, possivelmente devido a uma inibição das enzimas do CYP450 causada pela presença do (-)-miclobutanil.

Após determinação dos parâmetros enzimáticos, a correlação *in vitro* *in vivo* foi realizada, conforme apresentado na Tabela 18. O clearance hepático e a taxa de extração hepática foram obtidos de acordo com as Equações 11 e 12.

Tabela 18. Predição dos parâmetros toxicocinéticos *in vivo*.

| (+)-miclobutanil | Clearance Hepático (mL min ⁻¹ kg ⁻¹) | Taxa de Extração Hepática |
|---------------------|--|---------------------------|
| Racemato | 19,99 | 0,99 |
| Enantiômero isolado | 19,99 | 0,99 |

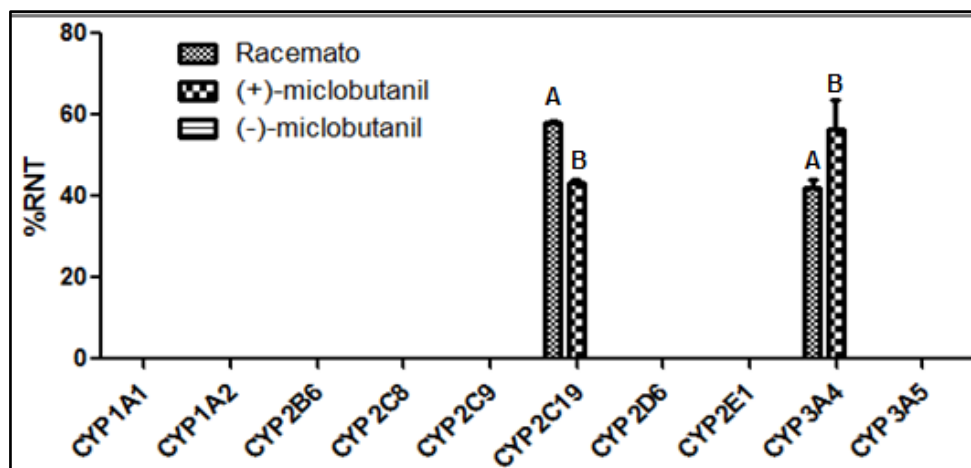
Fonte: Fonseca et al. (2019) [153], com permissão.

Os valores de clearance hepático obtidos para o (+)-miclobutanil indicam que esse agroquímico pode ser prioritariamente eliminado do corpo pelo fígado, uma vez que estes foram próximos de 20 mL min⁻¹ kg⁻¹, valor equivalente ao fluxo sanguíneo hepático. Além disso, os valores obtidos para a taxa de extração hepática, próximos de 1, indicam que o miclobutanil poderá sofrer o efeito de primeira passagem pelo fígado, portanto, caso o praguicida seja ingerido, sua concentração será diminuída significativamente antes de atingir a circulação sistêmica.

A fim de determinar quais isoformas do CYP450 atuam no metabolismo dos enantiômeros do miclobutanil, foi realizado um estudo de fenotipagem, empregando as isoformas recombinantes do CYP450 (Figura 39). As isoformas responsáveis pelo metabolismo do miclobutanil foram a CYP2C19 e a CYP3A4. Como já havia sido observado anteriormente, o (-)-miclobutanil não foi

metabolizado pelas enzimas do CYP450. Além disso, é possível observar também que quando o substrato empregado foi o racemato ocorre uma maior contribuição da CYP2C19 para o metabolismo do (+)-miclobutanil, enquanto que quando o substrato é o enantiômero isolado (+)-miclobutanil a contribuição da CYP3A4 no metabolismo desse enantiômero é maior, o que pode ser justificado por uma possível inibição desta isoforma pelo (-)-miclobutanil presente no racemato.

Figura 39. Determinação das isoformas envolvidas no metabolismo do *rac*-, (+)- e (-)-miclobutanil.



(A) (+)-miclobutanil empregando o racemato como substrato. (B) (+)-miclobutanil empregando o enantiômero isolado como substrato. Fonte: Adaptado de Fonseca et al. (2019) [153], com permissão.

A fim de finalizar os estudos com o praguicida miclobutanil, o potencial de inibição do miclobutanil sobre as enzimas do CYP450 foi avaliado através da determinação do IC_{50} , que corresponde a concentração do praguicida responsável pela inibição de 50% da atividade enzimática. As isoformas do CYP450 para as quais foi avaliado o efeito de inibição do miclobutanil foram: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A. Os estudos *in vitro* de inibição mostraram que o miclobutanil é um inibidor moderado das enzimas

CYP2D6 e CYP2C9 um inibidor forte das enzimas CYP3A e CYP2C19 (Tabela 19).

Tabela 19. Valores de IC₅₀ do miclobutanil frente as enzimas do CYP450 de humanos.

| CYP450 isoforma | IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) | | |
|--------------------|--|------------------|------------------|
| | <i>rac</i> -miclobutanil | (+)-miclobutanil | (-)-miclobutanil |
| 1A2 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 2E1 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 2D6 | > 100 | 81 ± 22 | 91 ± 38 |
| 2C9 | 36 ± 5 | 26 ± 4 | 31 ± 8 |
| 2C19 | 0,56 ± 0,03 | 0,29 ± 0,02 | 0,63 ± 0,05 |
| 3A ^a | 3,0 ± 0,5 | 1,2 ± 0,2 | 0,72 ± 0,05 |
| 3A ^b | 1,4 ± 0,4 | 0,58 ± 0,07 | 1,3 ± 0,3 |

Fonte: Adaptado de Fonseca et al. (2019), com permissão [153].

Como é possível observar pelos resultados obtidos, o miclobutanil mostrou-se como um inibidor forte para a CYP2C19 e para a CYP3A, duas isoformas bem significativas do ponto de vista de metabolização de fármacos. Assim, o uso dessas substâncias, combinado com uma exposição ao praguicida, pode resultar em interações fármaco-praguicida, aumentando a concentração dos medicamentos, que são prioritariamente metabolizados por esses grupos de enzimas, no organismo humano. Além disso, através do estudo de fenotipagem, foi possível constatar que as isoformas CYP2C19 e CYP3A4, que foram fortemente inibidas, são também as isoformas responsáveis pelo metabolismo do praguicida, o que sugere uma possível inibição competitiva. De acordo com os resultados de inibição obtidos, fármacos metabolizados pela CYP2C19 (por exemplo, citalopram, omeprazol, fenitoína) e pela CYP3A (alprazolam, amlodipina, clonazepam) [154] podem ter sua farmacocinética alterada pela presença do miclobutanil e causar possíveis efeitos tóxicos.

O estudo do miclobutanil ilustrou a importância dos estudos enantiosseletivos de metabolismo pois o enantiômero (–)-miclobutanil não foi metabolizado pelas enzimas do CYP450 de humanos. Portanto esse enantiômero poderá acumular no organismo e causar possíveis efeitos tóxicos, caso o indivíduo seja exposto ao miclobutanil. Este trabalho descreveu pela primeira vez o estudo enantiossetivo acerca do metabolismo e inibição enzimática in vitro do miclobutanil e os dados podem ser encontrados no periódico *Food and Chemical Toxicology* [153] (<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.009>).

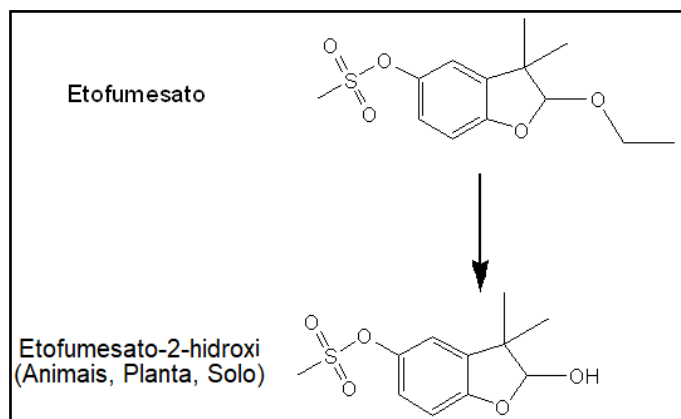
3.3.4. Estudos In Vitro de Metabolismo do Etofumesato

O etofumesato (ETO) é um praguicida quiral comercializado na forma de racemato. O ETO é um praguicida da classe dos benzofuranil alcano sulfonatos e é empregado no uso pré e pós emergencial de gramíneas e ervas daninhas de folha larga em plantações de beterraba, beterraba sacarina e gramas de pastagem [155]. Seu modo de ação está relacionado com a inibição do crescimento de meristemas, retardo da divisão celular e limitação da formação de cutícula em brotos de gramíneas e plantas dicotiledônias [155]. A principal rota metabólica do ETO em plantas, animais e no solo estão apresentadas na Figura 40.

O comportamento enantiosseletivo do ETO em diferentes organismos tem sido alvo de alguns estudos. O estudo de enantiosseletivo de toxicidade e bioacumulação de etofumesato na espécie *Eisenia fetida* determinou que a dose letal (DL₅₀) após 48 h de exposição para o (–)-etofumesato foi de 7,98 µg cm⁻² enquanto que para o (+)-etofumesato foi de 4,51 µg cm⁻² e para o racemato de

etofumesato (*rac*-ETO) foi de $5,93 \mu\text{g cm}^{-2}$ [156].

Figura 40. Rota metabólica de ETO em plantas, animais e solo.

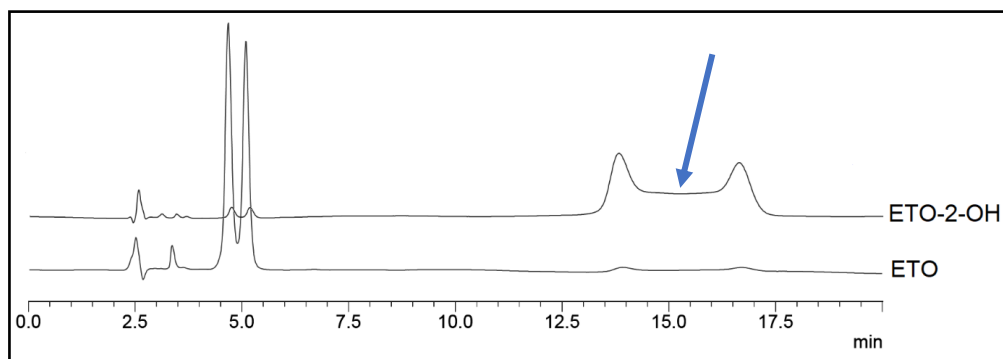


Inicialmente, procurou-se desenvolver um método cromatográfico quiral capaz de resolver as misturas racêmicas do etofumesato (ETO) e seu principal metabólito, etofumesato-2-hidroxi (ETO-2-OH) e que este fosse seletivo para a realização dos estudos enantiosseletivos de metabolismo *in vitro*. Durante a avaliação das colunas quirais a única condição na qual a resolução quiral simultânea dos analitos foi possível foi utilizando a coluna Chiralpak AD-H (tris 3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose; 150 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel composta de hexano: etanol (85:15, v/v) + 0,01% de ácido trifluoroacético, vazão de 1,0 mL min^{-1} e temperatura da coluna em 22 °C. A Figura 41 apresenta um cromatograma representativo da análise do ETO e do ETO-2-OH empregando a condição analítica descrita acima.

Nessas condições, a resolução entre os picos de ETO foi de 1,4 o que mostrou que uma pequena otimização das condições cromatográficas seria necessária para atingir um valor de resolução de linha de base (1,5), mais adequado para análises quantitativas [157]. O mais crítico é o perfil cromatográfico para a resolução dos enantiômeros do ETO-2-OH. Embora uma

resolução entre os enantiômeros é observada, nota-se um platô entre os picos. Esse perfil cromatográfico em um método quiral é decorrente da enantiomerização do analito na coluna durante a corrida cromatográfica [158].

Figura 41. Resolução cromatográfica quiral do ETO e do ETO-2-OH.



Concentração dos analitos: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fonte: Adaptado de Perovani, de Oliveira (2018) [5], com permissão.

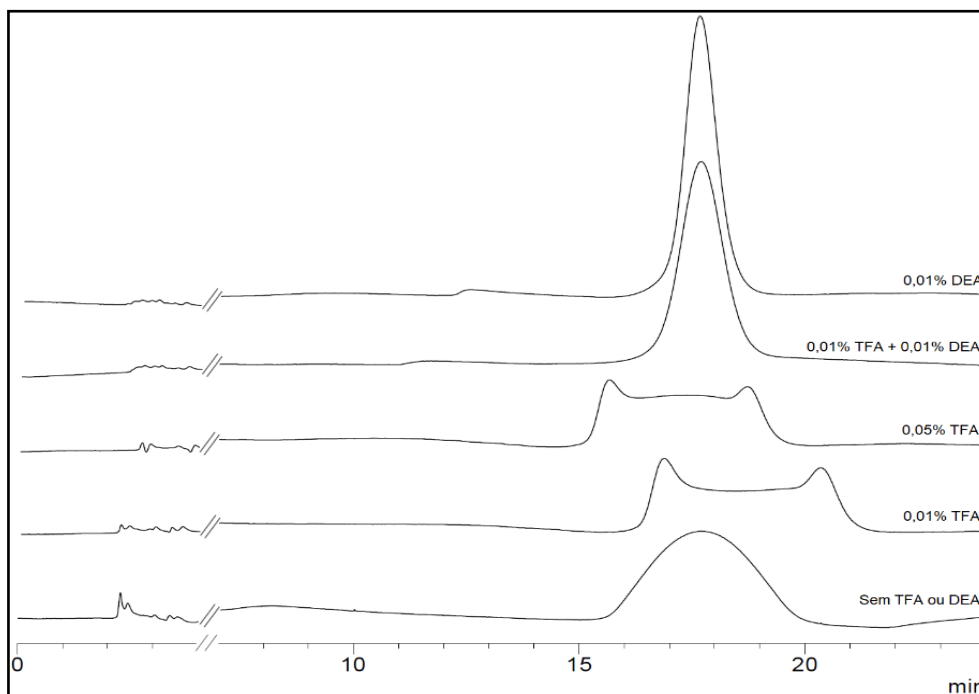
A enantiomerização do ETO-2-OH durante a separação cromatográfica representou um indício de sua estereolabilidade nas condições de análise. Dessa forma, um estudo mais detalhado empregando CLDAE foi realizado a fim de avaliar a estabilidade quiral dos enantiômeros do ETO-2-OH.

A avaliação da estereolabilidade do ETO-2-OH por CLDAE foi realizada sob diferentes condições de acidez e basicidade da fase móvel e a constante de enantiomerização aparente aproximada (k_1^{approx}) foi determinada de acordo Trapp, Schoetz e Schurig (2001) [158].

Inicialmente o efeito da acidez e da basicidade da fase móvel foi avaliado adicionando TFA e DEA à fase móvel. As seguintes condições foram avaliadas: (i) TFA 0,01 e 0,05% v/v, (ii) TFA e DEA ambos na concentração de 0,01% v/v, (iii) DEA 0,01% v/v e (iv) ausência de TFA e DEA na fase móvel. O efeito da temperatura da coluna cromatográfica também foi avaliado sendo avaliadas

duas temperaturas, 6 e 20 °C. A Figura 42 e Figura 43 mostram os resultados para a avaliação do efeito da acidez e basicidade da fase móvel e temperatura sob a enantiomerização.

Figura 42. Efeito da acidez e basicidade da fase móvel na enantiomerização do ETO-2-OH.

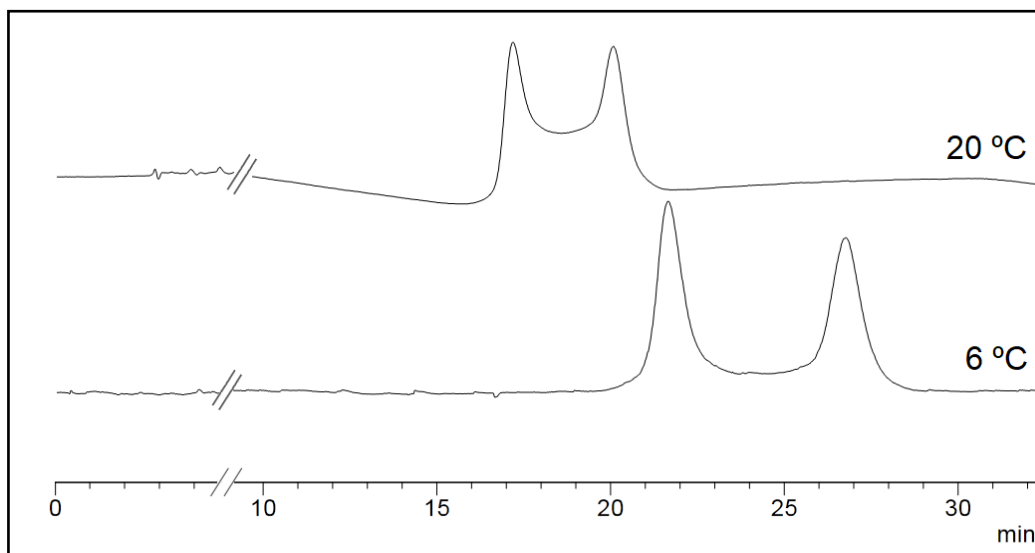


Condições de análise: As análises foram realizadas na coluna Chiralpak AD-H, vazão de fase móvel $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna $22 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção em 230 nm e fase móvel hexano: etanol (87:13, v/v). TFA: Ácido trifluoroacético. DEA: Dietilamina. Fonte: Adaptado de Perovani, de Oliveira (2018) [5], com permissão.

Conforme pode ser observado, é possível notar significativa alteração do perfil cromatográfico dependendo da acidez ou basicidade da fase móvel e da temperatura da coluna cromatográfica. A alteração observada é indicativa de processos cinéticos ocorrendo concomitante à separação. A total coalescência dos picos dos enantiômeros conforme se adiciona DEA indica que a interconversão entre os enantiômeros é mais rápida que a separação cromatográfica. A presença de platô ou alargamento dos picos cromatográficos

conforme se diminui a temperatura e as concentrações de TFA e DEA é indicativo de diminuição na rapidez da interconversão [158]. o etofumesato-2-hidroxi é um hemiacetal; essa classe de compostos possui tendência à racemização através da abertura reversível do anel do hemiacetalico.

Figura 43. Efeito da temperatura sobre a enantiomerização de ETO-2-OH.



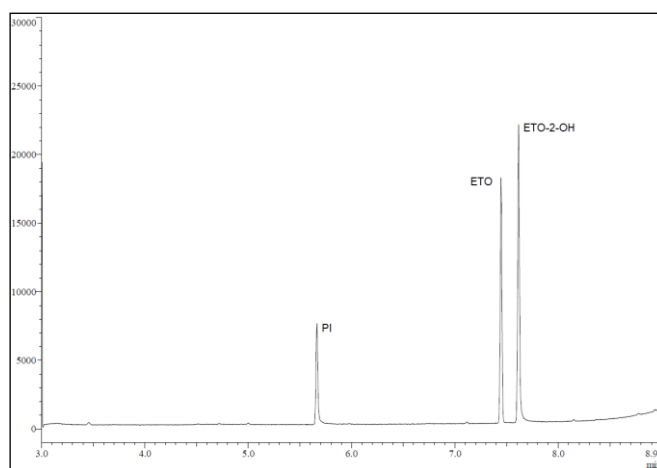
Condições de análise: Coluna: Chiralpak-AD-RH (150 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel 0,01% v/v de TFA em hexano:etanol (87:13, v/v) e vazão de fase móvel 0,8 mL min⁻¹. TFA: Ácido Trifluoroacético. Fonte: Adaptado de Perovani, de Oliveira (2018) [5], com permissão.

Os valores para entalpia e entropia de ativação da enantiomerização foram, respectivamente, 49 ± 1 kJ mol⁻¹ e -133 ± 4 J K⁻¹ mol⁻¹. Os resultados acerca da enantiomerização do ETO-2-OH podem ser encontrados no *Separation Science Plus* [5] (<https://doi.org/10.1002/sscp.201800112>). Dessa forma, monitorar a formação de cada enantiômero do ETO-2-OH seria inviável já que sua baixa barreira de enantiomerização é evidência de que extensiva racemização iria ocorrer durante o estudo de metabolismo in vitro. Assim, a observação do perfil cromatográfico (formação do platô entre os picos dos enantiômeros) durante a separação quiral do ETO-2-OH foi fundamental para

iniciar os estudos de enantiomerização e propor mudanças na forma da avaliação do metabolismo enantiosseletivo dessa molécula. A rápida percepção desse fenômeno proporcionou tomadas de decisões mais rápidas que não compromettesse o desenvolvimento do projeto. Por isso, a avaliação do metabolismo enantiosseletivo foi realizada incubando separadamente a mistura racêmica e cada enantiômero de ETO e monitoramento da formação do ETO-2-OH como racemato. Para isso, optou-se por desenvolver um método aquiral para análise de ETO e ETO-2-OH por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

A análise por GC-MS foi realizada em uma coluna capilar com fase estacionária composta por dimetil polissiloxano e hélio como gás de arraste. A Figura 44 apresenta um cromatograma representativo da análise dos analitos por GC-MS.

Figura 44. Cromatograma representativo para análise do ETO e ETO-2-OH por GC-MS.



Condições de análise: Coluna Phenomenex ZB1-MS® (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm), gás de arraste hélio, gradiente de temperatura, vazão total de gás de arraste 11,5 mL min⁻¹, velocidade do gás de arraste: 44,7 cm s⁻¹; razão de split 1:5, volume de injeção de 0,5 µL, ionização por elétrons (70 eV). Temperatura do injetor, fonte de íons e interface: 250 °C. Concentração dos analitos: 10 µg mL⁻¹. Fonte: Perovani, I. S. (2019) [159].

Posteriormente, anterior aos estudos de metabolismo *in vitro*, o método foi validado para análise do ETO e ETO-2-OH em meio microssomal. Os resultados demonstram que todos os parâmetros avaliados corroboram com as exigências do guia para validação de métodos bioanalíticos da Agência Europeia de Medicamentos [121].

Em seguida, o metabolismo da mistura racêmica e dos enantiômeros isolados de ETO pelas enzimas CYP450 foi realizado e os parâmetros cinéticos determinados (Tabela 20). O perfil cinético da curva enzimática para o *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO apresentou um perfil cinético atípico, onde a saturação da velocidade inicial nas concentrações mais elevadas de substrato não é observada.

Tabela 20. Parâmetros cinéticos para o metabolismo do etofumesato pelas enzimas CYP450.

| Analito | K_{M1} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | V_{MAX1} (nmol mg^{-1} min^{-1}) | CL_1 (mL min^{-1} mg^{-1}) | CL_2 (mL min^{-1} mg^{-1}) | CL_{int} (mL min^{-1} mg^{-1}) |
|-----------------|--|--|--|--|--|
| <i>rac</i> -ETO | 15 ± 1 | 1,59 ± 0,04 | 0,102 ± 0,007 | 0,0052 ± 0,0007 | 0,107 ± 0,007 |
| (+)-ETO | 5,8 ± 0,6 | 0,54 ± 0,02 | 0,10 ± 0,01 | 0,0017 ± 0,0004 | 0,10 ± 0,01 |
| (-)-ETO | 5,6 ± 0,5 | 0,53 ± 0,01 | 0,094 ± 0,008 | 0,0050 ± 0,0004 | 0,10 ± 0,01 |

K_{M1} : Constante de Michaelis-Menten da primeira componente. V_{MAX1} : Velocidade máxima da primeira componente. CL_1 : Depuração da primeira componente. CL_2 : Depuração da segunda componente. CL_{INT} : Depuração intrínseca $CL_{INT} = CL_1 + CL_2$. Fonte: adaptado de Perovani et al. (2020) [160], com permissão.

O elevado valor de K_M da segunda componente, aliado a limitações como o limite de solubilidade do substrato no meio de incubação faz com que apenas a porção inicial da segunda componente fique caracterizada; o que é experimentalmente traduzido como um aumento linear da velocidade inicial na

parte referente a segunda componente. Esse perfil cinético indica que *rac*-ETO e seus enantiômeros podem ser metabolizados por duas enzimas diferentes com valores de K_M e V_{MAX} diferentes ou uma enzima que os metaboliza pode apresentar múltiplos sítios ativos com diferentes valores de K_M e V_{MAX} . Com os valores de depuração de ambas as componentes, a depuração intrínseca in vitro total (CL_{int}) para *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO foi determinada pela soma de CL_1 e CL_2 . Comparando os valores de CL in vitro entre a primeira e a segunda componente para *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO, pode-se concluir que a depuração de ETO e seus enantiômeros in vitro é realizada principalmente pela primeira componente. Comparando os valores obtidos de CL_1 para *rac*-ETO e os enantiômeros isolados não se observa uma diferença significativa. Por outro lado, ao fazer a mesma comparação com a segunda componente, claramente se nota que CL_2 para (+)-ETO é inferior que CL_2 de *rac*-ETO e (-)-ETO, o que conduz a conclusão de que o metabolismo das CYP450 in vitro da segunda componente é enantiosseletivo. Como a primeira componente contribui majoritariamente para o CL total e não há significativa diferença enantiosseletiva entre *rac*-ETO e seus enantiômeros, o CL total in vitro também não é enantiosseletivo. Ao comparar os valores K_{M1} entre a mistura racêmica e os enantiômeros isolados, observa-se que há diferença entre eles. Para a mistura racêmica o valor de K_{M1} é maior que para os enantiômeros isolados o que pode indicar um efeito de inibição por parte de um dos enantiômeros no metabolismo do outro.

A correlação in vitro-in vivo oferece um cenário mais claro, permitindo uma estimativa da capacidade de depuração pelo fígado (CL_H). Os valores estimados de taxa de extração hepática (E%) mostram que tanto para a mistura racêmica

quanto os enantiômeros do ETO, metade da quantidade que chega ao fígado é metabolizada, o que indica que o ETO pode sofrer extensivo metabolismo de primeira passagem. De acordo com os resultados (Tabela 21) não foi observada diferença entre cada enantiômero após metabolismo hepático, o que representa evidência que pode não haver acúmulo de um enantiômero em relação ao outro.

Tabela 21. Resultados da correlação in vitro-in vivo para o *rac*-ETO, (+)-ETO E (-)-ETO.

| Analito | CL _H (mL min ⁻¹ kg ⁻¹) | E (%) |
|-----------------|--|-------|
| <i>rac</i> -ETO | 10 | 52 |
| (+)-ETO | 9,8 | 49 |
| (-)-ETO | 10 | 52 |

CL_H: Clearance hepático obtido por extrapolação; E: taxa de extração hepática obtida por extrapolação. Fonte: adaptado de Perovani et al. (2020) [160], com permissão.

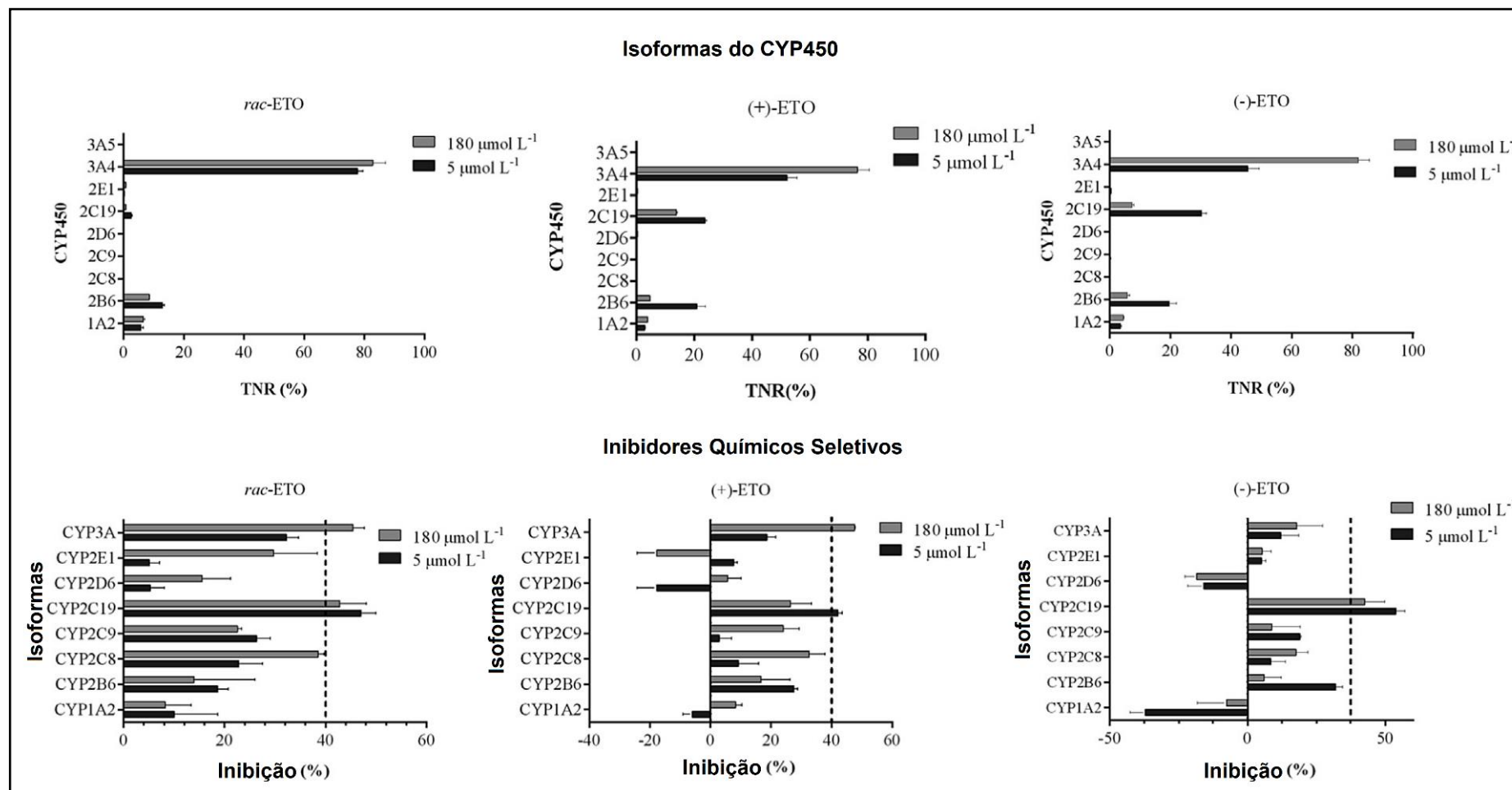
Para xenobióticos cuja taxa de extração hepática é moderada, como é o caso para *rac*-ETO e seus enantiômeros, alterações no fígado referente ao fluxo sanguíneo hepático (Q_H) e capacidade de metabolismo hepático (CL_H) influenciam diretamente a biodisponibilidade do xenobiótico [161]. Nesse sentido, alterações no Q_H e na concentração de proteínas plasmáticas decorrente de alguma enfermidade podem levar a alteração na fração biodisponível de *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO.

A próxima etapa foi determinar as isoformas do CYP450 envolvidas no metabolismo do etofumesato empregando também dois métodos diferentes, conforme relatado anteriormente para o fenamifós e fipronil. Como a cinética de metabolismo de *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO apresenta duas componentes, o estudo de fenotipagem foi conduzido em duas concentrações, uma concentração baixa próxima ao valor de K_M da primeira componente (C_{BAIXA} = 5 μmol L⁻¹) e outra concentração alta, na maior concentração de substrato utilizada no estudo

de cinética enzimática, referente a segunda componente ($C_{ALTA} = 180 \mu\text{mol L}^{-1}$). Iniciou-se o estudo com as rCYPs com intuito de avaliar as isoformas de CYP450 que tem o potencial de metabolizar *rac*-ETO e seus enantiômeros. Os resultados estão apresentados na Figura 45. De acordo com os resultados obtidos utilizando as isoformas recombinantes, as isoformas CYP1A2, 2B6, 2C19 e 3A4 apresentam potencial de metabolizar *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO. Já os resultados relativos ao uso de inibidores químicos seletivos indicaram que as principais isoformas envolvidas no metabolismo de *rac*-ETO e seus enantiômeros em microsomas hepáticos de humanos são CYP2C19 e CYP3A. Outras isoformas também apresentaram certa extensão de inibição como a CYP2B6 e CYP2C8.

Ao integrar os resultados obtidos em ambos os métodos de fenotipagem, a conclusão é que as principais isoformas responsáveis pelo metabolismo de *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO são CYP2C19 e CYP3A4, o que é coerente com o perfil cinético bifásico obtido na cinética de metabolismo para o praguicida e seus enantiômeros. Embora a CYP2B6 e CYP1A2 tenham potencial de metabolismo, conforme indicado pelo ensaio utilizando rCYPs, quando todas as isoformas estão em conjunto, como é o caso dos microsomas, CYP2B6 e CYP1A2 apresentam um papel minoritário no metabolismo.

Figura 45. Fenotipagem do *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO utilizando isoformas recombinantes do CYP450 e inibidores químicos seletivos.



Fonte: Perovani et al. (2020) [160], com permissão.

Outra informação que consegue se obter é que a isoforma responsável pela primeira componente do metabolismo de *rac*-ETO, (+)-ETO e (-)-ETO é CYP2C19 enquanto a isoforma responsável pela segunda componente de *rac*-ETO e (+)-ETO é a CYP3A4. Avaliando o enantiômero (-)-ETO, o metabolismo da segunda componente também é mediado por CYP2C19. Essa diferença também é observada ao comparar os valores de CL_2 para ambos os enantiômeros. O valor de CL_2 para (-)-ETO é, aproximadamente, 3 vezes maior que para (+)-ETO, o que indica que outra isoforma com menor capacidade de depleção do (+)-ETO é responsável pelo seu metabolismo.

Substratos da isoforma CYP2C19 geralmente compreendem moléculas neutras, como ETO, ou amidas com possibilidade de aceitar ligações de hidrogênio [154]. Alguns fármacos comumente utilizados e que são inibidores dessa isoforma são fluoxetina, clopidogrel e omeprazol [154]. Dessa forma, se indivíduos que fazem o uso desses fármacos forem expostos ao etofumesato, o metabolismo do praguicida e seus enantiômeros via CYP2C19 pode ser prejudicado. A implicação que isso causa é aumento da fração biodisponível do praguicida, e um possível efeito tóxico, uma vez que a isoforma em questão é responsável pela principal componente cinética responsável pela depleção de ETO em microsomas hepáticos de humanos.

No que se refere a análise dos enantiômeros isolados, o metabolismo do (+)-ETO é mediada por duas isoformas do CYP450 (CYP2C19 e CYP3A4) enquanto que o (-)-ETO é metabolizado apenas pela CYP2C19. Nesse sentido, a presença dos inibidores da CYP2C19 pode levar ao acúmulo enantiosseletivo de (-)-ETO uma vez que a eliminação de (+)-ETO é mediada por mais de uma isoforma em microsomas hepáticos de humanos, CYP2C19 e CYP3A4.

A CYP3A4 é uma isoforma importante no metabolismo de fármacos sendo responsável pelo metabolismo de mais da metade dos fármacos comumente utilizados [154]. Embora o metabolismo de *rac*-ETO e (+)-ETO por essa isoforma seja pouco extensivo, assim como discutido para a CYP2C19, a inibição da CYP3A4 pode levar a um acúmulo do praguicida no organismo e possíveis efeitos tóxicos. Fármacos comumente utilizados na clínica, como claritromicina, nicardipina e cetoconazol são inibidores da CYP3A4 [154]. Dessa forma, em humanos, o acúmulo de (-)-ETO devido a inibição da única isoforma responsável pela sua depuração pode amplificar significativamente a toxicidade do praguicida em virtude do aumento de sua fração biodisponível. Os resultados acerca do metabolismo in vitro do etofumesato podem ser encontrados no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [160] (<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113349>).

3.3.5. Conclusões e Avaliação Crítica Quanto os Estudos de Metabolismo e Inibição Enzimática In Vitro Envolvendo os Praguicidas Quirais Avaliados

O desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para posterior estudos de metabolismo e inibição enzimática in vitro mostraram-se muito importantes no desenvolvimento desses trabalhos. A validação dos métodos anterior aos estudos de metabolismo foi fundamental pois, dessa forma, foi possível obter com confiabilidade os dados da cinética enzimática (K_M , V_{MAX}) os quais foram importantes nos estudos de fenotipagem e correlação in vitro-in vivo. Os estudos de fenotipagem devem ser realizados ao redor dos valores de K_M obtidos e a predição dos parâmetros in vivo é realizada empregando os valores de clearance intrínseco obtidos, os quais são dados em função do V_{MAX} e K_M .

Portanto, a determinação correta desses parâmetros é fundamental no sentido de evitar erros nesses estudos. Portanto, o desenvolvimento correto do método analítico é fundamental para condução desses estudos.

O estudo enantiosseletivo do praguicida etofumesato mostrou que durante o desenvolvimento de um método cromatográfico enantiosseletivo, a inspeção visual do cromatograma e a avaliação do perfil do pico foram decisivos para a suspeita da estereolabilidade do metabólito ETO-2-OH. Esse fato, implicou diretamente no delineamento posterior dos estudos de metabolismo *in vitro*, mostrando a inviabilidade do monitoramento enantiosseletivo na formação do metabólito ETO-2-OH. Ainda assim, o estudo enantiosseletivo foi possível, contudo, avaliando a formação da mistura racêmica do metabólito ETO-2-OH após metabolismo da mistura racêmica e dos enantiômeros isolados do praguicida etofumesato.

Os resultados apresentados nesse texto mostraram que os praguicidas em estudo são capazes de inibir as principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos, sendo que em alguns casos, os valores de inibição apresentados (expressos como IC_{50}) foram inferiores a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que é muito relevante e preocupante, já que substratos que apresentam valores de IC_{50} inferiores a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ são considerados inibidores fortes [162]. Esses dados mostram que a presença desses praguicidas no organismo humano (seja através de ingestão de água ou alimentos contaminados ou através da exposição ocupacional) pode levar a interações medicamentosas, pois esses praguicidas podem inibir o metabolismo de fármacos que o indivíduo esteja fazendo uso. Além disso, os estudos de fenotipagem mostraram que enzimas importantes, como a CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19, estão envolvidas no metabolismo desses

praguicidas, o que pode também resultar em interação medicamentosa, principalmente se o indivíduo exposto faz o uso de algum medicamento que pode inibir essas isoformas. Isso poderá levar a um acúmulo do praguicida no organismo e conseqüentemente, possíveis efeitos tóxicos. Essa afirmação é corroborada quando a correlação *in vitro-in vivo* é realizada sendo possível observar que o fígado parece ser o principal órgão responsável pelo metabolismo desses praguicidas. Portanto, os estudos de inibição enzimática e fenotipagem são muito importantes na prevenção de interações fármaco-praguicidas, pois no primeiro caso, o estudo mostra o potencial de inibição do praguicida sobre as enzimas do CYP450 (podendo levar a um aumento na concentração plasmática do fármaco em uso concomitante) e no segundo quais enzimas estão envolvidas na eliminação do praguicida do organismo, sendo que, em caso de uso concomitante com fármacos que possam inibir tal enzima poderá ocorrer um aumento na concentração do praguicida no organismo e possíveis efeitos tóxicos. Em relação a enantiosseletividade no processo, o praguicida de maior destaque foi o miclobutanil, sendo que para esse substrato, somente o enantiômero (+) foi metabolizado pelas enzimas do CYP450 de humanos. Dessa forma, o enantiômero (-) poderá ser acumulado no organismo e causar efeitos tóxicos (considerando a eliminação hepática como única forma de excreção desse praguicida). Em relação os estudos de inibição enzimática, na maioria dos casos não foi observado enantiosseletividade para os praguicidas avaliados. Apesar dos valores de IC_{50} serem diferentes entre os enantiômeros e a mistura racêmica, não foi observado diferenças significativas no sentido de que um enantiômero é um inibidor forte e outro um inibidor moderado ou fraco. A única exceção é a inibição da CYP1A2 pelo fenamifós sendo que o *rac*-FS e o (-)-FS

mostraram inibidores fortes; por outro lado, o (+)-FS apresentou uma inibição moderada da CYP1A2.

Considerando todo o estudo desenvolvido considero muito satisfatórios e relevantes os resultados obtidos pois dados acerca de interações entre praguicidas e fármacos são muito escassos na literatura, principalmente, usando modelos humanos, como realizado nesses trabalhos. Dessa forma, acredito que estamos contribuindo com a sociedade no sentido de apresentar mais informações quanto a segurança de agroquímicos o que é muito importante para nós, pois o Brasil é o quinto país com maior consumo de praguicidas do mundo, com um consumo de 76 milhões de Kg por ano [103].

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

As técnicas cromatográficas e eletroforéticas vem se mostrando extremamente eficientes e adequadas para análise enantiosseletiva de fármacos, praguicidas e seus respectivos metabólitos. Essas técnicas se complementam sendo que cada uma apresenta vantagens e limitações.

As técnicas cromatográficas, representada aqui pela cromatografia líquida de alta eficiência, apresenta como principal vantagem a grande versatilidade, pois a análise de compostos com diferentes polaridades pode ser facilmente realizada simplesmente pela mudança da fase móvel. Além disso, quando empregada junto a espectrometria de massas apresenta elevada sensibilidade e seletividade o que muito desejável nos estudos de metabolismo e inibição enzimática *in vitro*. Contudo, a grande limitação dessa técnica é o elevado custo do equipamento quando associado ao espectrômetro de massas. No desenvolvimento de nossos métodos, o equipamento é muito utilizado, inviabilizando, muitas vezes, o uso de equipamentos presentes em centrais analíticas. Portanto, conseguir ter um LC-MS/MS é sonho de qualquer pesquisador que trabalha na nossa área. Na análise enantiosseletiva empregando a CLAE é empregado colunas contendo fases estacionárias quirais, as quais apresentam um elevado custo, o que também onera muito o custo final da análise. No geral o desenvolvimento de métodos por CLAE é mais simples quando comparada a eletroforese capilar.

A eletroforese capilar mostrou-se ser uma técnica importante na separação dos enantiômeros. Apesar da otimização do método ser um pouco

mais complicada, as variáveis possíveis de mudanças fazem com que o sucesso na separação dos enantiômeros seja mais provável. Os diversos seletores quirais existentes, principalmente as ciclodextrinas, vem se mostrando muito eficientes na separação dos enantiômeros. Em geral as análises apresentam um baixo custo, pois os capilares e os eletrólitos empregados, em geral, apresentam um baixo relativamente pequeno. A principal limitação da eletroforese capilar reside na obtenção de baixos valores de limite de quantificação/detecção. Mesmo com o uso de técnicas de pré concentração *online*, atingir baixos limites de quantificação e detecção é uma tarefa bem árdua (considerando um detector UV-Vis, pois é o mais utilizado). Além disso, a separação quiral de moléculas pouco polares também é difícil já que a presença de tensoativos ou solventes interferem na separação quiral dos analitos.

Nesses anos de trabalho, nosso grupo trabalhou com diversas técnicas de preparo de amostras, principalmente as técnicas miniaturizadas SPME, HF-LPME e DLLME e a extração líquido-líquido. Sem dúvida alguma, a DLLME é a técnica mais simples e de fácil execução. O procedimento é rápido, não há necessidade de fibras (SPME ou HF-LPME), usa equipamentos simples e presentes em muitos laboratórios de química (centrífuga, tubos de ensaio) e apresenta uma boa eficiência de extração. A maior limitação dessa técnica é que ainda gera uma quantidade de resíduo químico, que muitas vezes, não é pequena, dependendo do volume da amostra. Algumas limitações relacionadas, principalmente, ao início do desenvolvimento da técnica foram resolvidas, como por exemplo, a necessidade do uso de solventes clorados e a extração de moléculas polares foram solucionadas com o emprego de solventes menos densos que a água e o uso de reagente par-iônico.

Em relação aos estudos de biotransformação por fungos, apesar do sucesso dessa linha de pesquisa, com o passar dos anos, o número de projetos relacionados a essa temática foi diminuindo. O principal objetivo do nosso grupo, nessa linha de pesquisa, é desenvolver métodos enantiosseletivos de análise e avaliar a capacidade de fungos em realizar a biotransformação. Inicialmente avaliamos somente se o processo de biotransformação ocorreu e depois se ele foi enantiosseletivo o suficiente para propor uma nova forma de obtenção de fármacos enantiomericamente puros. Isso poderia nos permitir a solicitação de uma nova patente de processo e dar um pouco mais de sentido a essa linha de pesquisa. Entre os substratos discutidos, somente a paliperidona foi formada com uma razão enantiomérica de 100%. Isso não significa que os outros metabólitos não poderiam ser obtidos com essa razão enantiomérica, mas sim que poderíamos trabalhar em mudanças nas condições de incubação na tentativa de se obter uma maior enantiosseletividade no processo. Contudo, avaliar mudanças nas condições de incubação dos fungos levaria a um maior tempo para o desenvolvimento do projeto além de “fugir” da nossa área de atuação. Outro ponto também que começamos a nos questionar foi sobre o rendimento da reação pois apesar de termos em alguns casos de alta enantiosseletividade no processo, o rendimento era muito baixo, inviabilizando uma futura ampliação da escala. Entre todos os substratos que avaliamos, o rendimento maior foi obtido na biotransformação do ABZ pelo fungo *Mucor rouxii*. Eu ainda acredito muito no processo de biotransformação mediada por fungos e futuramente pretendo desenvolver mais trabalhos nessa temática. Acredito que um foco muito interessante é a procura por metabólitos de fármacos, praguicidas, produtos naturais entre outros e posterior ampliação de escala. Diversos estudos

farmacológicos e toxicológicos necessitam de metabólitos para avaliação da segurança de um determinado substrato. Contudo metabólitos são extremamente caros e muitas vezes difícil de serem adquiridos. Baseado no exposto, acredito que a produção desses analitos via catálise por fungos pode baratear o processo facilitando o acesso a mais pesquisadores.

Baseado no que foi exposto no parágrafo anterior, o foco de trabalho hoje do nosso grupo de pesquisa reside nos estudos *in vitro* de metabolismo e inibição enzimática dos praguicidas quirais. Essa linha possibilita o emprego da química analítica em sua essência, desde o desenvolvimento da separação cromatográfica até a validação do método. Além disso, os resultados obtidos de cinética enzimática possibilitam a realização da correlação *in vitro-in vivo* e predição de parâmetros toxicocinéticos. A importância na realização desses estudos de metabolismo com praguicidas quirais vem aumentando muito e nosso artigo de revisão publicado no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [163] foi citado em uma publicação da *European Food Safety Authority* [164]. Aliado a esses estudos, os estudos de inibição vêm se mostrando muito importantes já que o consumo de praguicidas, no Brasil e no mundo, vem aumentando, assim como o consumo de fármacos. Portanto, avaliar se há interação entre eles mostra-se muito importante do ponto de vista toxicológico. Nosso grupo foi pioneiro nesses estudos e a comunidade científica vem apresentando uma boa aceitação dos nossos trabalhos (com base nos pareceres dos artigos publicados). Portanto, considerando que essa linha de pesquisa é relativamente recente no grupo e diante das várias possibilidades ainda para ser exploradas, como por exemplo, o desenvolvimento de métodos enantiosseletivos por eletroforese capilar em meio não aquoso para análise de

praguicidas mais hidrofóbicos, pretendo continuar com esses estudos acerca de metabolismo in vitro com os praguicidas quirais.

REFERÊNCIAS

- [1] A.R.M. de Oliveira, P. da Fonseca, C. Curti, R.S. da Silva, P.S. Bonato, In vitro metabolism study of a new nitrosyl ruthenium complex [Ru(NH·NHq)(terpy)NO]³⁺ nitric oxide donor using rat microsomes, *Nitric Oxide*. 21 (2009) 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.003>.
- [2] A.R.M. de Oliveira, F.J.M. de Santana, P.S. Bonato, Stereoselective determination of the major ibuprofen metabolites in human urine by off-line coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*. 538 (2005) 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.01.058>.
- [3] D.B. Carrão, K.B. Borges, T. Barth, M.T. Pupo, P.S. Bonato, A.R.M. de Oliveira, Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus, *Electrophoresis*. 32 (2011) 2746–2756. <https://doi.org/10.1002/elps.201000658>.
- [4] N.C.P. de Albuquerque, J.V. de Matos, A.R.M. de Oliveira, In-line coupling of an achiral-chiral column to investigate the enantioselective in vitro metabolism of the pesticide Fenamiphos by human liver microsomes, *J. Chromatogr. A*. 1467 (2016) 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.039>.
- [5] I.S. Perovani, A.R.M. de Oliveira, Determination of Ethofumesate-2-hydroxy Stereolability by Dynamic HPLC, *Sep. Sci. Plus*. 1 (2018) 771–775. <https://doi.org/10.1002/sscp.201800112>.

- [6] G.K.E. Scriba, Chiral recognition in separation science – an update, *J. Chromatogr. A.* 1467 (2016) 56–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.061>.
- [7] D.B. Carrão, I.S. Perovani, N.C.P. de Albuquerque, A.R.M. de Oliveira, Enantioseparation of pesticides: A critical review, *TrAC Trends Anal. Chem.* 122 (2020) 115719. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115719>.
- [8] A. Rocco, Z. Aturki, S. Fanali, Chiral separations in food analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 52 (2013) 206–225. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.022>.
- [9] V. Pérez-Fernández, M.Á. García, M.L. Marina, Chiral separation of agricultural fungicides, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6561–6582. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.084>.
- [10] B. Chankvetadze, Recent trends in preparation, investigation and application of polysaccharide-based chiral stationary phases for separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 122 (2020) 115709. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115709>.
- [11] A.A. Younes, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, Chiral separations in reversed-phase liquid chromatography: Evaluation of several polysaccharide-based chiral stationary phases for a separation strategy update, *J. Chromatogr. A.* 1269 (2012) 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.070>.
- [12] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.-R. Chen, Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1473–1484.

- <https://doi.org/10.1021/ac00081a019>.
- [13] A. Cavazzini, G. Nadalini, F. Dondi, F. Gasparrini, A. Ciogli, C. Villani, Study of mechanisms of chiral discrimination of amino acids and their derivatives on a teicoplanin-based chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A.* 1031 (2004) 143–158. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.090>.
- [14] D.W. Armstrong, W. DeMond, Cyclodextrin Bonded Phases For the Liquid Chromatographic Separation of Optical, Geometrical, and Structural Isomers, *J. Chromatogr. Sci.* 22 (1984) 411–415. <https://doi.org/10.1093/chromsci/22.9.411>.
- [15] C. Fernandes, M.E. Tiritan, M. Pinto, Small Molecules as Chromatographic Tools for HPLC Enantiomeric Resolution: Pirkle-Type Chiral Stationary Phases Evolution, *Chromatographia.* 76 (2013) 871–897. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2469-8>.
- [16] B. Chankvetadze, Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers, *J. Chromatogr. A.* 1269 (2012) 26–51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.033>.
- [17] R. Geryk, K. Kalíková, J. Vozka, D. Plecítá, M.G. Schmid, E. Tesařová, Enantioselective potential of chiral stationary phases based on immobilized polysaccharides in reversed phase mode, *J. Chromatogr. A.* 1363 (2014) 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.040>.
- [18] J. Teixeira, M.E. Tiritan, M.M.M. Pinto, C. Fernandes, Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: Recent Developments, *Molecules.* 24 (2019) 865. <https://doi.org/10.3390/molecules24050865>.
- [19] N. Matthijs, M. Maftouh, Y. Vander Heyden, Screening approach for chiral

- separation of pharmaceuticals - IV. Polar organic solvent chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1111 (2006) 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.106>.
- [20] C. Perrin, V. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, D. Massart, Y. Vander Heyden, Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals - Part I. Normal-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 947 (2002) 69–83. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01573-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01573-4).
- [21] C. Perrin, N. Matthijs, D. Mangelings, C. Granier-Loyaux, M. Maftouh, D. Massart, Y. Vander Heyden, Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals - Part II. Reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 966 (2002) 119–134. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00746-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00746-X).
- [22] A.A. Younes, H. Ates, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, A separation strategy combining three HPLC modes and polysaccharide-based chiral stationary phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75 (2013) 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.019>.
- [23] J.M. Padró, S. Keunchkarian, State-of-the-art and recent developments of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparations by high-performance liquid chromatography (2013–2017), *Microchem. J.* 140 (2018) 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.017>.
- [24] J. Zhang, J. Sun, Y. Liu, J. Yu, X. Guo, Immobilized Cellulose-Based Chiralpak IC Chiral Stationary Phase for Enantioseparation of Eight Imidazole Antifungal Drugs in Normal-Phase, Polar Organic Phase and Reversed-Phase Conditions Using High-Performance Liquid

- Chromatography, *Chromatographia*. 82 (2019) 649–660.
<https://doi.org/10.1007/s10337-019-03688-y>.
- [25] G.K.E. Scriba, Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences, *Chromatographia*. 75 (2012) 815–838.
<https://doi.org/10.1007/s10337-012-2261-1>.
- [26] M. Blanco, I. Valverde, Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 428–439.
[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00705-2](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00705-2).
- [27] C.J. Easton, S.F. Lincoln, Chiral discrimination by modified cyclodextrins, *Chem. Soc. Rev.* 25 (1996) 163. <https://doi.org/10.1039/cs9962500163>.
- [28] G. Gübitz, M.G. Schmid, Chiral separation principles in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*. 792 (1997) 179–225.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00871-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00871-6).
- [29] M. Fillet, P. Hubert, J. Crommen, Enantioseparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using mixtures of anionic and uncharged β -cyclodextrins as chiral additives, *Electrophoresis*. 18 (1997) 1013–1018. <https://doi.org/10.1002/elps.1150180625>.
- [30] A.M. Stalcup, K.H. Gahm, Application of Sulfated Cyclodextrins to Chiral Separations by Capillary Zone Electrophoresis, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1360–1368. <https://doi.org/10.1021/ac950764a>.
- [31] B. Chankvetadze, G. Endresz, G. Blaschke, About some aspects of the use of charged cyclodextrins for capillary electrophoresis enantioseparation, *Electrophoresis*. 15 (1994) 804–807.
<https://doi.org/10.1002/elps.11501501113>.
- [32] A. Bunke, T. Jira, Use of cationic cyclodextrin for enantioseparation by

- capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 798 (1998) 275–280.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01197-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01197-7).
- [33] G.K.E.V. Scriba, Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations – Recent developments and applications, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1991–2011. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800095>.
- [34] B. Chankvetadze, Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques, *J. Chromatogr. A.* 1168 (2007) 45–70.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.008>.
- [35] S.A.C. Wren, R.C. Rowe, Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 603 (1992) 235–241.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85366-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85366-2).
- [36] A. Sarafray-Yazdi, A. Amiri, Liquid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003>.
- [37] L. Arce, L. Nozal, B.M. Simonet, M. Valcárcel, A. Ríos, Liquid-phase microextraction techniques for simplifying sample treatment in capillary electrophoresis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 842–853.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.02.016>.
- [38] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656.
<https://doi.org/10.1021/ac990055n>.
- [39] N.C.P. de Albuquerque, M.A. Bortoleto, A.R.M. de Oliveira, Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas empregando técnicas miniaturizadas de preparação de amostras, *Sci. Chromatogr.* 5 (2013) 214–228. <https://doi.org/10.4322/sc.2014.005>.

- [40] A.R.M. de Oliveira, Microextração em Fase Líquida, in: R.L. de M. Moreau, M.E.P.B. de Siqueira (Eds.), Toxicol. Analítica, 2nd ed., Guanabara Koogan LTDA, Rio de Janeiro, 2015: pp. 158–165.
- [41] A.R.M. de Oliveira, I.R. dos S. Magalhães, F.J.M. de Santana, P.S. Bonato, Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos, *Quim. Nova.* 31 (2008) 637–644. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300031>.
- [42] I.R.S. Magalhaes, A.R.M. de Oliveira, P.S. Bonato, Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME), *Sci. Chromatogr.* 1 (2009).
- [43] I.R. dos Santos Magalhães, P. Sueli Bonato, Two-step liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of the enantiomers of mefloquine and its main metabolite carboxymefloquine in plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1805–1813. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2620-4>.
- [44] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes, *J. Chromatogr. A.* 1109 (2006) 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.025>.
- [45] A.R.M. de Oliveira, Técnicas de microextração aplicadas à análise estereosseletiva do ibuprofeno, da hidroxicloroquina e de seus metabólitos em urina, Universidade de São Paulo, 2007. <https://doi.org/10.11606/T.60.2007.tde-23072007-155100>.
- [46] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00105-0).

- [47] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium - Towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1511–1516. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401870>.
- [48] K.E. Kramer, A.R. Andrews, Screening method for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 760 (2001) 27–36. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00232-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00232-8).
- [49] T.S. Ho, T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport, *J. Chromatogr. A.* 998 (2003) 61–72. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00634-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00634-4).
- [50] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in liquid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01007-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01007-0).
- [51] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- [52] B. Bojko, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, M. Wasowicz, Solid-phase microextraction. How far are we from clinical practice?, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1505–1512. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.07.008>.
- [53] D. Vuckovic, X. Zhang, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 4041–4060. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.061>.

- [54] S. Risticovic, H. Lord, T. Górecki, C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Protocol for solid-phase microextraction method development, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 122–139. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.179>.
- [55] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1116 (2006) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>.
- [56] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2342–2357. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>.
- [57] M.-I. Leong, M.-R. Fuh, S.-D. Huang, Beyond dispersive liquid–liquid microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1335 (2014) 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.021>.
- [58] M.L. Martins, E.G. Primel, S.S. Caldas, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella, Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações, *Sci. Chromatogr.* 4 (2012) 29–45. <https://doi.org/10.4322/sc.2012.004>.
- [59] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, Dispersive liquid-liquid microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1382–1399. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.014>.
- [60] L. Campone, A.L. Piccinelli, R. Celano, L. Rastrelli, pH-controlled dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals, *Anal. Chim. Acta.* 754 (2012) 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.010>.

- [61] J. López-Darias, M. Germán-Hernández, V. Pino, A.M. Afonso, Dispersive liquid–liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters, *Talanta*. 80 (2010) 1611–1618. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.057>.
- [62] V. Andruch, C.C. Acebal, J. Škrliková, H. Sklenářová, P. Solich, I.S. Balogh, F. Billes, L. Kocúrová, Automated on-line dispersive liquid–liquid microextraction based on a sequential injection system, *Microchem. J.* 100 (2012) 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.09.006>.
- [63] I.A. Parshikov, A.I. Netrusov, J.B. Sutherland, Microbial transformation of azaarenes and potential uses in pharmaceutical synthesis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 871–889. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4220-z>.
- [64] S. Chandra, Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 47–59. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4128-7>.
- [65] S. Asha, M. Vidyavathi, *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.005>.
- [66] A.J. Marsaioli, A.L.M. Porto, Biotatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações, in: *Biotransformação Util. Micro-Organismos Endofíticos Uma Abordagem Quim.*, Schoba, Salto, 2010: pp. 195–249.
- [67] K.B. Borges, W. de S. Borges, R. Durán-Patrón, M.T. Pupo, P.S. Bonato, I.G. Collado, Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts, *Tetrahedron: Asymmetry.* 20 (2009) 385–397.

- <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.02.009>.
- [68] J. Boonleang, W. Pipatrattanaseree, C. Tanthana, W. Mahatthanatrakul, Relative bioavailability and pharmacokinetic comparison of two 2-mg risperidone tablet formulations: A single dose, randomized-sequence, double-blind, 2-way crossover study in healthy male volunteers in thailand, *Clin. Ther.* 32 (2010) 1842–1853. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2010.09.013>.
- [69] G. Mannens, M.L. Huang, W. Meuldermans, J. Hendrickx, R. Woestenborghs, J. Heykants, Absorption, metabolism, and excretion of risperidone in humans, *Drug Metab. Dispos.* 21 (1993) 1134–1141.
- [70] L.E.C. van Beijsterveldt, R.J.F. Geerts, J.E. Leysen, A.A.H.P. Megens, H.M.J. Van den Eynde, W.E.G. Meuldermans, J.J.P. Heykants, Regional brain distribution of risperidone and its active metabolite 9-hydroxy-risperidone in the rat, *Psychopharmacology (Berl)*. 114 (1994) 53–62. <https://doi.org/10.1007/BF02245444>.
- [71] C. Danel, C. Barthélémy, D. Azarzar, H. Robert, J.-P. Bonte, P. Odou, C. Vaccher, Analytical and semipreparative enantioseparation of 9-hydroxyrisperidone, the main metabolite of risperidone, using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*. 1163 (2007) 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.023>.
- [72] A. Van Eeckhaut, Y. Michotte, Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications, *Electrophoresis*. 27 (2006) 2880–2895. <https://doi.org/10.1002/elps.200500375>.
- [73] K. Németh, G. Tárkányi, E. Varga, T. Imre, R. Mizsei, R. Iványi, J. Visy, J.

- Szemán, L. Jicsinszky, L. Szente, M. Simonyi, Enantiomeric separation of antimalarial drugs by capillary electrophoresis using neutral and negatively charged cyclodextrins, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.020>.
- [74] S.K. Dubey, G. Singhvi, A. Tyagi, H. Agarwal, K. V. Krishna, Spectrophotometric Determination of pKa and Log P of Risperidone, *J. Appl. Pharm. Sci.* 7 (2017) 155–158. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.71123>.
- [75] C.M. Gaitani, A.R.M. de Oliveira, P.S. Bonato, Capillary electromigration techniques for the analysis of drugs and metabolites in biological matrices: a critical appraisal, in: C.D. Garcia, K.C. Torres, E. Carrilho (Eds.), *Fundam. Concepts, Pract. Appl. Limitations Capill. Electrophor. Microchip Capill. Electrophor.*, 1st ed., John Wiley & Sons, 2012: pp. 229–246.
- [76] G. Gubtiz, M.G. Schimid, Cyclodextrin mediated chiral separations, in: A. V. Eeckhaut, Y. Michotte (Eds.), *Chiral Sep. by Capill. Electrophor.*, CRC Press, Boca Raton, 2010: pp. 47–86.
- [77] L.I. de Jesus, Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo 9-hidroxirisperidona (paliperidona) e análise por eletroforese capilar, Universidade de São Paulo, 2013. <https://doi.org/10.11606/D.60.2013.tde-27062013-130644>.
- [78] M. Beneš, I. Zusková, J. Svobodová, B. Gaš, Determination of stability constants of complexes of neutral analytes with charged cyclodextrins by affinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 33 (2012) 1032–1039. <https://doi.org/10.1002/elps.201100489>.
- [79] L.I. de Jesus, N.C.P. Albuquerque, K.B. Borges, R.A. Simões, L.A. Calixto,

- N.A.J.C. Furtado, C.M. de Gaitani, M.T. Pupo, A.R.M. de Oliveira, Enantioselective fungal biotransformation of risperidone in liquid culture medium by capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction, *Electrophoresis*. 32 (2011) 2765–2775. <https://doi.org/10.1002/elps.201100328>.
- [80] M.Z. Bocato, Avaliação de modelos microbiológicos e modelos biomiméticos no metabolismo estereosseletivo da risperidona por cromatografia líquida de alta eficiência, Universidade de São Paulo, 2012. <https://doi.org/10.11606/D.59.2012.tde-08082012-172645>.
- [81] T. de C. Lourenço, N.M. Cassiano, Q.B. Cass, Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência, *Quim. Nova*. 33 (2010) 2155–2164. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000028>.
- [82] M.Z. Bocato, R.A. Simões, L.A. Calixto, C.M. de Gaitani, M.T. Pupo, A.R.M. de Oliveira, Solid phase microextraction and LC–MS/MS for the determination of paliperidone after stereoselective fungal biotransformation of risperidone, *Anal. Chim. Acta*. 742 (2012) 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.056>.
- [83] B. Chankvetadze, I. Kartoziya, C. Yamamoto, Y. Okamoto, Comparative enantioseparation of selected chiral drugs on four different polysaccharide-type chiral stationary phases using polar organic mobile phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 467–478. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00648-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00648-3).
- [84] D. Vuckovic, R. Shirey, Y. Chen, L. Sidisky, C. Aurand, K. Stenerson, J. Pawliszyn, In vitro evaluation of new biocompatible coatings for solid-phase microextraction: Implications for drug analysis and in vivo sampling

- applications, *Anal. Chim. Acta.* 638 (2009) 175–185.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.02.049>.
- [85] M. De Meulder, B.M.M. Remmerie, R. de Vries, L.L.A. Sips, S. Boom, E.W.J. Hooijschuur, N.C. van de Merbel, P.M.M.B.L. Timmerman, Validated LC–MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine, *J. Chromatogr. B.* 870 (2008) 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.041>.
- [86] O.M. Takayanagui, Therapy for Neurocysticercosis, *Arch. Neurol.* 49 (1992) 290. <https://doi.org/10.1001/archneur.1992.00530270106026>.
- [87] F.O. Paias, V.L. Lanchote, O.M. Takayanagui, P.S. Bonato, Enantioselective analysis of albendazole sulfoxide in cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 22 (2001) 3263–3269.
[https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200109\)22:15<3263::AID-ELPS3263>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200109)22:15<3263::AID-ELPS3263>3.0.CO;2-4).
- [88] H. Jung, L. Medina, L. GarcíaA, I. Fuentes, R. Moreno-Esparza, Biopharmaceutics: Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and Its Metabolite Albendazole Sulphoxide, *J. Pharm. Pharmacol.* 50 (1998) 43–48.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03303.x>.
- [89] N.. Botsoglou, D.. Fletouris, I.. Psomas, A.. Mantis, Retention behaviour of the sulphoxide, sulphone and 2-aminosulphone metabolites of albendazole in ion-pair liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta.* 354 (1997) 115–121.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00458-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00458-3).
- [90] F. Prost, J. Caslavská, W. Thormann, Chiral analysis of albendazole

- sulfoxide enantiomers in human plasma and saliva using capillary electrophoresis with on-column absorption and fluorescence detection, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 1043–1054. [https://doi.org/10.1002/1615-9314\(20021101\)25:15/17<1043::AID-JSSC1043>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1615-9314(20021101)25:15/17<1043::AID-JSSC1043>3.0.CO;2-5).
- [91] A. Procházková, M. Chouki, R. Theurillat, W. Thormann, Therapeutic drug monitoring of albendazole: Determination of albendazole, albendazole sulfoxide, and albendazole sulfone in human plasma using nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 21 (2000) 729–736. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000301\)21:4<729::AID-ELPS729>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000301)21:4<729::AID-ELPS729>3.0.CO;2-M).
- [92] W. Thormann, F. Prost, A. Procházková, Capillary electrophoresis with (R)-(-)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -phenylglycine as chiral selector for separation of albendazole sulfoxide enantiomers and their analysis in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 555–567. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00650-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00650-1).
- [93] V.C. Hilário, D.B. Carrão, T. Barth, K.B. Borges, N.A.J.C. Furtado, M.T. Pupo, A.R.M. de Oliveira, Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61 (2012) 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.012>.
- [94] J. Najib, Eszopiclone, a Nonbenzodiazepine Sedative-Hypnotic Agent for the Treatment of Transient and Chronic Insomnia, *Clin. Ther.* 28 (2006) 491–516. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.04.014>.
- [95] J.N. Carlson, R. Haskew, J. Wacker, I.M. Maisonneuve, S.D. Glick, T.P. Jerussi, Sedative and anxiolytic effects of zopiclone's enantiomers and

- metabolite, *Eur. J. Pharmacol.* 415 (2001) 181–189.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)00851-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00851-2).
- [96] G. Hempel, G. Blaschke, Enantioselective determination of zopiclone and its metabolites in urine by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 675 (1996) 139–146. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00348-7](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00348-7).
- [97] M.A. Tonon, P.S. Bonato, Capillary electrophoretic enantioselective determination of zopiclone and its impurities, *Electrophoresis*. 33 (2012) 1606–1612. <https://doi.org/10.1002/elps.201100583>.
- [98] R. Weinberger, *Capillary Zone Electrophoresis: Basic Concepts*, in: *Pract. Capill. Electrophor.*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2000: pp. 25–72.
- [99] A.C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, Factors influencing cyclodextrin-mediated chiral separations, in: A. V. Eeckhaut, Y. Michotte (Eds.), *Chiral Sep. Capill. Electrophor.*, CRC Press, Boca Raton, 2010: pp. 87–107.
- [100] N.C.P. de Albuquerque, *Avaliação de fungos no metabolismo enantiosseletivo da Zopiclona e análise por eletroforese capilar*, Universidade de São Paulo, 2014. <https://doi.org/10.11606/D.59.2014.tde-29102014-093152>.
- [101] N.C.P. de Albuquerque, C.M. de Gaitani, A.R.M. de Oliveira, A new and fast DLLME-CE method for the enantioselective analysis of zopiclone and its active metabolite after fungal biotransformation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 109 (2015) 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.039>.
- [102] C. Fernandez, F. Gimenez, B. Baune, V. Maradeix, A. Thuillier, R. Farinotti, Determination of the enantiomers of zopiclone and its two chiral

- metabolites in urine using an automated coupled achiral—chiral chromatographic system, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 617 (1993) 271–278. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80498-S](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80498-S).
- [103] Worldatlas, Top Pesticide Using Countries, (2017).
- [104] G.K. Blankson, P. Osei-Fosu, E.A. Adeendze, D. Ashie, Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra, Ghana, *Food Control.* 68 (2016) 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.045>.
- [105] A. Masiá, M.M. Suarez-Varela, A. Llopis-Gonzalez, Y. Picó, Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review, *Anal. Chim. Acta.* 936 (2016) 40–61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.023>.
- [106] S. Mostafalou, M. Abdollahi, Pesticides: an update of human exposure and toxicity, *Arch. Toxicol.* 91 (2017) 549–599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>.
- [107] T. VoPham, M.M. Brooks, J.-M. Yuan, E.O. Talbott, D. Ruddell, J.E. Hart, C.-C.H. Chang, J.L. Weissfeld, Pesticide exposure and hepatocellular carcinoma risk: A case-control study using a geographic information system (GIS) to link SEER-Medicare and California pesticide data, *Environ. Res.* 143 (2015) 68–82.
- [108] K.M. Hayden, M.C. Norton, D. Darcey, T. Østbye, P.P. Zandi, J.C.S. Breitner, K.A. Welsh-Bohmer, Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: The Cache County Study, *Neurology.* 74 (2010) 1524–1530.
- [109] E. Lekei, A. V. Ngowi, L. London, Acute Pesticide Poisoning in Children:

- Hospital Review in Selected Hospitals of Tanzania, *J. Toxicol.* 2017 (2017) 4208405. <https://doi.org/10.1155/2017/4208405>.
- [110] J.R. Richardson, V. Fitsanakis, R.H.S. Westerink, A.G. Kanthasamy, Neurotoxicity of pesticides, *Acta Neuropathol.* 138 (2019) 343–362. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>.
- [111] E. Evangelou, G. Ntritsos, M. Chondrogiorgi, F.K. Kavvoura, A.F. Hernández, E.E. Ntzani, I. Tzoulaki, Exposure to pesticides and diabetes: A systematic review and meta-analysis, *Environ. Int.* 91 (2016) 60–68.
- [112] J. Ye, M. Zhao, L. Niu, W. Liu, Enantioselective Environmental Toxicology of Chiral Pesticides, *Chem. Res. Toxicol.* 28 (2015) 325–338. <https://doi.org/10.1021/tx500481n>.
- [113] C. Drăghici, E. Chirila, M. Sica, Enantioselectivity of Chiral Pesticides in the Environment, in: L.I. Simeonov, F.Z. Macaev, B.G. Simeonova (Eds.), *Environ. Secur. Assess. Manag. Obs. Pestic. Southeast Eur.*, 1st ed., Springer Netherlands, Dordrecht, 2013: pp. 91–102. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6461-3_7.
- [114] A.W. Garrison, An Introduction to Pesticide Chirality and the Consequences of Stereoselectivity, in: A.W. Garrison, J. Gan, W. Liu (Eds.), *Chiral Pestic. Stereoselectivity Its Consequences*, 1st ed., American Chemical Society, Washington, 2011: pp. 1–7. <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1085.ch001>.
- [115] T. Cáceres, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, N. Sethunathan, R. Naidu, Fenamiphos and Related Organophosphorus Pesticides: Environmental Fate and Toxicology, in: D.M. Whitacre (Ed.), *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 1st ed., Springer Science+Business Media, Nova York, 2010: pp.

- 117–162.
- [116] T. Cáceres, M. Megharaj, R. Naidu, Toxicity and transformation of fenamiphos and its metabolites by two micro algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorococcum* sp., *Sci. Total Environ.* 398 (2008) 53–59.
- [117] A.L. Damianys, M.S.M. Fernanda, O.H.M. Laura, V.D. Rafael, M.N. Antonio, Fenamiphos is recalcitrant to the hydrolysis by alloforms PON1 Q192R of human serum, *Toxicol. Vitro.* 27 (2013) 681–685.
- [118] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 2237–2248.
- [119] M. Lecoeur-Lorin, R. Delépée, P. Morin, Simultaneous enantioselective determination of fenamiphos and its two metabolites in soil sample by CE, Electrophoresis. 30 (2009) 2931–2939. <https://doi.org/10.1002/elps.200800697>.
- [120] W.N. Xiong, T.T. Xia, J.W. Chen, X.Y. Cai, Direct Enantioselective Determination of Fenamiphos and Its Two Metabolites in Soils Using QuEChERS-HPLC, *J. Agro-Environment Sci.* 33 (2014) 708–714.
- [121] EMA, Guideline on bioanalytical method validation, (2011).
- [122] C.M. Bowman, L.Z. Benet, An examination of protein binding and protein-facilitated uptake relating to in vitro-in vivo extrapolation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 123 (2018) 502–514. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.008>.
- [123] N.C.P. de Albuquerque, Estudos enantiosseletivos de metabolismo, citotoxicidade e genotoxicidade in vitro do nematicida fenamifós, Universidade de São Paulo, 2019.

- [124] R. Mehvar, Application of Organ Clearance to Estimation of the In Vivo Hepatic Extraction Ratio, *Curr. Clin. Pharmacol.* 11 (2016) 47–52. <https://doi.org/10.2174/1574884710666150817104746>.
- [125] R. Mehvar, Clearance Concepts: Fundamentals and Application to Pharmacokinetic Behavior of Drugs, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 21 (2018) 88s–102s. <https://doi.org/10.18433/jpps29896>.
- [126] A.D.D. Rodrigues, Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 465–480. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00268-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00268-8).
- [127] D. Sychev, G.M. Ashraf, A. Svistunov, M. Maksimov, V. Tarasov, V.N. Chubarev, V.A. Otdelenov, N.P. Denisenko, G.E. Barreto, G. Aliev, The cytochrome P450 isoenzyme and some new opportunities for the prediction of negative drug interaction in vivo, *Drug Des. Devel. Ther.* 12 (2018) 1147–1156. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S149069>.
- [128] H.B. Teicher, B. Kofoed-Hansen, N. Jacobsen, Insecticidal activity of the enantiomers of fipronil, *Pest Manag. Sci.* 59 (2003) 1273–1275. <https://doi.org/10.1002/ps.819>.
- [129] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Monografias de Agrotóxicos Autorizados - Fipronil, (2019).
- [130] R. Kumar, B. Singh, K. Mandal, A. Kar, P.S. Sarao, Bioefficacy and fate of fipronil and its metabolites in basmati rice under sub-tropical climatic conditions, *Crop Prot.* 45 (2013) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.017>.
- [131] D.B. Carrão, I.C. dos Reis Gomes, F. Barbosa Junior, A.R.M. de Oliveira,

- Evaluation of the enantioselective in vitro metabolism of the chiral pesticide fipronil employing a human model: Risk assessment through in vitro-in vivo correlation and prediction of toxicokinetic parameters, *Food Chem. Toxicol.* 123 (2019) 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.060>.
- [132] P. Wang, S. Jiang, D. Liu, G. Jia, Q. Wang, P. Wang, Z. Zhou, Effect of alcohols and temperature on the direct chiral resolutions of fipronil, isocarbophos and carfentrazone-ethyl, *Biomed. Chromatogr.* 19 (2005) 454–458. <https://doi.org/10.1002/bmc.505>.
- [133] F. Qin, Y. Gao, P. Xu, B. Guo, J. Li, H. Wang, Enantioselective bioaccumulation and toxic effects of fipronil in the earthworm *Eisenia foetida* following soil exposure, *Pest Manag. Sci.* 71 (2015) 553–561. <https://doi.org/10.1002/ps.3841>.
- [134] P. Wang, D. Liu, X. Lei, S. Jiang, Z. Zhou, Enantiomeric separation of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography on an amylose tris-(S)-1-phenylethylcarbamate chiral stationary phase, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 265–271. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500271>.
- [135] D. Liu, P. Wang, W. Zhu, X. Gu, W. Zhou, Z. Zhou, Enantioselective degradation of fipronil in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*), *Food Chem.* 110 (2008) 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.017>.
- [136] M.G. Nillos, K. Lin, J. Gan, S. Bondarenko, D. Schlenk, Enantioselectivity in fipronil aquatic toxicity and degradation, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 1825. <https://doi.org/10.1897/08-658.1>.
- [137] H. Tan, Y. Cao, T. Tang, K. Qian, W. Chen, J. Li, Biodegradation and chiral stability of fipronil in aerobic and flooded paddy soils, *Sci. Total Environ.*

- 407 (2008) 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.007>.
- [138] X. Li, C. Bao, D. Yang, M. Zheng, X. Li, S. Tao, Toxicities of fipronil enantiomers to the honeybee *Apis mellifera* L. and enantiomeric compositions of fipronil in honey plant flowers, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 127–132. <https://doi.org/10.1002/etc.17>.
- [139] T. Liu, P. Wang, Y. Lu, G. Zhou, J. Diao, Z. Zhou, Enantioselective bioaccumulation of soil-associated fipronil enantiomers in *Tubifex tubifex*, *J. Hazard. Mater.* 219–220 (2012) 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.042>.
- [140] D. Lu, D. Liu, X. Gu, J. Diao, Z. Zhou, Stereoselective metabolism of fipronil in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), *Pestic. Biochem. Physiol.* 97 (2010) 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.04.009>.
- [141] Q. Tian, Z. Zhou, C. Lv, J. Yang, Direct enantiomeric separation of chiral pesticides by liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phases under reversed phase conditions, *Anal. Methods.* 4 (2012) 2307. <https://doi.org/10.1039/c2ay05890a>.
- [142] M. Chiba, Y. Ishii, Y. Sugiyama, Prediction of Hepatic Clearance in Human From In Vitro Data for Successful Drug Development, *AAPS J.* 11 (2009) 262. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9103-6>.
- [143] L.C. Wienkers, T.G. Heath, Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 825–833. <https://doi.org/10.1038/nrd1851>.
- [144] D.B. Carrão, M.D. Habenchus, N.C.P. de Albuquerque, R.M. da Silva, N.P. Lopes, A.R.M. de Oliveira, In vitro inhibition of human CYP2D6 by the chiral pesticide fipronil and its metabolite fipronil sulfone: Prediction of pesticide-

- drug interactions, *Toxicol. Lett.* 313 (2019) 196–204.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.07.005>.
- [145] D. Spaggiari, Y. Daali, S. Rudaz, An extensive cocktail approach for rapid risk assessment of in vitro CYP450 direct reversible inhibition by xenobiotic exposure, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 302 (2016) 41–51.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.04.013>.
- [146] Y. Kapelyukh, R. Wolf, CYP2D6 substrates and drug metabolism, in: P. Baumann (Ed.), *CYP2D6 Genet. Pharmacol. Clin. Relev.*, 1st ed., Future Medicine Ltd, London, 2014: pp. 80–100.
<https://doi.org/10.2217/fmeh2013.13.283>.
- [147] M.J. de Groot, F. Wakenhut, G. Whitlock, R. Hyland, Understanding CYP2D6 interactions, *Drug Discov. Today.* 14 (2009) 964–972.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.07.005>.
- [148] J. Yan, P. Zhang, X. Wang, Y. Wang, Z. Zhou, W. Zhu, Stereoselective degradation of chiral fungicide myclobutanil in rat liver microsomes, *Chirality.* 26 (2014) 51–55. <https://doi.org/10.1002/chir.22265>.
- [149] Z. Deng, J. Hu, Bioactivity investigation of fungicide myclobutanil enantiomers, *Agrochemicals.* 50 (2011).
- [150] M. Sun, D. Liu, X. Qiu, Q. Zhou, Z. Shen, P. Wang, Z. Zhou, Acute toxicity, bioactivity, and enantioselective behavior with tissue distribution in rabbits of myclobutanil enantiomers, *Chirality.* 26 (2014) 784–789.
<https://doi.org/10.1002/chir.22353>.
- [151] F.S. Fonseca, Análise enantiosseletiva do praguicida miclobutanil após metabolismo in vitro por microssomas hepáticos de humanos, Universidade de São Paulo, 2018.

- [152] Y. Wang, J. Qiu, W. Zhu, X. Wang, P. Zhang, D. Wang, Z. Zhou, Enantioselective metabolism and interference on tryptophan metabolism of myclobutanil in rat hepatocytes, *Chirality*. 27 (2015) 643–649. <https://doi.org/10.1002/chir.22479>.
- [153] F.S. Fonseca, D.B. Carrão, N.C.P. de Albuquerque, V. Nardini, L.G. Dias, R.M. da Silva, N.P. Lopes, A.R.M. de Oliveira, Myclobutanil enantioselective risk assessment in humans through in vitro CYP450 reactions: Metabolism and inhibition studies, *Food Chem. Toxicol.* 128 (2019) 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.009>.
- [154] U.M. Zanger, M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol. Ther.* 138 (2013) 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.
- [155] T.R. Roberts, D.H. Hutson, P.W. Lee, P.H. Nicholls, J.R. Plimmer, L.J. Choucher, *Metabolic Pathways of Agrochemicals Part One Herbicides and Plant Growth Regulators*, 1st ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.
- [156] P. Xu, Y. Wang, Y. Zhang, J. Li, H. Wang, Toxicity and bioaccumulation of ethofumesate enantiomers in earthworm *Eisenia fetida*, *Chemosphere*. 112 (2014) 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.120>.
- [157] L.R. Snyder, J.J. Kikland, J.W. Dolan, Basic Concepts and the Control of Separation, in: *Introd. to Mod. Liq. Chromatogr.*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2009: pp. 20–80.
- [158] O. Trapp, G. Schoetz, V. Schurig, Determination of enantiomerization barriers by dynamic and stopped-flow chromatographic methods, *Chirality*.

- 13 (2001) 403–414. <https://doi.org/10.1002/chir.1052>.
- [159] I.S. Perovani, *Análise Enantiosseletiva do herbicida etofumesato e correlação in vitro-in vivo após metabolismo por microsomas hepático de humanos*, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, 2019.
- [160] I.S. Perovani, D.B. Carrão, N.C.P. de Albuquerque, A.R.M. de Oliveira, Enantioselective in vitro metabolism and in vitro-in vivo correlation of the herbicide ethofumesate in a human model, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 187 (2020) 113349. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113349>.
- [161] M. Gonzalez, L. Goracci, G. Cruciani, I. Poggesi, Some considerations on the predictions of pharmacokinetic alterations in subjects with liver disease, (2014) 1397–1408.
- [162] D. Spaggiari, L. Geiser, Y. Daali, S. Rudaz, A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: An overview of current methodologies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 221–237. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.018>.
- [163] N.C.P. de Albuquerque, D.B. Carrão, M.D. Habenschus, A.R.M. de Oliveira, Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 89–109. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.011>.
- [164] L. Bura, A. Friel, J.O. Magrans, J.M. Parra-Morte, C. Szentes, Guidance of EFSA on risk assessments for active substances of plant protection products that have stereoisomers as components or impurities and for transformation products of active substances that may have stereoisomers, *EFSA J.* 17 (2019) e05804. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5804>.