



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos in vitro enantiosseletivos do fungicida tebuconazol
utilizando modelo humano: metabolismo, inibição enzimática e
fenotipagem**

MAÍSA DANIELA HABENSCHUS

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2021

MAÍSA DANIELA HABENSCHUS

**Estudos in vitro enantiosseletivos do fungicida tebuconazol
utilizando modelo humano: metabolismo, inibição enzimática e
fenotipagem**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO - SP
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Habenschus, Maísa Daniela

Estudos in vitro enantiosseletivos do fungicida tebuconazol utilizando modelo humano: metabolismo, inibição enzimática e fenotipagem/ Maísa Daniela Habenschus; orientador, Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira. – 2021.

150 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências, Área Química) – Programa de Pós- Graduação em Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível no repositório www.teses.usp.br.

1. Tebuconazol. 2. Praguicida. 3. Metabolismo in vitro. 4. Cinética enzimática. 5. Inibição enzimática. 6. Parâmetros toxicocinéticos. 7. Microsomas. 8. Enantiosseletivo. I. de Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes, orient. II. Título.

Nome: HABENSCHUS, Maísa Daniela

Título: Estudos in vitro enantiosseletivos do fungicida tebuconazol utilizando modelo humano: metabolismo, inibição enzimática e fenotipagem.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Segundo o escritor americano Jim Rohn, nós somos a média das cinco pessoas com quem passamos mais tempo. Se isso for verdade, não tenho do que reclamar, pois nesses anos de Doutorado sempre estive cercada de excelentes pessoas e profissionais. A sensação de dever cumprido e gratidão que sinto hoje eu devo dividir com vocês.

*Primeiramente, agradeço aos meus pais, **Luíz Carlos** e **Maria Helena**, que são meu alicerce, e ao meu irmão **Lucas**. Obrigada por sempre me apoiarem e pelos esforços que fizeram para que eu chagasse até aqui, muitas vezes abrindo mão de sonhos próprios para que eu realizasse os meus.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Anderson**. Obrigada pela parceria, compreensão, apoio e pelos ensinamentos que vão além do mundo acadêmico.*

*À **Raíssa Ferrari**, por estar presente na maioria das minhas vitórias. Obrigada pelo companheirismo, por ser minha confidente e por sempre me ensinar a ver o lado positivo das coisas e a ser uma pessoa melhor.*

*A todos os amigos que passaram pelo **LABMETs** durante esses anos, em especial ao **Daniel**, **Nayara**, **Franciele** e **Ícaro**. Aprendi muito com vocês. Obrigada por transformarem dias difíceis em dias mais leves. Com vocês cresci pessoalmente e profissionalmente.*

*Aos meus companheiros de **SABESP**, que sempre me incentivaram a concluir essa importante etapa da minha carreira.*

*Ao professor **Luís Gustavo Dias** e sua aluna **Viviani Nardini**, pela colaboração nos cálculos de determinação das configurações absolutas.*

*Ao professor **Fernando Barbosa Júnior**, pela disponibilização de seu laboratório e do equipamento de **CLAE-EM/EM**, e em especial ao então seu aluno de pós-doutorado, **Bruno Alves Rocha**, pelo auxílio durante as análises. Muito Obrigada!*

*Ao professor **Norberto Peporine Lopes** e seu aluno de pós-doutorado, **Rodrigo Moreira**, pela colaboração, disponibilização do equipamento de **CLAE-EM/EM** e auxílio nas análises dos ensaios de inibição enzimática.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto**, bem como a todos os professores, técnicos e funcionários, que de maneira direta ou indireta fizeram parte desses anos de Doutorado.*

Às Agências de Fomento, Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa (CNPQ) pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida (código de financiamento 001).

RESUMO

HABENSCHUS, M. D. **Estudos in vitro enantiosseletivos do fungicida tebuconazol utilizando modelo humano: metabolismo, inibição enzimática e fenotipagem.** 2021. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências, Área Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

As pessoas estão constantemente expostas a resíduos de praguicidas, seja de maneira indireta, através do consumo de água e alimentos contaminados, seja de maneira direta, como a exposição de trabalhadores rurais que aplicam praguicidas nas lavouras. Além da preocupação com a exposição do homem a esses compostos, outra questão importante diz respeito aos riscos que os praguicidas quirais representam para a saúde humana. Enantiômeros de praguicidas quirais podem diferir quanto a absorção, distribuição, metabolismo e excreção, além da toxicidade e bioacumulação em organismos não-alvo. O tebuconazol (TEB), composto em estudo neste trabalho, é um praguicida quiral da classe dos triazóis. Ele é empregado na forma de mistura racêmica para o controle do crescimento de fungos e como conservante de madeira. Estudos enantiosseletivos do TEB indicam que seus enantiômeros apresentam diferenças de atividade biológica e toxicidade para organismos aquáticos não-alvo e, portanto, o metabolismo e a toxicidade para o homem também podem ser enantiosseletivos e devem ser estudados. Baseando-se nisso, o presente trabalho propôs avaliar, de maneira enantiosseletiva, o metabolismo in vitro de fase I do TEB utilizando modelo humano, bem como o potencial inibitório deste composto frente as principais enzimas do citocromo P450 (CYP450) a fim de verificar o risco de possíveis interações praguicida-fármacos. Para isso, um método analítico enantiosseletivo por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado, permitindo a análise simultânea dos enantiômeros do TEB e do seu principal metabólito, 1-hidroxitebuconazol (TEBOH). Importantes parâmetros metabólicos in vitro foram obtidos e extrapolações in vitro-in vivo foram realizadas para calcular alguns parâmetros toxicocinéticos. Os resultados mostraram que as enzimas do CYP450 presentes nos microsomas hepáticos de humanos são capazes de metabolizar o TEB em TEBOH e perfis cinéticos de Michaelis-Menten e perfis bifásicos atípicos foram observados. Ademais, pode ocorrer metabolismo preferencial do *S*-(+)-TEB comparado ao *rac*-TEB e *R*-(-)-TEB, com formação preferencial do *S*-(+)-TEBOH. Os estudos de fenotipagem revelaram que múltiplas isoformas do CYP450 estão envolvidas no metabolismo do TEB em TEBOH, com destaque para a CYP3A4 e CYP2C9. Os estudos de inibição enzimática mostraram que o TEB pode inibir as enzimas CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6. Os mecanismos e constantes de inibição foram determinados apenas para o *rac*-TEB, que mostrou ser um inibidor misto forte da CYP3A4/5 e CYP2C9 e um inibidor competitivo moderado e forte da CYP2D6 e CYP2C19, respectivamente. Além disso, os valores das constantes de inibição indicaram que o risco de interações *rac*-TEB-fármacos não pode ser ignorado, principalmente interações com fármacos metabolizados majoritariamente pela CYP3A4/5, CYP2C9 e CYP2C19. Dessa forma, esses resultados juntos contribuem para a avaliação do risco de exposição humana ao praguicida quiral TEB e esse risco não deve ser negligenciado.

Palavras-chave: Tebuconazol. Praguicida. Metabolismo in vitro. Cinética enzimática. Inibição enzimática. Parâmetros toxicocinéticos. Microsomas. Enantiosseletivo.

ABSTRACT

HABENSCHUS, M. D. ***In vitro* enantioselective studies of the fungicide tebuconazole using human model: metabolism, enzyme inhibition and phenotyping.** 2021. 150 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

People are constantly exposed to pesticide residues, either indirectly, through the consumption of contaminated water and food, or directly, such as the exposure of agricultural workers who apply pesticides to the crops. In addition to the concern with human's exposure to these compounds, another important issue is the risk that chiral pesticides pose to human health. Enantiomers of chiral pesticides may have different absorption, distribution, metabolism and excretion in human body, besides toxicity and bioaccumulation in non-target organisms. Tebuconazole (TEB), the compound in study in this work, is a chiral triazole pesticide worldwide used as racemic mixture to control fungal plant pathogens and as wood preservative. Enantioselective studies with TEB indicate that its enantiomers have different biological activities and toxicity to non-target organisms, so the metabolism and toxicity of TEB in human body may also be enantioselective and should be studied. Therefore, the present work proposed to evaluate, enantioselectively, the *in vitro* phase I metabolism of TEB by using human model and also evaluate the inhibitory potential of TEB over the main cytochrome P450 (CYP450) enzymes in order to verify the risk of pesticide-drug interactions. An enantioselective analytical method using high performance liquid chromatography was developed and validated to simultaneously analyze the enantiomers of TEB and its main metabolite, 1-hydroxytebuconazole (TEBOH). Important *in vitro* metabolic parameters were obtained, and *in vitro-in vivo* extrapolations were performed to calculate some toxicokinetic parameters. The results showed that the CYP450 enzymes present in the human liver microsomes are able to metabolize TEB into TEBOH and Michaelis-Menten kinetic profiles and also atypical biphasic kinetic profiles were observed. Furthermore, preferential metabolism of *S*-(+)-TEB over *rac*-TEB and *R*-(-)-TEB may occur, with preferential production of *S*-(+)-TEBOH. Phenotyping reaction studies have shown that multiple CYP450 isoforms catalyzed TEB metabolism when TEBOH enantiomers were produced, mainly CYP3A4 and CYP2C9. The enzyme inhibition studies showed that the TEB can inhibit CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6. The inhibition mechanisms and constants were determined only for *rac*-TEB, which was a strong mixed-type inhibitor of CYP3A4/5 and CYP2C9 and a moderate and strong competitive inhibitor of CYP2D6 and CYP2C19, respectively. In addition, the values of inhibition constants suggested the risk of *rac*-TEB-drug interactions cannot be ignored, especially with drugs metabolized mainly by CYP3A4/5, CYP2C9 and CYP2C19. Thus, the results together contribute to the risk assessment of human exposure to the chiral pesticide TEB, and the risk should not be neglected.

Keywords: Tebuconazole. Pesticide. *In vitro* metabolism. Enzyme kinetics. Enzyme inhibition. Toxicokinetic parameters. Microsome. Enantioselective.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do TEB.	23
Figura 2- Estrutura química dos principais metabólitos do TEB.	25
Figura 3- Fluxograma do procedimento adotado durante a triagem para avaliação da separação enantiosseletiva do TEB e TEBOH no A) modo polar orgânico (PO-CLAE) e em B) fase reversa (FR-CLAE).	34
Figura 4- Ângulos diédricos flexíveis (em vermelho) digitalizados na busca conformacional do A) TEB e B) TEBOH.	38
Figura 5- Cromatogramas representativos da análise enantiosseletiva, por PO-CLAE, do A) <i>rac</i> -TEBOH, B) <i>rac</i> -TEB e da mistura entre C) <i>rac</i> -TEBOH.	44
Figura 6- Cromatogramas representativos da análise enantiosseletiva, por FR-CLAE, do A) <i>rac</i> -TEBOH, B) <i>rac</i> -TEB e da mistura entre C) <i>rac</i> -TEBOH e <i>rac</i> -TEB.	45
Figura 7- Cromatogramas representativos da análise enantiosseletiva, por FR-CLAE, do A) <i>rac</i> -TEBOH, B) <i>rac</i> -TEB e da mistura entre C) <i>rac</i> -TEBOH e <i>rac</i> -TEB.	46
Figura 8- Cromatograma representativo da separação quiral do <i>rac</i> -TEB e <i>rac</i> -TEBOH por FR-CLAE.	47
Figura 9- Avaliação do solvente empregado na extração do TEB, TEBOH e FEN.	49
Figura 10- Cromatogramas representativos obtidos por CLAE-DAD após a ELL utilizando acetato de etila.	50
Figura 11- Influência do volume de acetato de etila na recuperação dos analitos.	50
Figura 12- Influência do tempo de agitação na recuperação dos analitos.	51
Figura 13- Cromatogramas representativos para a análise enantiosseletiva de TEB, TEBOH e PI por CLAE-EM/EM de uma amostra obtida após incubação do <i>rac</i> -TEB com HLM e NADPH.	54
Figura 14- Figuras representativas das análises por DC dos enantiômeros isolados do TEB e TEBOH após serem solubilizados em metanol: água (90:10, v/v).	55
Figura 15- Representações esféricas dos isômeros mais estáveis A) <i>S</i> -TEB B) <i>R</i> -TEBOH no nível B3LYP-D3 / def2-TZVP (-f).	56
Figura 16- Espectros de DCE teóricos preditos por cálculos ω B97X-D3/def2-TZVP:.....	57
Figura 17- Cromatogramas obtidos após a análise enantiosseletiva de soluções padrão de TEB, TEBOH e FEN por CLAE-EM/EM.	58

Figura 18- Gráfico de resíduos para o A) <i>R</i> -(-)-TEB, B) <i>S</i> -(+)-TEB, C) <i>R</i> -(-)-TEBOH e D) <i>S</i> -(+)-TEBOH após avaliação da regressão linear simples pelo método de mínimos quadrados ordinários ponderados utilizando $1/x^2$ como peso.	60
Figura 19- Representação simplificada das etapas que compõem a toxicocinética de um xenobiótico.	68
Figura 20- Gráficos de velocidade inicial da reação (v_0) vs a concentração de substrato ($[S]$) representando o perfil cinético de A) Michaelis-Menten e C) bifásico. B) e D) representam os gráficos de Eadie-Hofstee para uma cinética de Michaelis-Menten e para uma cinética bifásica, respectivamente.	72
Figura 21- Avaliação da solubilidade do TEB no meio de incubação.	89
Figura 22- Estudo de racemização do (—) <i>S</i> -(+)-TEB e (—) <i>R</i> -(-)-TEB ao serem submetidos às condições de incubação.	90
Figura 23- Estudo de estabilidade metabólica do <i>rac</i> -TEB na presença das enzimas do CYP450.	91
Figura 24- Formação dos enantiômeros do TEBOH de acordo com o tempo de incubação e em diferentes concentrações de TEB.	93
Figura 25- Porcentagens de área dos enantiômeros do TEB de acordo com o tempo de incubação e em diferentes concentrações.	94
Figura 26- Gráficos de cinética enzimática e Eadie-Hofstee para a reação de 1-hidroxilação <i>in vitro</i> enantiosseletiva do TEB após incubação por 20 minutos com HLM ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$).	98
Figura 27- Determinação das isoformas do CYP450 envolvidas no metabolismo do TEB utilizando inibidores químicos (% Inibição, à esquerda) e rCYP450 (%VTN, à direita).	104
Figura 28- Triagem de inibição direta pelo TEB das enzimas do CYP450 avaliadas nesse trabalho.	119
Figura 29- Gráficos obtidos para a determinação dos valores de IC_{50} do <i>rac</i> -TEB, <i>R</i> -(-)-TEB e <i>S</i> -(+)-TEB após inibição da atividade enzimática da A) e B) CYP3A4/5, C) CYP2C9, D) CYP2C19 e E) CYP2D6.	122
Figura 30- Gráficos de Lineweaver-Burk obtidos nos estudos de inibição das enzimas do CYP450 por <i>rac</i> -TEB empregando HLM.	125
Figura 31- Gráficos secundários de Lineweaver-Burk e gráficos de Dixon para a determinação de K_i e αK_i para a inibição competitiva e inibição mista das isoformas do CYP450 por <i>rac</i> -TEB utilizando HLM.	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Colunas avaliadas durante o processo de triagem para desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-DAD e seus respectivos SQ.	33
Tabela 2. Concentrações dos analitos empregadas na validação do método analítico.	40
Tabela 3- Tipos de interações intermoleculares que governam as separações quirais.	42
Tabela 4- Parâmetros cromatográficos para a análise enantiosseletiva do TEB e TEBOH por FR-CLAE.	47
Tabela 5- Estruturas e propriedades físico-químicas dos analitos.	48
Tabela 6- Condições finais após otimização dos parâmetros para ELL.	51
Tabela 7- Linearidade do método analítico desenvolvido.	60
Tabela 8- Precisão e exatidão intra- e interensaio.	62
Tabela 9- Avaliação do efeito matriz.	63
Tabela 10- Teste de estabilidade dos analitos (n=5).	65
Tabela 11- Inibidores químicos seletivos e suas respectivas concentrações empregadas nos estudos de fenotipagem.	86
Tabela 12- Concentrações das principais isoformas do CYP450 presentes em HLM.	87
Tabela 13- Parâmetros cinéticos e perfis cinéticos para a reação de 1-hidroxilação do TEB catalisada por HLM.	96
Tabela 14- Valores de $f_{u,mic}$ e $f_{u,plasma}$ para o <i>rac</i> -TEB, <i>R</i> -(-)-TEB e <i>S</i> -(+)-TEB obtidos pelo método de ultracentrifugação.	100
Tabela 15- Predição enantiosseletiva dos parâmetros toxicocinéticos in vivo para o TEB ..	101
Tabela 16- Reações específicas catalisadas pelas isoformas do CYP450 que podem ser monitoradas nos estudos in vitro de inibição enzimática e os respectivos metabólitos formados.	109
Tabela 17- Condições de incubação e de preparo de amostras empregadas nos estudos in vitro de inibição das enzimas do CYP450 por TEB.	115
Tabela 18- Condições de análise por CLAE-EM/EM empregadas nos estudos in vitro de inibição das enzimas do CYP450 por TEB.	115
Tabela 19- Concentrações de substrato e de <i>rac</i> -TEB utilizadas nos estudos de determinação do mecanismo e da constante de inibição reversível.	117
Tabela 20- Valores de IC_{50} para a inibição das isoformas do CYP450 por <i>rac</i> -TEB, <i>R</i> -(-)-TEB e <i>S</i> -(+)-TEB e classificação de acordo com o potencial inibitório.	120

Tabela 21- One- way ANOVA comparando os valores de IC₅₀ obtidos empregando o *rac*-TEB, *S*-(+)-TEB e *R*-(-)-TEB como inibidores..... 121

Tabela 22- Mecanismos e valores das constantes de inibição das isoformas do CYP450 na presença de *rac*-TEB. 127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[S], concentração de substrato

ADME, absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos

CLAE-EM, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

CLAE-EM/EM, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

CL_H, *clearance* hepático, obtido por extrapolação

CL_{int, in vitro}, *clearance* hepático intrínseco determinado in vitro (V_{max}/K_M)

CL_{int, in vivo}, *clearance* hepático intrínseco in vivo, obtido por extrapolação

CQ1, controle de qualidade 1

CQ2, controle de qualidade 2

CQA, controle de qualidade alto

CQB, controle de qualidade baixo

CQM, controle de qualidade médio

CYP450, citocromo P450

CYP51, enzima lanosterol 14- α -demetilase

DAD, detector de arranjo de diodos

DC, dicroísmo circular

DCE, dicroísmo circular eletrônico

DPR%, desvio padrão relativo porcentual

E, enzima livre

E1 TEB, primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna

E1 TEBOH, primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna

E2 TEB, segundo enantiômero do TEB a eluir da coluna

E2 TEBOH, segundo enantiômero do TEBOH a eluir da coluna

ECs, energias de colisão

E_H, taxa de extração hepática, obtida por extrapolação

EI, complexo enzima- inibidor

ELL, extração líquido-líquido

EM, espectrometria de massas

EMA, *European Medicines Agency*, Agência Europeia de Medicamentos

EPI, equipamento de proteção individual

ER%, erro relativo porcentual

ES, complexo enzima-substrato

ESI, complexo enzima-substrato-inibidor

FDA, *Food and Drug Administration*, Agência Americana Reguladora de Alimentos e Medicamentos

FEN, fenamifós

FEQ, fases estacionárias quirais

FMN, fator matriz normalizado

FN-CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal

FR-CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

FR, fase reversa

$f_{u, plasma}$, fração do composto não ligada às proteínas plasmáticas

$f_{u, mic}$, fração do composto não ligada às proteínas microsomais

HLM, *human liver microsomes*, microsomas hepáticos de humanos

IC₅₀, concentração do composto que inibe em 50% a atividade de uma determinada enzima

K_i, constante de inibição reversível, constante de dissociação do complexo EI

K_M, constante de Michaelis-Menten

LIQ, limite inferior de quantificação

LMR, limite máximo de resíduo permitido

LSQ, limite superior de quantificação

MRM, monitoramento de reações múltiplas

NADP⁺, β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada

NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

ONU, *United Nation*, Organização das Nações Unidas

P, produto

PI, padrão interno

PO-CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência no modo polar orgânico

PO, polar orgânico

Q, fluxo sanguíneo hepático

QqQ, triplo quadrupolo

Rac-TEB, mistura racêmica do tebuconazol

Rac-TEBOH, mistura racêmica do 1-hidroxitebuconazol

rCYP450, isoformas recombinantes do CYP450

R_s, resolução

R-TEB, enantiômero *R*- do tebuconazol

S, substrato

SQ, seletor quiral

S-TEB, enantiômero *S*- do tebuconazol

T_{1/2}, meia vida

TEB, tebuconazol

TEBOH, 1-hidroxitebuconazol

t_R, tempo de retenção

USEPA, *United States Environmental Protection Agency*, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

v₀, velocidade inicial da reação

V_{max}, velocidade máxima da reação

WHO, *World Health Organization*, Organização Mundial da Saúde

αK_i, constante de dissociação do complexo ESI para a inibição do tipo mista

SUMÁRIO

Capítulo 1. Praguicidas quirais: tebuconazol	19
1.1. DESTAQUES REPORTADOS NO CAPÍTULO	19
1.2. INTRODUÇÃO.....	19
1.2.1. Praguicidas	19
1.2.2. Praguicidas Quirais.....	21
1.2.3. Tebuconazol.....	22
Capítulo 2. Objetivos.....	27
2.1. OBJETIVOS.....	27
Capítulo 3. Separação e análise enantiosseletiva do tebuconazol e seu metabólito, 1-hidroxitebuconazol	28
3.1. DESTAQUES REPORTADOS NO CAPÍTULO	28
3.2. INTRODUÇÃO.....	28
3.3. OBJETIVO	30
3.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.4.1. Padrões analíticos	30
3.4.2. Preparo das soluções padrão	30
3.4.3. Reagente e solventes	31
3.4.4. Microssomas hepáticos de humanos (HLM) e sistema de regeneração de NADPH	31
3.4.5. Isolamento dos enantiômeros do TEB e TEBOH	31
3.4.6. Desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE- DAD	32
3.4.7. Otimização do preparo de amostras por extração líquido- líquido (ELL)	35
3.4.8. Desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-EM/EM.....	36
3.4.9. Determinação da atividade óptica dos enantiômeros do TEB e TEBOH, das configurações absolutas e confirmação da ordem de eluição	37
3.4.10. Validação do método analítico.....	39
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.5.1. Desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-DAD.....	41
3.5.2. Preparo de amostra por extração líquido-líquido (ELL).....	47
3.5.3. Desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-EM/EM.....	52
3.5.4. Determinação da atividade óptica dos enantiômeros do TEB e TEBOH, das configurações absolutas e confirmação da ordem de eluição	55

3.5.5. Validação do método analítico.....	58
3.6. CONCLUSÕES	66
Capítulo 4. Estudos enantiosseletivos de metabolismo in vitro do praguicida tebuconazol	67
4.1. DESTAQUES REPORTADOS NO CAPÍTULO	67
4.2. INTRODUÇÃO.....	67
4.2.1. Cinética enzimática e extrapolações in vitro- in vivo	70
4.2.2. Estudos de Fenotipagem.....	74
4.3. OBJETIVOS.....	76
4.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
4.4.1. Padrões analíticos	76
4.4.2. Preparo das soluções padrão	77
4.4.3. Reagente e solventes.....	77
4.4.4. HLM, rCYP450 e sistema de regeneração de NADPH.....	77
4.4.5. Composição do meio de incubação	78
4.4.6. Preparo de amostras por ELL.....	78
4.4.7. Condições de análise do TEB e TEBOH por CLAE-EM/EM.....	79
4.4.8. Estudos prévios.....	79
4.4.9. Cinética enzimática	82
4.4.10. Ligação às proteínas plasmáticas e microsossomais	83
4.4.11. Análise dos dados de cinética enzimática e predição de parâmetros toxicocinéticos in vivo	83
4.4.12. Fenotipagem (mapeamento enzimático).....	85
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.6. CONCLUSÕES	106
Capítulo 5. Estudos enantiosseletivos de inibição enzimática: interação praguicida- fármaco	107
5.1. DESTAQUES REPORTADOS NO CAPÍTULO	107
5.2. INTRODUÇÃO.....	107
5.3. OBJETIVOS.....	111
5.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	111
5.4.1. Padrões analíticos	111
5.4.2. Preparo das soluções padrão	112
5.4.3. Reagentes e solventes	112
5.4.4. HLM e sistema de regeneração de NADPH.....	113

5.4.5. <i>Composição do meio e condições de incubação</i>	113
5.4.6. <i>Preparo de amostra por ELL</i>	114
5.4.7. <i>Condições de análise por CLAE-EM/EM</i>	114
5.4.8. <i>Avaliação do potencial inibitório do TEB e do risco de interações TEB-fármacos</i>	116
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
5.5.1. <i>Avaliação do potencial inibitório do TEB e do risco de interações TEB- fármacos</i> ...	118
5.6. CONCLUSÕES	128
Capítulo 6. Conclusões Gerais	129
Referências Bibliográficas.....	131
Apêndice.....	143

Capítulo 1. Praguicidas quirais: tebuconazol

1.1. DESTAQUES REPORTADOS NO CAPÍTULO

- O conceito de praguicidas e a importância desses compostos.
- O consumo de praguicidas ao longo dos anos no Brasil e no mundo.
- A contaminação ambiental e, conseqüentemente, o aumento da exposição humana a esses compostos, representando riscos à saúde.
- Praguicidas quirais e suas propriedades peculiares que fazem com que sejam alvo de importantes estudos.
- Tebuconazol: praguicida quiral, suas propriedades, indícios de enantiosseletividade em diversos processos biológicos e riscos de exposição humana.

1.2. INTRODUÇÃO

1.2.1. Praguicidas

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) praguicidas (*pesticides*) são compostos químicos usados para matar pragas, incluindo insetos, roedores, fungos e plantas indesejáveis (ervas daninhas) (WHO, 2018). Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, *Environmental Protection Agency*) classifica praguicidas como substâncias, ou misturas de substâncias, utilizadas para prevenir, repelir, mitigar ou destruir alguma praga. Tais substâncias também podem ser utilizadas como agentes reguladores de crescimento, desfolhantes, dessecantes, ou então como estabilizadores de nitrogênio (USEPA, 2007).

No Brasil, os praguicidas têm diversas denominações, tais como agrotóxicos, agroquímicos, pesticidas, defensivos fitossanitários ou agrícolas, dentre outras. Eles são definidos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e ambientes urbanos, hídricos e industriais. Além disso, segundo a definição brasileira, a finalidade dos praguicidas é alterar a composição da flora ou da fauna a fim de preservá-las da ação danosa de

seres vivos considerados nocivos e também atuar como agentes desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

Os praguicidas são classificados com base no organismo-alvo que combatem. Os fungicidas são usados no controle de fungos, inseticidas no controle de insetos, bactericidas no controle de bactérias, nematicidas no controle de nematoides, dentre outros, e, do ponto de vista da agricultura, o uso desses compostos é visto como algo necessário e vantajoso. Um dos benefícios, por exemplo, é a redução da população de vetores responsáveis por propagar doenças, fazendo com que haja um controle das pragas e uma diminuição dos danos provocados nas plantações. Isso acarreta, conseqüentemente, uma produção mais eficiente de alimentos em uma menor área de cultivo e tais alimentos tendem a durar mais tempo na prateleira (POPP; PETŐ; NAGY, 2013).

Esses benefícios são muito importantes quando levamos em consideração o aumento da população e a necessidade de se produzir cada vez mais alimentos para abastecê-la. De acordo com levantamentos realizados pela Organização das Nações Unidas (ONU, *United Nations*), a população mundial está projetada para ser de 9 bilhões de pessoas no ano de 2050 e de 11,2 bilhões em 2100 (UN, 2017). Assim, para acompanhar esse crescimento, a produção de alimentos tem que necessariamente aumentar. Em contrapartida, a existência de novas áreas para plantio é limitada, sendo necessário então um aumento de produção das lavouras já existentes, e uma das maneiras de se conseguir isso é através de um maior consumo mundial de praguicidas (BONNER; ALAVANJA, 2017; POPP; PETŐ; NAGY, 2013).

Atualmente, o Brasil se destaca como um dos maiores consumidores mundiais desses compostos. Dados revelam que a venda de praguicidas no país movimentou em torno de 10 bilhões de dólares por ano, o que representa cerca de 20% do mercado global (VASCONCELOS, 2018). Além disso, em 2017 os produtores brasileiros aplicaram cerca de 540 mil toneladas de praguicidas nas lavouras, o que corresponde a um aumento de 50% quando comparado ao ano de 2010 (VASCONCELOS, 2018). Esse elevado consumo tornou o Brasil um dos maiores produtores e exportadores de importantes culturas agrícolas, principalmente de grãos, como a soja. Porém, o uso crescente desses compostos tem levantado preocupações a respeito dos danos que podem ser causados ao meio ambiente e os efeitos que podem causar na saúde humana (BONNER; ALAVANJA, 2017).

Já é conhecido que muitos praguicidas são persistentes no meio ambiente, podem acumular em seres vivos, ser tóxicos para organismos não alvo, além de serem transportados a longo alcance. Isso faz com que possam contaminar o solo, o ar, a água e os alimentos. Dessa forma, as pessoas podem ser expostas a resíduos de praguicidas seja através da alimentação ou

respiração, chamado de exposição indireta, ou então através de uma exposição direta, que como o nome já diz, ocorre quando a pessoa tem contato direto com o praguicida, como por exemplo, trabalhadores rurais que aplicam esses produtos e que não utilizam ou fazem o uso incorreto dos equipamentos de proteção individual (EPIs), o que é uma realidade muito presente no Brasil (CARGNIN; ECHER; SILVA, 2017; DE LUCCA et al., 2012).

Um levantamento feito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) entre os anos de 2017 e 2018 apontou que, do total das amostras de alimentos analisadas naquele período no Brasil, 51% delas apresentavam resíduos de praguicidas. Desses 51%, 28% das amostras apresentaram concentrações abaixo do limite máximo de resíduos permitidos (LMR) enquanto que 23% eram consideradas amostras insatisfatórias, ou seja, a concentração do praguicida estava acima do LMR, ou havia a presença de pelo menos um praguicida de uso proibido para aquele tipo de lavoura, ou então havia a presença de praguicidas cujo uso já havia sido banido no Brasil (ANVISA, 2019).

Dessa forma, fica evidente que estamos expostos a esses compostos e por isso não é difícil encontrar na literatura trabalhos que mostrem a presença de resíduos de praguicidas, ou de metabólitos de praguicidas, em amostras biológicas humanas, como por exemplo amostras de cabelo, sangue e urina (CARVALHO et al., 2018; MERCADANTE et al., 2014; RUDGE et al., 2012; TSATSAKIS et al., 2010).

Como o modo de ação dos praguicidas não é, muitas vezes, espécie-específico, ou seja, os danos não são causados apenas aos organismos-alvo, a exposição a esses compostos pode provocar, a curto prazo, efeitos tóxicos agudos nas pessoas, como irritação dos olhos e da pele, dores de cabeça e enjoo. Ademais, caso a exposição seja constante e dependendo da dose e da toxicidade do mesmo, podem surgir, ao longo dos anos, problemas crônicos de saúde, como doença de Alzheimer, câncer, disfunções neurológicas e hormonais, asma, alergias, dentre outros (KIM; KABIR; JAHAN, 2017).

Portanto, há uma preocupação recorrente da comunidade científica com o crescente aumento no uso de praguicidas e a consequente exposição do homem a esses compostos.

1.2.2. Praguicidas Quirais

Outra questão importante envolvendo praguicidas diz respeito aos riscos que o uso de praguicidas quirais representam para a saúde humana e para o meio ambiente (DE ALBUQUERQUE et al., 2018).

Moléculas quirais são moléculas que não tem um plano interno de simetria e que apresentam elementos de quiralidade, tais como eixos, planos ou o mais comum deles, os centros de quiralidade (CHANKVETADZE, 2017). Cada centro de quiralidade nessas moléculas indica que existe um par de compostos com a mesma fórmula molecular, as mesmas ligações entre os átomos e que se distinguem apenas pela disposição espacial dos substituintes, sendo suas estruturas imagens especulares uma da outra, não sobreponíveis, também chamados de enantiômeros (CHANKVETADZE, 2017).

Os enantiômeros têm características peculiares que fazem com que eles sejam objeto de estudos. Em um ambiente aquiral, os enantiômeros de um mesmo composto têm propriedade físico-químicas idênticas, como ponto de fusão, ponto de ebulição e solubilidade, podendo ser distinguidos apenas pelas diferenças de atividade óptica: um enantiômero desvia o plano da luz polarizada para a esquerda, chamado de levogiro (*l*- ou -), enquanto que o outro desvia o plano da luz polarizada para a direita, chamado de dextrogiro (*d*- ou +) (MCMURRY, 2012). Porém, em um meio contendo moléculas quirais, os enantiômeros podem se comportar como dois compostos distintos (DE ALBUQUERQUE et al., 2018).

Como os organismos vivos têm moléculas quirais em suas estruturas, qualquer interação que envolva uma proteína, um transportador ou uma enzima, pode ocorrer de maneira diferente para os enantiômeros, ou seja, ser enantiosseletiva (DEFRA, 2002). Dessa forma, enantiômeros de praguicidas quirais podem apresentar diferenças de atividade biológica, toxicidade, bioacumulação e metabolismo, por exemplo.

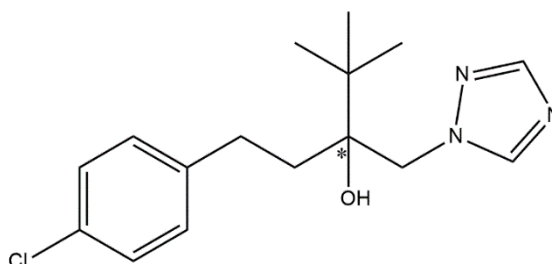
Atualmente, cerca de 30% dos praguicidas registrados são moléculas quirais (JESCHKE, 2018). Por questões econômicas, a maioria dos praguicidas quirais é comercializado na forma de mistura racêmica, sendo apenas 7% deles comercializados como enantiômeros isolados ou misturas enriquecidas de um dos enantiômeros. Devido a isso, autoridades têm chamado a atenção para a necessidade de um maior entendimento do comportamento e dos efeitos desses enantiômeros em organismos não-alvo. Portanto, em estudos de avaliação de risco de praguicidas quirais, os enantiômeros precisam ser tratados como compostos diferentes (BURA et al., 2019).

1.2.3. Tebuconazol

O tebuconazol (TEB), (*RS*)-1-*p*-clorofenil-4,4-dimetil-3(1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol (**Figura 1**), composto alvo desse trabalho, é um fungicida sistêmico da classe dos triazóis mundialmente comercializado e utilizado em culturas de cereais, frutas, vegetais, dentre

outras, e também como conservante de madeira. Sua função consiste em inibir a enzima lanosterol 14- α -demetilase (CYP51), que é uma enzima da família do complexo do citocromo P450 (CYP450) responsável por regular a biossíntese de ergosterol. O ergosterol está presente na membrana celular dos fungos e atua mantendo a integridade desta (CHEN et al., 2018).

Figura 1- Estrutura química do TEB.



*Centro quiral. **Fonte:** Autoria própria.

De acordo com ensaios toxicológicos, ainda que o emprego do TEB na agricultura seja considerado seguro por autoridades regulatórias (ESFA, 2014a), ele é classificado pela USEPA como um possível carcinogênico humano (classificação C, USEPA, 1996). Além disso, estudos apontam que, dependendo da concentração, o TEB pode causar má formação em fetos de animais (MA et al., 2021) e tem a capacidade de interferir nas funções celulares de trofoblastos da placenta humana, o que indica que seu efeito na gestação e também na formação de fetos humanos deve ser melhor avaliado (ZHOU et al., 2016). O TEB também pode agir como desregulador endócrino em diferentes espécies (LI et al., 2019; LV et al., 2017), por exemplo, em ratos, produzindo efeitos antiandrogênicos em adultos e reduzindo o nível de testosterona e o número de espermatozoides (YANG et al., 2018). Efeitos indesejáveis no fígado também já foram observados, como o aumento do peso hepático em ratos e hipertrofia centrolobular em camundongos (ESFA, 2014a; SCHMIDT et al., 2016).

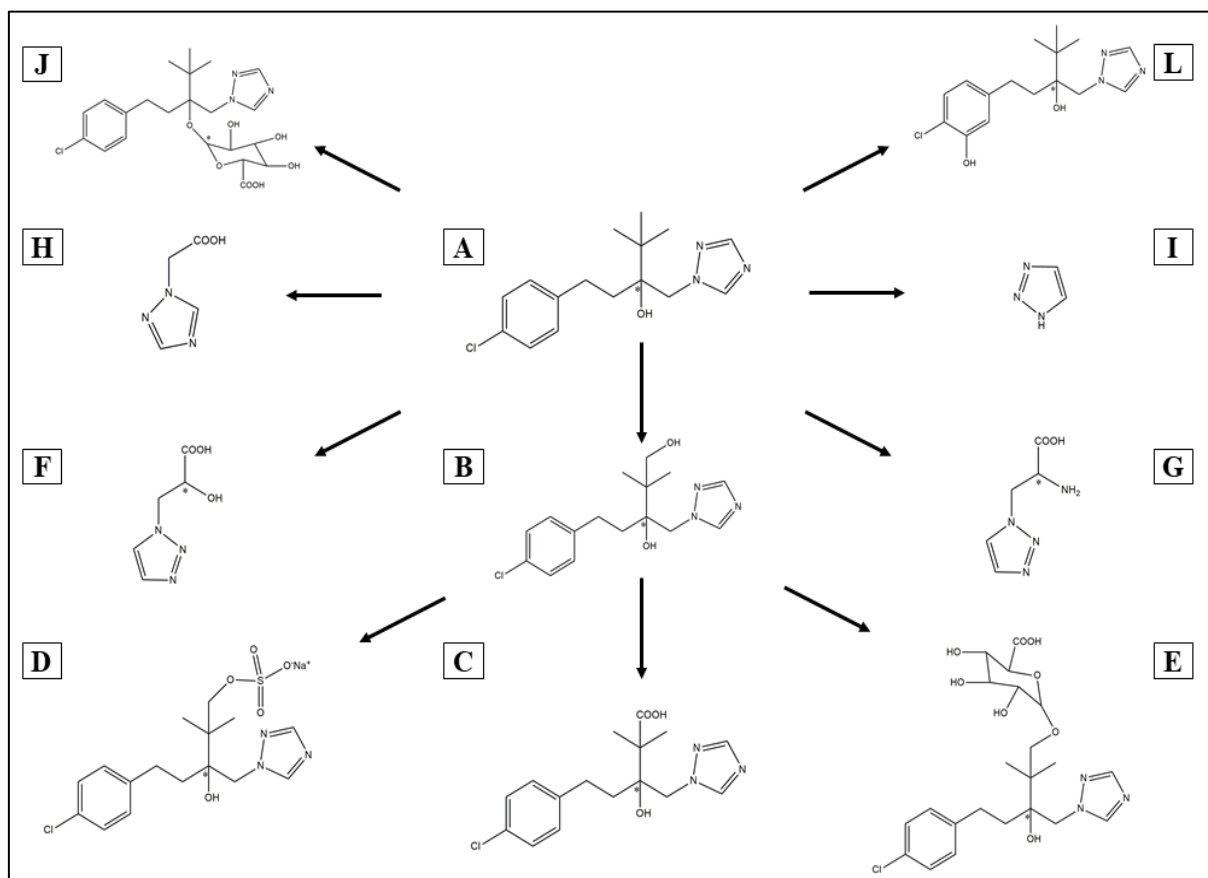
Por ser muito estável a degradação no solo, o TEB é classificado como um praguicida de moderada a alta persistência, sendo que a sua meia-vida ($t_{1/2}$) varia de cerca de 40 até 600 dias (BADAWI et al., 2016; BENDING; RODRÍGUEZ-CRUZ; LINCOLN, 2007; ESFA, 2014a; STRICKLAND; POTTER; JOO, 2004). Apesar de ter um relativo baixo potencial de mobilidade, principalmente em solos com muita matéria orgânica (UN, 1994), monitoramentos mostram que os níveis de TEB encontrados em sedimentos, águas superficiais, subterrâneas e água tratada vêm aumentando ao longo do anos (BAUGROS et al., 2008; DE SOUZA et al., 2020; HERRERO-HERNÁNDEZ et al., 2013; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2013).

Trabalhos científicos também apontam seu potencial de acumulação em rãs selvagens (POULSEN et al., 2015) e peixes (CLASEN et al., 2018; EUROPEAN CHEMICAL AGENCY, 2013), e a presença de resíduos em alimentos (FREEMAN et al., 2016; NOUGADÈRE et al., 2020; SAITTA et al., 2017). No Brasil, o TEB foi detectado em 12% das amostras de alimentos monitoradas pela ANVISA entre os anos de 2017 e 2018, o que equivale a 570 amostras. Em amostras de goiaba, pimentão e batata-doce, por exemplo, chegou a ser encontrado até mesmo acima do LMR (0,2 mg kg⁻¹) (ANVISA, 2019), o que eleva o risco de exposição indireta do homem a esse composto.

Trabalhadores que aplicam esse praguicida também sofrem exposição laboral direta, e muitos, por não utilizarem corretamente os EPIs, estão sujeitos a se exporem, principalmente, por absorção dérmica, com concentrações de TEB acima do limite aceitável (ESFA, 2014a; FUSTINONI et al., 2014; MERCADANTE et al., 2014). Além disso, há indícios de que o TEB absorvido por via dérmica pode acumular no tecido adiposo (JÓNSDÓTTIR et al., 2016). Dessa forma, todas as evidências científicas mencionadas anteriormente sugerem que o uso desse praguicida pode apresentar riscos para a saúde humana e, portanto, estudos acerca do seu potencial tóxico em modelos humanos tornam-se relevantes.

A degradação, biotransformação e/ou metabolismo do TEB já foi estudada em diferentes plantas, como trigo, e animais, como ratos, coelhos, cabras e galinhas. Os principais metabólitos formados foram reportados e estão exemplificados na **Figura 2**. Em plantas, a alanina triazol merece destaque. Já em animais, os principais metabólitos são os produtos de reações de hidroxilação e carboxilação da fração *terc*-butil, seguido de reações de conjugação. O 1-hidroxitebuconazol (TEBOH) e o tebuconazol-ácido carboxílico, além de conjugados glicuronídeos e sulfatados, foram os compostos encontrados em maiores concentrações.

A presença desses metabólitos em amostras de urina de trabalhadores rurais que fazem a aplicação do TEB em vinhedos, conforme reportado por FUSTINONI et al., 2014 e MERCADANTE et al., 2014, é uma outra evidência que indica a contaminação humana por esse composto, nesse caso, devido a uma exposição direta. Em tal estudo, o TEBOH foi o metabólito encontrado em maior concentração (0,025 – 1,198 µmol L⁻¹).

Figura 2- Estrutura química dos principais metabólitos do TEB em diferentes espécies.

A) Tebuconazol, **B)** 1-hidroxitebuconazol (TEBOH), **C)** tebuconazol-ácido carboxílico, **D)** 1- hidroxisulfato de tebuconazol, **E)** 1-hidroxitebuconazol glicuronídeo, **F)** ácido triazol láctico, **G)** alanina triazol, **H)** ácido triazol acético, **I)** 1,2,4-triazol, **J)** tebuconazol glicuronídeo, **L)** m-hidroxitebuconazol. *Centro quiral. **Fonte:** Autoria própria.

Conforme é possível observar na **Figura 1** e **Figura 2**, o TEB é um composto quiral, com um centro de assimetria no átomo de carbono da porção álcool, sendo constituído por um par de enantiômeros, o *R*-tebuconazol (*R*-TEB) e o *S*-tebuconazol (*S*-TEB). Apesar de demonstrar enantiosseletividade em diferentes processos, o TEB ainda é comercializado e utilizado na forma de mistura racêmica (*rac*-tebuconazol, *rac*-TEB).

Por exemplo, já se sabe que a sua atividade fungicida é enantiosseletiva, com o *R*-TEB sendo mais ativo que o *S*-TEB (CUI et al., 2018), enquanto que o *S*-TEB tem maior capacidade de regular o crescimento de plantas (STEHMANN; DE WAARD, 1995). O *R*-TEB também já demonstrou ser mais tóxico para organismos aquáticos não-alvo (*Danio rerio*, *Scenedesmus obliquus*, *Daphnia magna*) (LI et al., 2015), ser degradado mais lentamente do que o *S*-TEB em solos em condições aeróbias e anaeróbias (LI et al., 2015) e também bioacumular preferencialmente em peixes-zebra (*Danio rerio*) (LIU et al., 2016).

Com relação ao metabolismo, a degradação enantiosseletiva do TEB já foi avaliada em diferentes espécies de animais. Em coelhos, por exemplo, a degradação foi investigada através da injeção intravenosa do *rac*-TEB e a quantificação das concentrações dos enantiômeros presentes no plasma indicou uma disposição enantiosseletiva, com o *S*-TEB sendo degradado mais rapidamente do que o *R*-TEB (ZHU et al., 2007). Em ratos, por sua vez, o metabolismo *in vitro* enantiosseletivo foi investigado utilizando microssomas hepáticos. Nesse estudo, após a incubação do *rac*-TEB, foi observado que a degradação do *S*-TEB foi mais rápida do que a do *R*-TEB, porém quando os enantiômeros foram avaliados separadamente não foi observada diferença significativa. Os parâmetros cinéticos também foram determinados empregando ambos os enantiômeros isolados, individualmente, e os valores da constante de Michaelis-Menten (K_M) foram semelhantes, enquanto que a velocidade máxima da reação (V_{max}) foi ligeiramente maior para o enantiômero *R*-TEB (SHEN et al., 2012).

Nesse contexto, considerando o amplo emprego do TEB mundialmente, a crescente exposição do homem a esse composto e as distintas propriedades de seus enantiômeros dependendo da espécie ao qual são expostos, entender seu metabolismo e avaliar a sua capacidade de inibir as enzimas do CYP450, e se esses processos ocorrem ou não de maneira enantiosseletiva, são etapas essenciais no processo de avaliação de risco desse praguicida para o homem.

Capítulo 2. Objetivos

2.1. OBJETIVOS

Tendo como base o que foi dito no **Capítulo 1**, o objetivo do presente trabalho foi realizar um amplo estudo *in vitro* e enantiosseletivo para contribuir na avaliação do risco de exposição humana ao praguicida quiral TEB.

Para isso, foi proposto desenvolver um método analítico para separação e análise dos enantiômeros do TEB e TEBOH, investigar o metabolismo *in vitro* enantiosseletivo desse praguicida utilizando modelo humano e determinar os perfis e parâmetros cinéticos da reação de degradação tanto da mistura racêmica, quanto dos enantiômeros isolados.

Também foi proposto determinar as enzimas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo (estudos de fenotipagem), bem como os parâmetros toxicocinéticos das reações através de extrapolações *in vitro-in vivo*. Ademais, pretendia-se avaliar o risco de possíveis interações TEB-fármacos através de ensaios enantiosseletivos de inibição da atividade das principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos.

Capítulo 3. Separação e análise enantiosseletiva do tebuconazol e seu metabólito, 1-hidroxitebuconazol

3.1. DESTAQUES REPORTADOS NO CAPÍTULO

- O desenvolvimento de um método analítico como uma das principais etapas dos estudos de metabolismo *in vitro* enantiosseletivo.
- A avaliação da separação enantiosseletiva do TEB e TEBOH por um processo de triagem com o emprego de diferentes colunas quirais.
- O emprego da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) como técnica de análise do TEB e TEBOH.
- A confirmação da ordem de eluição dos analitos através da determinação da atividade óptica dos enantiômeros por dicroísmo circular (DC) seguido da determinação da configuração absoluta através da química computacional.
- O uso da extração líquido-líquido (ELL) como técnica de preparo de amostras para extração dos analitos do meio reacional.
- A validação do método analítico para análise enantiosseletiva do TEB e TEBOH.

3.2. INTRODUÇÃO

Nos estudos de metabolismo *in vitro* enantiosseletivo de praguicidas quirais é necessário, na grande maioria das vezes, uma etapa inicial de desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a separação dos enantiômeros do praguicida para monitorar o seu decaimento, ou então a separação dos enantiômeros dos metabólitos formados durante a reação, caso eles também sejam moléculas quirais (DE ALBUQUERQUE et al., 2018).

Para isso podem ser empregadas diferentes técnicas analíticas de separação, tais como a cromatografia gasosa, a cromatografia em fluido supercrítico, as técnicas de eletromigração, como por exemplo a eletroforese capilar, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), todas acopladas aos mais diversos tipos de detectores (CARRÃO et al., 2020)

A CLAE acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) é a técnica mais difundida para esses estudos (DE ALBUQUERQUE et al., 2018), contudo aplicações

empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) e à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) têm ganhado destaque, principalmente devido à alta seletividade e detectabilidade dos métodos desenvolvidos por essas técnicas (DE ALBUQUERQUE et al., 2018).

As análises quirais por cromatografia líquida podem ser feitas utilizando o método indireto, em que é necessário uma etapa prévia de derivatização do analito com um reagente quiral enantiomericamente puro para posterior análise dos diastereoisômeros formados empregando uma coluna aquiral, ou utilizando o método direto, em que são empregadas, na maioria das vezes, colunas com fases estacionárias ligadas aos mais diversos tipos seletores quirais (SQ), denominadas fases estacionárias quirais (FEQs) (LÄMMERHOFER, 2010). As FEQs são, na sua maioria, colunas a base de suportes de sílica funcionalizados com um SQ que é covalentemente ligado ou fisicamente adsorvido a estes (LÄMMERHOFER, 2010).

Existem diversos tipos de SQ, como por exemplo amilose, celulose, ciclodextrinas e antibióticos macrocíclicos. Os SQ mais empregados são aqueles derivados de polissacarídeos como a amilose e a celulose, sendo que FEQs derivadas de amilose e celulose com grupamentos fenilcarbamatos são as mais empregadas em estudos de metabolismo de praguicidas quirais (DE ALBUQUERQUE et al., 2018).

A resolução (R_s) entre os enantiômeros de um praguicida acontece, inicialmente, através do reconhecimento quiral. O reconhecimento quiral se dá pela formação de complexos diastereoisoméricos transientes entre o SQ e os enantiômeros. As constantes de formação de cada um desses complexos tendem a ser diferentes, o que resulta em tempos de retenção (t_R) distintos para o par de enantiômeros e, por fim, a separação destes (LÄMMERHOFER, 2010).

Dentre os tipos de interações intermoleculares que contribuem para a formação dos complexos diastereoisoméricos transientes podem ser citadas as interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações π - π , íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo induzido-dipolo e dipolo induzido-dipolo induzido (DE CAMPOS LOURENÇO; CASSIANO; CASS, 2010), sendo que essas interações podem ser atrativas ou repulsivas.

Além disso, a fase móvel também influencia nas interações intermoleculares e na força com que elas ocorrem. Quando é utilizado, na fase móvel, um solvente de alta polaridade em maior quantidade, como no modo reverso de eluição, as interações eletrostáticas entre o analito e a fase estacionária perdem força, uma vez que o solvente compete com a FEQ para interagir com o analito. Em compensação, as interações hidrofóbicas tendem a predominar. Já quando se utiliza um solvente de baixa polaridade, como no modo normal de eluição, as interações hidrofóbicas entre o analito e a FEQ perdem força, novamente porque o solvente compete com

a FEQ para interagir com o analito. Em compensação predominam as interações eletrostáticas (LÄMMERHOFER, 2010). Assim, durante o desenvolvimento de um método analítico enantiosseletivo é preciso avaliar qual FEQ será empregada e também a composição da fase móvel para então obter métodos seletivos, precisos e no menor tempo de análise possível.

A separação dos enantiômeros do TEB em diferentes matrizes, tais como frutas, vegetais e solo já foi reportada na literatura utilizando FEQ derivadas de amilose (LI et al., 2015; ZHAO et al., 2019), celulose (ZHANG et al., 2015) e ciclodextrinas (SHUANG et al., 2021), empregando CLAE-EM/EM (LI et al., 2015; ZHAO et al., 2019) e CLAE-DAD (ZHANG et al., 2015) tanto no modo normal, quanto no modo reverso de eluição. Porém, até o momento nenhum método analítico havia reportado a separação simultânea dos enantiômeros do TEB e TEBOH, o que é essencial para realizar o estudo de metabolismo *in vitro* proposto.

3.3. OBJETIVO

Nessa etapa, o objetivo do trabalho foi desenvolver e validar um método analítico enantiosseletivo para quantificar os enantiômeros do TEB e os enantiômeros do seu principal metabólito, TEBOH, em meio contendo microsomas hepáticos de humanos (HLM, *human liver microsomes*).

3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1. Padrões analíticos

Os padrões analíticos do *rac*-TEB ($\geq 99\%$) e fenamifós [FEN, padrão interno (PI), 99,5%] foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) enquanto que o *rac*-TEBOH (≥ 98) foi adquirido da Toronto Reserch Chemicals (Toronto, Canadá).

3.4.2. Preparo das soluções padrão

As soluções padrão de *rac*-TEB ($6800 \mu\text{mol L}^{-1}$) e *rac*-TEBOH ($72 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram preparadas em metanol, enquanto a solução de FEN ($21 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi preparada em acetonitrila. Todas as soluções foram armazenadas protegidas da luz, em tubos de vidro âmbar, a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.3. Reagente e solventes

Os reagentes de grau analítico, tais como hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de amônio (NH₄OH), ácido clorídrico (HCl) ácido fórmico (CH₂O₂), fosfato de sódio monobásico anidro (NaH₂PO₄) e fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) foram adquiridos da Synth (Diadema, São Paulo), enquanto que o tris base (tris(hidroxiometil)aminometano) foi adquirido da J. T. Baker (Phillisburg, EUA) e o cloreto de potássio (KCl) granular da Mallinckrodt Chemicals (Xalostoc, México). Água ultrapura (água do tipo, 1, 18 MΩ.cm a 25 °C) foi obtida utilizando o sistema Milli-Q Direct-Q3 UV da Millipore (Bedford, EUA).

Os solventes grau cromatografia, como metanol, acetonitrila, etanol, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano e isopropanol foram adquiridos da Panreac (Barcelona, Espanha), n-hexano 95% e o isopropanol foram adquiridos da Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha).

3.4.4. *Microsomas hepáticos de humanos (HLM)*

Os HLM (20 mg mL⁻¹), preparados a partir de pedaços do fígado de um pool de 150 doadores de ambos os sexos foram adquiridos da empresa Corning Life Science (Phoenix, EUA) e foram armazenados a -80°C.

3.4.5. *Isolamento dos enantiômeros do TEB e TEBOH*

Os enantiômeros do TEB e do TEBOH foram isolados utilizando um sistema de CLAE-DAD da empresa Shimadzu (Quioto, Japão), constituído de duas bombas LC-10AD, degaseificador DGU-20A3, controladora SCL-10AVP e detecção em 220 nm. A coluna empregada foi a Lux 5u Amilose-2® (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, EUA), fase móvel composta por hexano: isopropanol (85:15 v/v), vazão de 1 mL min⁻¹ e temperatura de 20 ± 2°C. Injeções manuais de 50 µL de soluções padrão de *rac*-TEB (5 mg mL⁻¹) e *rac*-TEBOH (1 mg mL⁻¹) foram feitas de maneira sequencial, separadamente, e os dados foram analisados com o programa LC solution 1.25 (Shimadzu, Quito, Japão). Os enantiômeros do TEB e do TEBOH foram coletados individualmente, e posteriormente, a fase móvel foi evaporada utilizando um fluxo suave de ar comprimido. O primeiro enantiômero a eluir da

coluna cromatográfica foi identificado como enantiômero 1 (E1 TEB ou E1 TEBOH), e o segundo, como enantiômero 2 (E2 TEB ou E2 TEBOH).

A porcentagem de pureza enantiomérica das frações isoladas foi calculada conforme a **Equação 1** (RIBEIRO et al., 2014):

$$\% \text{Pureza enantiomérica} = \left(\frac{n_1}{n_1 + n_2} \right) \times 100 \text{ ou } \left(\frac{n_2}{n_1 + n_2} \right) \times 100 \quad (1)$$

sendo n_1 – área do enantiômero 1; n_2 – área do enantiômero 2.

Por fim, os enantiômeros isolados foram solubilizados em metanol e armazenados em tubos âmbar a -20°C para posterior determinação de suas respectivas atividades ópticas e configurações absolutas (**seção 3.4.9**).

3.4.6. Desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE- DAD

O método analítico enantiosseletivo utilizado nos estudos de metabolismo in vitro foi desenvolvido inicialmente por CLAE-DAD empregando o equipamento citado na **seção 3.4.5** com detector operando em 220 nm e temperatura de análise de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Primeiramente, foi realizada uma triagem sistemática no modo polar orgânico (PO) e em fase reversa (FR) utilizando colunas quirais com diferentes comprimentos, tamanhos de partículas e SQ derivados de antibióticos macrocíclicos e polissacarídeos conforme descrito na **Tabela 1**.

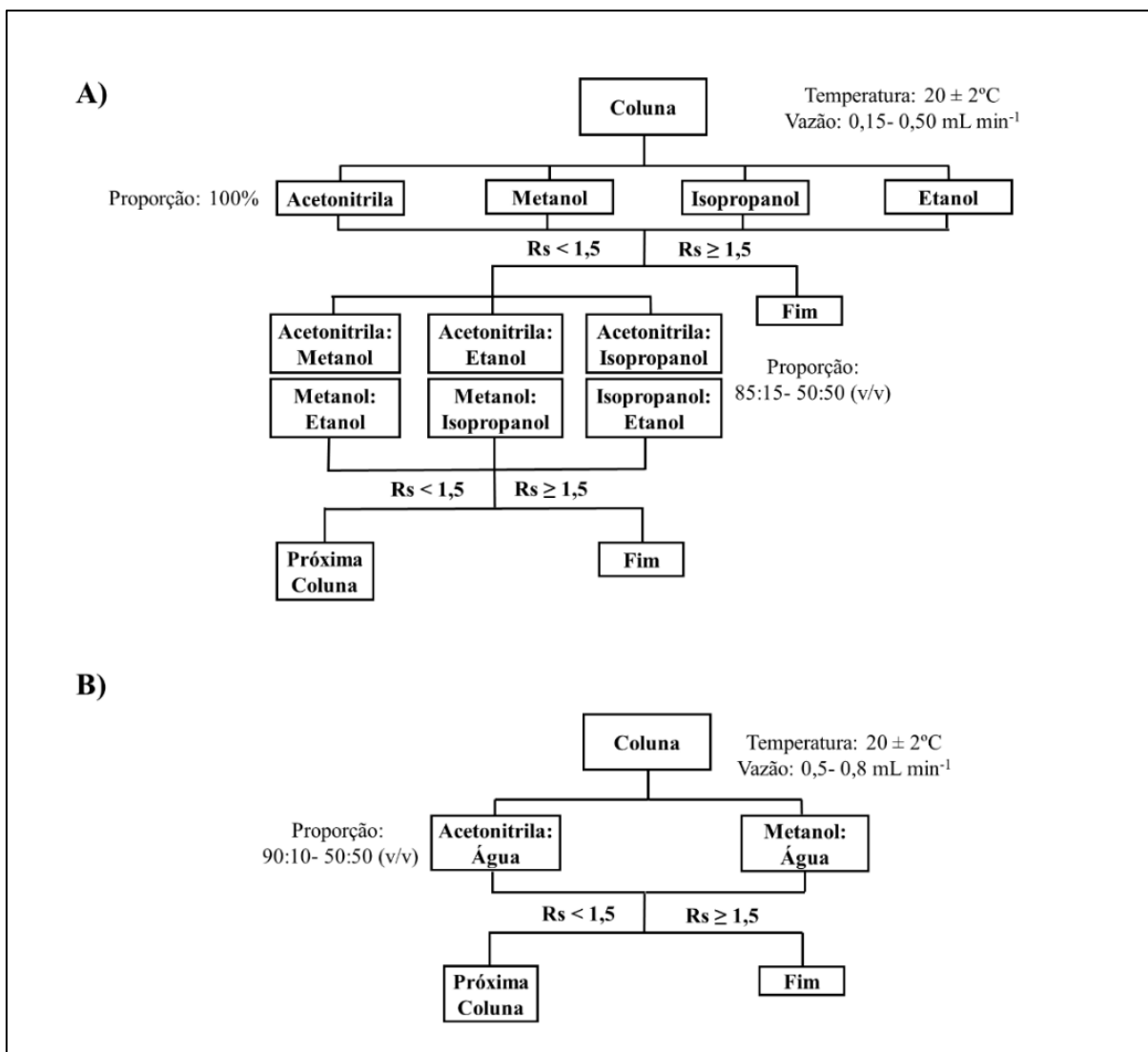
Tabela 1- Colunas avaliadas durante o processo de triagem para desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-DAD e seus respectivos SQ.

Coluna	Seletor Quiral
Chiralpak AD-H [®] (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Daicel Chemical Industries, Tóquio, Japão)	Amilose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)
Chiralpak AS [®] (250 mm x 4,6 mm, 10 µm, Daicel Chemical Industries, Tóquio, Japão)	Amilose tris-[(S)- α -metilbenzilcarbamato]
Chiralcel OD-H [®] (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Daicel Chemical Industries, Tóquio, Japão)	Celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)
Chiralcel OJ [®] (250 mm x 4,6 mm, 10 µm, Daicel Chemical Industries, Tóquio, Japão)	Celulose tris-(4-metilbenzoato)
Lux Amilose-2 [®] (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, EUA)	Amilose tris-(5-cloro-2-metilfenilcarbamato)
Lux Celulose-1 [®] (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, EUA)	Celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)
Lux Celulose-2 [®] (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, EUA)	Celulose tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato)
Chirobiotic T [®] (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Astec, Supelco, EUA)	Teicoplanina

Fonte: Autoria própria.

Além disso, diferentes vazões e composições da fase móvel foram testadas, respeitando as especificações e as pressões máximas suportadas por cada coluna. As estratégias adotadas durante a triagem seguiram as propostas elaboradas por MATTHIJS; MAFTOUH; HEYDEN, 2006 e PERRIN et al., 2002, respectivamente, de acordo com os fluxogramas apresentados na **Figura 3**.

Figura 3- Fluxograma do procedimento adotado durante a triagem para avaliação da separação enantiosseletiva do TEB e TEBOH no **A)** modo polar orgânico (PO-CLAE) e em **B)** fase reversa (FR-CLAE).



Rs: resolução. **Fonte:** Autoria própria.

Inicialmente, apenas o *rac*-TEB foi injetado no sistema cromatográfico ($20 \mu\text{L}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para avaliar a separação de seus enantiômeros. Se os enantiômeros do TEB fossem separados utilizando os parâmetros empregados, então o *rac*-TEBOH era injetado ($20 \mu\text{L}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a separação dos seus enantiômeros investigada. Além disso, a condição avaliada era descartada e uma nova era testada quando não havia nenhum indício de início de separação dos enantiômeros do TEB ou quando os compostos não eluíam em até 15 minutos.

Posteriormente, as condições mais promissoras obtidas durante a triagem por CLAE-DAD foram usadas como base para desenvolver o método analítico enantiosseletivo por CLAE-EM/EM (seção 3.4.8).

3.4.7. Otimização do preparo de amostras por extração líquido-líquido (ELL)

A influência de diferentes solventes extratores (hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila), dos volumes de solvente (600 µL, 800 µL e 1000 µL) e do tempo de agitação das amostras (5, 10, 15 e 20 minutos) na seletividade, repetibilidade e recuperação do TEB, TEBOH e FEN (PI) após a extração líquido-líquido (ELL) foi investigada, sendo otimizado um parâmetro por vez (otimização univariada), e cada condição foi avaliada em triplicata (n=3).

Para isso, 2,5 µL das soluções padrão de *rac*-TEB (concentração final no meio igual a 8,1 µmol L⁻¹) e *rac*-TEBOH (concentração final no meio igual a 7,7 µmol L⁻¹) foram pipetados, respectivamente, em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf® (n=3), seguido da adição de 105 µL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), 50 µL de solução tampão Tris-KCl (pH 7,4; 0,05 mol L⁻¹) e 40 µL de HLM (concentração final no meio igual a 0,5 mg mL⁻¹).

Posteriormente, o solvente orgânico foi adicionado, seguido de 30 µL de solução padrão de FEN (concentração final no meio igual a 3,15 µmol L⁻¹). As amostras foram então agitadas em agitador do tipo Vibrax® (IKA, Alemanha) e centrifugadas em centrífuga Hitachi HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão). As fases extratoras foram coletadas (80% do volume de solvente orgânico adicionado) e o solvente foi evaporado em concentrador de amostras à vácuo (Eppendorf Concentrator plus, Eppendorf, Alemanha), sendo posteriormente solubilizadas em 80 µL da fase móvel (acetona: água 50:50 v/v) e analisadas por CLAE-DAD utilizando o método de eluição por gradiente reportado na **seção 3.5.1**.

Para avaliar a recuperação, a área dos analitos obtida após análise de amostras extraídas foi comparada com a área dos analitos obtida após análise de amostras “branco” (contendo todos os componentes do meio reacional, exceto os analitos) fortificadas após a extração (**Equação 2**).

$$\% \text{ de recuperação} = \left(\frac{n_1}{n_2} \right) \times 100 \quad (2)$$

sendo **n₁** – área do analito obtida após análise de amostras extraídas; **n₂** – área do analito obtida após análise de amostras de branco fortificado.

A seletividade, por sua vez, foi avaliada através da comparação de cromatogramas de amostras “brancos” com cromatogramas de amostras extraídas, a fim de verificar se nenhum interferente eluia no mesmo tempo de retenção (**t_R**) dos analitos de interesse.

Por fim, a repetibilidade da técnica foi verificada através do cálculo do desvio padrão relativo porcentual (DPR%), admitindo-se como aceitável um valor inferior a 15%.

3.4.8. Desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-EM/EM

O método analítico enantiosseletivo utilizado nos estudos de metabolismo *in vitro* foi desenvolvido, por fim, utilizando CLAE-EM/EM. Os enantiômeros do TEB e do TEBOH foram detectados e quantificados em um equipamento de cromatografia líquida da Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EUA), equipado com bomba de solvente Accela 600 *pump* e amostrador automático Accela *autosampler*, acoplado ao EM modelo TSQ Quantum Access Max com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) e fonte de ionização por eletrospray (*electrospray ionization*). O software Xcalibur versão 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) foi empregado para controlar o equipamento e para a aquisição dos dados.

Para obter melhor detectabilidade e seletividade do método analítico, as condições de análise mais promissoras resultantes da triagem por CLAE-DAD foram utilizadas como base para o desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-EM/EM. Nesse processo, a composição da fase móvel foi reavaliada (misturas de metanol: água ou acetonitrila: água ambas com e sem a adição de ácido fórmico 0,1%), bem como a vazão (0,1- 0,6 mL min⁻¹) e a temperatura do forno (20 - 32°C).

Já os parâmetros de operação do EM, tais como condições de ionização, as transições a serem monitoradas no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e as energias de colisão empregadas (ECs) foram otimizadas usando o auto ajuste do equipamento. Para isso foram feitas infusões diretas, a uma vazão de 0,03 mL min⁻¹, de soluções padrão contendo cada um dos três analitos, FEN (PI), *rac*-TEB e *rac*-TEBOH, todos na concentração de 1 mg L⁻¹, preparadas em metanol:água (90:10 v/v). Os sinais foram registrados no modo positivo e os dois fragmentos mais intensos foram escolhidos para quantificação e confirmação dos compostos.

3.4.9. Determinação da atividade óptica dos enantiômeros do TEB e TEBOH, das configurações absolutas e confirmação da ordem de eluição

A atividade óptica dos enantiômeros isolados do TEB e TEBOH foi determinada através de ensaios empregando dicroísmo circular (DC) (Jasco J-810, Tóquio, Japão). Os enantiômeros foram solubilizados na fase móvel utilizada no método analítico desenvolvido por CLAE-EM/EM (**seção 3.5.3**, metanol: água (90:10, v/v)) e os espectros foram adquiridos no intervalo de 195-260 nm após correção com um branco (apenas fase móvel). Uma cubeta com caminho óptico de 1 mm foi usada, a largura das bandas foi de 1 nm, a velocidade de varredura foi de 50 nm min⁻¹ e foram feitas quatro varreduras para a obtenção de cada espectro.

Com os espectros de DC obtidos, as configurações absolutas dos enantiômeros do TEB e TEBOH foram determinadas por química computacional. Para isso, inicialmente, foi feita uma busca conformacional aleatória utilizando o programa VegaZZ versão 3.1.1.42 (100 passos, 50 corridas distintas) (PEDRETTI; VILLA; VISTOLI, 2002, 2003, 2004). Sete ângulos diédricos flexíveis do TEB e nove ângulos diédricos flexíveis do TEBOH (**Figura 4**) foram variados aleatoriamente (30 graus) e geometrias completamente relaxadas foram alcançadas usando o campo de força MMFF94. Após a pesquisa conformacional, todos os isômeros para cada enantiômero foram submetidos a otimizações de geometria local usando métodos de química quântica no nível DFT. Todos os cálculos quânticos foram realizados usando o programa ORCA 4.0.1.2 (NEESE, 2012).

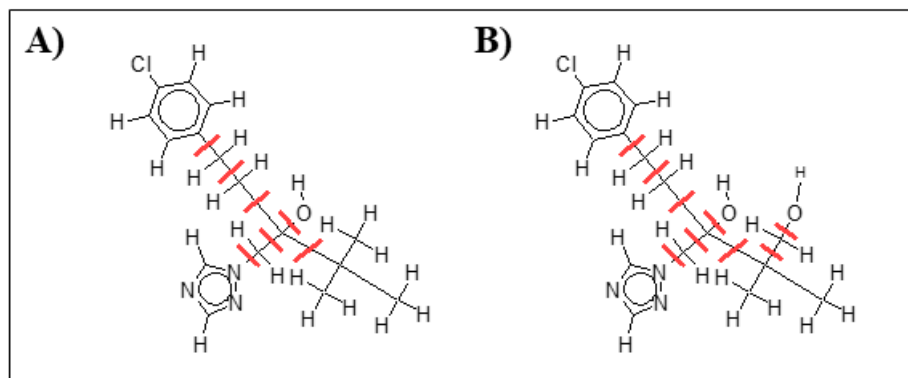
Cada isômero obtido na busca conformacional foi totalmente relaxado em vácuo no nível BLYP-D3 (BJ) / DZVP usando ajuste fino e critérios de convergência de campo auto consistentes. Tais cálculos seguiram a nova parametrização de Hostas e Rezac para abordagem GGA-DFT pura e conjunto de base zeta dupla (HOSTAŠ; ŘEZÁČ, 2017).

Cálculos adicionais foram realizados em B3LYP-D3/def2-TZVP(-f) usando ajuste fino e critérios de convergência de campo auto consistentes. Após a otimização, a distribuição de Boltzmann dos isômeros foi calculada a partir da diferença entre as energias de ponto único ($\Delta E_i = E_i - E_0$), tendo como referência o isômero mais estável (E_0) (NARDINI et al., 2018) (**Equação 3**).

$$w_i = \frac{e^{\left(\frac{-\Delta E_i}{RT}\right)}}{\sum_{j=1}^N e^{\left(\frac{-\Delta E_j}{RT}\right)}} \quad (3)$$

sendo w_i – peso de Boltzmann para cara isômero.

Figura 4- Ângulos diédricos flexíveis (em vermelho) digitalizados na busca conformacional do **A)** TEB e **B)** TEBOH.



Fonte: Autoria própria

Os cálculos de dicroísmo circular eletrônico (DCE) foram realizados no nível ω B97X-D3/def2-TZVP. O modelo polarizável contínuo do tipo-condutor (C-PCM) (COSSI et al., 2003) foi usado para descrever o efeito do solvente metanol no espectro de DCE. A abordagem simplificada da teoria funcional de densidade tempo-dependente (sTD-DFT) (GRIMME, 2013; RISTHAUS; HANSEN; GRIMME, 2014) permitiu cálculos dos espectros de DCE usando limiares de até 10 eV. Finalmente, os verdadeiros espectros de DCE de cada enantiômero foram gerados através da aplicação de uma banda Gaussiana a cada força de rotação, somada na faixa de 190-260 nm, e levando em consideração o peso de Boltzmann do espectro de cada isômero. Seguindo a equação de Harada-Nakanishi (HARADA; CHEN; NAKANISHI, 1975), os verdadeiros espectros-médios são dados pela **Equação 4**:

$$\Delta\varepsilon = \sum_{i=1}^N w_i \sum_{j=1}^{N_{exc}} \Delta\varepsilon_{ij}^{max} \exp \left[-\left(\frac{\bar{\nu} - \bar{\nu}_{ij}}{\sigma_j}\right)^2 \right] \quad (4)$$

sendo que a primeira soma leva em consideração N isômeros, a segunda soma leva em consideração N_{exc} excitações no intervalo espectral selecionado, $\bar{\nu}$ – o comprimento de onda monitorado, $\bar{\nu}_{ij}$ – a j^{th} excitação do isômero-i, $\Delta\varepsilon_{ij}^{max}$ – o valor de $\Delta\varepsilon$ no ponto máximo da banda, σ_j – o desvio padrão da excitação, muitas vezes escolhido em uma abordagem de melhor ajuste (valores típicos estão na faixa de 0,1-0,3 eV (PESCITELLI; BRUHN, 2016)).

$\Delta\varepsilon_{ij}^{\max}$ e a força rotacional (**R**) estão correlacionados por segundo (em unidades CGS) de acordo com a **Equação 5**:

$$R_{ij} = 2.296 \times 10^{-39} \Delta\varepsilon_{ij}^{\max} \sqrt{\pi} \frac{\sigma}{\bar{\nu}_{ij}} \quad (5)$$

sendo $\Delta\varepsilon_{ij}^{\max}$ – valor de $\Delta\varepsilon$ no ponto máximo da banda, σ – desvio padrão da excitação e $\bar{\nu}_{ij}$ – j^{th} excitação do isômero-i.

Após a atividade óptica e as configurações absolutas dos enantiômeros do TEB e TEBOH serem identificadas, eles foram analisados, individualmente, utilizando o método desenvolvido por CLAE-EM/EM (**seção 3.5.3**) para confirmar a ordem de eluição.

3.4.10. Validação do método analítico

O método analítico desenvolvido por CLAE-EM/EM foi validado pela avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, efeito residual (*carry over*), limite inferior de quantificação (LIQ), precisão e exatidão intra- e interensaio, efeito matriz e estabilidade. Os critérios de aceitabilidade desses parâmetros foram baseados no guia de validação de métodos bioanalíticos da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012).

Para isso, 2,5 μL de solução padrão de *rac*-TEB e *rac*-TEBOH foram pipetados em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf[®], seguido da adição de 105 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), 50 μL de solução tampão Tris-KCl (pH 7,4; 0,05 mol L⁻¹) e 40 μL de HLM (concentração final no meio igual a 0,2 mg mL⁻¹). As amostras foram submetidas às etapas de preparo de amostra (**seção 3.5.2**) e posteriormente analisadas pelo método analítico enantiosseletivo desenvolvido por CLAE-EM/EM (**seção 3.5.3**).

Primeiramente, a linearidade foi avaliada (n=3) em sete níveis de concentração, sendo estes 0,125 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (LIQ), 0,250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (controle de qualidade baixo, CQB), 15,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (controle de qualidade 1, CQ1), 25,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (controle de qualidade médio, CQM), 50,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (controle de qualidade 2, CQ2), 75,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (controle de qualidade alto, CQA) e 85,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (limite superior de quantificação, LSQ) para cada enantiômero do TEB e 0,005 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (LIQ), 0,015 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (CQB), 0,050 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (CQ1), 0,250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (CQM), 0,375 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (CQ2), 0,750 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (CQA) e 0,900 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (LSQ) para cada enantiômero do

TEBOH (**Tabela 2**). Os ajustes lineares das curvas de calibração foram avaliados sem ponderação e com ponderação ($1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$) e a linearidade foi expressa pelo coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de correlação. Testes de falta de ajuste (ANOVA *lack of fit*) utilizando o software Minitab 16 (LLC, Pensilvânia, EUA) também foram realizados para garantir a linearidade.

Tabela 2. Concentrações dos analitos empregadas na validação do método analítico.

	Nível de Concentração	R-(-)-TEB ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	S-(+)-TEB ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	R-(-)-TEBOH ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	S-(+)-TEBOH ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1	LIQ	0,125	0,125	0,005	0,005
2	CQB	0,250	0,250	0,015	0,015
3	CQ1	15,00	15,00	0,050	0,050
4	CQM	25,00	25,00	0,250	0,250
5	CQ2	50,00	50,00	0,375	0,375
6	CQA	75,00	75,00	0,750	0,750
7	LSQ	85,00	85,00	0,900	0,900

CQ1: controle de qualidade 1, CQ2: controle de qualidade 2, CQA: controle de qualidade alto, CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, LIQ: limite inferior de quantificação e LSQ: limite superior de quantificação. **Fonte:** Autoria própria.

A seletividade foi avaliada através da análise de cromatogramas de amostras “branco”. Para tanto, foi observado se havia picos que eluíam no mesmo t_R dos analitos de interesse e do PI. Já o efeito residual foi verificado através da análise de cromatogramas do branco obtidos logo após a injeção das amostras LSQ. Este efeito foi considerado ausente caso picos que elúissem no mesmo tempo t_R dos analitos e PI tivessem área \leq a 20% da área obtida para o LIQ dos enantiômeros do TEB e TEBOH e área \leq a 5% da área do PI.

A precisão e exatidão foram avaliadas intra- ($n=5$) e inter- ($n=3$, número de dias) ensaio para o LIQ e para os CQB, CQM e CQA. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo porcentual (DPR%) para a precisão, e erro relativo porcentual (ER%) para a exatidão. O DPR% e ER% foram considerados satisfatórios entre 15% e $\pm 15\%$ e 20% e $\pm 20\%$ para as amostras de controle de qualidade e LIQ, respectivamente.

O efeito matriz ($n=5$), por sua vez, foi investigado através da análise de (I) brancos fortificados com *rac*-TEB, *rac*-TEBOH e PI após as etapas de preparo de amostra (**seção 3.5.2**) e (II) soluções de *rac*-TEB, *rac*-TEBOH e PI preparadas com a fase móvel (metanol: água, 90:10 v/v). As concentrações de *rac*-TEB e *rac*-TEBOH foram as mesmas utilizadas no CQB

e CQA. O fator matriz normalizado (FMN) foi calculado através da razão entre a área dos picos dos enantiômeros do TEB ou TEBOH e a área do PI após as análises de (I) e (II) (**Equação 6**). Além disso, o DPR% do FMN foi considerado aceitável se inferior a 15%.

$$FMN = \frac{\frac{\text{Área do pico do analito nas amostras de branco fortificado}}{\text{Área do pico do PI nas amostras de branco fortificado}}}{\frac{\text{Área do pico do analito nas soluções preparadas com fase móvel}}{\text{Área do pico do PI nas soluções preparadas com fase móvel}}} \quad (6)$$

A estabilidade (n=5) dos analitos foi avaliada para as amostras de CQB e CQA submetidas (a) às condições de incubação (30 minutos à 37°C) e (b) mantidas no auto injetor (48 horas à 10°C). As amostras foram quantificadas utilizando curvas de calibração preparadas no mesmo dia da análise e foram consideradas estáveis se as concentrações obtidas para cada analito estivessem entre ±15% da concentração nominal.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-DAD

O método analítico enantiosseletivo utilizado nos estudos de metabolismo in vitro foi desenvolvido inicialmente empregando como técnica a CLAE-DAD. A cromatografia líquida é a técnica analítica mais comum para a análise enantiosseletiva de praguicidas quirais, principalmente devido ao número de instrumentos disponíveis comercialmente, a diversidade de colunas e SQ, a compatibilidade com diferentes tipos de detectores, além dos diferentes modos de eluição que contribuem para o reconhecimento quiral (CARRÃO et al., 2020).

O objetivo dessa etapa era desenvolver um método analítico seletivo e rápido. Além disso, a resolução entre os picos dos enantiômeros do TEB, dos enantiômeros do TEBOH e entre todos os picos adjacentes entre si deveria ser maior ou igual a 1,5 ($R_s \geq 1,5$). Isso garantiria uma separação praticamente completa, com sobreposição aproximada de apenas 0,3% entre os picos (DVOŘÁK et al., 2015; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Até o momento de desenvolvimento desse estudo, nenhum outro trabalho havia reportado a análise quiral e simultânea do TEB e TEBOH. Portanto, de imediato, a separação foi avaliada através de um processo de triagem sistemática empregando diversas colunas quirais com fases estacionárias baseadas em derivados de antibióticos macrocíclicos, como a teicoplanina, e derivados de polissacarídeos, como amilose e a celulose (**seção 3.4.6**). Essas

colunas possuem SQ que tendem a interagir de maneira estereosseletiva com compostos quirais. Através de interações intermoleculares (**Tabela 3**) são formados complexos diastereoisoméricos transientes, e diferenças no equilíbrio termodinâmico da formação desses complexos possibilitam a separação, uma vez que um enantiômero tende a ficar mais tempo retido na fase estacionária do que o outro, ocorrendo então eluição em tempos diferentes (DE CAMPOS LOURENÇO; CASSIANO; CASS, 2010).

Tabela 3- Tipos de interações intermoleculares que governam as separações quirais.

Tipo de Interação	Força	Direção	Alcance
Eletrostática	Muito Forte	Atrativa ou Repulsiva	Médio
Ligação de hidrogênio	Muito Forte	Atrativa	Longo
π - π	Forte	Atrativa ou repulsiva	Médio
Íon-dipolo	Forte	Atrativa	Pequeno
Dipolo-dipolo	Intermediária	Atrativa	Pequeno
Dipolo-dipolo induzido	Fraca	Atrativa	Pequeno
Dipolo induzido-dipolo induzido	Muito Fraca	Atrativa	Pequeno

Fonte: Adaptado de BERTHOD, 2010.

Além do tipo de SQ da fase estacionária, conforme já relatado anteriormente, a fase móvel também exerce influência nas interações intermoleculares e na força com que elas ocorrem. Portanto, em uma fase móvel altamente polar as interações hidrofóbicas entre o analito e a FEQ tendem a predominar. Por outro lado, as interações eletrostáticas tendem a predominar em fases móveis de baixa polaridade (LÄMMERHOFER, 2010).

Tendo isso como base, a composição da fase móvel nas etapas de triagem foi avaliada utilizando a FR-CLAE e a PO-CLAE, não sendo avaliada a cromatografia líquida no modo normal (FN-CLAE). Na FR-CLAE a fase móvel é constituída por misturas de água, ou de soluções aquosas, com acetonitrila e com álcoois, como o metanol. Já na PO-CLAE a fase móvel contém apenas solventes orgânicos polares, como 100% de acetonitrila, 100% de álcoois, como metanol e etanol, ou então misturas entre eles (TACHIBANA; OHNISHI, 2001).

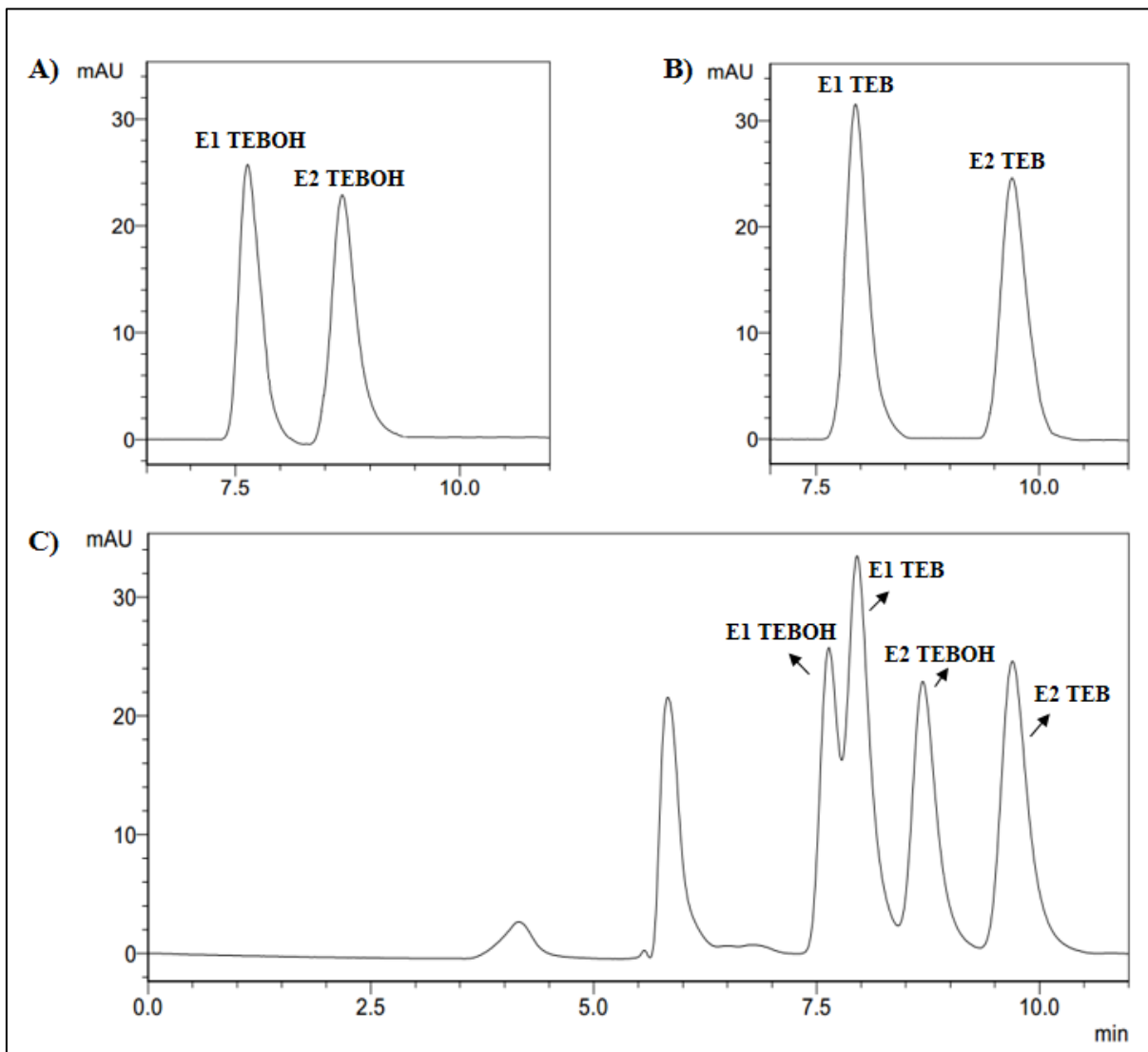
Apesar da FN-CLAE ser ainda um modo de eluição muito comum para separações enantiosseletivas, tanto a FR-CLAE quanto a PO-CLAE apresentam algumas vantagens quando comparadas a esta técnica. Dentre as vantagens podemos citar o menor custo de análise para a FR-CLAE, uma vez que hexano e isopropanol são os solventes mais utilizados em FN-CLAE e têm um custo elevado, e análises mais rápidas e maior solubilidade de compostos polares na

fase móvel para a PO-CLAE. Além disso, tanto a FR-CLAE quanto a PO-CLAE permitem um fácil acoplamento com a EM (MATTHIJS; MAFTOUH; HEYDEN, 2006; PERRIN et al., 2002). A CLAE-EM/EM possibilita que métodos altamente seletivos e com alto poder de detectabilidade sejam desenvolvidos, o que é muito importante para os estudos de metabolismo *in vitro*, uma vez que baixas concentrações de metabólitos tendem a ser formadas (JING et al., 2013).

Após as etapas de triagem descritas na **seção 3.4.6**, dentre todas as condições avaliadas em PO-CLAE e FR-CLAE (**Apêndice A e B**), os resultados obtidos com a coluna Chiralcel OJ[®] com fase estacionária constituída por celulose tris-(4-metilbenzoato), foram os mais promissores. Elucidar o mecanismo de reconhecimento quiral envolvido nas separações de enantiômeros é uma tarefa difícil, mas, nesse caso, a formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila presentes nas estruturas químicas do TEB e TEBOH e os grupamentos carbonila presentes na estrutura química da fase estacionária quiral podem ter contribuído para o reconhecimento quiral. Ademais, o grupamento fenil também pode ter estabelecido interações intermoleculares do tipo π - π com o anel aromático da FEQ (ZHOU et al., 2009).

Além disso, o primeiro modo de eluição testado foi a PO-CLAE e nesse caso uma R_s satisfatória entre os enantiômeros do TEB e TEBOH, separadamente, foi observada utilizando como fase móvel 100% de metanol, vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (**Figura 5A e Figura 5B**). Porém, conforme é possível observar na **Figura 5C**, houve coeluição entre o primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna (E1 TEBOH) e o primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna (E1 TEB) ($R_s < 1,5$). Contudo, o intuito inicial era empregar a CLAE-DAD como técnica de análise, sendo necessário, portanto, um valor de $R_s \geq 1,5$ entre todos os analitos. Como isso não aconteceu, prosseguiu-se com a triagem por FR-CLAE.

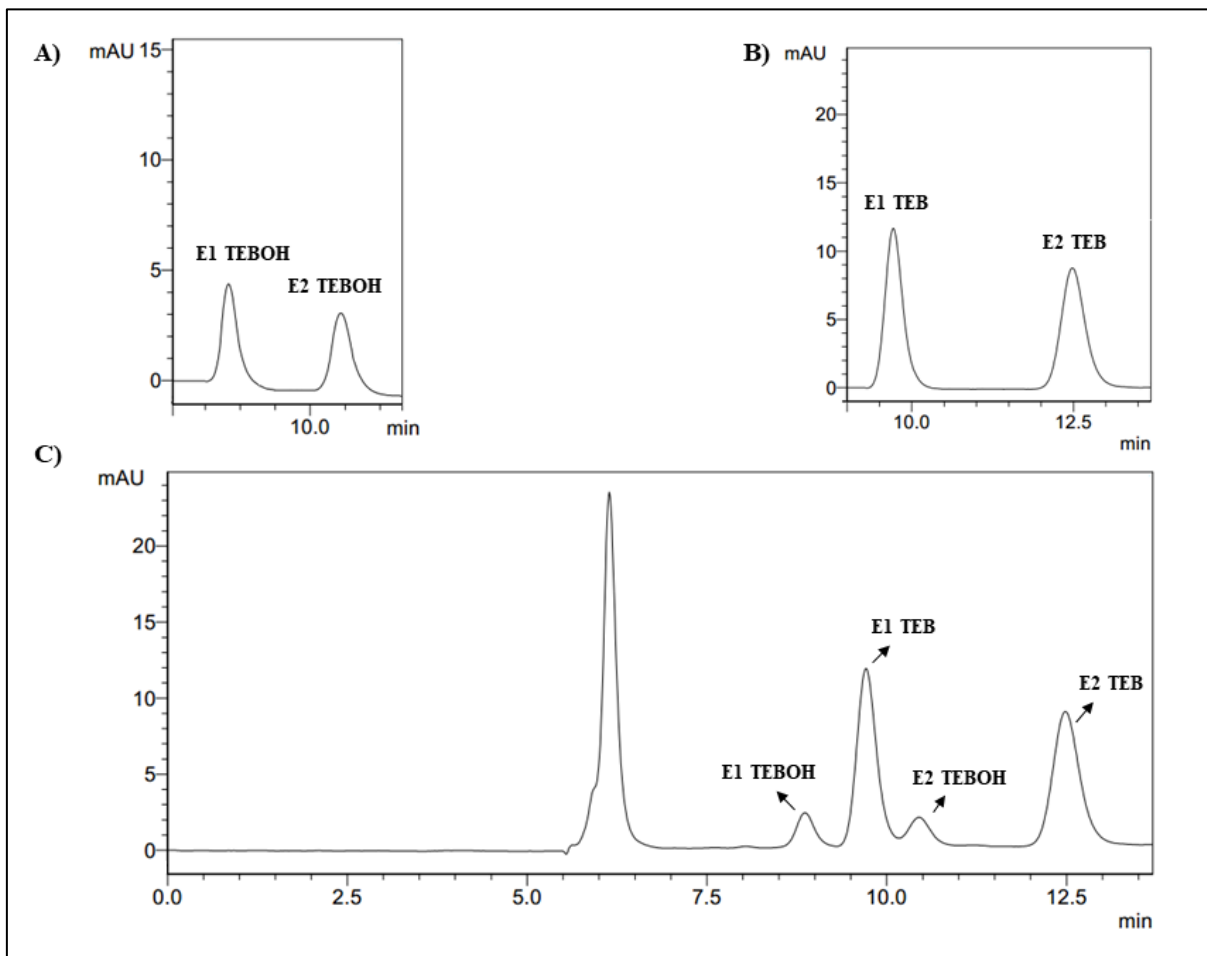
Figura 5- Cromatogramas representativos da análise enantiosseletiva, por PO-CLAE, do **A)** *rac*-TEBOH, **B)** *rac*-TEB e da mistura entre **C)** *rac*-TEBOH.



Condição cromatográfica: Coluna Chiralcel OJ[®] (250 mm x 4,6 mm, 10 μ m), 100% de metanol como fase móvel, vazão de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura de 20 \pm 2°C, detecção em 220 nm, volume injetado: 20 μ L. E1 TEBOH= primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E2 TEBOH= segundo enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E1 TEB= primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna; E2 TEB= segundo enantiômero do TEB a eluir da coluna. **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019- Material Suplementar.

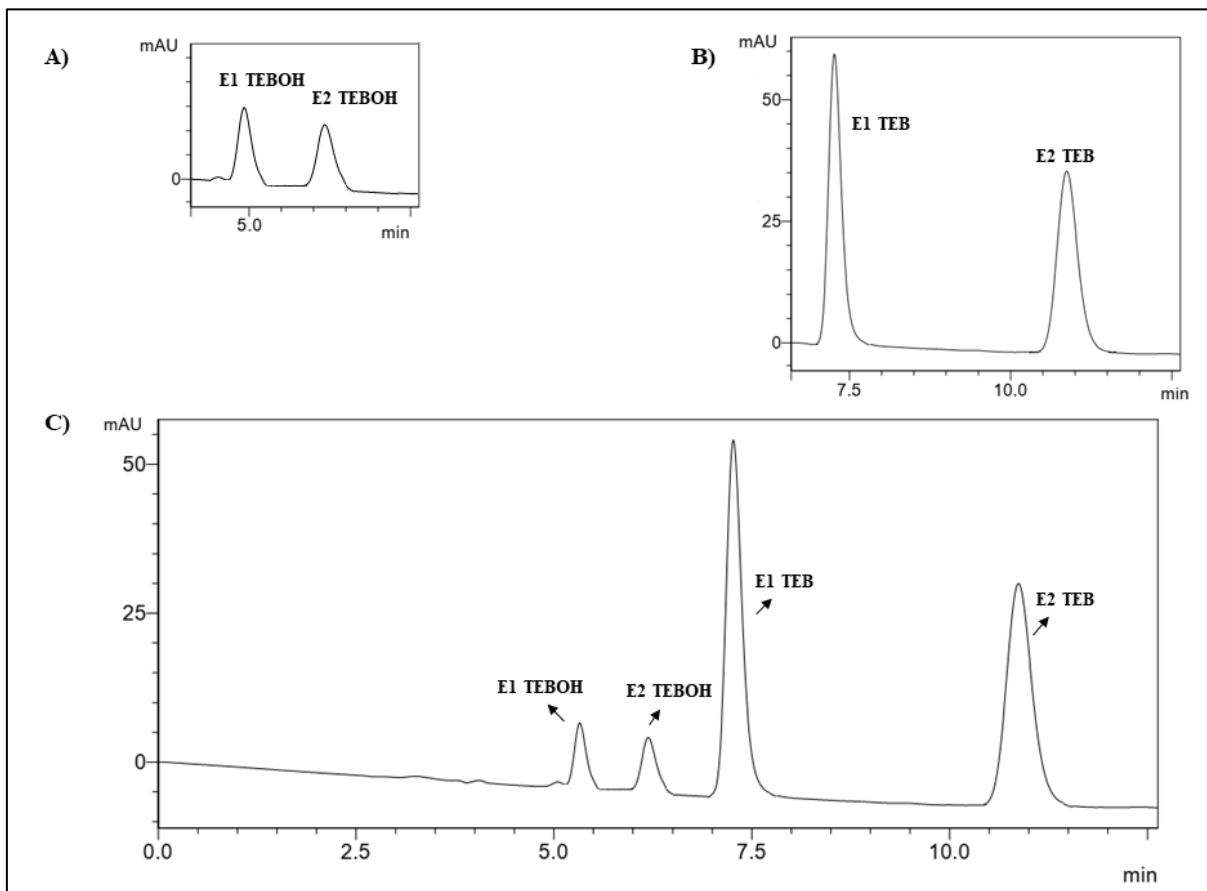
No caso da separação por FR-CLAE, as condições iniciais mais promissoras foram obtidas utilizando metanol: água (90:10 v/v) e acetonitrila: água (60:40 v/v) como fase móvel a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ e 0,7 mL min⁻¹, respectivamente, e temperatura da coluna de 20 \pm 2°C (**Figura 6** e **Figura 7**).

Figura 6- Cromatogramas representativos da análise enantiosseletiva, por FR-CLAE, do **A)** *rac*-TEBOH, **B)** *rac*-TEB e da mistura entre **C)** *rac*-TEBOH e *rac*-TEB.



Condição cromatográfica: Coluna Chiralcel OJ[®] (250 mm x 4,6 mm, 10 μ m), metanol: água (90:10 v/v) como fase móvel, vazão de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura de 20 \pm 2°C, detecção em 220 nm, volume injetado: 20 μ L. E1 TEBOH= primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E2 TEBOH= segundo enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E1 TEB= primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna; E2 TEB= segundo enantiômero do TEB a eluir da coluna. **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019- Material Suplementar.

Figura 7- Cromatogramas representativos da análise enantiosseletiva, por FR-CLAE, do **A)** *rac*-TEBOH, **B)** *rac*-TEB e da mistura entre **C)** *rac*-TEBOH e *rac*-TEB.



Condição cromatográfica: Coluna Chiralcel OJ[®] (250 mm x 4,6 mm, 10 μ m), acetonitrila: água (60:40 v/v) como fase móvel, vazão de 0,7 mL min⁻¹ e temperatura de 20 \pm 2°C, detecção em 220 nm, volume injetado: 20 μ L. E1 TEBOH= primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E2 TEBOH= segundo enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E1 TEB= primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna; E2 TEB= segundo enantiômero do TEB a eluir da coluna. **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019- Material Suplementar.

Apesar dessas condições serem promissoras, ensaios preliminares de preparo de amostra indicaram que interferentes da matriz, que absorviam no mesmo comprimento de onda dos analitos, eluíam também no mesmo t_R .

Diante dos fatos, uma otimização mais minuciosa foi realizada variando a composição da fase móvel, a vazão empregada e a temperatura da coluna. Ao final desta etapa, a melhor condição de análise foi obtida utilizando como fase móvel acetonitrila: água no modo de eluição por gradiente, temperatura da coluna de 32°C e vazão de 1,2 mL min⁻¹, iniciando com 35% de acetonitrila com um aumento linear para 60% em 8 minutos, permanecendo assim até 10 minutos. Em seguida, o gradiente retornava para a condição inicial em 10,5 minutos e permanecia por mais 2,5 minutos nessa condição antes da próxima análise, totalizando 13 minutos de corrida.

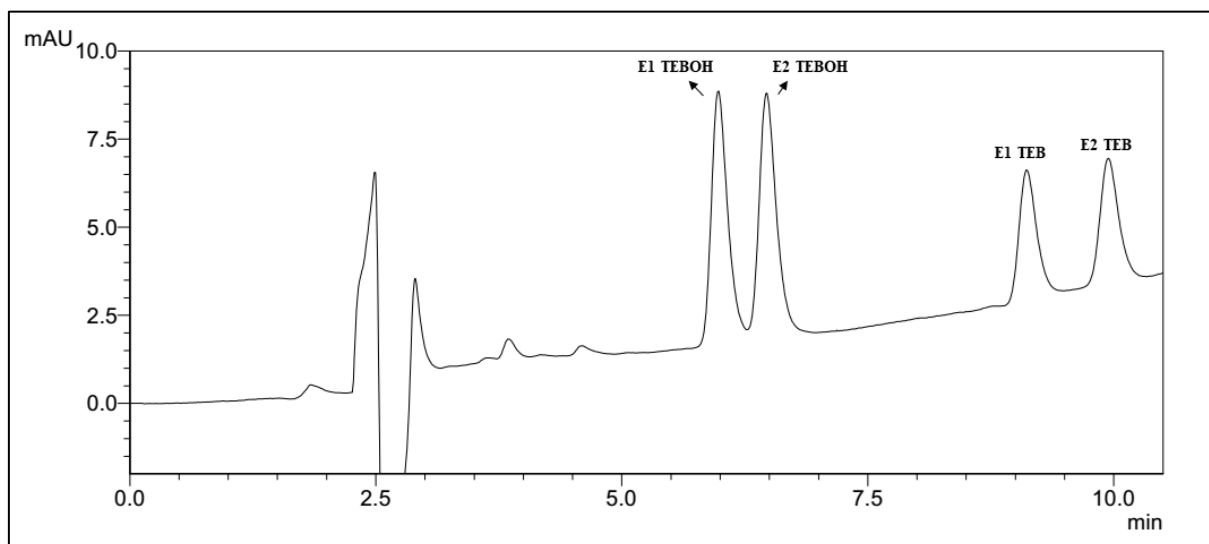
Conforme pode ser observado na **Tabela 4** e **Figura 8**, foram obtidos valores de $R_s \geq 1,5$ entre todos os analitos, sendo esse o método adotado de início para a análise das amostras provenientes dos estudos de metabolismo in vitro do TEB.

Tabela 4- Parâmetros cromatográficos para a análise enantiosseletiva do TEB e TEBOH por FR-CLAE.

Analitos	Tempo de retenção (min)	R_s
E1 TEBOH	6,0	—
E2 TEBOH	6,5	1,5 ^a
E1 TEB	9,1	7,9 ^b
E2 TEB	9,9	2,4 ^c

R_s = Resolução entre os picos ^aE1 TEBOH/E2 TEBOH, ^bE2 TEBOH/E1 TEB, ^cE1 TEB/E2 TEB. **Fonte:** Autoria própria.

Figura 8- Cromatograma representativo da separação quiral do *rac*-TEB e *rac*-TEBOH por FR-CLAE.



Condições cromatográficas: Coluna Chiralcel OJ[®] (250 mm x 4,6 mm, 10 μ m), eluição por gradiente com vazão de 1,2 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 μ L e temperatura da coluna de 32°C. Inicialmente manteve-se 35% de acetonitrila, com um aumento linear para 60% em 8 minutos, permanecendo até 10 minutos. Em 10,5 minutos retornou-se para a condição inicial, permanecendo por mais 2,5 minutos até a próxima análise. Comprimento de onda = 220 nm. E1 TEBOH= primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E2 TEBOH= segundo enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E1 TEB= primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna; E2 TEB= segundo enantiômero do TEB a eluir da coluna. **Fonte:** Autoria própria.

3.5.2. Preparo de amostra por extração líquido-líquido (ELL)

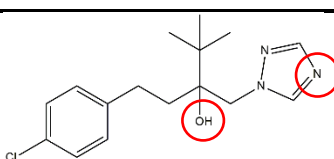
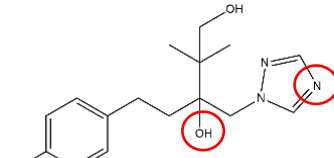
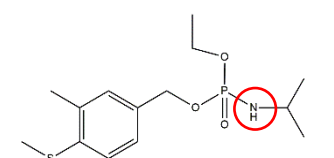
Em estudos de metabolismo in vitro com microsomas hepáticos, a matriz é considerada relativamente complexa por ser constituída, principalmente, por proteínas, lipídios e organelas celulares. Então, é necessário eliminar possíveis interferentes presentes na matriz e tornar a

amostra compatível com o sistema de análise. Para isso, é feito o preparo de amostra e, nesse caso, a técnica escolhida foi a ELL

A ELL é uma técnica simples que permite a utilização de diversos solventes disponíveis comercialmente e que fornecem uma ampla faixa de seletividade (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Ademais, essa técnica possibilita a concentração dos analitos, o que é uma vantagem para esses estudos, uma vez que, na maioria das vezes, o metabólito é formado em baixas concentrações.

Na ELL, o uso do padrão interno é muito importante, pois tende a corrigir erros provocados, por exemplo, pela manipulação da amostra. O PI deve apresentar propriedades físico-químicas semelhantes aos analitos (**Tabela 5**), como o valor do logaritmo decimal do coeficiente de partição octanol/água ($\log P$), não deve reagir com nenhum dos componentes da amostra e nem mesmo estar presente na matriz. Além disso, na separação cromatográfica, o PI deve estar bem resolvido dos demais picos e, de preferência, não deve aumentar o tempo de análise (LIGIERO et al., 2009). Todos esses critérios foram utilizados como base para a escolha do PI, e dentre diversos compostos analisados, o FEN foi escolhido.

Tabela 5- Estruturas e propriedades físico-químicas dos analitos.

Analito	Estrutura	$\log P$	pKa	Grupamento Ionizável
Tebuconazol		3,77	13,70 ± 0,29 3,27 ± 12	Hidroxila Imina
1-hidroxitebuconazol		2,46	13,34 ± 0,29 3,16 ± 0,12	Hidroxila Imina
Fenamifós		3,18	-0,09 ± 0,70	Amina

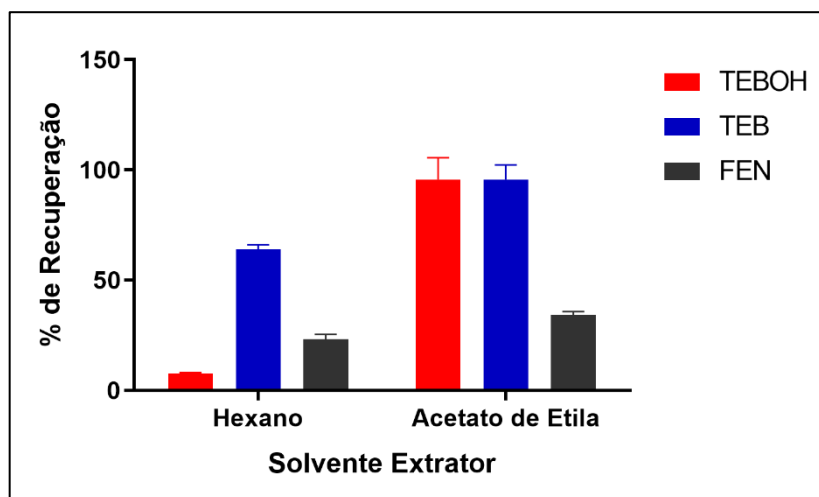
Os grupamentos ionizáveis estão destacadas em vermelho. **Fonte:** AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2021.

O primeiro parâmetro avaliado durante a otimização da ELL foi a escolha do solvente extrator. Como o meio de incubação era composto majoritariamente por solução tampão, foram avaliados solventes imiscíveis com a água, no caso hexano, diclorometano, clorofórmio e

acetato de etila. Ademais, o pH do meio de incubação era de 7,4 e nesse pH, de acordo com os valores de pKa e de acordo com as estruturas químicas dos analitos (**Tabela 5**), todos permaneciam no meio em sua forma não ionizada, favorecendo assim a partição destes para a fase orgânica. Dessa forma, não houve necessidade do uso de aditivos para modificar o valor do pH da amostra.

Os resultados iniciais das análises cromatográficas mostraram que, ao utilizar o diclorometano e o clorofórmio como solventes extratores, o método não foi seletivo, uma vez que interferentes da matriz eluíam no mesmo t_R dos analitos de interesse. Então, optou-se por avaliar as recuperações do TEB, TEBOH e FEN empregando apenas hexano e acetato de etila.

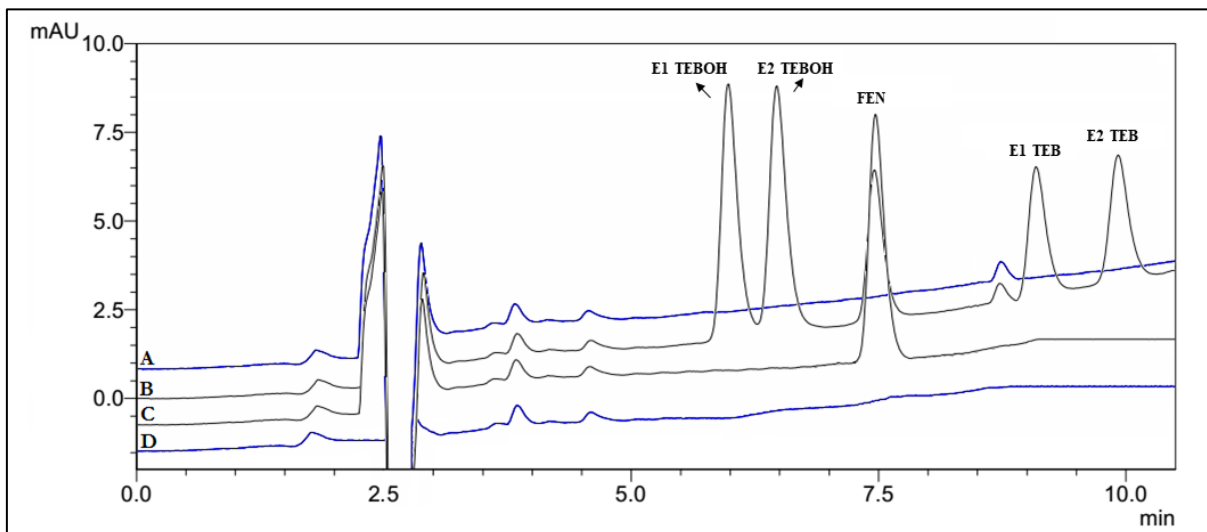
Figura 9- Avaliação do solvente empregado na extração do TEB, TEBOH e FEN.



Condição: 1000 μL de solvente, 10 minutos de agitação a 1000 rpm e 10 minutos de centrifugação a 1780 $\times g$ a 4°C. Os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$) e os resultados estão expressos como média \pm estimativa do desvio padrão. **Fonte:** Autoria própria.

Como pode ser observado na **Figura 9**, a extração dos analitos foi mais eficiente ao utilizar acetato de etila como solvente extrator e as porcentagens de recuperação absoluta do TEBOH, TEB e FEN foram de 95%, 96% e 35%, respectivamente. Apesar da porcentagem de recuperação do FEN ter sido relativamente baixa (35%), a repetibilidade foi satisfatória ($\text{DPR}\% < 15\%$), indicando que esse composto pode ser usado como PI nas análises. Além disso, com o emprego do acetato de etila, interferentes não foram observados nos t_R dos analitos, como pode ser observado na **Figura 10**. Dessa forma, o acetato de etila foi o solvente de escolha para ELL.

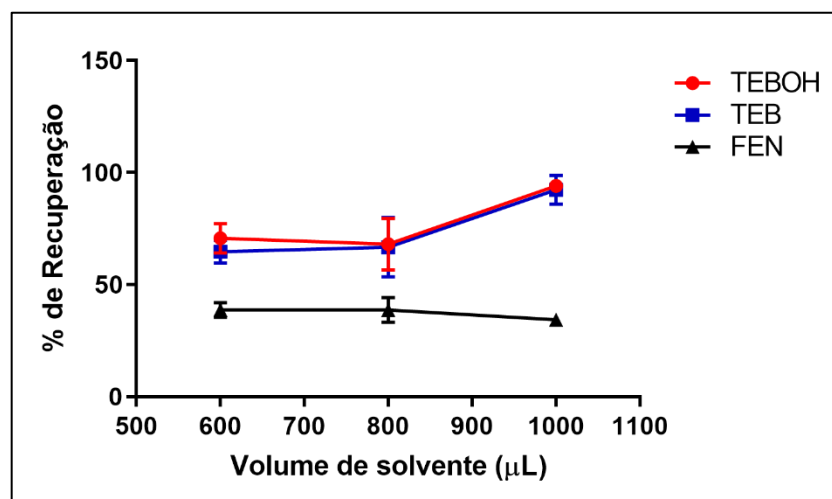
Figura 10- Cromatogramas representativos obtidos por CLAE-DAD após a ELL utilizando acetato de etila.



(—) Após ELL do branco monitorando **A)** 220 nm e **D)** 254 nm; (—) após a ELL do TEB, TEBOH e FEN monitorando **B)** 220 nm para o TEB e TEBOH e **C)** 254 nm para o FEN. E1 TEBOH= primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E2 TEBOH= segundo enantiômero do TEBOH a eluir da coluna; E1 TEB= primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna; E2 TEB= segundo enantiômero do TEB a eluir da coluna. **Fonte:** Autoria própria.

Em seguida, a recuperação dos analitos utilizando 600 μL , 800 μL e 1000 μL de acetato de etila foi avaliada com o intuito de verificar a possibilidade de diminuir o volume de solvente orgânico empregado durante a extração.

Figura 11- Influência do volume de acetato de etila na recuperação dos analitos.

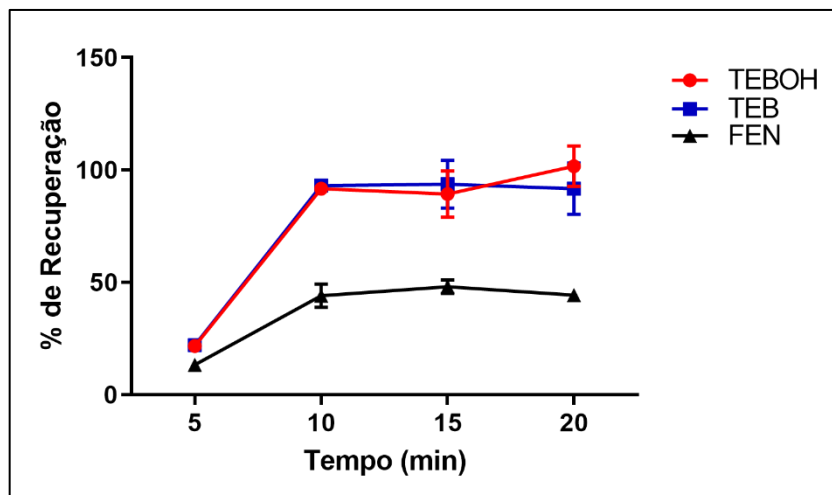


Condição: 10 minutos de agitação a 1000 rpm e 10 minutos de centrifugação a 1780 $x g$ a 4°C. Os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$) e os resultados estão expressos como média \pm estimativa do desvio padrão. **Fonte:** Autoria própria.

Como pode ser observado pela **Figura 11**, a porcentagem de recuperação do FEN manteve-se constante em todas as condições avaliada, porém, para o TEB e TEBOH a extração foi mais eficiente utilizando 1000 μL de acetato de etila.

Por fim, foi avaliada a influência do tempo de agitação das amostras na recuperação dos analitos com o objetivo de diminuir o tempo gasto durante a extração.

Figura 12- Influência do tempo de agitação na recuperação dos analitos.



Condição: 1000 μL de acetato de etila, agitação a 1000 rpm e 10 minutos de centrifugação a 1780 xg a 4°C. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3) e os resultados estão expressos como média \pm estimativa do desvio padrão. **Fonte:** Autoria própria.

Como pode ser observado pela **Figura 12**, a partir de 10 minutos de agitação a 1000 rpm a extração dos analitos atingiu o estado de equilíbrio e a porcentagem de recuperação destes permaneceu constante. Logo, o tempo de agitação das amostras foi fixado em 10 minutos.

Com isso, as condições finais de preparo de amostra utilizadas nos estudos de metabolismo in vitro do TEB estão apresentadas na **Tabela 6**.

Tabela 6- Condições finais após otimização dos parâmetros para ELL.

Parâmetro	Condição após otimização
Volume de amostra (μL)	200
Solvente extrator	Acetato de etila
Volume do solvente extrator (μL)	1000
Volume de fase orgânica coletada (μL)	800
PI	Fenamifós (21 $\mu\text{mol L}^{-1}$)
Volume de PI adicionado (μL)	30
Tempo de agitação das amostras (minutos)	10

Parâmetro	Condição após otimização
Velocidade de agitação (rpm)	1000
Centrifugação	1780 ×g por 10 minutos a 4 °C

Fonte: Autoria própria

3.5.3. Desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-EM/EM

Após o desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-DAD utilizando gradiente (seção 3.5.1) e após a otimização do preparo de amostra por ELL (seção 3.5.2) foram feitos estudos preliminares de metabolismo in vitro com o TEB. Esses estudos preliminares indicaram problemas tanto de seletividade, quanto de detectabilidade do método.

Apesar da ELL ter possibilitado uma recuperação satisfatória para o TEBOH (95%), nenhum dos enantiômeros foi detectado por CLAE-DAD após o *rac*-TEB (8,1 μmol L⁻¹, concentração baixa) ser incubado por 50 minutos com HLM (0,5 mg mL⁻¹) na presença do sistema de regeneração de NADPH, confirmando a necessidade de uma técnica analítica mais sensível. A técnica escolhida no caso foi a CLAE-EM/EM, cuja sensibilidade e seletividade permitem a quantificação de analitos em concentrações menores do que aquelas obtidas pela maioria dos detectores utilizados com cromatografia líquida (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

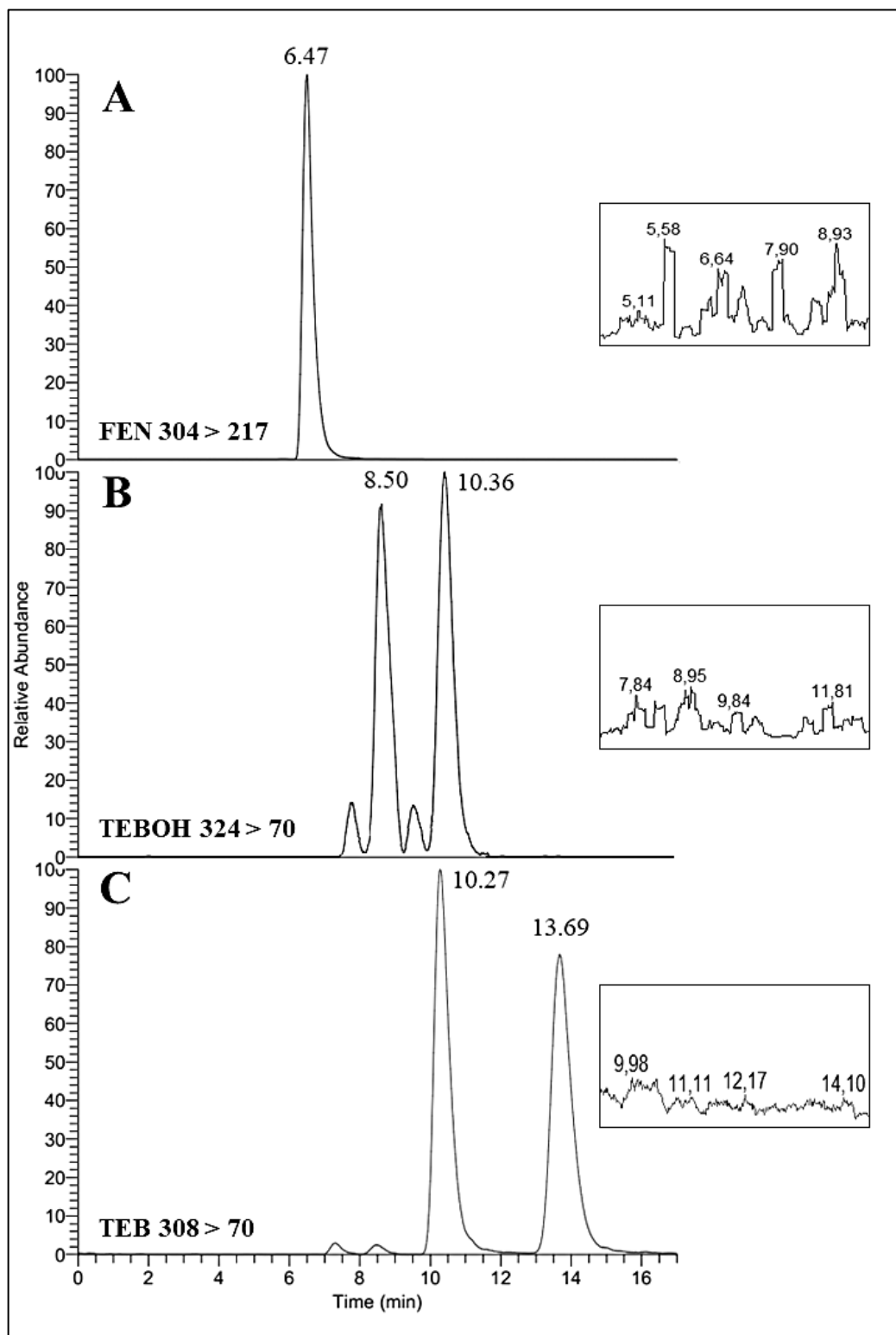
Além disso, embora o método por gradiente desenvolvido por CLAE-DAD tenha se mostrado inicialmente seletivo (seção 3.5.1), após sua transposição para o CLAE-EM/EM observou-se que, ao analisar amostras provenientes de reações de metabolismo recentemente preparadas, dois picos interferentes com o mesmo perfil de fragmentação do TEBOH não eram resolvidos dos enantiômeros deste. Dessa forma, para resolver esse problema, as melhores condições de análise obtidas durante o processo de triagem por CLAE-DAD foram utilizadas como base para uma nova otimização do método analítico enantiosseletivo por CLAE-EM/EM.

De imediato, a separação dos analitos foi ajustada reavaliando a composição da fase móvel (metanol: água e acetonitrila: água, com e sem ácido fórmico), vazão (0,1- 0,6 mL min⁻¹) e a temperatura do forno (20- 32°C).

Ao final dessa etapa a melhor condição foi obtida empregando a coluna Chiralcel OJ[®] (250 x 4,6 mm, 10 μm), fase móvel composta por metanol:água (90:10 v/v, modo isocrático), vazão de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 25°C. O volume de injeção foi de 10 μL e o amostrador automático foi mantido a 10°C. *Rac*-TEB, *rac*-TEBOH e FEN (PI), preparados em metanol: água 90:10 v/v a uma concentração de 1 mg L⁻¹, foram infundidos diretamente no EM

a uma vazão de $0,03 \text{ mL min}^{-1}$ e, após ajustes automáticos do equipamento, os parâmetros utilizados nas análises foram os seguintes: tensão do capilar de $+5000\text{V}$, temperatura do capilar de 320°C , temperatura de vaporização de 290°C , pressão do gás de dessolvatação (nitrogênio) de 10 unidades (escala arbitrária), pressão do gás auxiliar de 5 unidades (escala arbitrária) e tensão do cone de 110 V . A dissociação induzida por colisão foi realizada utilizando argônio a uma pressão de $2,1 \text{ mTorr}$. Os analitos foram detectados no modo positivo e a quantificação e confirmação destes foram baseadas no MRM, monitorando as seguintes transições m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: para o FEN $304 \rightarrow 217$ (quantificação, EC 23 V) e $304 \rightarrow 202$ (confirmação, EC 34 V); para o TEB $308 \rightarrow 70$ (quantificação, EC 21 V) e $308 \rightarrow 125$ (confirmação, EC 33 V); para o TEBOH $324 \rightarrow 70$ (quantificação, EC 21 V) e $324 \rightarrow 125$ (confirmação, EC 40 V). Como pode ser observado na **Figura 13**, os valores de resolução entre os enantiômeros do TEB e TEBOH (R_s 2,8 entre E2 TEB e E1 TEB e R_s 2,0 entre E2 TEBOH e E1 TEBOH) e também entre os enantiômeros do TEBOH e os interferentes (R_s 1,5) são satisfatórias e o método desenvolvido foi seletivo, uma vez que não há interferentes da matriz eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos.

Figura 13- Cromatogramas representativos para a análise enantiosseletiva de TEB, TEBOH e PI por CLAE-EM/EM de uma amostra obtida após incubação do *rac*-TEB com HLM e NADPH.



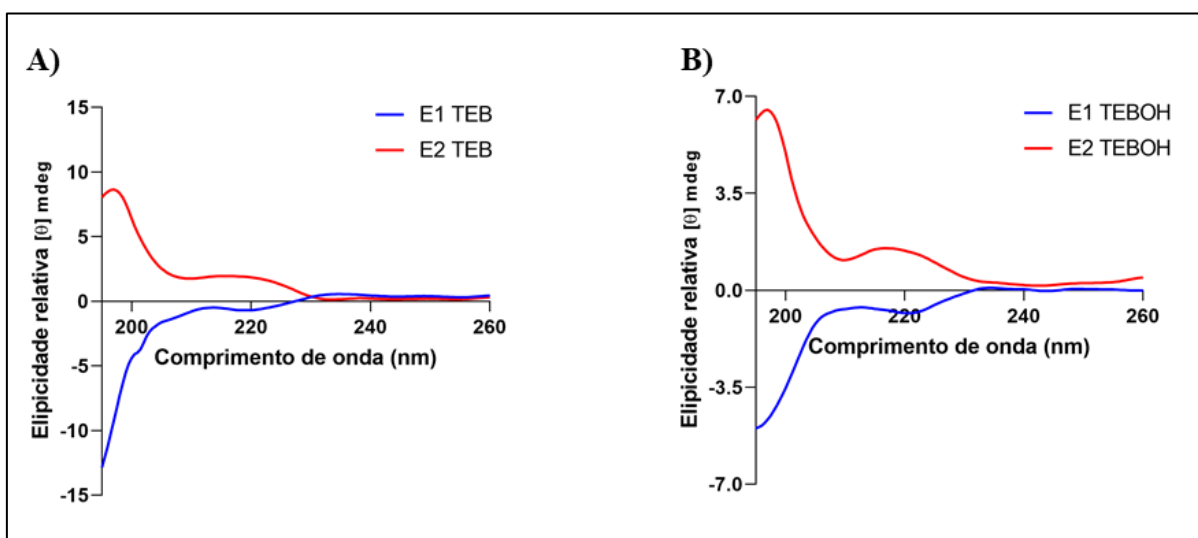
A) Cromatograma para o PI [FEN, t_R de 6,47 minutos), **B)** E1 TEBOH= primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna (t_R de 8,50 minutos) e E2 TEBOH= segundo enantiômero do TEBOH a eluir da coluna (t_R de 10,36 minutos) e **C)** E1 TEB= primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna (t_R de 10,27 minutos) e E2 TEB= segundo enantiômero do TEB a eluir da coluna (t_R de 13,49 minutos). Em destaque estão os cromatogramas resultantes da análise de uma amostra branco. Condição de incubação: *rac*-TEB ($75 \mu\text{mol L}^{-1}$), 20 minutos de incubação com HLM ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) e NADPH. **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019.

3.5.4. Determinação da atividade óptica dos enantiômeros do TEB e TEBOH, das configurações absolutas e confirmação da ordem de eluição

Após o desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por CLAE-EM/EM, a atividade óptica dos enantiômeros do TEB e TEBOH foi determinada utilizando a técnica de DC. O DC permite medir a diferença de absorção, pelos enantiômeros, entre a luz polarizada direita e a luz polarizada esquerda (JENNINGS, 1992). Assim, os enantiômeros isolados pelo método descrito na **seção 3.4.5**, inicialmente denominados como E1 TEB (primeiro enantiômero do TEB a eluir da coluna), E2 TEB (segundo enantiômero do TEB a eluir da coluna), E1 TEBOH (primeiro enantiômero do TEBOH a eluir da coluna) e E2 TEBOH (segundo enantiômero do TEBOH a eluir da coluna), foram solubilizadas na mesma fase móvel utilizada durante as análises por CLAE-EM/EM, ou seja, metanol: água (90:10 v/v) e então as análises por DC foram feitas.

De acordo com os resultados, E1 TEB e E2 TEB correspondem a (–)-TEB e (+)-TEB, pois apresentaram efeito cóton negativo e efeito cóton positivo, respectivamente em 200 e 220 nm (**Figura 14A**). Da mesma maneira, E1 TEBOH e E2 TEBOH correspondem a (–)-TEBOH e (+)-TEBOH, pois também apresentaram efeito cóton negativo e efeito cóton positivo, respectivamente, em 200 e 220 nm (**Figura 14B**).

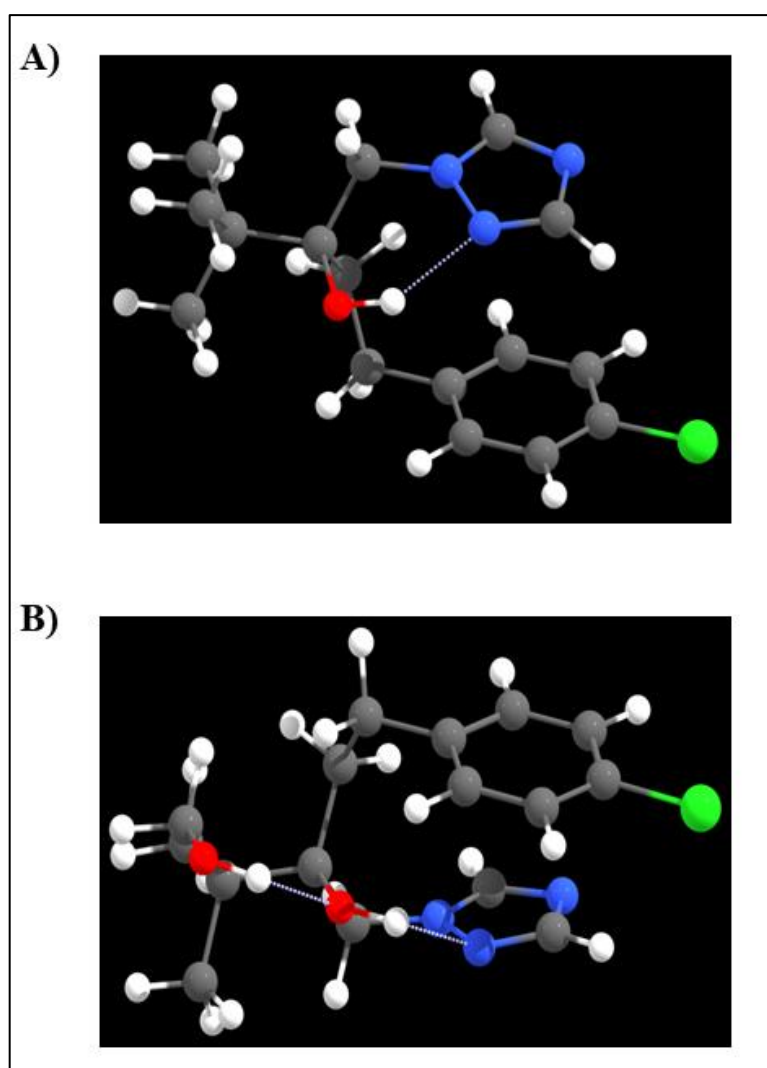
Figura 14- Figuras representativas das análises por DC dos enantiômeros isolados do TEB e TEBOH após serem solubilizados em metanol: água (90:10, v/v).



A) (—) E1 TEB e (—) E2 TEB, **B)** (—) E1 TEBOH e (—) E2 TEBOH. **Fonte:** Autoria própria

Em seguida, as configurações absolutas dos enantiômeros foram determinadas por cálculos teóricos de DCE. Apenas o isômero mais estável de cada enantiômero foi usado nos cálculos (o mais estável totalizou mais de 90% da população de isômeros). Embora a pesquisa de conformação não tenha sido extensa, era altamente improvável que um isômero mais estável aparecesse. Observou-se então que os isômeros mais estáveis do TEB e TEBOH faziam ligações de hidrogênio internas, e seus anéis aromáticos eram arranjados em orientações inclinadas (**Figura 15A** e **Figura 15B**).

Figura 15- Representações esféricas dos isômeros mais estáveis **A)** *S*-TEB **B)** *R*-TEBOH no nível B3LYP-D3 / def2-TZVP (-f).

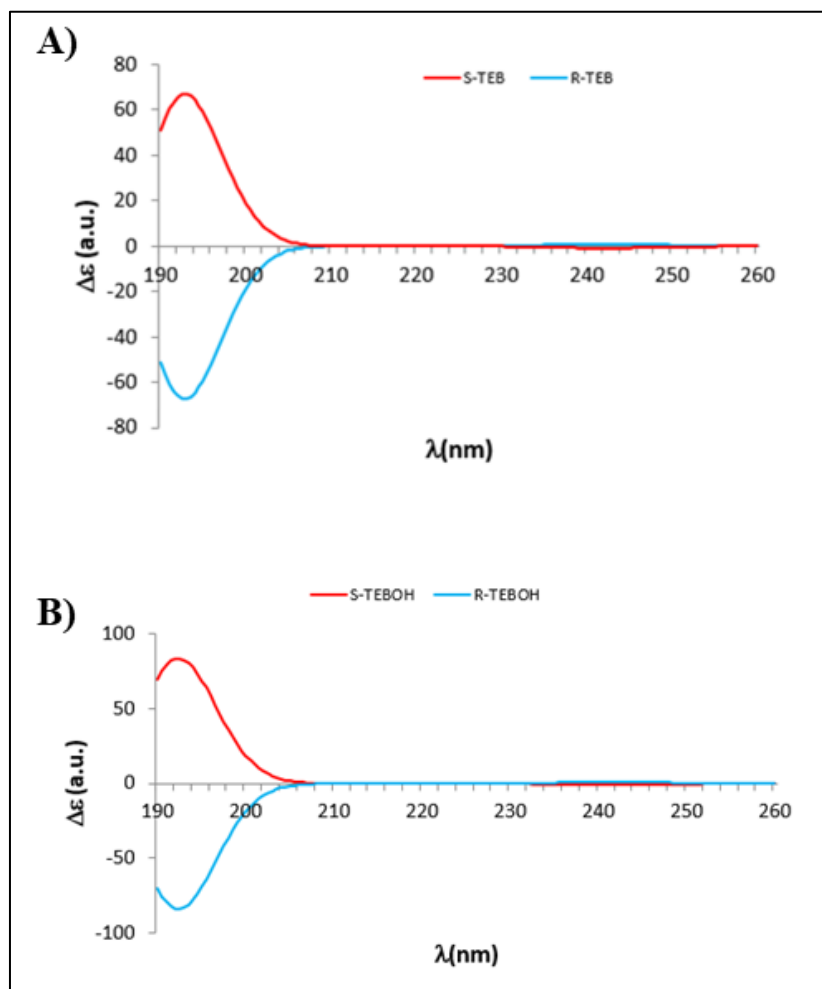


A linha pontilhada representa uma ligação de hidrogênio entre os átomos doadores e receptores. Os átomos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e cloro são representados por esferas cinza, branca, azul e verde, respectivamente.
Fonte: Autoria própria.

Dessa maneira, os espectros de DCE teóricos foram obtidos para as configurações mais estáveis dos enantiômeros do TEB e TEBOH e observou-se que *S*-TEB e *S*-TEBOH

apresentavam efeito cóton positivo, sendo então classificados como *S*-(+)-TEB e *S*-(+)-TEBOH, enquanto que os espectros do *R*-TEB e *R*-TEBOH apresentavam efeito cóton negativo, sendo classificados como *R*-(-)-TEB e *R*-(-)-TEBOH (**Figura 16**).

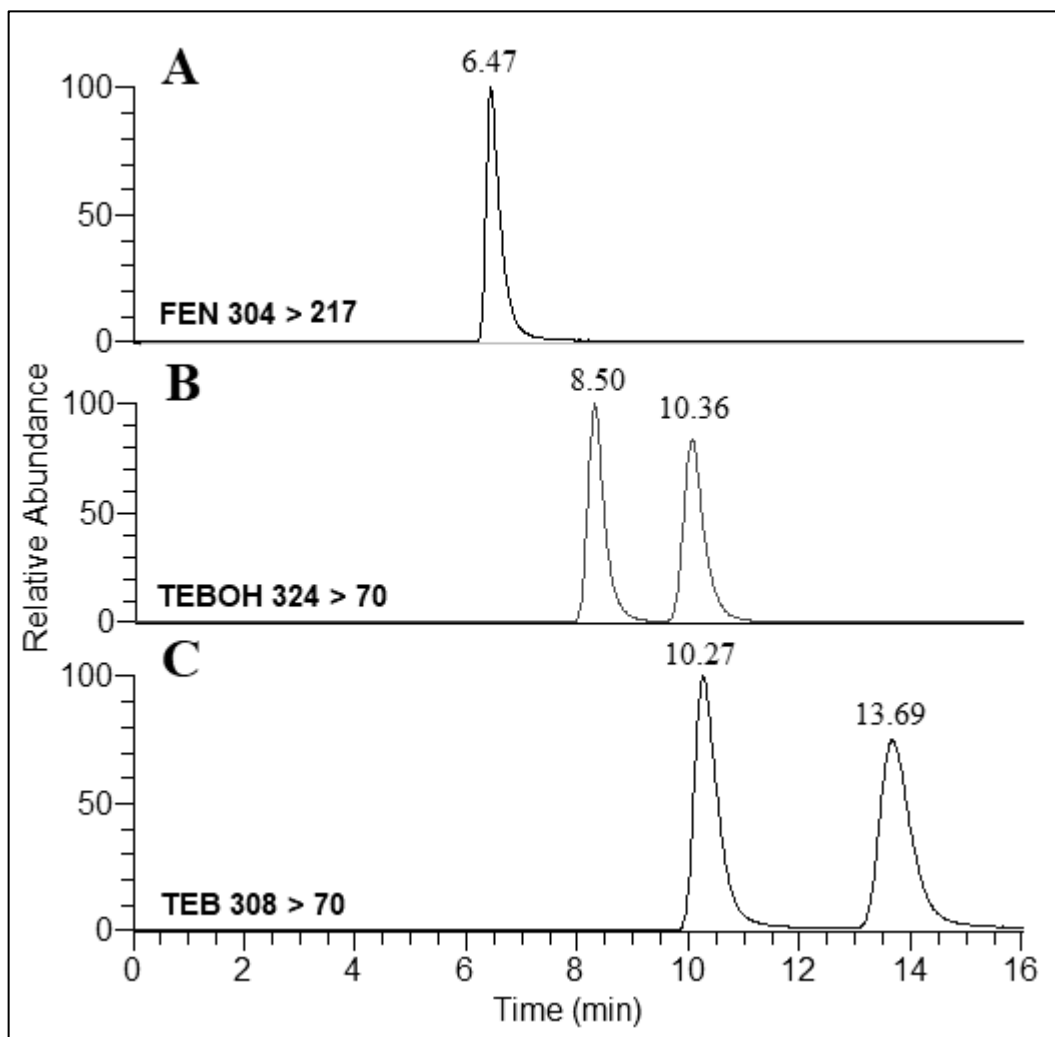
Figura 16- Espectros de DCE teóricos preditos por cálculos ω B97X-D3/def2-TZVP:



A) (—) *S*-TEB e (—) *R*-TEB e **B)** (—) *S*-TEBOH e (—) *R*-TEBOH. Os espectros são curvas Gaussianas que foram calculadas utilizando $\sigma = 0.2$ eV. **Fonte:** Autoria própria.

Finalmente, a ordem de eluição dos enantiômeros do TEB e TEBOH no método analítico desenvolvido por CLAE-EM/EM (**seção 3.5.3**) foi determinada por injeção individual dos enantiômeros identificados. A ordem de eluição obtida foi: *S*-(+)-TEBOH (t_R de 8,50 min), *S*-(+)-TEB (t_R de 10,27 min), *R*-(-)-TEBOH (t_R de 10,36 min) e *R*-(-)-TEB (t_R de 13,69 min) (**Figura 17**).

Figura 17- Cromatogramas obtidos após a análise enantiosseletiva de soluções padrão de TEB, TEBOH e FEN por CLAE-EM/EM.



A) o cromatograma para o PI (FEN, t_R de 6,47 minutos), **B)** *S*-(+)-TEBOH (t_R de 8,50 minutos) e *R*-(-)- TEBOH (t_R de 10,36 minutos) e **C)** *S*-(+)-TEB (t_R de 10,27 minutos) e *R*-(-)-TEB (t_R de 13,49 minutos). Concentração dos analitos = 100 ng mL⁻¹. **Fonte:** Autoria própria.

3.5.5. Validação do método analítico

O método analítico enantiosseletivo desenvolvido para ser empregado nos estudos de metabolismo *in vitro* foi validado com o intuito de garantir um desempenho adequado deste em toda a faixa de concentração de TEB e TEBOH para o qual seria aplicado, bem como garantir a confiabilidade dos resultados cinéticos que seriam obtidos (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004). Para isso foi utilizado como base os critérios de aceitação do guia de validação para métodos bioanalíticos da Agência Europeia de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012), uma vez que a matriz dos estudos, HLM, é biológica.

Os parâmetros avaliados foram linearidade, seletividade, efeito residual, LIQ, precisão e exatidão intra- e interensaio, efeito matriz e estabilidade.

- Linearidade

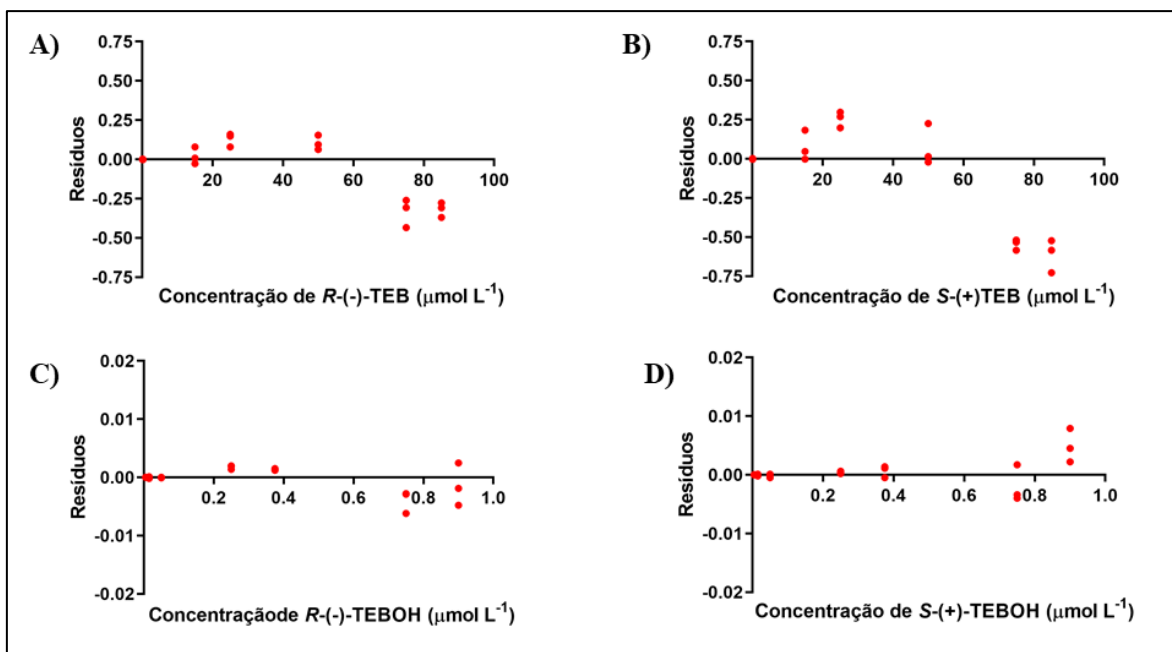
A linearidade avalia, em um determinado intervalo de concentrações do analito, a proporcionalidade entre tais concentrações e a resposta do instrumento. Se as respostas do instrumento forem diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, a curva de calibração segue o modelo de regressão linear (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

Para avaliar a linearidade das curvas de calibração para o *S*-(+)- e *R*-(-)-TEB (0,125- 85,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e para o *S*-(+)- e *R*-(-)-TEBOH (0,005- 0,900 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram calculadas as equações da regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados. Porém os resultados obtidos não foram homocedásticos, ou seja, havia tendência na distribuição dos resíduos. Além disso, os valores de exatidão não eram aceitáveis (ER % $\leq \pm 20\%$ para o LIQ e $\pm 15\%$ para os demais pontos) para os níveis de concentração mais baixos. Isso ocorria, provavelmente, devido ao amplo intervalo de concentrações utilizado (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

Então, uma forma de contornar esse problema foi avaliar a regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados ordinários ponderados, sendo empregados os pesos de $1/x$, $1/x^2$ e $1/x^{1/2}$. Com isso, os erros nas concentrações baixas da curva de calibração eram minimizados (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). Observou-se então que a ponderação de $1/x^2$ foi a que apresentou os melhores resultados para todos os analitos, com a menor somatória de resíduos. Além disso, empregando tal ponderação os resíduos apresentaram uma distribuição homocedástica, como é possível ver na **Figura 18**.

Dessa forma, os resultados demonstraram que as curvas de calibração foram lineares no intervalo de concentração de 0,125- 85,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o *S*-(+)- e *R*-(-)-TEB e de 0,005- 0,900 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o *S*-(+)- e *R*-(-)-TEBOH, respectivamente. Os dados da linearidade foram expressos em função do coeficiente angular, linear e também do coeficiente de correlação linear (**Tabela 7**). Além disso, foi feito o teste ANOVA de falta de ajuste (ANOVA, *lack of fit*) e, para todos os analitos, o valor de F calculado foi menor que o valor crítico (2,85) e o valor de p foi maior que 0,05 ($\alpha = 5\%$), o que comprova a ausência de falta de ajuste da curva de calibração (**Tabela 7**).

Figura 18- Gráfico de resíduos para o **A)** *R*-(-)-TEB, **B)** *S*-(+)-TEB, **C)** *R*-(-)-TEBOH e **D)** *S*-(+)-TEBOH após avaliação da regressão linear simples pelo método de mínimos quadrados ordinários ponderados utilizando $1/x^2$ como peso.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 7- Linearidade do método analítico desenvolvido.

Analitos	Intervalo de concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Equação linear	r^a	ANOVA falta de ajuste	
				Valor de F^b	Valor de p^c
<i>S</i> -(+)-TEB	0,125 – 85,00	$y = 0,1097x + 0,0099$	0,9978	2,04	0,135
<i>R</i> -(-)-TEB	0,125 – 85,00	$y = 0,1079x + 0,0084$	0,9993	2,57	0,075
<i>S</i> -(+)-TEBOH	0,005 – 0,900	$y = 0,1352x - 0,0005$	0,9993	1,92	0,152
<i>R</i> -(-)-TEBOH	0,005 – 0,900	$y = 0,1219x - 0,0005$	0,9992	2,71	0,065

^a coeficiente de correlação linear; ^b $F_{\text{crítico}} < F_{\text{calculado}} = 2,85$; ^c $p > 0,05$, nível de significância de 95%. Fonte: HABENSCHUS et al., 2019.

- Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de diferenciar os analitos de interesse, e o PI, de outros componentes da amostra (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012). Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2016).

A seletividade do método foi avaliada através da análise do branco microsomal. Como pôde ser observado anteriormente na **Figura 13** (seção 3.5.3) o método mostrou ser seletivo,

uma vez que não houve eluição de picos interferentes no mesmo t_R dos enantiômeros do TEB, TEBOH e também do FEN (PI).

- Efeito Residual (carry over)

O efeito residual, também chamado de *carry over*, é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal dos analitos e do PI devido a contaminação provocada por amostras que foram anteriormente analisadas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012). O efeito residual foi avaliado através da análise de cromatogramas do branco microsomal obtidos logo após a injeção do LSQ dos analitos, na presença do PI. Os resultados confirmaram a não existência de efeito residual, uma vez que não foram observados, nesses cromatogramas, a presença de picos que eluíam no mesmo t_R dos analitos de interesse e do PI.

- Limite inferior de quantificação (LIQ)

O LIQ é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser quantificada de forma confiável, com exatidão e precisão aceitáveis (ER% de $\pm 20\%$ e DPR $\leq 20\%$, respectivamente) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012). O LIQ estabelecido para o método foi de $0,125 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o *S*-(+)- e *R*-(-)-TEB e $0,005 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o *S*-(+)- e *R*-(-)-TEBOH com DPR% máximo de 10,7% e valores de ER% entre -1,1 e 4,8%.

- Precisão e exatidão intra- e interensaio

A precisão de um método descreve o quão próximas estão as repetições de medições individuais dos analitos de interesse e pode ser expressa em função do DPR%. Já a exatidão descreve o quão próxima a concentração do analito que foi determinada pelo método está em relação a sua concentração nominal e pode ser expressa em função do ER% (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012). A precisão e a exatidão do método foram avaliadas intra- e interensaio e, como é possível observar pelos resultados (**Tabela 8**), o método apresentou exatidão e precisão aceitáveis com base nos critérios estabelecidos pelo guia de validação de métodos bioanalíticos da EMA (DPR% $\leq 15\%$ e $\leq 20\%$ para o LIQ e ER% entre $\pm 15\%$ e $\pm 20\%$ para o LIQ).

Tabela 8- Precisão e exatidão intra- e interensaio.

	Analito	Concentração Nominal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Precisão (%DPR)^a	Exatidão (%ER)^b
Intraensaio (n=5)	<i>S</i> -(+)-TEB	0,125 / 0,250 / 25,00 / 75,00	0,131 / 0,243 / 27,52 / 69,42	10,7 / 2,0 / 1,5 / 1,5	4,8 / -2,7 / 10,1 / -7,4
	<i>R</i> -(-)-TEB	0,125 / 0,250 / 25,00 / 75,00	0,128 / 0,244 / 26,49 / 71,20	8,0 / 2,5 / 1,9 / 1,7	2,7 / -2,4 / 6,0 / -5,1
	<i>S</i> -(+)-TEBOH	0,005 / 0,015 / 0,250 / 0,750	0,005 / 0,014 / 0,251 / 0,759	3,1 / 7,3 / 2,2 / 2,6	1,3 / -6,2 / 0,2 / 1,1
	<i>R</i> -(-)-TEBOH	0,005 / 0,015 / 0,250 / 0,750	0,005 / 0,015 / 0,267 / 0,726	2,9 / 6,8 / 1,4 / 3,7	2,2 / -1,0 / 6,8 / -3,1
Interensaio (n=3)	<i>S</i> -(+)-TEB	0,125 / 0,250 / 25,00 / 75,00	0,126 / 0,252 / 27,26 / 69,20	7,2 / 4,3 / 1,7 / 2,7	0,9 / 0,8 / 9,1 / -7,7
	<i>R</i> -(-)-TEB	0,125 / 0,250 / 25,00 / 75,00	0,125 / 0,249 / 26,55 / 70,59	5,8 / 3,3 / 1,8 / 3,5	-0,3 / -0,5 / 6,2 / -5,9
	<i>S</i> -(+)-TEBOH	0,005 / 0,015 / 0,250 / 0,750	0,005 / 0,015 / 0,250 / 0,748	2,9 / 6,1 / 3,1 / 2,6	1,1 / -2,2 / 0,1 / -0,3
	<i>R</i> -(-)-TEBOH	0,005 / 0,015 / 0,250 / 0,750	0,005 / 0,015 / 0,263 / 0,713	6,2 / 5,5 / 3,1 / 3,4	-1,1 / 0,8 / 5,3 / -4,9

^a desvio padrão relativo porcentual e ^b erro relativo porcentual. **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019.

- Efeito Matriz

O efeito matriz é a alteração direta ou indireta da resposta dos analitos de interesse devido a presença de interferentes na matriz ou até mesmo de analitos que eluem no mesmo t_R . Devido ao efeito matriz, pode ser observado um aumento ou uma diminuição do sinal dos analitos e, se não houver repetibilidade, o resultado pode ser comprometido (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012; INMETRO, 2016).

O efeito matriz foi avaliado e os valores de FMN foram calculados, demonstrando que os valores de DPR% foram menores do que 10% (**Tabela 9**), portanto, considerado aceitável (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012).

Tabela 9- Avaliação do efeito matriz.

Analitos	Concentração Nominal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	FMN ^a	Precisão (%DPR) ^b
S-(+)-TEB	0,250 / 75,00	1,17 / 1,05	7,4 / 3,1
R(-)-TEB	0,250 / 75,00	1,21 / 1,08	5,8 / 4,2
S-(+)-TEBOH	0,015 / 0,750	1,28 / 1,24	8,9 / 4,2
R(-)-TEBOH	0,015 / 0,750	1,13 / 1,25	6,7 / 5,6

^a fator de matriz normalizado ^b desvio padrão relativo porcentual. **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019.

- Estabilidade

Os estudos de estabilidade visam avaliar se a concentração de um analito se mantém dentro dos limites estabelecidos como aceitáveis ($ER\% \pm 15\%$), numa dada matriz, sob condições específicas que podem impactar no resultado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012). Nesse caso, os estudos de estabilidade tinham como objetivo garantir que as etapas dos ensaios, que vão desde a incubação dos analitos até a análise destes, não afetavam de maneira significativa suas concentrações nominais (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012). Dessa forma, a estabilidade do S-(+)-TEB, R(-)-TEB, S-(+)-TEBOH e R(-)-TEBOH, nas concentrações equivalentes aos seus respectivos CQBs e CQAs, foi avaliada sob condições de incubação que simulavam aquelas a serem utilizadas nos estudos de metabolismo in vitro (30 minutos em banho termostático a 37°C). Além disso, também foi avaliada a estabilidade dos analitos no auto injetor do sistema CLAE-EM/EM por 48 horas a

10°C. Curvas de calibração preparadas no mesmo dia dos ensaios foram utilizadas para quantificação.

Os resultados dos ensaios demonstraram que os enantiômeros do TEB e TEBOH foram estáveis quando mantidos no auto injetor do equipamento por 48 horas a 10°C e também quando incubados em banho termostático a 37°C por 30 minutos (**Tabela 10**).

Portanto, após a avaliação da linearidade, seletividade, efeito residual (*carry over*), efeito matriz, estabilidade e também determinação do LIQ e da precisão e exatidão inter- e intraensaio, o método analítico enantiosseletivo desenvolvido (**seção 3.5.3**) foi considerado validado, uma vez que os parâmetros cumpriram os critérios estabelecidos pelo guia de validação de métodos bioanalíticos da agência adotada como referência (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012).

Tabela 10- Teste de estabilidade dos analitos (n=5).

	Analito	Concentração Nominal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Precisão (%DPR)^a	Exatidão (%ER)^b
Incubação (30 min a 37°C)	<i>S</i> -(+)-TEB	0,250 / 75,00	0,274 / 66,72	4,9 / 4,3	9,6 / -11,0
	<i>R</i> -(-)-TEB	0,250 / 75,00	0,266 / 67,83	4,8 / 6,9	6,4 / -9,6
	<i>S</i> -(+)-TEBOH	0,015 / 0,750	0,015 / 0,702	5,2 / 7,6	-0,8 / -6,3
	<i>R</i> -(-)-TEBOH	0,015 / 0,750	0,016 / 0,688	5,0 / 6,5	4,9 / -8,3
Auto injetor (48 h a 10°C)	<i>S</i> -(+)-TEB	0,250 / 75,00	0,259 / 72,77	4,2 / 4,0	3,7 / -3,0
	<i>R</i> -(-)-TEB	0,250 / 75,00	0,251 / 73,23	5,7 / 1,8	0,4 / -2,4
	<i>S</i> -(+)-TEBOH	0,015 / 0,750	0,014 / 0,800	7,7 / 4,4	-3,4 / 6,7
	<i>R</i> -(-)-TEBOH	0,015 / 0,750	0,015 / 0,751	5,9 / 4,1	-0,8 / 0,2

^a desvio padrão relativo porcentual e ^b erro relativo porcentual. **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019.

3.6. CONCLUSÕES

Nesta etapa foi otimizado o preparo de amostras por ELL e foi desenvolvido e validado um método analítico que permite a quantificação dos enantiômeros do TEB e do seu metabólito TEBOH, em meio microsomal, utilizando CLAE-EM/EM em fase reversa, totalizando 17 minutos de análise.

Esse foi o primeiro método analítico enantiosseletivo reportado na literatura, até o momento, em que foi realizada a separação e quantificação dos enantiômeros do TEB e do TEBOH simultaneamente. Tais resultados garantiram a confiabilidade necessária para que o método fosse utilizado nos estudos enantiosseletivos de metabolismo in vitro.

Capítulo 4. Estudos enantiosseletivos de metabolismo in vitro do praguicida tebuconazol

4.1. DESTAQUES REPORTADOS NO CAPÍTULO

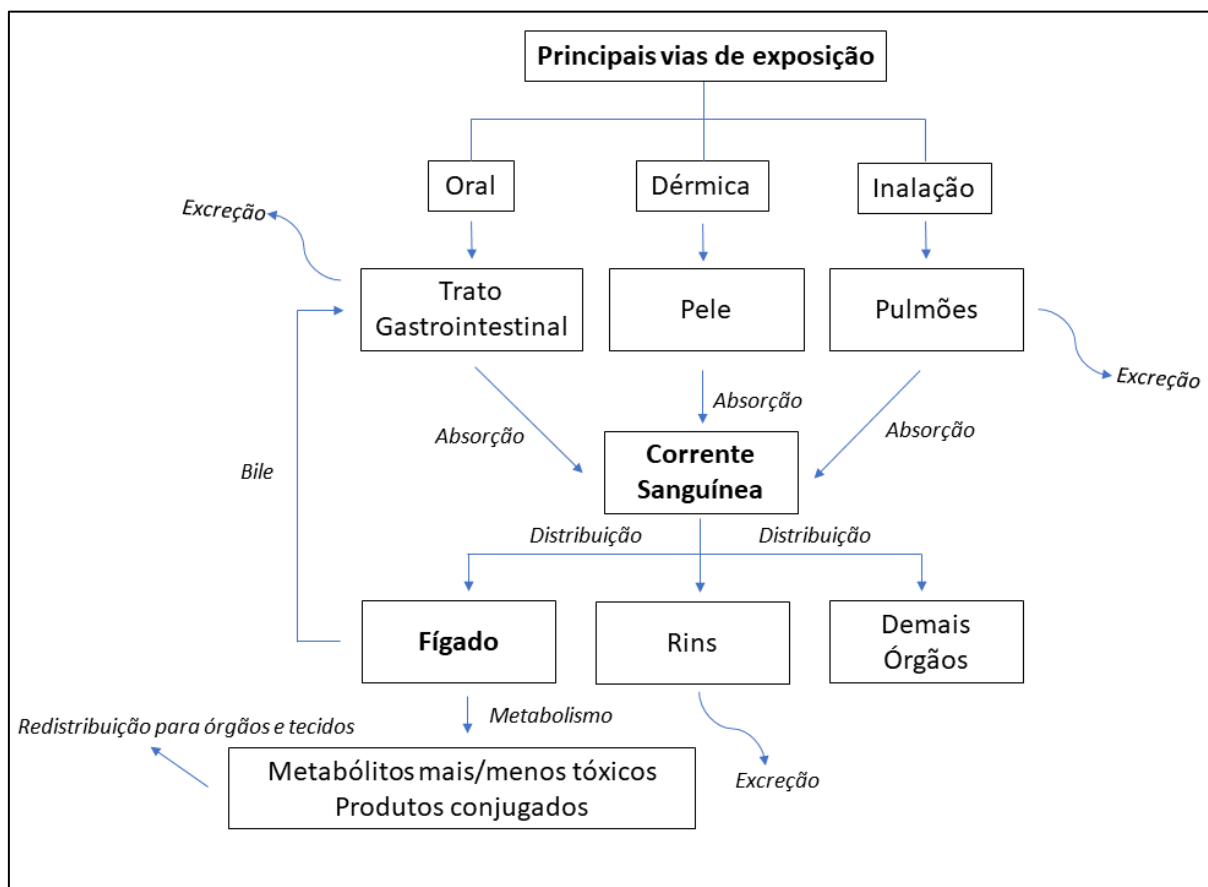
- Estudos de metabolismo in vitro mostraram-se importantes ferramentas para predição de alguns parâmetros toxicocinéticos in vivo.
- O metabolismo in vitro enantiosseletivo do TEB foi investigado empregando microsomas hepático de humanos e isoformas recombinantes.
- As enzimas do CYP450 presentes nos microsomas hepáticos se mostraram capazes de metabolizar o TEB em TEBOH com a participação de diversas isoformas.
- O metabolismo mostrou ser enantiosseletivo e a predição do clearance hepático e da taxa de extração hepática mostrou que o fígado pode estar envolvido no metabolismo do TEB, porém o efeito de primeira passagem parece ser mínimo.

4.2. INTRODUÇÃO

A toxicidade dos praguicidas não se deve especificamente a uma única interação a nível molecular, mas sim a uma cascata de eventos que são desencadeados desde quando somos expostos a esses compostos, seja por via dérmica, oral, ou através da inalação, e que pode culminar com o surgimento ou não de um ou mais efeitos tóxicos (HODGSON, 2012).

Essa cascata de eventos envolve diversas etapas que vão desde a absorção, distribuição, metabolismo e por fim excreção do praguicida em si, ou dos metabólitos formados (ADME, **Figura 19**) (HODGSON, 2012), bem como as interações que ocorrem com as macromoléculas, como por exemplo o RNA, o DNA, e os mecanismos de ação tóxica gerados.

Figura 19- Representação simplificada das etapas que compõem a toxicocinética de um xenobiótico.



Fonte: Adaptado de HODGSON, 2010.

Avaliar o que acontece com um praguicida durante as etapas de ADME, em particular durante o seu metabolismo, é crucial para entender o seu modo de ação e sua possível toxicidade em organismos não-alvo.

O metabolismo, também chamado de biotransformação, é definido como o conjunto de reações catalisadas por enzimas que transformam os xenobióticos em compostos mais hidrofílicos, os chamados metabólitos, para que estes sejam excretados do organismo. Essas reações podem acontecer em diferentes órgãos, como rins, pulmão e cérebro, mas o principal órgão responsável pelo metabolismo é o fígado (ROSE; HODGSON, 2004a).

A importância do fígado fica evidente quando observamos que a absorção dos praguicidas pode ocorrer tanto através da pele, quanto das vias respiratórias e do trato gastrointestinal, e mesmo assim, após estes compostos atingirem a circulação sanguínea, eles tendem a passar pelo fígado, onde podem ser biotransformados (**Figura 19**). No fígado, o xenobiótico pode sofrer detoxificação, ou seja, ser metabolizado para formar metabólitos menos tóxicos do que o composto inicial, ou sofrer ativação, em que são produzidos metabólitos mais tóxicos (HODGSON, 2012).

As reações de metabolismo podem ser divididas em reações de fase I e de fase II. As reações de fase I são, predominantemente, reações de oxidação, redução e hidrólise e servem para introduzir grupos polares na molécula. Já as reações de fase II são reações de conjugação e nelas o produto obtido na fase I, ou a própria molécula original, sofre reações de conjugação com grupos endógenos hidrofílicos (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

A grande maioria dos praguicidas sofre inicialmente reações de fase I do metabolismo e essas reações podem ser catalisadas por diferentes famílias de enzimas, como das flavina monooxigenases, álcool ou aldeído desidrogenases, amina oxidases, mas principalmente a família de enzimas do CYP450 (ABASS et al., 2012).

As enzimas do CYP450 são uma superfamília de hemeproteínas presente no retículo endoplasmático de células de diferentes órgãos, mas principalmente de células hepáticas (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Existem diversas isoformas de enzimas do CYP450, sendo que as principais são a CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2E1 (ABASS et al., 2012) e essas isoformas são conhecidas por catalisar o metabolismo de diversos praguicidas, como o diurom (ABASS et al., 2007), carbaril (TANG et al., 2002), fipronil (TANG et al., 2004), clorpirifós (TANG et al., 2001), metóxicloro (HU; KUPFER, 2002), dentre outros (HODGSON, 2010).

No caso de praguicidas quirais, o metabolismo tem a peculiaridade de poder ocorrer de maneira enantiosseletiva, uma vez que o corpo humano é um ambiente altamente estereoespecífico (ALI; ABOUL-ENEIN, 2004) e essas reações são catalisadas por enzimas constituídas por aminoácidos homoquirais (L-aminoácidos) (FUJII, 2002). Dessa forma, os enantiômeros de praguicidas quirais podem ser metabolizados por diferentes enzimas, podem ser metabolizados pela mesma enzima, mas com velocidades diferentes, além de outras situações (DE ALBUQUERQUE et al., 2018; MA; GAN; LIU, 2011)

Os estudos de metabolismo enantiosseletivo de praguicidas quirais envolvendo as enzimas do CYP450 podem ser realizados *in vitro* e tendem a ser mais fáceis de se executar do que estudos *in vivo*, além de utilizar pequenas quantidades dos compostos a serem avaliados e também serem mais baratos (STEPAN et al., 2013). Ademais, eles permitem colocar em prática a política dos 3Rs (*reduce, replace, refine*), reduzindo assim o emprego de animais em pesquisas toxicológicas (ESFA, 2014b), o que é também uma questão ética.

Atualmente já existem diversos modelos *in vitro* derivados de células humanas que permitem investigar de maneira eficiente o metabolismo de praguicidas, como hepatócitos, pedaços do fígado, frações citosólicas e S9, isoformas recombinantes (rCYP450) e HLM

(ASHA; VIDYAVATHI, 2010; ESFA, 2014b), sendo os HLM e rCYP450 os modelos *in vitro* mais utilizados.

Os HLM consistem em vesículas do retículo endoplasmático de hepatócitos preparadas através da homogeneização de pedaços do fígado seguido de etapas sucessivas de centrifugação diferenciada (ABASS, 2013). Esse modelo é muito útil para avaliar a estabilidade metabólica do composto, realizar estudos de inibição enzimática, identificar e quantificar metabólitos formados e determinar parâmetros cinéticos (ABASS, 2013). Já as rCYP450 são enzimas metabólicas recombinantes expressas em bactérias, leveduras ou células de insetos infectadas com baculovírus humano (ABASS, 2013; ESFA, 2014b) e são muito utilizadas para identificar as enzimas responsáveis por catalisar as reações de metabolismo.

Através dos ensaios *in vitro* utilizando modelos derivados de células humanas é possível determinar os perfis e os parâmetros cinéticos das reações de degradação dos enantiômeros de praguicidas quirais e identificar possíveis diferenças no metabolismo, bem como determinar alguns parâmetros toxicocinéticos após realizações de extrapolações *in vitro-in vivo*. Além disso, é possível determinar a rota metabólica, as enzimas responsáveis por catalisar o metabolismo e também avaliar possíveis interações com outros compostos, por exemplo fármacos (ESFA, 2014b).

4.2.1. Cinética enzimática e extrapolações in vitro- in vivo

As enzimas do CYP450 são catalisadores biológicos, ou seja, diminuem a energia de ativação das reações e aumentam a velocidade destas sem que ocorram mudanças no equilíbrio químico. A variação da velocidade dessas reações devido a mudanças de parâmetros experimentais, tais como a concentração de substrato e a concentração de proteína, é estudada por uma área da bioquímica chamada de cinética enzimática.

A grande maioria das reações catalisadas pelas enzimas do CYP450 pode ser descrita pela **Equação 7**, que representa a catálise por enzimas que tem um único sítio de ligação, ou múltiplos sítios independentes (SEIBERT; TRACY, 2014a). Nessas reações, a enzima (E) se liga rapidamente ao substrato (S), formando o complexo enzima-substrato (ES) e este se quebra para formar o produto (P), no caso de reações metabólicas também chamado de metabólito, deixando a enzima novamente na sua forma livre (E) (SEGEL, 2013). E, S e ES estão em equilíbrio e, dessa forma, a velocidade de dissociação de ES para E + S é muito maior do que a velocidade na qual ES se quebra para formar E + P (SEGEL, 2013).



sendo **E** – enzima; **S** – substrato; **ES** – complexo enzima- substrato e **P** – produto, ou no caso, o metabólito formado.

A velocidade inicial dessas reações segue o modelo de cinética mais simples que é o modelo de Michaelis-Menten. Esse modelo correlaciona a concentração de substrato ($[S]$) com a velocidade inicial da reação (v_0) através de dois parâmetros, V_{\max} , que é a velocidade máxima da reação, e K_M (constante de Michaelis-Menten), que é a concentração de substrato na qual v_0 é igual a metade de V_{\max} (HABENSCHUS, 2016).

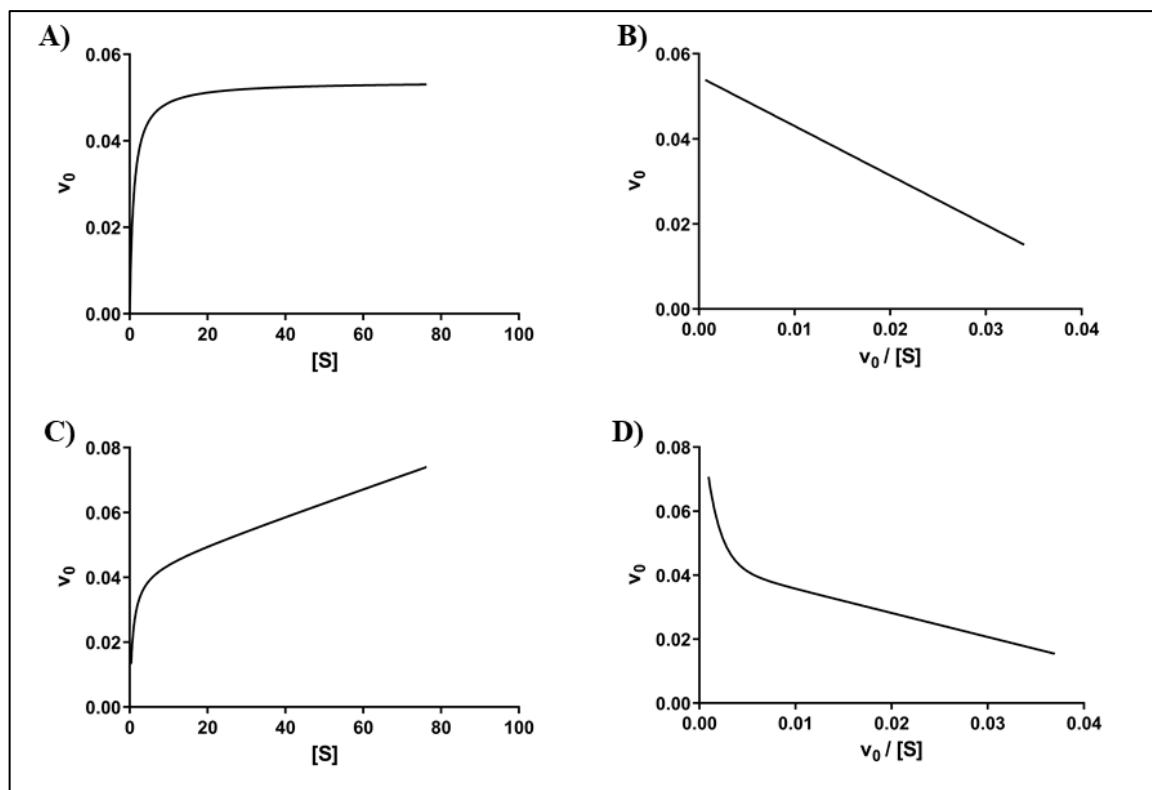
$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

sendo v_0 – velocidade inicial da reação enzimática; V_{\max} – velocidade máxima da reação enzimática; $[S]$ – concentração de substrato e K_M – constante de Michaelis-Menten (SEIBERT; TRACY, 2014a).

A equação de Michaelis- Menten (**Equação 8**) estabelece uma relação hiperbólica entre v_0 e $[S]$ (**Figura 20A**). Em concentrações baixas de substrato, v_0 varia de forma linear com $[S]$, já em concentrações muito maiores do que o valor de K_M a enzima atinge condições de saturação e a partir daí, aumentos em $[S]$ não provocam aumentos significativos na velocidade, e se diz então que a reação atingiu V_{\max} (SEIBERT; TRACY, 2014a).

Porém, algumas reações catalisadas pelas enzimas do CYP450 podem apresentar perfis cinéticos chamados de atípicos, principalmente pelo fato dos sítios ativos dessas enzimas serem maiores e menos específicos (SEIBERT; TRACY, 2014b). Devido a isso, o substrato pode se ligar a mais de um sítio ativo da enzima, ou mais de uma molécula de substrato pode se ligar a estes (SEIBERT; TRACY, 2014b). Dentre os perfis atípicos podemos citar o perfil bifásico.

Figura 20- Gráficos de velocidade inicial da reação (v_0) vs a concentração de substrato ([S]) representando o perfil cinético de **A)** Michaelis-Menten e **C)** bifásico. **B)** e **D)** representam os gráficos de Eadie-Hofstee para uma cinética de Michaelis-Menten e para uma cinética bifásica, respectivamente.



Fonte: Autoria própria

Na cinética bifásica (**Figura 20C**), o perfil é caracterizado por, no início, apresentar um aumento proporcional em v_0 à medida que se aumenta [S], assim como ocorre na cinética de Michaelis-Menten. Porém, ao contrário da cinética de Michaelis-Menten, que passa a ser de ordem zero em [S] muito maiores do que o valor de K_M , na cinética bifásica a saturação não é alcançada. Assim, mesmo em [S] muito altas, observa-se ainda uma relação linear entre v_0 e [S], o que pode ser descrito pela **Equação 9** (SEIBERT; TRACY, 2014b). Esse tipo de perfil cinético normalmente é observado quando a reação é catalisada por enzimas com múltiplos sítios de ligação, ou quando a reação é catalisada por diversas enzimas.

$$v_0 = \frac{(V_{max1} \cdot [S]) + \left(\frac{V_{max2}}{K_{M2}} \cdot [S]^2\right)}{K_{M1} + [S]} \quad (9)$$

sendo v_0 – velocidade inicial da reação enzimática; [S] – concentração de substrato; V_{max1} – velocidade máxima da reação catalisada pela enzima ou sítio de ligação que tem alta afinidade pelo substrato; K_{M1} – constante de Michaelis-Menten relacionada a enzima ou sítio de ligação que tem alta afinidade pelo substrato; V_{max2} – velocidade máxima da reação catalisada pela enzima ou sítio de ligação que tem baixa afinidade pelo substrato e K_{M2} – constante de Michaelis-Menten relacionada a enzima ou sítio de ligação que tem baixa afinidade pelo substrato (SEIBERT; TRACY, 2014b).

Muitas vezes, é difícil caracterizar qual o perfil cinético de uma reação apenas observando o gráfico de v_0 vs. $[S]$, pois desvios da cinética de Michaelis-Menten costumam acontecer em baixas concentrações de substrato e podem não ser aparentes no gráfico direto (BRIAN HOUSTON; KENWORTHY; GALETIN, 2003). Então, gráficos de Eadie-Hofstee, que correlacionam v_0 vs. $v_0/[S]$, podem ser empregados como ferramentas de diagnóstico. Tais gráficos distribuem melhor os dados obtidos, tornando mais fácil visualizar os parâmetros e detectar perfis atípicos (BRIAN HOUSTON; KENWORTHY; GALETIN, 2003).

As **Figura 20B e 20D** mostram os gráficos de Eadie-Hofstee para a cinética de Michaelis-Menten e para a cinética bifásica, respectivamente. É possível observar que os perfis são bem distintos e é mais fácil visualizar a contribuição de dois componentes para a cinética bifásica, o de alta e o de baixa afinidade pelo substrato, enquanto há a contribuição de apenas um para a cinética de Michaelis-Menten (SEIBERT; TRACY, 2014b).

Avaliar corretamente qual é o perfil cinético de uma reação catalisada por enzimas é essencial para a obtenção de valores corretos de K_M e V_{max} . Esses valores são utilizados para a determinação do *clearance* hepático intrínseco in vitro ($CL_{int, in vitro}$), que é uma medida da capacidade que o fígado tem de depurar um determinado composto quando não há influência de outros parâmetros fisiológicos, tais como o fluxo sanguíneo hepático e ligações às proteínas plasmáticas, e é obtido pela relação entre V_{max} e K_M (BRIAN HOUSTON; KENWORTHY; GALETIN, 2003).

A partir dos valores de $CL_{int, in vitro}$ e levando-se em consideração o fluxo sanguíneo hepático e a porcentagem de ligação do composto às proteínas plasmáticas e microssomais, podem ser feitas extrapolações in vitro-in vivo para prever alguns parâmetros toxicocinéticos, tais como o *clearance* hepático (CL_H) e a taxa de extração hepática (E_H).

CL_H está associado à eficiência do processo de depuração de um xenobiótico pelo fígado, sendo que valores de CL_H próximos a $20 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, que equivale ao fluxo sanguíneo hepático, indicam que praticamente todo composto que chega ao fígado pode vir a ser removido da corrente sanguínea através do metabolismo hepático (BOWMAN; BENET, 2018; DAMRE; IYER, 2012). Já E_H indica a fração do xenobiótico que é depurada durante a sua passagem pelo órgão, considerando uma ingestão oral. Uma taxa de extração hepática próxima a 100% sugere que o composto pode ser metabolizado quase que totalmente pelo fígado já em sua primeira passagem pelo órgão, chegando uma pequena parcela deste na circulação sistêmica, ou seja, o composto sofre um alto efeito de primeira passagem (BOWMAN; BENET, 2018; DAMRE; IYER, 2012).

Extrapolações *in vitro-in vivo* são importantes para prever o que pode vir acontecer *in vivo* em casos de exposição a um praguicida, e também se ocorre enantiosseletividade no caso de praguicidas quirais. Por questões éticas, diferente do que acontece com fármacos em desenvolvimento, praguicidas não podem ser administrados em humanos para então serem determinados os parâmetros toxicocinéticos. Dessa forma, através de ensaios *in vitro* e fazendo extrapolações é possível diminuir o uso de animais nesses estudos ou até mesmo selecionar o modelo animal mais adequado, uma vez que existem diferenças entre a atividade catalítica das isoformas das enzimas do CYP450 expressas em animais e as expressas em humanos (MARTIGNONI; GROOTHUIS; DE KANTER, 2006). Sendo assim, extrapolações *in vitro- in vivo* tem ganhado destaque.

4.2.2. Estudos de Fenotipagem

O *clearance*, ou seja, a depuração de um praguicida no organismo humano, pode acontecer através da excreção desse composto sem que ocorram modificações em sua estrutura química ou então através de reações de metabolismo que levam a formação de outros compostos chamados metabólitos (STEVENS; WIENKERS, 2003).

Diferentes reações de metabolismo de praguicidas são catalisadas pelas isoformas das enzimas do CYP450, principalmente a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 e CYP3A5 (NIROGI et al., 2015). A CYP1A2, por exemplo, catalisa a oxidação da *cis*-permetrina (SCOLLON et al., 2009) e a *N*-demetilação do diurom (ABASS et al., 2007), enquanto que a CYP2C9 catalisa a oxidação do esfenverelato (GODIN et al., 2007) e a CYP3A4 catalisa a oxidação do fipronil (CARRÃO et al., 2019a).

Nos ensaios para a elucidação da rota metabólica de um determinado praguicida, além de determinar quais famílias de enzimas catalisam as reações, é primordial determinar também quais isoformas em específico estão envolvidas no processo e esses estudos são denominados estudos de fenotipagem ou mapeamento enzimático (WHITE, 2012).

Os estudos de fenotipagem ou mapeamento enzimático envolvendo as enzimas do CYP450 testam a capacidade que diversas isoformas têm de metabolizar um determinado composto (ZHANG et al., 2007). Esses estudos são muito importantes, pois através de seus resultados consegue-se prever a rota metabólica e também possíveis interações indesejáveis entre xenobióticos.

Dentre as interações indesejáveis entre xenobióticos podemos citar aquelas causadas pela inibição ou indução da atividade das enzimas do CYP450. Essas interações podem causar

efeitos adversos no organismo humano, principalmente se o composto é metabolizado por uma única isoforma (STEVENS; WIENKERS, 2003), uma vez que a inibição da atividade enzimática dessa isoforma leva a um metabolismo em menor extensão, podendo prejudicar a excreção do xenobiótico e causar um acúmulo no organismo.

Além disso, algumas enzimas do CYP450 apresentam variantes alélicas em seus genes, fenômeno chamado de polimorfismo. O polimorfismo faz com que tais enzimas possam ser expressas de diferentes formas na população, ou seja, uma determinada isoforma pode ser expressa, em algumas pessoas, com atividade catalítica reduzida, em outras com nenhuma atividade, ou então determinadas isoformas podem ser expressas em excesso, resultando em uma alta atividade catalítica (WHITE, 2012).

O polimorfismo também faz com que a extensão do metabolismo possa ser variável entre grupos étnicos (WHITE, 2012) e tal variação deve ser levada em consideração quando está sendo avaliado o risco de exposição a um determinado praguicida. Já se sabe, por exemplo, que a CYP2C19 e a CYP2D6 são isoformas que apresentam polimorfismo (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008). Portanto, se um praguicida é metabolizado por apenas uma dessas isoformas, o risco de exposição de parte dos caucasianos e asiáticos a esse composto pode ser maior, uma vez que essas pessoas são geneticamente deficientes nessas enzimas e, conseqüentemente, o metabolismo ocorrerá em menor extensão (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008).

Existem dois métodos *in vitro* comumente utilizados nos estudos de fenotipagem: um que emprega rCYP450 individuais e outro que emprega HLM ou hepatócitos juntamente com compostos químicos ou anticorpos que inibem seletivamente a atividade de isoformas específicas (FDA, 2020a), sendo aconselhável a realização de ensaios utilizando ambos os métodos e também a correlação entre os resultados (FDA, 2020a).

No primeiro caso, o xenobiótico cujo metabolismo está sendo avaliado é incubado com as rCYP450 individuais na presença do cofator NADPH e então é monitorado o seu consumo ou então a formação de metabólitos (SINZ, 2012). Com isso, as atividades enzimáticas são determinadas e aquelas isoformas capazes de metabolizar o composto em questão são confirmadas (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008).

Já no segundo caso, o xenobiótico a ser avaliado é incubado com HLM ou hepatócitos e NADPH na presença e na ausência de determinados compostos químicos ou anticorpos que diminuem ou eliminam seletivamente a atividade de isoformas específicas. Assim, a contribuição de cada isoforma pode ser determinada (SINZ, 2012) e aquelas isoformas cujas atividades enzimáticas tiveram maiores porcentagens de inibição são consideradas as que contribuem mais para o metabolismo.

Atualmente, segundo a agência americana reguladora de alimentos e medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*), os estudos de fenotipagem envolvendo fármacos quirais devem ser feitos avaliando individualmente cada um dos enantiômeros com o intuito de entender e constatar uma possível diferença no metabolismo de cada um destes (FDA, 2020a). Tendo isso como base, o mesmo pode ser estendido para o caso de praguicidas quirais, pois os enantiômeros de praguicidas quirais podem ser metabolizados por isoformas distintas, sendo importante essa investigação (BURA et al., 2019).

4.3. OBJETIVOS

Nessa etapa, o objetivo do trabalho foi realizar um amplo estudo enantiosseletivo *in vitro* do metabolismo de fase I do TEB empregando HLM. Nesse sentido, visou-se determinar os perfis e parâmetros cinéticos da reação de degradação da mistura racêmica e dos enantiômeros isolados, bem como determinar as enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo (estudos de fenotipagem). Além disso, essa etapa também teve como objetivo obter importantes parâmetros toxicocinéticos *in vivo* através de extrapolações *in vitro-in vivo* (CL_H e E_H).

4.4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1. Padrões analíticos

Os padrões analíticos do *rac*-TEB ($\geq 99\%$) e FEN (PI, 99,5%) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e o padrão analítico do *rac*-TEBOH (≥ 98) foi adquirido da Toronto Reserch Chemicals (Toronto, Canadá). Os enantiômeros do TEB e do TEBOH, *S*-(+)-TEB (99%), *R*-(-)-TEB (99%), *S*-(+)-TEBOH (99%) e *R*-(-)-TEBOH (99%), foram isolados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito na **seção**

3.4.5.

Os inibidores químicos seletivos, usados nos estudos de fenotipagem, α -naftoflavona ($\geq 98\%$, CYP1A2), sulfafenazol ($\geq 98\%$, CYP2C9), ticlopidina ($\geq 99\%$, CYP2C19 e CYP2B6), quinidina (≥ 98 , CYP2D6), dietilditiocarbamato ($\geq 99\%$, CYP2E1), cetoconazol ($\geq 98\%$, CYP3A4/5) e montelucaste ($\geq 98\%$, CYP2C8) foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

4.4.2. Preparo das soluções padrão

As soluções padrão de *rac*-TEB ($6800 \mu\text{mol L}^{-1}$), *S*-(+)-TEB ($6800 \mu\text{mol L}^{-1}$), *R*-(-)-TEB ($6800 \mu\text{mol L}^{-1}$), *rac*-TEBOH ($72 \mu\text{mol L}^{-1}$), *S*-(+)-TEBOH ($72 \mu\text{mol L}^{-1}$) e *R*-(-)-TEBOH ($72 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram preparadas em metanol, enquanto que a solução de FEN ($21 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi preparada em acetonitrila.

As soluções padrão dos inibidores químicos seletivos, α -naftoflavona ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$, CYP1A2), sulfafenazol ($800 \mu\text{mol L}^{-1}$, CYP2C9), ticlopidina (240 e $800 \mu\text{mol L}^{-1}$, CYP2B6 e CYP2C19, respectivamente), quinidina ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$, CYP2D6), dietilditiocarbamato ($8000 \mu\text{mol L}^{-1}$, CYP2E1), cetoconazol ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$, CYP3A4/5) e montelucaste ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$, CYP2C8) foram preparadas em acetonitrila.

Todas as soluções foram armazenadas protegidas da luz, em tubos de vidro âmbar, a -20°C .

4.4.3. Reagente e solventes

Os reagentes de grau analítico, tais como NaOH, NaCl, NH_4OH , HCl, CH_2O_2 , NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 foram adquiridos da Synth (Diadema, São Paulo); tris (tris(hidroximetil)aminometano) foi adquirido da J. T. Baker (Phillisburg, EUA) e o KCl granular da Mallinckrodt Chemicals (Xalostoc, México). A água foi ultrapurificada (tipo 1, $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ à 25°C) utilizando o sistema Milli-Q Direct-Q3 UV da Millipore (Bedford, EUA).

O metanol e o acetato de etila, ambos de grau cromatografia, foram adquiridos da Panreac (Barcelona, Espanha).

4.4.4. HLM, rCYP450 e sistema de regeneração de NADPH

Os HLM (20 mg mL^{-1}), preparados a partir de pedaços do fígado de um pool de 150 doadores de ambos os sexos, e as rCYP450 (rCYP1A2, rCYP2C9, rCYP2C19, rCYP2D6, rCYP2E1, rCYP3A4, rCYP3A5, rCYP2B6, rCYP2C8), preparadas a partir de células de insetos transfectadas com baculovírus (Supersomes[®]), foram adquiridas da empresa Corning Life Science (Phoenix, EUA). Ambos foram armazenados a -80°C .

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e os reagentes utilizados para gerar NADPH, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada (NADP^+) e glicose-6-fosfato

de sódio, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Estes reagentes foram preparados em solução tampão tris-KCl (tris 0,05 mol L⁻¹ e KCl 0,15 mol L⁻¹, pH 7,4), e armazenado a -20°C nas seguintes concentrações: NADP⁺ 2,5 mmol L⁻¹, glicose-6-fosfato desidrogenase 8,0 U mL⁻¹ e glicose-6-fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹.

4.4.5. Composição do meio de incubação

O meio de incubação para os estudos de metabolismo in vitro foi preparado pipetando-se, em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf® (Eppendorf, Alemanha), 5 µL do substrato (*rac*-TEB, *S*-(+)-TEB ou *R*-(-)-TEB) solubilizado em metanol, 105 µL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), e 40 µL de HLM ou rCYP450. As amostras foram pré-aquecidas em banho termostático (Dubnoff, *Metabolic Shaking Incubator*, Solab, Brasil) a 37°C por 5 minutos e as reações de metabolismo foram iniciadas pela adição de 50 µL de solução do sistema de regeneração de NADPH (concentração final no meio equivalente a 5 mmol L⁻¹ de glicose-6-fosfato, 0,25 mmol L⁻¹ de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato e 0,5 unidades da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase), totalizando um volume final de 200 µL. Após o tempo de incubação necessário, as reações foram interrompidas com a adição de solvente orgânico, sendo iniciado então o processo de preparo de amostra (seção 4.4.6) para posterior análise por CLAE-EM/EM (seção 4.4.7).

4.4.6. Preparo de amostras por ELL

A extração do TEB e TEBOH do meio de incubação foi realizada através da adição de 1000 µL de acetato de etila, seguido da adição de 30 µL de FEN (21 µmol L⁻¹). Então, as amostras foram agitadas por 10 minutos a 1000 rpm em agitador do tipo Vibrax VXR® e centrifugadas por 10 minutos a 1780 x g e 4°C. As condições estão resumidas na **Tabela 6**.

Posteriormente, a fase orgânica das amostras foi coletada (800 µL) e evaporada em um concentrador de amostras a vácuo. Por fim, os resíduos foram solubilizados em 200 µL de metanol: água (90:10 v/v) para serem analisados por CLAE-EM/EM empregando o método desenvolvido e validado (seção 4.4.7).

4.4.7. Condições de análise do TEB e TEBOH por CLAE-EM/EM

Os enantiômeros do TEB e do TEBOH foram detectados e quantificados em um equipamento de cromatografia líquida da Thermo Scientific (Massachusetts, EUA), equipado com bomba de solvente (Accela 600 *pump*) e amostrador automático (Accela *autosampler*) acoplado a um espectrômetro de massas modelo TSQ Quantum Access Max com analisador de massas do tipo QqQ e ionização por eletrospray. O software Xcalibur versão 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) foi empregado para controlar o equipamento e para aquisição dos dados.

As análises foram feitas utilizando a coluna Chiralcel OJ[®] (250 x 4,6 mm, 10 μ m), fase móvel composta por metanol:água (90:10 v/v, modo isocrático), vazão de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 25°C. O volume de injeção foi de 10 μ L e o amostrador automático foi mantido a 10°C. Os parâmetros utilizados no EM foram os seguintes: tensão do capilar de +5000V, temperatura do capilar de 320°C, temperatura de vaporização de 290°C, pressão do gás de dessolvatação (nitrogênio) de 10 unidades (escala arbitrária), pressão do gás auxiliar de 5 unidades (escala arbitrária) e tensão do cone de 110 V.

A dissociação induzida por colisão foi realizada utilizando argônio a uma pressão de 2,1 mTorr. Os analitos foram detectados no modo positivo e a quantificação e confirmação foram baseadas no MRM, monitorando as seguintes transições m/z [M+H]⁺: para o FEN 304 \rightarrow 217 (quantificação, EC 23 V) e 304 \rightarrow 202 (confirmação, EC 34 V); para o TEB 308 \rightarrow 70 (quantificação, EC 21 V) e 308 \rightarrow 125 (confirmação, EC 33 V); para o TEBOH 324 \rightarrow 70 (quantificação, EC 21 V) e 324 \rightarrow 125 (confirmação, EC 40 V).

4.4.8. Estudos prévios

4.4.8.1. Solubilidade

A solubilidade do *rac*-TEB em solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) e solução tampão Tris-KCl (pH 7,4; 0,05 mol L⁻¹), que são as soluções que compõem o meio de incubação nos estudos envolvendo as enzimas do CYP450, foi avaliada em triplicata (n=3).

Para isso, 5 μ L de soluções padrão de *rac*-TEB foram pipetados em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf[®] seguido de 145 μ L de solução tampão fosfato e 50 μ L de solução tampão Tris-KCl. As concentrações de *rac*-TEB avaliadas foram de 10 μ mol L⁻¹, 20 μ mol L⁻¹, 30 μ mol L⁻¹,

50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Controles contendo *rac*-TEB dissolvido apenas em metanol (200 μL) ($n=3$) também foram preparados.

Os controles e as amostras foram centrifugados por 10 minutos a 1780 xg e 50 μL dos sobrenadantes foram coletados. Posteriormente foram adicionados 50 μL de água nos controles e 50 μL de metanol nas amostras a fim de garantir a mesma composição e força cromatográfica para injeção no sistema CLAE-DAD.

O equipamento utilizado para análise foi um sistema para cromatografia líquida da marca Shimadzu (Quioto, Japão) composto por bomba unitária de solvente LC-20AT, degaseificador on-line DGU-20A5, forno CTO-20A (operando a 30°C), sistema controlador CBM 20A e detector DAD SPD20A operando em 220 nm. As injeções foram feitas automaticamente (10 μL) utilizando o injetor automático SIL-10AF. Os dados foram coletados utilizando o software LC Solution versão 1.25 SP1 (Shimadzu, Quioto, Japão). Essas análises foram realizadas de maneira não-enantiosseletiva e para tanto foi empregada a coluna aquiral Ascentis Express Fused Core C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 2,7 μm , Supelco, EUA) e como fase móvel metanol: água (75:25 v/v) a uma vazão de 1 mL min^{-1} .

Para verificar diferenças significativas entre os resultados dos controles e das amostras foi realizado o teste estatístico *t-Student* não pareado empregando o programa GraphPad Prism[®] versão 8.0.2 (La Jolla, EUA). Os resultados que apresentaram valores de $p < 0,05$ quando comparados ao controle foram considerados com diferenças de solubilidade estatisticamente significativas, ou seja, as amostras não estavam 100% solúveis.

4.4.8.2. Racemização

A racemização dos enantiômeros do TEB no meio de incubação (**seção 4.4.5**) foi avaliada utilizando os enantiômeros isolados desse substrato em dois níveis de concentração: 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (concentração baixa) e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (concentração alta).

Para isso, 5 μL de solução padrão de *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB foram pipetados, individualmente, em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf[®] ($n=3$) seguido da adição de 145 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) e 50 μL de tampão Tris-KCl (pH 7,4; 0,05 mol L^{-1}), ou seja, na ausência de HLM e do cofator NADPH. Essas amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C em banho termostático e após esse tempo adicionou-se o solvente orgânico para dar início ao preparo de amostra (**seção 4.4.6**) para posterior análise por CLAE-EM/EM (**seção 4.4.7**).

Os cromatogramas obtidos foram analisados de maneira qualitativa com o intuito de verificar se, com as condições de incubação empregadas, haveria conversão de um enantiômero no outro, caracterizando a racemização.

4.4.8.3. Estabilidade metabólica do TEB na presença das enzimas do CYP450

A capacidade das enzimas do CYP450 de humanos catalisarem a reação de biotransformação *in vitro* do *rac*-TEB formando os enantiômeros do TEBOH foi previamente avaliada. Para isso, 5 μL de solução padrão de *rac*-TEB foram pipetados em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf[®] [n=3, concentração final no meio igual a 8,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (concentração baixa) e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (concentração alta)], seguido da adição de 105 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) e 40 μL de HLM (concentração proteica no meio igual a 0,5 mg mL^{-1}). Essas amostras foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C em banho termostático e as reações foram iniciadas com a adição de 50 μL de solução do sistema de regeneração de NADPH, ocorrendo por 50 minutos. Controles negativos, sem a presença de NADPH (n=3), ou seja, controles em que não ocorre o metabolismo pelas enzimas do CYP450, também foram preparados.

Transcorridos os 50 minutos, as reações foram interrompidas através da adição de solvente orgânico, seguido das etapas de preparo de amostra (**seção 4.4.6**) e, por fim, análise por CLAE-EM/EM (**seção 4.4.7**).

O valor das áreas normalizadas dos enantiômeros do TEB pelo FEN e dos enantiômeros do TEBOH pelo FEN nas amostras foram comparados entre si. O teste estatístico *t-Student* não pareado foi feito a fim de verificar diferenças significativas e avaliar previamente uma possível enantiosseletividade da reação. Para isso foi empregado o programa GraphPad Prism[®] versão 8.0.2 (La Jolla, EUA) e os resultados que apresentaram valores de $p < 0,05$ foram considerados com diferenças estatisticamente significativas, ou seja, uma possível enantiosseletividade.

4.4.8.4. Condições de incubação para os estudos de cinética enzimática (ensaios de pré-cinética)

As condições de incubação a serem utilizadas nos ensaios de cinética enzimática foram previamente determinadas. Primeiramente, foi avaliada a menor concentração de proteínas microsossomais (0,1 mg mL^{-1} , 0,2 mg mL^{-1} e 0,3 mg mL^{-1}) necessária para a formação quantificável dos enantiômeros do TEBOH. Em seguida, com a concentração proteica fixada

(0,2 mg mL⁻¹), foi feita a avaliação da relação linear entre o tempo de incubação e a formação dos enantiômeros do TEBOH.

Para isso, 5 µL de solução padrão de *rac*-TEB foram pipetados em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf® [(n=3), concentrações finais no meio de incubação iguais a 1 µmol L⁻¹ (concentração baixa), 50 µmol L⁻¹ (concentração média) e 75 µmol L⁻¹ (concentração alta)], seguido da adição de 105 µL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) e 40 µL de HLM. Essas amostras foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C em banho termostático e as reações foram iniciadas com a adição de 50 µL de solução do sistema de regeneração de NADPH, ocorrendo por 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

Transcorridos esses tempos as reações foram interrompidas através da adição de solvente orgânico, seguido das etapas de preparo de amostra (**seção 4.4.6**) e, por fim, análise por CLAE-EM/EM (**seção 4.4.7**). Gráficos que correlacionavam a área normalizada dos enantiômeros do TEBOH pelo FEN vs. o tempo de incubação foram plotados e a linearidade no intervalo de 0-60 minutos foi verificada através da análise dos valores do coeficiente de correlação linear (r).

4.4.9. Cinética enzimática

Os parâmetros e perfis cinéticos da reação de 1-hidroxilação do TEB, catalisada pelas enzimas do CYP450, foram determinados através de ensaios nos quais 5 µL de solução padrão de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB foram pipetados, individualmente, em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf® [(n=3), concentrações finais no meio de incubação de 0,35-75 µmol L⁻¹], seguido da adição de 105 µL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) e 40 µL de HLM (concentração proteica no meio igual a 0,2 mg mL⁻¹). Essas amostras foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C em banho termostático e as reações foram iniciadas com a adição de 50 µL de solução do sistema de regeneração de NADPH, ocorrendo por 20 minutos.

Transcorridos os 20 minutos de incubação, as reações foram interrompidas através da adição de solvente orgânico, seguido das etapas de preparo de amostra (**seção 4.4.6**) para posterior análise por CLAE-EM/EM empregando o método analítico enantiosseletivo desenvolvido e validado previamente (**seção 4.4.7**).

Os enantiômeros do TEBOH, formados durante a reação, foram quantificados utilizando curvas de calibração preparadas no mesmo dia do ensaio e as velocidades iniciais da reação (v_0) foram calculadas. Para isso, a concentração dos enantiômeros do TEBOH foi normalizada pela concentração de proteínas microsossomais e o tempo de incubação. Por fim, os resultados foram

expressos através de gráficos que correlacionam v_0 vs. $[S]$ e v_0 vs. $v/[S]$ (gráfico de Eadie-Hofstee) utilizando o programa GraphPad Prism[®] versão 8.0.2. Os dados obtidos foram analisados conforme descrito na **seção 4.4.11** para a determinação dos parâmetros e dos perfis cinéticos.

4.4.10. Ligação às proteínas plasmáticas e microsossomais

A fração de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB, e *S*-(+)-TEB que não se liga às proteínas plasmáticas e microsossomais foi determinada em dois experimentos independentes incubando os compostos [(n=3), concentração ao redor de 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$] com solução tampão fosfato (100 mmol L^{-1} , pH 7,4) e com (I) HLM (concentração proteica de 0,20 mg mL^{-1}) e (II) plasma humano (concentração proteica de 42 mg mL^{-1}) (CHANG et al., 2010) à 37°C por 20 minutos, sem a adição de NADPH. Controles (n=3), sem a adição de (I) HLM e (II) plasma humano, também foram preparados simultaneamente.

Alíquotas de 3000 μL de cada amostra foram transferidas para tubos de policarbonato (13 x 64 mm, Beckman Coulter, Inc., Califórnia, EUA) e as amostras foram ultracentrifugadas por 120 minutos à 150 000 x *g* e 4°C (Optima MAX Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Inc., Califórnia, EUA). Após a ultracentrifugação, (I) 500 μL do sobrenadante das amostras contendo HLM e (II) 500 μL da parte superior do sobrenadante da camada intermediária das amostras contendo plasma humano foram coletados e submetidos ao preparo de amostra (**seção 4.4.6**). Posteriormente, as análises foram feitas por CLAE-EM/EM (**seção 4.4.7**).

As frações de TEB não ligadas às proteínas microsossomais ($f_{u,mic}$) e às proteínas plasmáticas ($f_{u,plasma}$) foram determinadas de acordo com a **Equação 10** (CHANG et al., 2010).

$$f_{u,mic} \text{ ou } f_{u,plasma} = A_{amostra}/A_{controle} \quad (10)$$

sendo $A_{amostra}$ – área de TEB obtida na análise das amostras; $A_{controle}$ – área de TEB obtida na análise dos controles, ambos após a ultracentrifugação.

4.4.11. Análise dos dados de cinética enzimática e predição de parâmetros toxicocinéticos in vivo

Os perfis obtidos durante os estudos de cinética enzimática foram visualmente analisados através de gráficos que correlacionavam v_0 vs. $[S]$ e também através de gráficos de

Eadie-Hofstee (v_0 vs. $v_0/[S]$) para então determinar os modelos cinéticos mais apropriados. Com isso, os valores da V_{max} e K_M foram obtidos seguindo ou o modelo de Michaelis-Menten (**Equação 11**), ou o modelo de cinética bifásica (**Equação 12**).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$

sendo V_{max} – velocidade máxima da reação de metabolismo; K_M – constante de Michaelis-Menten e $[S]$ – concentração de substrato (SEIBERT; TRACY, 2014a).

$$v = \frac{(V_{max1} \cdot [S]) + CL_{int2} \cdot [S]^2}{(K_{M1} + [S])} \quad (12)$$

sendo V_{max1} e K_{m1} – velocidade máxima da reação de metabolismo e constante de Michaelis-Menten para o sítio de alta afinidade, respectivamente, obtidos através da porção pseudo-hiperbólica da curva de cinética bifásica; CL_{int2} – equivale ao coeficiente angular da porção linear da curva de cinética bifásica e é definido como o *clearance* intrínseco do sítio de baixa afinidade (V_{max2}/K_{M2}). Novamente, $[S]$ corresponde a concentração de substrato (SEIBERT; TRACY, 2014b).

No modelo de Michaelis-Menten, o $CL_{int, in vitro}$ foi calculado pela razão entre V_{max} e K_M (V_{max}/K_M) e no modelo de cinética bifásica, o $CL_{int, in vitro}$ total foi calculado pela soma de CL_{int1} e CL_{int2} (BORN et al., 2000).

Em seguida, extrapolações in vitro-in vivo foram realizadas levando em consideração que 1 g de fígado humano possui 40 mg de proteínas microssomais e que uma pessoa apresenta, aproximadamente, 21,4 gramas de fígado para cada kg de peso corpóreo (CARRÃO et al., 2019a) e assim o *clearance* hepático intrínseco in vivo ($CL_{int, in vivo}$) foi obtido.

CL_H e E_H foram calculadas de acordo com a **Equação 13** (BOWMAN; BENET, 2018) e **Equação 14** (DAMRE; IYER, 2012), respectivamente.

$$CL_H = \frac{Q \times (f_{u,plasma} / f_{u,mic}) \times CL_{int,in vivo}}{Q + (f_{u,plasma} / f_{u,mic}) \times CL_{int,in vivo}} \quad (13)$$

sendo CL_H – *clearance* hepático; $f_{u,plasma}$ – fração de TEB não ligada às proteínas plasmáticas; $f_{u,mic}$ – fração de TEB não ligada às proteínas microssomais; $CL_{int, in vivo}$ – *clearance* hepático intrínseco in vivo e Q – fluxo sanguíneo hepático ($20 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) (BOWMAN; BENET, 2018).

$$E_H = \frac{(f_{u,plasma} / f_{u,mic}) \times CL_{int,in vivo}}{Q + (f_{u,plasma} / f_{u,mic}) \times CL_{int,in vivo}} \times 100 \quad (14)$$

em que E_H – taxa de extração hepática; $f_{u,plasma}$ – fração de TEB não ligada às proteínas plasmáticas; $f_{u,mic}$ – fração de TEB não ligada às proteínas microsossomais; $CL_{int,in vivo}$ – *clearance* hepático intrínseco in vivo e Q – fluxo sanguíneo hepático ($20 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) (DAMRE; IYER, 2012).

4.4.12. Fenotipagem (mapeamento enzimático)

As isoformas do CYP450 envolvidas na reação de 1-hidroxilação do TEB foram determinadas utilizando tanto inibidores químicos seletivos (seção 4.4.12.1), quanto rCYP450 (Supersomes[®], seção 4.4.12.2).

As concentrações de TEB utilizadas no estudo foram próximas aos valores de K_M obtidos nos estudos de cinética enzimática (seção 4.5.2): para o monitoramento da reação de 1-hidroxilação do *rac*-TEB produzindo *S*-(+)-TEBOH [*rac*-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH] e *R*-(-)-TEBOH [*rac*-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH], assim como da reação de 1-hidroxilação do *R*-(-)-TEB produzindo *R*-(-)-TEBOH [*R*-(-)-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH], foram utilizadas duas concentrações distintas de TEB, 0,50 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, devido aos perfis cinéticos bifásicos observados. Já para o monitoramento da reação de 1-hidroxilação do *S*-(+)-TEB produzindo *S*-(+)-TEBOH [*S*-(+)-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH], que apresentou perfil cinético de Michaelis-Menten, foi utilizada apenas uma concentração de *S*-(+)-TEB, igual a 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (RODRIGUES, 1999).

4.4.12.1. Inibidores químicos seletivos

Para esse ensaio, 2,5 μL de solução padrão de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB foram pipetados, individualmente, em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf[®] (n=3), seguido da adição de 2,5 μL de soluções padrão dos inibidores químicos seletivos citados na Tabela 11, 105 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) e 40 μL de HLM (concentração proteica no meio igual 0,2 mg mL^{-1}). Controles negativos (n=3), sem os inibidores químicos, também foram preparados.

Em seguida, as amostras foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C em banho termostático e as reações foram iniciadas com a adição de 50 μL de solução do sistema de regeneração de NADPH, com exceção das reações catalisadas pela CYP2B6 e CYP2E1, cujos inibidores químicos seletivos eram do tipo tempo-dependente.

Tabela 11- Inibidores químicos seletivos e suas respectivas concentrações empregadas nos estudos de fenotipagem.

Isoforma	Inibidor Químico Seletivo	Referência
CYP2D6	Quinidina (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	(BARTH et al., 2015)
CYP2C9	Sulfafenazol (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	(WUSTROW et al., 2012)
CYP2C8	Montelucaste (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	(NIROGI et al., 2015)
CYP1A2	α -naftoflavona (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	(BARTH et al., 2015)
CYP3A4/5	Cetoconazol (0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	(NIROGI et al., 2015)
CYP2B6	Ticlopidina (3 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	(WALSKY; OBACH, 2007)
CYP2C19	Ticlopidina (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	(BARTH et al., 2015)
CYP2E1	Dietilditiocarbamato (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	(WUSTROW et al., 2012)

Fonte: Autoria Própria

No caso da CYP2B6, a ticlopidina foi pré-incubada por 10 minutos na presença de HLM e do sistema de regeneração de NADPH. Posteriormente, uma diluição (10 vezes) foi feita e a reação foi iniciada com a adição de TEB.

Já para a CYP2E1, por sua vez, o dietilditiocarbamato foi pré-incubado por 15 minutos também na presença de HLM e do sistema de regeneração de NADPH antes da reação ser iniciada com a adição de TEB.

Transcorridos os 20 minutos de incubação, as reações foram interrompidas através da adição de solvente orgânico, seguido das etapas de preparo de amostra (seção 4.4.6) para posterior análise por CLAE-EM/EM (seção 4.4.7).

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição enzimática utilizando a **Equação 15**:

$$\% \text{Inibição} = ((A_0 - A_i) / v_0) \times 100 \quad (15)$$

sendo A_0 – área dos enantiômeros do TEBOH no controle negativo; A_i – área dos enantiômeros do TEBOH em amostras incubadas com o inibidor químico seletivo.

Gráficos de %Inibição vs. isoforma do CYP450 foram construídos pelo programa GraphPad Prism[®] versão 8.0.2. As isoformas que as atividades enzimáticas foram inibidas mais do que 40% pelo inibidor químico seletivo foram consideradas com participação significativa na reação de 1-hidroxilação do TEB (JING et al., 2013).

4.4.12.2. Emprego de rCYP450

Na realização desse ensaio, 5 μL de solução padrão de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB foram pipetados, individualmente, em tubos de 2 mL do tipo Eppendorf® (n=3), seguido da adição de 105 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) e 40 μL de rCYP450 (concentração final no meio de 50 pmol mL⁻¹).

As rCYP450s avaliadas foram: rCYP1A2, rCYP2B6, rCYP2C19, rCYP2C8, rCYP2C9, rCYP2D6, rCYP2E1, rCYP3A4 e rCYP3A5. Controle negativos (n=3), contendo células de inseto ao invés de rCYP450, foram preparados simultaneamente para efeito de comparação.

As amostras foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C em banho termostático e as reações iniciadas com a adição de 50 μL de solução do sistema de regeneração de NADPH, ocorrendo por 20 minutos. Após esse tempo de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de solvente orgânico, seguido das etapas de preparo de amostra (seção 4.4.6) para posterior análise por CLAE-EM/EM (seção 4.4.7). Curvas de calibração foram preparadas no mesmo dia do ensaio e as velocidades de formação dos enantiômeros do TEBOH foram calculadas.

Como as rCYP450s apresentam atividades catalíticas muito elevadas quando comparadas com os níveis apresentados nos HLM, os resultados foram primeiramente normalizados. Para isso foi considerado a abundância de cada isoforma nos HLM nativos (Tabela 12).

Tabela 12- Concentrações das principais isoformas do CYP450 presentes em HLM.

Isoforma	Concentração presente em HLM (pmol de CYP/ mg)
CYP2D6	10
CYP2C9	96
CYP2C8	64
CYP1A2	45
CYP3A4	108
CYP3A5	1
CYP2B6	39
CYP2C19	19
CYP2E1	49

Fonte: Adaptado de RODRIGUES, 1999.

Com a normalização foi possível obter a contribuição relativa de cada isoforma para o metabolismo do TEB (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008). Posteriormente, as velocidades das reações foram multiplicadas pelo conteúdo médio de cada isoforma nos HLM nativos (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008) a fim de obter uma velocidade normalizada (VN) (RODRIGUES, 1999).

As VNs para todas as isoformas avaliadas foram somadas, o que resultou na velocidade total normalizada (VTN). Posteriormente, a VN da reação catalisada por cada isoforma foi expressa como porcentagem da VTN, conforme descrito na **Equação 16**:

$$\% \text{VTN} = (\text{VN} / \text{VTN}) \times 100 \quad (16)$$

sendo VN – velocidade normalizada catalisada por cada isoforma do CYP450; VTN – velocidade total normalizada

Por fim, gráficos de %VTN vs. isoforma do CYP450 foram construídos no programa GraphPad Prism® versão 8.0.2. A contribuição de uma determinada isoforma no metabolismo do TEB foi considerada significativa se o resultado de %VTN fosse maior ou igual a 30% (RODRIGUES, 1999).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Estudos prévios

Para iniciar os estudos de determinação dos perfis e parâmetros cinéticos da reação de metabolismo in vitro do TEB foi necessário realizar diversos ensaios prévios com o objetivo de garantir a confiabilidade dos resultados.

Dentre esses ensaios estão a avaliação da solubilidade e da racemização do TEB no meio de incubação, a avaliação da capacidade das enzimas do CYP450 presentes nos HLMs de catalisar o metabolismo do TEB, bem como a definição das condições de incubação que seriam utilizadas nos estudos de cinética enzimática, denominado ensaio de pré-cinética.

4.5.1.1. Solubilidade

Para definir os perfis e determinar os parâmetros cinéticos de uma reação catalisada por enzimas é recomendado utilizar um amplo intervalo de concentração do substrato. Esse intervalo deve compreender desde concentrações baixas (menor concentração possível que possa ser quantificada com precisão e exatidão adequadas) até a maior concentração possível, que é limitada pela solubilidade do composto no meio de incubação (SEIBERT; TRACY, 2014b).

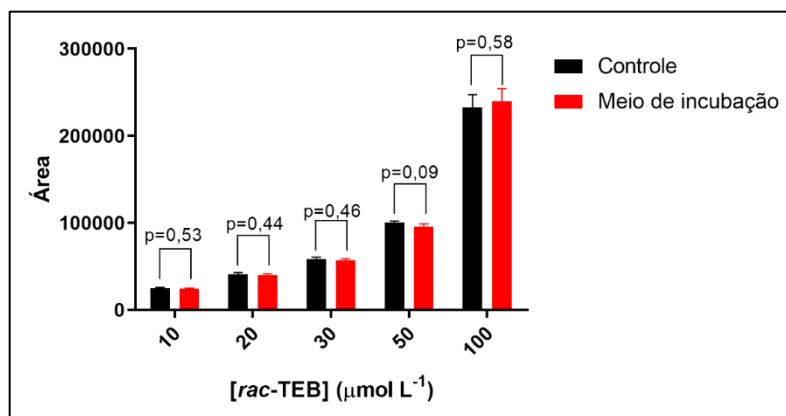
A solubilidade parcial ou insolubilidade do substrato no meio de incubação impacta negativamente a quantificação dos parâmetros cinéticos (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), uma vez que é necessário garantir que o substrato esteja disponível em sua totalidade para interagir com as enzimas presentes no meio, permitindo, assim, que sejam obtidos resultados confiáveis e reprodutíveis.

Portanto, a solubilidade do *rac*-TEB em solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) e solução tampão Tris-KCl (pH 7,4; 0,05 mol L⁻¹), que são as soluções que compõem o meio de incubação nos estudos envolvendo as enzimas do CYP450, foi avaliada.

Os dados obtidos nessa etapa mostraram que o TEB é solúvel no meio de incubação até a concentração de 100 μmol L⁻¹ (**Figura 21**), uma vez que não houve diferença significativa entre as áreas do TEB resultantes da análise dos controles (considerado como 100% de solubilidade) e as áreas do TEB resultantes da análise das amostras ($p > 0,05$).

Com isso, ficou definido que as soluções utilizadas nos estudos de metabolismo in vitro e inibição enzimática seriam preparadas em metanol e que a concentração máxima de TEB utilizada seria de até 100 μmol L⁻¹.

Figura 21- Avaliação da solubilidade do TEB no meio de incubação.



Condição: meio de incubação composto por 145 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) e 50 μL de solução tampão Tris-KCl (pH 7,4; 0,05 mol L⁻¹). **Fonte:** Autoria própria.

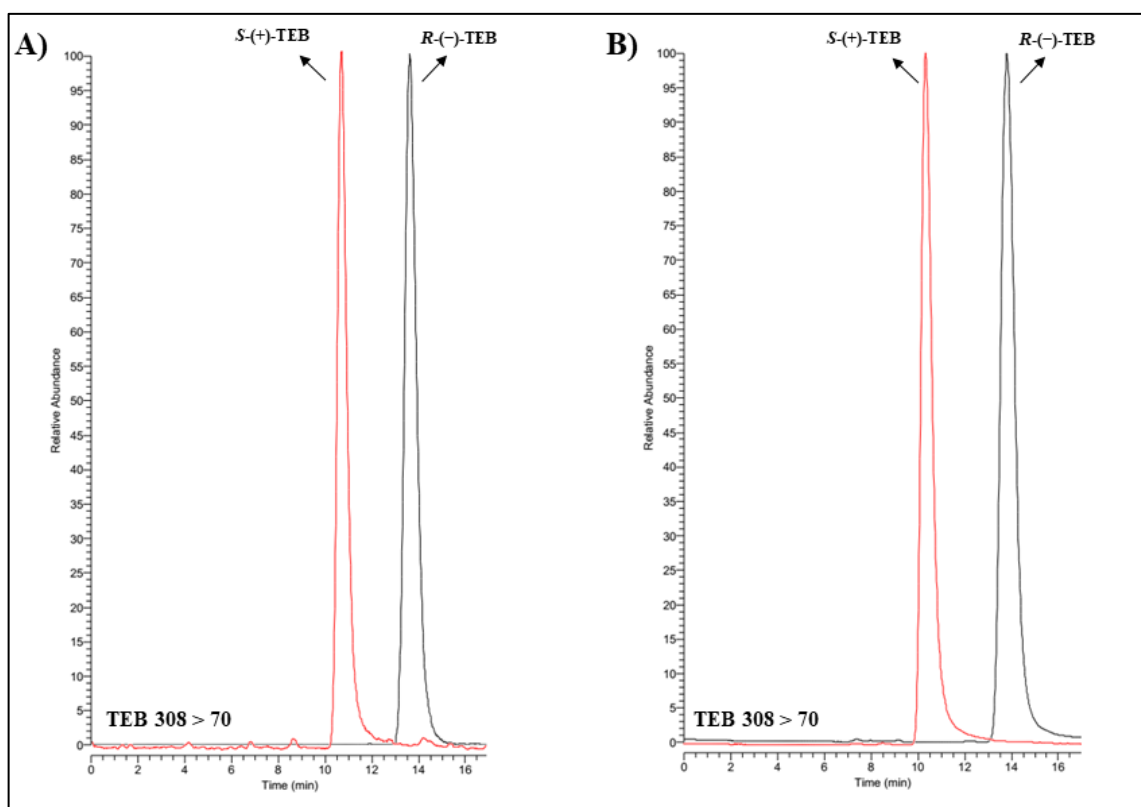
4.5.1.2. Racemização

A racemização é o processo de conversão de um composto enantiomericamente puro em uma mistura racêmica (SOLOMONS; FRYHKE, 2012). Essa conversão pode acontecer de maneira parcial (racemização parcial) ou completa (racemização completa) (SOLOMONS; FRYHKE, 2012) e tal processo depende de diferentes fatores, tais como as características físico-químicas da molécula, o pH ao qual ela é submetida, bem como a temperatura e o tempo de exposição.

A racemização dos enantiômeros do TEB foi avaliada qualitativamente pela observação dos cromatogramas resultantes da análise das amostras preparadas de acordo com a **seção 4.4.8.2**.

Como é possível observar pela **Figura 22**, não houve racemização dos enantiômeros do TEB quando incubados por 60 minutos à 37°C na ausência do sistema de regeneração de NADPH e de HLM. Com isso, concluiu-se que era possível avaliar o metabolismo *in vitro* desse praguicida de maneira enantiosseletiva.

Figura 22- Estudo de racemização do (—) *S*-(+)-TEB e (—) *R*-(-)-TEB ao serem submetidos às condições de incubação.



A) 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TEB e **B)** 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TEB. Condições de incubação: 60 minutos à 37°C em banho termostático na ausência do sistema de regeneração de NADPH e de HLM. **Fonte:** Autoria própria.

4.5.1.3. Estabilidade metabólica do TEB na presença das enzimas do CYP450

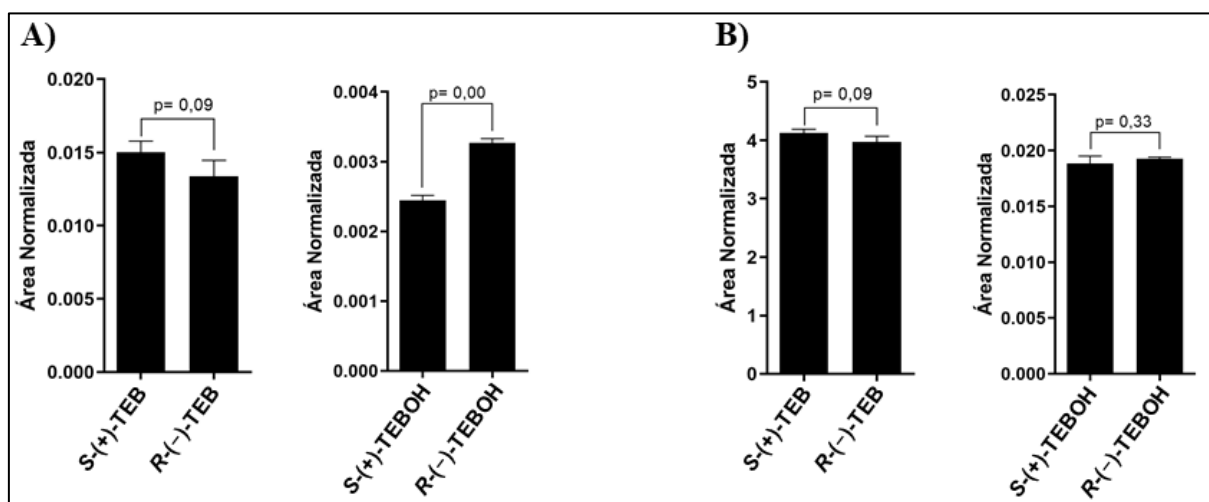
O estudo de estabilidade metabólica do *rac*-TEB na presença das enzimas do CYP450 foi realizado com o objetivo de comprovar a capacidade dessa família de enzimas de catalisar o metabolismo *in vitro* desse composto. Para isso foi monitorado tanto o decaimento dos enantiômeros do TEB, quanto a formação dos enantiômeros do TEBOH.

O TEBOH é o principal metabólito produzido a partir das reações de metabolismo de fase I do TEB e já foi encontrado na urina de trabalhadores rurais (FUSTINONI et al., 2014; MERCADANTE et al., 2014). Sendo assim, monitorar a formação dos enantiômeros do TEBOH durante as reações de metabolismo *in vitro* é uma importante ferramenta para avaliar a enantiosseletividade do processo.

Os resultados obtidos comprovaram que o TEB é metabolizado pelas enzimas do CYP450 que estão presentes nos HLM e que durante a reação ocorre a formação dos enantiômeros do TEBOH. Isso tornou possível a posterior determinação dos parâmetros cinéticos dessa reação.

Além disso, através dos resultados foi possível observar que, em concentração baixa de *rac*-TEB ($8,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e nas condições de incubação empregadas, houve um maior decaimento do *R*-(-)-TEB em comparação com o *S*-(+)-TEB, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figura 23A**). Em contrapartida, observou-se diferença significativa entre a formação de *S*-(+)-TEBOH e *R*-(-)-TEBOH ($p < 0,05$), sendo que o *R*-(-) TEBOH foi formado em maior quantidade (**Figura 23A**).

Figura 23- Estudo de estabilidade metabólica do *rac*-TEB na presença das enzimas do CYP450.



Condição de incubação: concentrações de *rac*-TEB: **A)** $8,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e **B)** $75 \mu\text{mol L}^{-1}$; concentração de HLM igual a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e tempo de incubação de 50 minutos. **Fonte:** Autoria própria.

Quando a concentração *rac*-TEB adicionada ao meio de incubação foi alta ($75 \mu\text{mol L}^{-1}$), por sua vez, não foi verificado esse mesmo comportamento (**Figura 23B**), pois não houve diferença significativa tanto no decaimento dos enantiômeros do TEB, quanto na formação dos enantiômeros do TEBOH ($p > 0,05$).

Isso indicou, de imediato, que o metabolismo *in vitro* do TEB catalisado pelas enzimas do CYP450 presentes nos HLM poderia ser enantiosseletivo dependendo da concentração desse substrato. Então, a enantiosseletividade foi avaliada posteriormente através dos estudos de cinética enzimática e predição dos parâmetros toxicocinéticos *in vivo*.

4.5.1.4. Condições de incubação para os ensaios de cinética enzimática (*pré-cinética*)

Os estudos para determinação dos parâmetros cinéticos de uma reação enzimática devem ser realizados em condições de v_0 , ou seja, condições nas quais a formação do metabólito ou o decaimento do substrato é linear de acordo com a concentração de proteínas e o tempo de incubação empregados (BARR; FLORA; IWUCHUKWU, 2014).

Além disso, ainda é recomendável utilizar uma baixa concentração de proteínas microsossomais com o objetivo de diminuir ao máximo ligações não-específicas entre as proteínas e o substrato (LI et al., 2014). Ligações não-específicas fazem com que a [S] livre no sistema seja menor e, conseqüentemente, os valores de K_M obtidos durante os estudos podem ser superestimados (WATERS; OBACH; DI, 2014), o que afeta a exatidão da predição do CL_H (WANG; GIBSON, 2014).

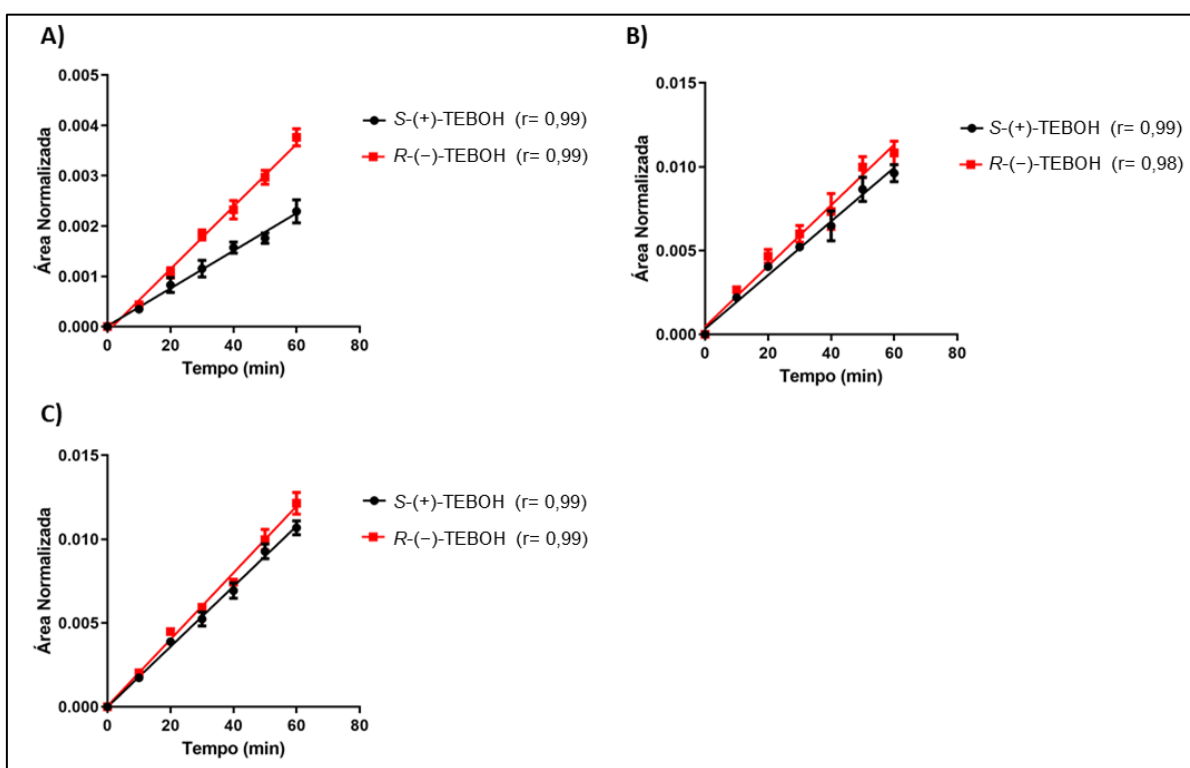
Dessa forma, tais critérios foram tidos como base para determinar as condições de incubação dos estudos de cinética enzimática. A concentração proteica foi fixada em $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, que foi a menor concentração de proteínas microsossomais na qual se detectou a formação dos enantiômeros do TEBOH após incubação do TEB. Já os tempos de incubação avaliados foram 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. A partir de 60 minutos as enzimas podem ser degradadas ou perder atividade devido ao acúmulo de espécies oxidativas no meio (COE; KOUDRIAKOVA, 2014).

Como pode ser observado na **Figura 24**, a formação dos enantiômeros do TEBOH mostrou uma tendência linear até 60 minutos utilizando $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas microsossomais, o que pode ser comprovado pelos valores de coeficiente de correlação maiores ou iguais a 0,98 em todos os casos. Optou-se então por fixar o tempo de incubação das reações em 20 minutos. Esse tempo era suficiente para formação dos enantiômeros do TEBOH em concentrações detectáveis e quantificáveis. Ademais, nessas condições o decaimento dos enantiômeros do

TEB foi de no máximo 20% (**Figura 25**), o que também é recomendável para estudos de cinética enzimática (COE; KOUDRIAKOVA, 2014).

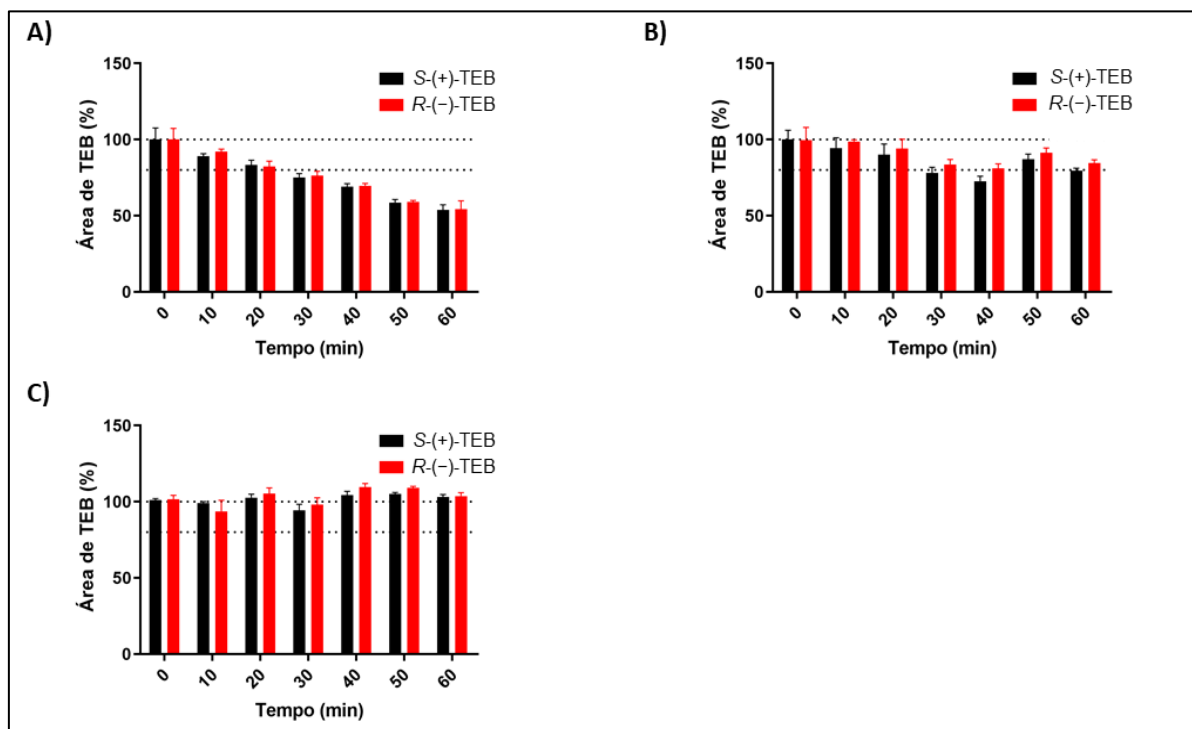
Com isso, ficou definido que os estudos para determinação dos parâmetros cinéticos da reação de degradação do TEB formando os enantiômeros do TEBOH seriam conduzidos utilizando $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas microsomais presentes nos HLM, 20 minutos de incubação e a concentração de *rac*-TEB e de seus enantiômeros isolados seria variada de $0,35\text{-}75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 24- Formação dos enantiômeros do TEBOH de acordo com o tempo de incubação e em diferentes concentrações de TEB.



Condições de incubação: concentração de HLM igual $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, tempo de incubação de 0-60 minutos e concentração de *rac*-TEB de **A)** $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, **B)** $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e **C)** $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. **Fonte:** Autoria própria.

Figura 25- Porcentagens de área dos enantiômeros do TEB de acordo com o tempo de incubação e em diferentes concentrações.



Condições de incubação: concentração de HLM igual $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, tempo de incubação de 0-60 minutos e concentração de *rac*-TEB de A) $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, B) $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e C) $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. **Fonte:** Autoria própria.

4.5.2. Cinética enzimática

A população está constantemente exposta ao TEB indiretamente, através da dieta (FREEMAN et al., 2016) ou exposição ambiental (COTTON et al., 2016; HERRERO-HERNÁNDEZ et al., 2013; PÉREZ et al., 2021), e também diretamente, através da exposição ocupacional durante sua aplicação nas lavouras (FUSTINONI et al., 2014), o que representa riscos à saúde humana devido as problemáticas apresentadas anteriormente no **Capítulo 1**.

O comportamento dos enantiômeros do TEB, bem como da mistura racêmica, no organismo humano ainda é desconhecido em diversas vertentes e para ajudar a compreender isso é muito importante avaliar o metabolismo *in vitro* enantiosseletivo do TEB empregando modelo humano. Para isso, foi monitorada e quantificada a produção enantiosseletiva *in vitro* do seu principal metabólito hidroxilado, o TEBOH, um composto também quiral e que já foi encontrado e quantificado em amostras de urina humana (MERCADANTE et al., 2014).

Os resultados da reação metabólica catalisada pelas enzimas do CYP450 presentes nos HLM mostraram que o TEBOH era produzido apenas quando o TEB era incubado na presença do sistema de regeneração de NADPH (seção 4.5.1.3). Isso indica que a reação de 1-hidroxilação do TEB é NADPH-dependente e catalisada pelas enzimas do CYP450 presentes

nos HLM. Além disso, não foi observado, nas condições avaliadas, a formação do tebuconazol-ácido carboxílico, outro metabólito que também já foi encontrado em amostras de urina humana (MERCADANTE et al., 2014). Através dos ensaios também foi possível constatar que quando o *rac*-TEB foi incubado com HLM e NADPH, ambos os enantiômeros do TEBOH foram formados, porém em diferentes proporções, indicando a formação de uma mistura enantiomericamente enriquecida em *R*-(-)-TEBOH. Por outro lado, a incubação do *R*-(-)-TEB isoladamente produziu apenas *R*-(-)-TEBOH e a incubação do *S*-(+)-TEB isoladamente produziu apenas *S*-(+)-TEBOH.

Com base nessa rota metabólica, os parâmetros e perfis cinéticos *in vitro* dessas reações foram determinados (**Tabela 13**). Os resultados mostraram que a reação de *S*-(+)-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH foi a única que apresentou perfil cinético típico de Michaelis-Menten. Em baixas concentrações de *S*-(+)-TEB, a velocidade da reação aumentava de maneira linear com o aumento de [S], enquanto que em concentrações elevadas de *S*-(+)-TEB a velocidade permaneceu praticamente constante (**Figura 26A**), ou seja, a enzima atingiu condições de saturação e a cinética se tornou de ordem zero (SEIBERT; TRACY, 2014b) .

Tabela 13- Parâmetros cinéticos e perfis cinéticos para a reação de 1-hidroxilação do TEB catalisada por HLM.

Reação metabólica	K_{M1} ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$V_{\text{max}1}$ ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$CL_{\text{int}1, \text{in vitro}}$ ^b ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$CL_{\text{int}2, \text{in vitro}}$ ^c ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$CL_{\text{int, in vitro}}$ ^d ($\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Perfil Cinético
<i>Rac</i> -TEB → Mistura enantiomericamente enriquecida em <i>R</i> -(-)-TEBOH	0,73 ± 0,06	0,0376 ± 0,0008	51 ± 4	0,47 ± 0,03	52 ± 4	Bifásico
<i>Rac</i> -TEB → <i>S</i> -(+)-TEBOH	1,05 ± 0,09	0,0193 ± 0,0004	18 ± 2	0,19 ± 0,01	19 ± 2	Bifásico
<i>Rac</i> -TEB → <i>R</i> -(-)-TEBOH	0,57 ± 0,06	0,0190 ± 0,0005	33 ± 3	0,28 ± 0,01	33 ± 3	Bifásico
<i>S</i> -(+)-TEB → <i>S</i> -(+)-TEBOH	0,99 ± 0,06	0,0537 ± 0,0006	54 ± 3	—	54 ± 3	Michaelis-Menten
<i>R</i> -(-)-TEB → <i>R</i> -(-)-TEBOH	0,86 ± 0,06	0,0456 ± 0,0008	53 ± 4	0,35 ± 0,02	53 ± 4	Bifásico

^a Dados expressados como média ± estimativa do desvio padrão (n=3).

^b $CL_{\text{int}1, \text{in vitro}}$ = *clearance* hepático intrínseco do sítio de alta afinidade ($V_{\text{max}1}/K_{M1}$), determinado in vitro.

^c $CL_{\text{int}2, \text{in vitro}}$ = *clearance* hepático intrínseco do sítio de baixa afinidade (coeficiente angular da porção linear referente à cinética bifásica), determinado in vitro.

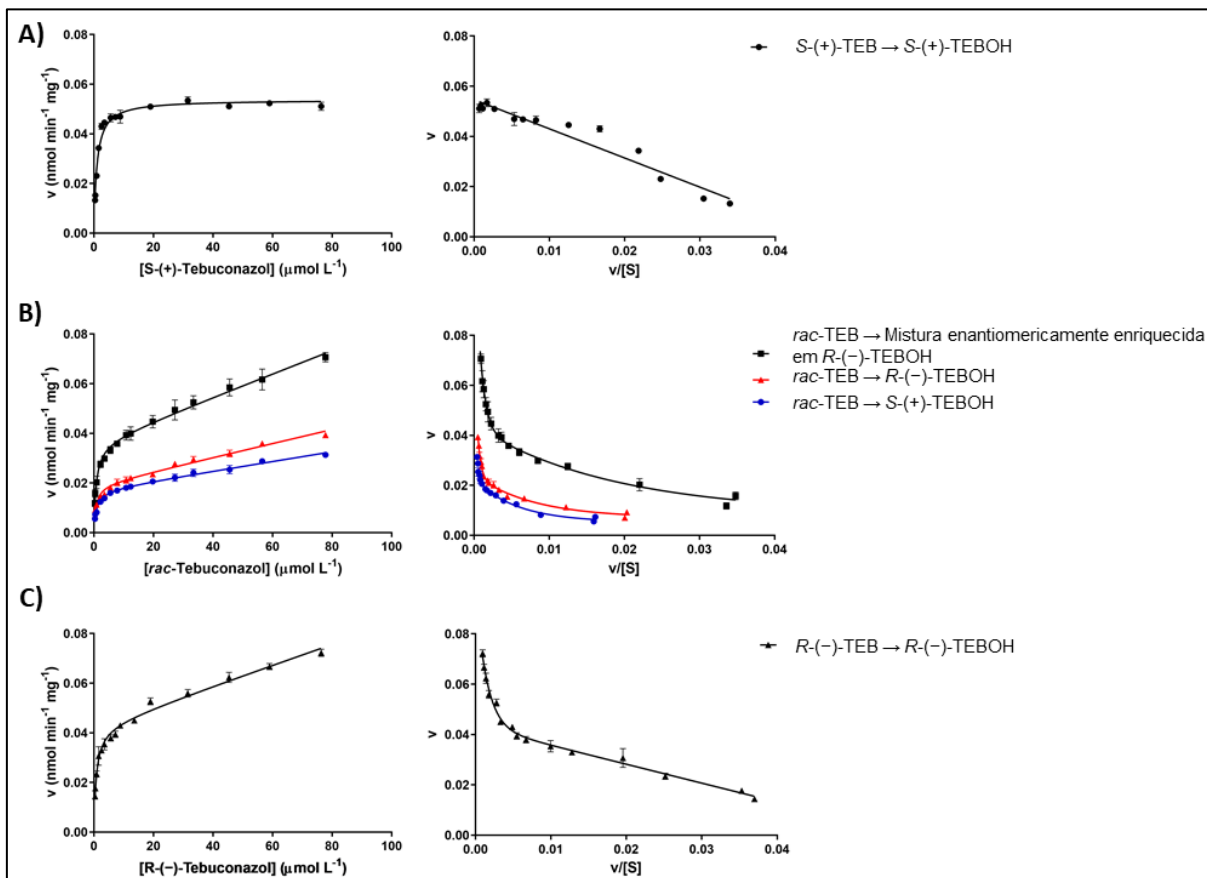
^d CL_{int} = *clearance* hepático intrínseco total ($CL_{\text{int}1} + CL_{\text{int}2}$), determinado in vitro.

Fonte: HABENSCHUS et al., 2019.

Em contrapartida, a reação de 1-hidroxilação do *rac*-TEB produzindo uma mistura enantiomericamente enriquecida em *R*-(-)-TEBOH [*rac*-TEB \rightarrow Mistura enantiomericamente enriquecida em *R*-(-)-TEBOH], *rac*-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH e *rac*-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH (**Figura 26B**), assim como a reação de *R*-(-)-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH (**Figura 26C**) exibiram perfis de cinética bifásica, sem que a enzima alcançasse saturação mesmo quando o TEB era incubado em concentrações elevadas. Nesses casos, a velocidade da reação continuou a aumentar linearmente em função da concentração de TEB, o que é característico de cinética bifásica (SEIBERT; TRACY, 2014b).

Com o intuito de confirmar tais perfis cinéticos, foram plotados também gráficos de Eadie-Hofstee (v_0 vs. $v_0/[S]$). Esses gráficos mostraram claramente o perfil cinético de Michaelis-Menten para *S*-(+)-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH e os perfis cinéticos bifásicos atípicos para *rac*-TEB \rightarrow Mistura enantiomericamente enriquecida em *R*-(-)-TEBOH, *rac*-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH, *rac*-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH e *R*-(-)-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH. Perfis cinéticos atípicos ocorrem quando a reação é catalisada por mais de uma enzima ou por uma enzima com múltiplos sítio de ligação (SEIBERT; TRACY, 2014b) e só é possível observá-los se os valores de K_M e V_{max} para as reações catalisadas por diferentes enzimas, ou por enzimas com múltiplos sítios, forem suficientemente diferentes (SEIBERT; TRACY, 2014b).

Figura 26- Gráficos de cinética enzimática e Eadie-Hofstee para a reação de 1-hidroxilação *in vitro* enantiosseletiva do TEB após incubação por 20 minutos com HLM ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$).



A) $S-(+)-\text{TEB}$ produzindo (●) $S-(+)-\text{TEBOH}$; **B)** rac-TEB produzindo (■) Mistura enantiomericamente enriquecida em $R(-)-\text{TEBOH}$, (▲) $R(-)-\text{TEBOH}$ e (●) $S-(+)-\text{TEBOH}$; **C)** $R(-)-\text{TEB}$ produzindo (▲) $R(-)-\text{TEBOH}$. Cada ponto é reportado como a média \pm estimativa do desvio padrão das triplicatas ($n=3$). **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019.

Com os dados plotados de acordo com os modelos adequados, os valores de K_M e V_{\max} assim como os valores de $CL_{\text{int1, in vitro}}$ e $CL_{\text{int2, in vitro}}$, quando apropriado, foram determinados, e esses valores foram usados para estimar $CL_{\text{int, in vitro}}$, que indica a capacidade funcional das enzimas do CYP450, presentes no fígado, de metabolizar o TEB na ausência de fluxo sanguíneo hepático e na ausência de ligações às proteínas plasmáticas (GABRIELSSON; WEINER, 2010).

Os resultados indicaram que a reação $\text{rac-TEB} \rightarrow R(-)-\text{TEBOH}$ resultou em um valor de $CL_{\text{int, in vitro}}$ cerca de 1,8 vezes maior do que o $CL_{\text{int, in vitro}}$ para a reação $\text{rac-TEB} \rightarrow S-(+)-\text{TEBOH}$ (Tabela 13). Portanto, na ausência de fluxo sanguíneo hepático e na ausência de ligação as proteínas, o $R(-)-\text{TEB}$ é preferencialmente metabolizado *in vitro* quando o rac-TEB é incubado com HLM, produzindo uma mistura enantiomericamente enriquecida com $R(-)-\text{TEBOH}$. Isso sugere que, quando o TEB é incubado na forma de mistura racêmica, ambos os enantiômeros podem interagir entre si, competindo para se ligar ao sítio ativo da enzima, o que

contribuiu para o metabolismo *in vitro* preferencial de um enantiômero quando comparado ao outro.

SHEN et al., 2012 observaram o mesmo comportamento quando estudaram o metabolismo *in vitro* enantiosseletivo do TEB utilizando microssomas hepáticos de ratos. Eles concluíram que a razão para isso era uma inibição competitiva entre os enantiômeros do TEB (SHEN et al., 2012). Porém, ao contrário do que foi observado no estudo com microssomas hepáticos de ratos, no estudo com HLM o enantiômero *R*-(-)-TEB deve ter um potencial inibitório maior do que o *S*-(+)-TEB, pois o $CL_{int, in vitro}$ para *rac*-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH foi menor do que para *rac*-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH.

Por outro lado, quando o *R*-(-)-TEB e o *S*-(+)-TEB foram incubados individualmente com HLM, apesar dos perfis cinéticos serem distintos, os valores de $CL_{int, in vitro}$ para a formação de ambos os enantiômeros do TEBOH foram semelhantes (53 e 54 $\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para a formação do *R*-(-)-TEBOH e *S*-(+)-TEBOH, respectivamente). Isso sugere que, na ausência de fluxo sanguíneo hepático e ligações as proteínas, a capacidade do fígado de depurar os enantiômeros isolados é igual (**Tabela 13**). Além disso, comparações entre os valores de $CL_{int, in vitro}$ das reações em que *rac*-TEB era o substrato com os valores de $CL_{int, in vitro}$ das reações em que *R*-(-)-TEB ou o *S*-(+)-TEB eram os substratos, demonstraram que o *R*-(-)-TEBOH e o *S*-(+)-TEBOH foram extensivamente formados quando os enantiômeros foram incubados isoladamente.

Essas diferenças no metabolismo do TEB não teriam sido observadas se os ensaios fossem realizados monitorando o TEBOH como um composto aquiral, pois os valores de $CL_{int, in vitro}$ para o metabolismo dos enantiômeros isolados foi similar ao valor de $CL_{int, in vitro}$ para *rac*-TEB \rightarrow Mistura enantiomericamente enriquecida em *R*-(-)-TEBOH (**Tabela 13**). Isso reforça a importância de se desenvolver um método analítico enantiosseletivo para analisar os enantiômeros do TEB e TEBOH e também a importância de se conduzir os estudos de maneira enantiosseletiva.

4.5.3. Ligação às proteínas plasmática e microssomais, parâmetros toxicocinéticos e extrapolações *in vitro*- *in vivo*

As frações de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB não ligadas às proteínas plasmáticas e microssomais ($f_{u,mic}$ e $f_{u,plasma}$, respectivamente) foram individualmente determinadas com o intuito de extrapolar os valores de $CL_{int, in vitro}$ para obter alguns parâmetros toxicocinéticos *in vivo*.

Ligações não-específicas às proteínas microsossomais em estudos in vitro de cinética enzimática podem provocar uma superestimação dos valores de K_M , pois a $[S]$ livre no sistema será menor (WANG; GIBSON, 2014). Com relação as ligações não-específicas às proteínas plasmáticas, uma alta afinidade por essas proteínas pode significar uma maior fração do composto presente na circulação sanguínea, o que pode levar a um menor volume de distribuição (KALAMARIDIS; PATEL, 2014). Já uma menor afinidade pode significar que o composto estará livre para se distribuir para os tecidos, resultando em um grande volume de distribuição (KALAMARIDIS; PATEL, 2014). Logo, os parâmetros afetam a exatidão da predição de CL_H e E_H , pois refletem a fração de TEB que estará disponível para ser metabolizada pelo fígado humano, e devem ser então considerados quando extrapolações in vitro-in vivo são feitas.

Os resultados da determinação de $f_{u,mic}$ e $f_{u,plasma}$ para o *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB pelo método de ultracentrifugação demonstraram que o *R*-(-)-TEB isolado tem maior afinidade pelas proteínas plasmáticas e microsossomais, seguido de *rac*-TEB e *S*-(+)-TEB, respectivamente. Os valores estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14- Valores de $f_{u,mic}$ e $f_{u,plasma}$ para o *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB obtidos pelo método de ultracentrifugação.

Substrato	$f_{u,mic}$	$f_{u,plasma}$
<i>rac</i> -TEB	0,90 ± 0,03	0,06 ± 0,01
<i>R</i> -(-)-TEB	0,83 ± 0,05	0,01 ± 0,00
<i>S</i> -(+)-TEB	0,95 ± 0,02	0,14 ± 0,03

Valores expressados como média ± estimativa do desvio padrão

Com os valores de $CL_{int, in vitro}$, $f_{u,mic}$ e $f_{u,plasma}$ e considerando o fluxo sanguíneo hepático (Q) igual a 20 mL min⁻¹ kg⁻¹, o CL_H e E_H do *rac*-TEB e de seus enantiômeros isolados foram calculados para predizer a contribuição do fígado no metabolismo do TEB em organismo humano (**Tabela 15**).

Tabela 15- Predição enantiosseletiva dos parâmetros toxicocinéticos in vivo para o TEB

Reação Metabólica	CL _H (mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	E _H (%)
<i>rac</i> -TEB → Mistura enantiomericamente enriquecida em <i>R</i> -(-)-TEBOH	2,6	13
<i>rac</i> -TEB → <i>S</i> -(+)-TEBOH	1,0	5,0
<i>rac</i> -TEB → <i>R</i> -(-)-TEBOH	1,7	8,7
<i>S</i> -(+)-TEB → <i>S</i> -(+)-TEBOH	5,1	25
<i>R</i> -(-)-TEB → <i>R</i> -(-)-TEBOH	0,53	2,7

Como os valores de CL_{int}, in vitro, $f_{u,mic}$ e $f_{u,plasma}$ para o *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB foram diferentes, as extrapolações sugeriram que os valores de CL_H e E_H também fossem. O CL_H indicou que o TEB pode ser enantiosseletivamente metabolizado pelo fígado. A reação *rac*-TEB → *R*-(-)-TEBOH pode ocorrer mais rapidamente do que a reação *rac*-TEB → *S*-(+)-TEBOH (razão entre os valores de CL_H igual a 1,7), portanto, uma mistura enantiomericamente enriquecida com *R*-(-)-TEBOH pode ser produzida.

Em contraste, quando os valores de CL_H para a reação de 1-hidroxilação dos enantiômeros isolados foram comparados, observou-se que pode ocorrer um metabolismo preferencial de *S*-(+)-TEB → *S*-(+)-TEBOH (razão entre os valores de CL_H de 9,5).

Já com relação aos valores de E_H (< 30%), os resultados demonstraram que o TEB pode ter que passar diversas vezes pelo fígado humano para ser totalmente depurado da corrente sanguínea por esse órgão, ou seja, tem um baixo efeito de primeira passagem. Ademais, o *S*-(+)-TEB aparenta ser mais facilmente metabolizado do que o *rac*-TEB e *R*-(-)-TEB, portanto a fração de *S*-(+)-TEB que deixaria o fígado sem ser completamente metabolizado, considerando uma ingestão oral, e alcançaria a circulação sistêmica seria menor do que as concentrações de *rac*-TEB e *R*-(-)-TEB. Consequentemente, a concentração de *S*-(+)-TEBOH que deixaria o fígado seria maior do que a concentração de *R*-(-)-TEBOH, e isso deve ser levado em consideração, uma vez que ainda não existem estudos avaliando a toxicidade enantiosseletiva do TEBOH.

O acúmulo do TEB no corpo humano depende também de vários outros fatores, tais como ingestão, absorção, transporte e excreção e, levando em consideração o metabolismo hepático, os resultados sugerem que, em uma pessoa frequentemente exposta a xenobióticos, por exemplo medicamentos, se esses medicamentos inibirem o metabolismo do TEB, que é catalisado pelas enzimas do CYP450, ou então se a pessoa sofrer danos hepáticos que prejudiquem suas funções metabólicas (por exemplo, esteatose hepática), o TEB poderia

acumular enantiosseletivamente no organismo. Isso poderia causar efeitos adversos, dependendo tanto da concentração, quanto dos efeitos tóxicos dos enantiômeros em específico, o que ainda não é muito bem esclarecido.

Ademais, outros estudos vêm demonstrando que o *R*-(-)-TEB é degradado mais lentamente do que o *S*-(+)-TEB em solos, em condições aeróbias e anaeróbias (LI et al., 2015), em vegetais (WANG et al., 2012) e também é preferencialmente acumulado em peixes-zebra (*Danio rerio*) (LIU et al., 2016). Essa dissipação enantiosseletiva do TEB no meio ambiente pode resultar em uma maior exposição humana indireta ao *R*-(-)-TEB, evidenciando a importância de se avaliar, enantiosseletivamente, os riscos do TEB à saúde humana.

4.5.4. Fenotipagem (mapeamento enzimático)

Os estudos de fenotipagem, também conhecidos como estudos de mapeamento enzimático *in vitro*, são importantes para identificar quais enzimas catalisam a biotransformação de um determinado xenobiótico.

Através desses estudos se obtém informações sobre a rota metabólica e sobre possíveis interações entre o xenobiótico e inibidores ou indutores da atividade das enzimas responsáveis pelo seu metabolismo. Por exemplo, se uma única isoforma do CYP450 catalisa a reação de biotransformação de um xenobiótico no organismo humano, a inibição de sua atividade enzimática pode fazer com que a pessoa fique exposta a concentrações mais elevadas desse composto. Isso pode provocar efeitos adversos e até mesmo toxicidade (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008). Em contraste, xenobióticos que são metabolizados por diversas enzimas são menos propensos a apresentarem tais riscos.

As principais isoformas do CYP450 envolvidas na reação de 1-hidroxilação do TEB foram determinadas utilizando duas concentrações de TEB, 0,50 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para as reações com perfil cinético bifásico, sendo elas *rac*-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH; *rac*-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH; *R*-(-)-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH, e uma concentração, 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para a reação *S*-(+)-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH, que teve perfil cinético de Michaelis-Menten (RODRIGUES, 1999).

Além disso, esses ensaios devem ser feitos empregando pelo menos dois modelos distintos e independentes (ZIENTEK; YOUDIM, 2015). Portanto, o (i) modelo que utiliza inibidores químicos seletivos das isoformas do CYP450 e também o (ii) modelo que utiliza rCYP450 foram empregados.

Em (i), se a formação dos enantiômeros do TEBOH fosse inibida em mais de 40% por um inibidor seletivo da isoforma avaliada, essa isoforma era considerada como tendo possível

participação significativa no metabolismo do TEB (JING et al., 2013). Em (ii), por sua vez, a participação de cada isoforma no metabolismo do TEB foi avaliada, individualmente, através do monitoramento de sua capacidade de produzir os enantiômeros do TEBOH.

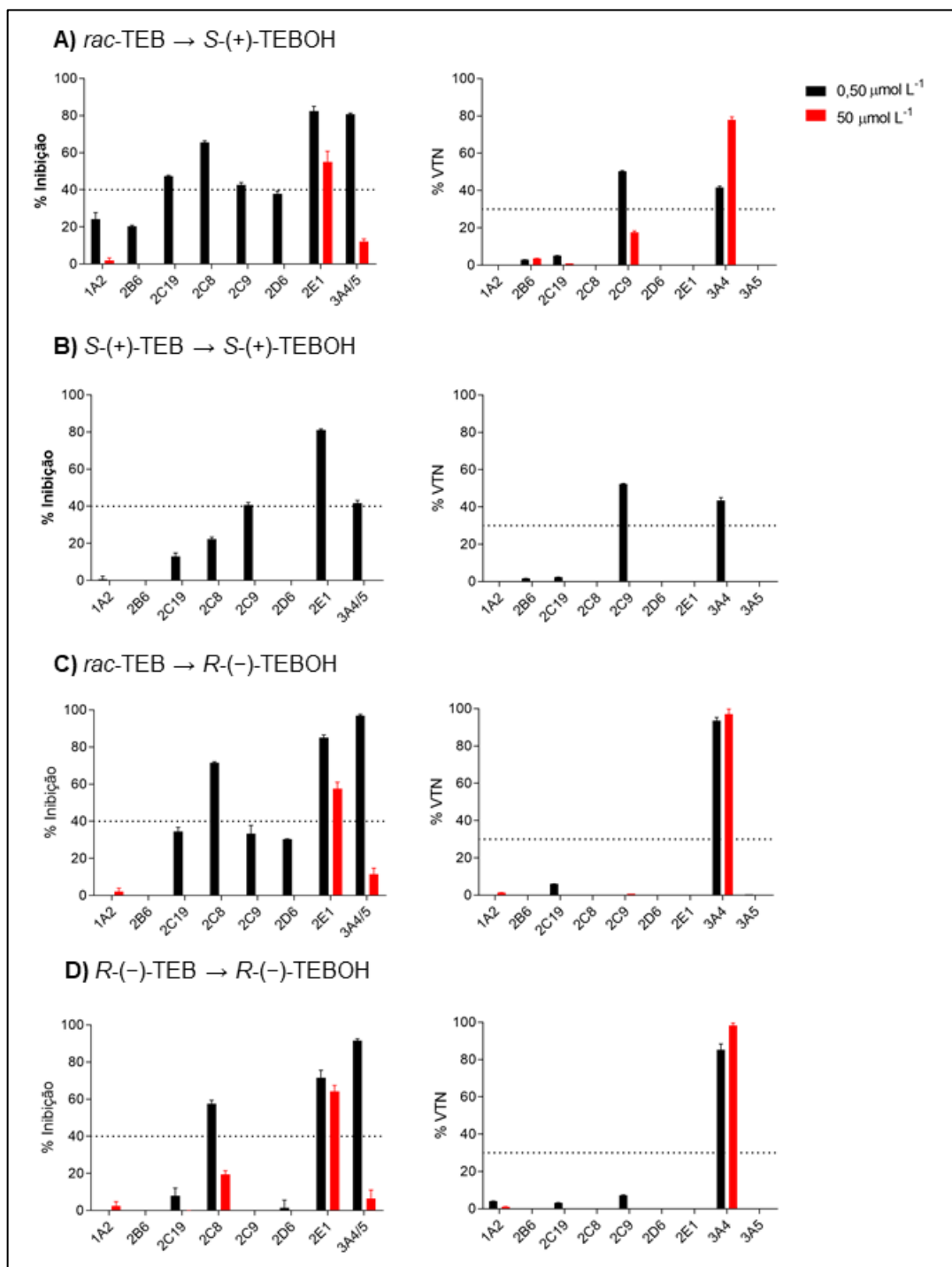
Os resultados dos ensaios utilizando HLM e inibidores químicos seletivos mostraram que, na concentração de $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de *rac*-TEB, a reação *rac*-TEB \rightarrow *S*-(+)-TEBOH (**Figura 27A**) foi catalisada por diversas isoformas (CYP3A4/5, CYP2E1, CYP2C9, CYP2C8 e CYP2C19) com contribuição principal da CYP3A4/5 e CYP2E1. Porém, quando o *rac*-TEB foi incubado na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, apenas a CYP2E1 esteve significativamente envolvida no seu metabolismo, com uma pequena participação da CYP3A4/5.

Por outro lado, quando as rCYP450 foram utilizadas, a rCYP2C9 e rCYP3A4 foram as principais isoformas capazes de produzir o *S*-(+)-TEBOH a partir da incubação de *rac*-TEB na concentração de $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que a contribuição da rCYP3A4 foi a mais significativa quando o *rac*-TEB foi incubado na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Figura 27A**).

Resultados similares foram obtidos para a formação do *S*-(+)-TEBOH quando o *S*-(+)-TEB foi incubado em uma única concentração ($0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$) (**Figura 27B**). Os ensaios com HLM e inibidores químicos seletivos indicaram a participação significativa da CYP2C9, CYP3A4/5 e CYP2E1, enquanto a incubação com rCYP450 indicou a participação da rCYP3A4 e rCYP2C9.

Para a reação *rac*-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH, por sua vez, os resultados obtidos utilizando inibidores químicos mostraram que as enzimas CYP2C8, CYP2E1 e CYP3A4/5 estão envolvidas no metabolismo quando a concentração de *rac*-TEB era de $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que, em concentração elevada ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), a CYP2E1 foi a única enzima significativamente envolvida (**Figura 27C**). Ademais, a rCYP3A4 produziu o *R*-(-)-TEBOH quando o *rac*-TEB foi incubado nas concentrações baixa e alta, com menor participação de outras rCYP450. Resultados similares foram obtidos quando a reação *R*-(-)-TEB \rightarrow *R*-(-)-TEBOH foi estudada (**Figura 27D**).

Figura 27- Determinação das isoformas do CYP450 envolvidas no metabolismo do TEB utilizando inibidores químicos (% Inibição, à esquerda) e rCYP450 (% VTN, à direita).



Resultados obtidos monitorando a reação de 1-hidroxição do *rac*-TEB produzindo **A)** S-(+)-TEBOH e **C)** R-(-)-TEBOH; 1-hidroxição do S-(+)-TEB produzindo **B)** S-(+)-TEBOH; 1-hidroxição do R-(-)-TEB produzindo **D)** R-(-)-TEBOH. Cada barra representa a média \pm estimativa do desvio padrão (n=3). **Fonte:** HABENSCHUS et al., 2019.

Como é possível observar, os resultados obtidos utilizando inibidores químicos seletivos e rCYP450 foram diferentes em algumas situações, principalmente com relação a participação da CYP2E1 e CYP2C8 no metabolismo. Essas diferenças podem ser explicadas por limitações

dos modelos e também pelas dificuldades em corroborar os resultados obtidos por rCYP450 com os aqueles obtidos utilizando HLM nativos (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008).

Considerando o modelo (i), a CYP2C8 e CYP3A4/5 são isoformas que tem sítios ativos com cavidades de tamanhos similares (AQUILANTE et al., 2013). Por causa dessa similaridade no tamanho, essas isoformas tem alguns substratos em comum, o que poderia explicar o porquê de a CYP2C8 ter sido inibida, enquanto que a rCYP2C8 não produziu o *S*-(+)-TEBOH e *R*-(-)-TEBOH ou os produziu em quantidades indetectáveis pelo método (JING et al., 2013).

Além disso, o inibidor químico utilizado para avaliar a participação da CYP2E1 foi o dietilditiocarbamato, um inibidor baseado em mecanismo comumente utilizado nos estudos de fenotipagem. Todavia, o dietilditiocarbamato é conhecido por inibir outras isoformas além da CYP2E1, como a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8 e CYP3A4 (CHANG; GONZALEZ; WAXMAN, 1994). Uma possível inibição equivocada da CYP3A4 pelo dietilditiocarbamato explicaria porque a rCYP2E1 não metabolizou o TEB (JAAKKOLA et al., 2006). A CYP3A4 é a isoforma do CYP450 que é mais expressada no fígado humano e, de acordo com os resultados confirmados pela incubação com rCYP3A4, é uma isoforma que participa extensivamente do metabolismo do TEB.

Outras limitações também podem ter contribuído para essas diferenças nos resultados. A composição da membrana lipídica e as interações proteína-proteína que ocorrem nos HLM, por exemplo, são diferentes das que ocorrem em rCYP450. Ambos os fatores impactam na atividade enzimática, resultando em diferentes parâmetros quando a mesma enzima e o mesmo substrato são estudados pelos diferentes modelos. Ademais, nos HLM ocorrem interações múltiplas e simultâneas entre as diferentes isoformas e também entre as isoformas e o substrato. Já nas rCYP450, uma única enzima é super expressada e não existem interações múltiplas e simultâneas entre outras enzimas (WANG; GIBSON, 2014).

Embora haja diferenças nos resultados para cada um dos modelos, é possível afirmar que distintas isoformas podem catalisar as reações de metabolismo do TEB e uma isoforma que catalisa a formação de um enantiômero do TEBOH pode não catalisar a formação do outro, ou então catalisar em menor proporção de acordo com a concentração de TEB disponível para ser metabolizada.

Os estudos com rCYP450 também confirmaram que a CYP3A4, e não a CYP3A5, é a isoforma da família 3A capaz de metabolizar o TEB. E vale enfatizar que, em ambos os experimentos, a CYP2C9 e a CYP3A4 catalisam a formação de *S*-(+)-TEBOH quando o *rac*-TEB e *S*-(+)-TEB são os substratos e que a CYP3A4 participa da formação do *R*-(-)-TEBOH quando o *rac*-TEB e *R*-(-)-TEB são os substratos. Um estudo in sílico realizado por Jónsdóttir

et al (JÓNSDÓTTIR et al., 2016) utilizando um modelo QSAR que relacionava estruturalmente quantitativamente predisse que o TEB era substrato da CYP3A4 em humanos, porém não predisse a contribuição de outras isoformas, como indicado por esse ensaio.

Portanto, os resultados implicam que, do ponto de vista toxicológico, se uma das isoformas envolvidas no metabolismo do TEB for inibida, ou se for expressa em menor quantidade por uma pessoa, outros caminhos metabólicos estão disponíveis para o *clearance* hepático. Isso torna o acúmulo do TEB no corpo humano mais difícil de ocorrer. Em contrapartida, a toxicidade dos enantiômeros do TEBOH que são formados nesse processo ainda não foi estudada, e essa questão deve também ser levada em consideração.

4.6. CONCLUSÕES

Nesse capítulo, importantes informações a respeito do metabolismo enantiosseletivo do TEB em humanos foram apresentadas. Perfis cinéticos de Michaelis-Menten e bifásico foram observados para as reações de metabolismo do *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB. Além disso, extrapolações *in vitro*-*in vivo* permitiram calcular os valores de C_H e estes indicaram que o TEB pode ser depurado enantiosseletivamente pelo fígado humano, com degradação preferencial do *S*-(+)-TEB, seguido pelo *rac*-TEB e *R*-(-)-TEB. Os valores de E_H , por sua vez, sugeriram que se o TEB for ingerido, absorvido e chegar até o fígado, o efeito de primeira passagem pelo órgão pode não ser efetivo para diminuir a sua concentração inicial na corrente sanguínea, principalmente a concentração de *R*-(-)-TEB.

Em contraste, múltiplas isoformas do CYP450, com destaque para a CYP3A4 e CYP2C9, aparentam ser capazes de metabolizar o TEB e produzir o TEBOH. Essas diversas rotas metabólicas disponíveis são muito importantes, pois podem reduzir o risco de intoxicação por esse praguicida, por exemplo em pessoas que apresentam problemas hepáticos, ou então o risco de intoxicação provocada pela inibição da atividade da CYP2C9 e CYP3A4.

Capítulo 5. Estudos enantiosseletivos de inibição enzimática: interação praguicida- fármaco

5.1. DESTAQUE RESPORTADOS NO CAPÍTULO

- O *rac*-TEB, *S*-(+)-TEB e *R*-(-)-TEB foram capazes de inibir algumas das principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos.
- Os estudos mostraram que a inibição foi enantiosseletiva, contudo, os potenciais inibitórios dos enantiômeros e da mistura racêmica foram iguais.
- O *rac*-TEB se mostrou um inibidor misto forte da CYP3A4/5 e CYP2C9 e um inibidor competitivo moderado e forte da CYP2D6 e CYP2C19, respectivamente.
- Os valores das constantes de inibição indicaram a possibilidade de ocorrerem interações *rac*-TEB-fármacos.

5.2. INTRODUÇÃO

As pessoas estão em contato diário com diferentes tipos de xenobióticos e essa exposição se dá por diversas rotas, como por exemplo via oral, dérmica e também através da inalação. Tal exposição pode ocorrer de maneira desejada e consciente, como quando medicamentos são utilizados para tratar ou prevenir alguma doença, ou de maneira indesejada e inconsciente, quando alimentos ou água contaminados com praguicidas são ingeridos, quando trabalhadores rurais são expostos durante a aplicação de agroquímicos nas lavouras, e até mesmo, quando o ar contaminado com poluentes é inalado.

Devido ao contato simultâneo com xenobióticos de diferentes classes, é muito provável o surgimento no nosso organismo de interações metabólicas entre esses compostos, principalmente devido a efeitos que um deles pode provocar no metabolismo hepático do outro (ROSE; HODGSON, 2004b)

As reações de fase I do metabolismo hepático de xenobióticos são catalisadas principalmente pela família de enzimas do CYP450. Dentre as principais isoformas do CYP450 podem ser destacadas a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4/5. Juntas, essas isoformas são responsáveis por, aproximadamente, 80% das reações de metabolismo de fármacos catalisadas pela família do CYP450 (ARORA et al., 2015). Além

disso, estima-se que essas isoformas sejam responsáveis por catalisar o metabolismo de mais de 70% dos praguicidas (ABASS et al., 2012).

Os xenobióticos, além de serem substratos dessas isoformas, também podem atuar como inibidores de sua atividade enzimática ou como indutores de sua expressão gênica (ABASS; PELKONEN, 2013; HODGSON, 2004). Já é conhecido que praguicidas podem inibir a atividade das enzimas do CYP450 (ABASS; PELKONEN, 2013; CARRÃO et al., 2019a; FONSECA et al., 2019), e por isso eles podem interferir nas reações de metabolismo de fase I de outros xenobióticos, como por exemplo fármacos, causando assim interações praguicida-fármacos (ABASS; PELKONEN, 2013; CARRÃO et al., 2019a; FONSECA et al., 2019). O termo interação, nesse caso, se refere a situações em que os compostos influenciam na toxicidade uns dos outros e os efeitos conjuntos podem ser diferentes dos efeitos individuais previstos para eles (HERNÁNDEZ; GIL; LACASAÑA, 2017).

Uma interação causada pela inibição do metabolismo de um fármaco pode provocar um aumento na sua concentração plasmática, e conseqüentemente desencadear possíveis efeitos tóxicos, principalmente se o fármaco em uso tem uma janela terapêutica estreita. Além disso, alguns estudos com trabalhadores rurais sugerem que interações praguicida-fármacos podem estar relacionadas com problemas de saúde apresentados por esses trabalhadores, como por exemplo o surgimento de doença de Hodgkin, leucemia, câncer de próstata, estômago, pele, etc (ROSE et al., 2005).

Dessa forma, é muito importante avaliar se um praguicida pode inibir a atividade das enzimas do CYP450 e qual é o seu potencial inibitório. No caso de praguicidas quirais, essa avaliação ganha ainda mais destaque, uma vez que pode acontecer de forma enantiosseletiva, com um enantiômero tendo maior potencial inibitório do que o outro (DE ALBUQUERQUE et al., 2020).

Os estudos de inibição das enzimas do CYP450 podem ser feitos *in vitro* utilizando HLM. Para isso, monitora-se a velocidade de formação de metabólitos de reações específicas que são catalisadas pelas isoformas do CYP450, na presença e na ausência do possível inibidor e do cofator NADPH (**Tabela 16**, FDA, 2020b). As reações específicas a serem monitoradas devem ter os parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) bem definidos e os substratos devem ser escolhidos de acordo com a sua seletividade, ou seja, o substrato deve ser predominantemente metabolizado pela isoforma avaliada. Os resultados obtidos desses ensaios permitem a determinação de importantes parâmetros relacionados a inibição de uma enzima, tais como a concentração do composto que inibe em 50% a atividade da isoforma (IC_{50}), além dos mecanismos e das constantes de inibição (HABENSCHUS, 2016).

Tabela 16- Reações específicas catalisadas pelas isoformas do CYP450 que podem ser monitoradas nos estudos in vitro de inibição enzimática e os respectivos metabólitos formados.

Isoformas	Reações específicas	Metabólitos
CYP1A2	<i>O</i> -desetilação da fenacetina	Acetaminofeno
	<i>O</i> -desetilação da etoxiresorufina	Resorufina
CYP2B6	Hidroxilação da bupropiona	Hidroxibupropiona
	8-hidroxilação do efavirez	8-hidroxi-efavirenz
CYP2C8	6 α -hidroxilação do paclitaxel	6 α -hidroxipaclitaxel
	<i>N</i> -desetilação da almoaquina	<i>N</i> -desetilalmoaquina
CYP2C9	7-hidroxilação da <i>S</i> -varfarina	7-hidroxi- <i>S</i> -varfarina
	4'-hidroxilação do diclofenaco	4'-hidroxidiclofenaco
CYP2C19	4'-hidroxilação da <i>S</i> -mefenitoína	4'-hidroxi- <i>S</i> -mefenitoína
CYP2D6	1'-hidroxilação do bufuralol	1'-hidroxibufuralol
	<i>O</i> -desmetilação do dextrometorfano	Dextroorfano
CYP2E1	6-hidroxilação da clorzoxazona	6-hidroxiclorzoxazona
	4-hidroxilação da anilina	4-hidroxianilina
CYP3A4/5*	1'-hidroxilação do midazolam	1'-hidroximidazolam
	6 β -hidroxilação da testosterona	6 β -hidroxitestosterona
	Oxidação da nifedipina	deidronifenidipina

* É recomendado utilizar dois substratos estruturalmente não similares para avaliar a inibição da CYP3A4/5.
Fonte: Adaptado de FDA, 2020b.

A inibição da atividade das enzimas do CYP450 pode ocorrer tanto de maneira direta, quanto de maneira tempo-dependente. A inibição direta ocorre assim que o composto se liga à enzima e sem a necessidade de etapas prévias de biotransformação. Já na inibição tempo-dependente, o potencial inibitório do composto aumenta com o tempo de interação entre ele e a enzima, indicando, na maioria dos casos, a necessidade de etapas prévias de biotransformação (FONSECA, 2018; OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008).

A inibição tempo-dependente acontece devido a interações quase-irreversíveis entre a enzima e o inibidor, ou interações irreversíveis que são dependentes do metabolismo. Nesses casos, a enzima perde a sua atividade, sendo necessário a síntese de novas enzimas para desempenharem a mesma função. Já as inibições diretas ocorrem devido a interações reversíveis entre a enzima e o inibidor e são mais frequentes do que as inibições tempo-dependentes (HABENSCHUS, 2016; OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008).

De maneira geral, a inibição reversível acontece devido a rápida associação e dissociação entre a enzima e o inibidor (ROSE; HODGSON, 2004b) através de ligações não-

covalentes, tais como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações iônicas (KRAMER; TRACY, 2012). Como o próprio nome já diz, tal inibição é reversível e pode ser desfeita por processos como diálise, ou então diluição, e a enzima recupera a sua atividade catalítica. Esse tipo de inibição ocorre por quatro mecanismos distintos, sendo estes a inibição competitiva, não-competitiva, mista (competitiva/não-competitiva) e incompetitiva (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014).

A inibição competitiva é o mecanismo mais observado para a inibição das enzimas do CYP450 (VOLAK; GREENBLATT; VON MOLTKE, 2007). Nesse caso, o substrato e o inibidor competem para se ligar ao sítio ativo da enzima livre (E), ou seja, apenas um deles pode se ligar exclusivamente ao sítio ativo.

Caso o substrato se ligue, ocorre a formação do complexo ES e a reação ocorre na mesma velocidade que ocorreria na ausência de inibidor. Portanto a reação atinge a mesma V_{max} . Porém, caso o inibidor se ligue ao sítio ativo, acontece a formação do complexo enzima-inibidor (EI) e a enzima se torna incapaz de catalisar a reação de depuração do substrato, havendo um aumento de K_M (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014).

Na inibição não-competitiva o inibidor se liga a um sítio da enzima que é diferente do sítio ativo ao qual se liga o substrato (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008). Ele pode se ligar tanto a enzima livre, formando o complexo EI, quanto ao complexo ES, formando o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI) e essas ligações acontecem com a mesma afinidade. Esse mecanismo de inibição é caracterizado por uma diminuição de V_{max} sem que ocorram mudanças em K_M (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014).

Na inibição mista (competitiva/não-competitiva) o inibidor se liga tanto a enzima livre, formando o complexo EI, quanto a ES, formando o complexo ESI. Porém diferente do que ocorre na inibição não-competitiva, essa ligação ocorre com afinidades diferentes (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014). Além disso, esse mecanismo é caracterizado por uma diminuição de V_{max} e aumento de K_M .

Por fim, na inibição incompetitiva o inibidor se liga à enzima quando o substrato já está ligado, estabilizando o complexo ES e formando o complexo ESI, ou seja, o inibidor não tem afinidade pela enzima livre. Nesse tipo de inibição ocorre uma diminuição de V_{max} da reação e também de K_M (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014). Ademais, esse mecanismo é raramente observado nos estudos de inibição das enzimas do CYP450 (VOLAK; GREENBLATT; VON MOLTKE, 2007)

Outro importante parâmetro a ser determinado nos estudos de inibição reversível, além do mecanismo de inibição, é a afinidade com que o inibidor se liga à enzima (HABENSCHUS,

2016). Esse parâmetro é denominado K_i , constante de inibição reversível, e é definido como sendo a constante de dissociação do complexo EI, ou no caso de uma inibição mista, também de ESI (αK_i) (OGILVIE; USUKI; YERINO, 2008). Quanto menor o valor de K_i , maior a afinidade da enzima pelo inibidor, ou seja, maior o potencial inibitório do composto em estudo, e no caso de praguicidas, maior a probabilidade de que ocorram interações praguicida-fármaco.

Baseado no exposto e no fato de que as informações a respeito dos efeitos dos enantiômeros do TEB no corpo humano ainda são muito escassas, investigar a inibição *in vitro* enantiosseletiva das enzimas do CYP450 pelo TEB é importante, pois fornecerá informações valiosas a respeito do risco de exposição do homem ao TEB e de prováveis interações TEB-fármacos.

5.3. OBJETIVOS

Nessa etapa, o objetivo do trabalho foi investigar a inibição *in vitro* enantiosseletiva das principais isoformas do CYP450 pelo TEB e com isso obter informações a respeito de possíveis interações TEB-fármacos.

5.4. MATERIAIS E MÉTODOS

5.4.1. Padrões analíticos

Os padrões analíticos do *rac*-TEB ($\geq 99\%$) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e os enantiômeros *S*-(+)-TEB (99%) e *R*-(-)-TEB (99%) foram isolados por CLAE conforme descrito na **seção 3.4.5**.

Os substratos empregados nos estudos de inibição enzimática, fenacetina ($\geq 98\%$, CYP1A2), diclofenaco ($\geq 98\%$, CYP2C9), clorzoxazona ($\geq 98\%$, CYP2E1) e nifedipina ($\geq 98\%$, CYP3A4/5) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A *S*-mefenitoína ($\geq 98\%$, CYP2C19), bufuralol ($\geq 98\%$) e midazolam ($\geq 98\%$, CYP3A4/5) foram obtidos da Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá). Os metabólitos monitorados durante os estudos de inibição enzimática, 4'-hidroxiclofenaco ($\geq 98\%$, CYP2C9), 4-hidroximefenitoína ($\geq 98\%$, CYP2C19), 1'-hidroxibufuralol ($\geq 98\%$, CYP2D6), 6-hidroxiclorzoxazona ($\geq 98\%$, CYP2E1), deidronifedipina ($\geq 98\%$, CYP3A4/5), 1'-hidroximidazolam ($\geq 95\%$, CYP3A4/5) foram obtidos da Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá). O acetaminofeno ($\geq 98\%$,

CYP1A2) foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Os padrões analíticos do bisfenol A-d₁₆ (≥ 98%), tolbutamida (≥ 97%) e diazepam (≥ 99%), que foram utilizados como PI, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

5.4.2. Preparo das soluções padrão

As soluções padrão de *rac*-TEB (8000 μmol L⁻¹), *S*-(+)-TEB (8000 μmol L⁻¹) e *R*-(-)-TEB (8000 μmol L⁻¹) foram preparadas em metanol.

Os substratos empregados nos estudos de inibição enzimática, fenacetina (962 μmol L⁻¹, CYP1A2), *S*-mefenitoína (8000 μmol L⁻¹, CYP2C19), bufuralol (432 μmol L⁻¹, CYP2D6), clorzoxazona (11672 μmol L⁻¹, CYP2E1), midazolam (433 μmol L⁻¹, CYP3A4/5) e nifedipina (560 μmol L⁻¹, CYP3A4/5) foram preparados em acetonitrila; o diclofenaco (3956 μmol L⁻¹, CYP2C9) foi preparado em metanol. Os metabólitos que são formados durante os estudos de inibição enzimática, acetaminofeno (CYP1A2), 4-hidroximefenitoína (CYP2C19), 1'-hidroxibufuralol (CYP2D6), 6-hidroxiclorzoxazona (CYP2E1), 1'-hidroximidazolam (CYP3A4/5) e deidronifedipina (CYP3A4/5), foram preparados em acetonitrila; o 4'-hidroxiclofenaco (CYP2C9) foi preparado em metanol, todos na concentração de 1000 μmol L⁻¹. As soluções dos PI diazepam (1 μmol L⁻¹), tolbutamida (1 μmol L⁻¹) e bisfenol A-d₁₆ (1 μmol L⁻¹) foram preparadas em metanol.

Todas as soluções foram armazenadas protegidas da luz, em tubos de vidro âmbar, a -20 °C.

5.4.3. Reagentes e solventes

Os reagentes de grau analítico, tais como NaOH, NaCl, NH₄OH, HCl, CH₂O₂, NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄ foram adquiridos da Synth (Diadema, São Paulo); tris (tris(hidroximetil)aminometano) foi adquirido da J. T. Baker (Phillisburg, EUA) e KCl granular da Mallinckrodt Chemicals (Xalostoc, México). A água foi ultrapurificada (tipo 1, 18 MΩ cm à 25 °C) utilizando o sistema Milli-Q Direct-Q3 UV Millipore (Bedford, EUA).

Os solventes grau cromatografia, como metanol, acetonitrila, acetato de etila e clorofórmio foram adquiridos da Panreac (Barcelona, Espanha).

5.4.4. HLM e sistema de regeneração de NADPH

Os HLM (concentração proteica de 20 mg mL⁻¹), preparados a partir de pedaços do fígado humano (pool de 150 doadores de ambos os sexos) foram adquiridos da empresa Corning Life Science (Phoenix, EUA) e foram armazenados a -80°C.

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e os reagentes utilizados para gerar NADPH, β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada (NADP⁺) e glicose-6-fosfato de sódio, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Estes reagentes foram preparados em solução tampão tris-KCl (tris 0,05 mol L⁻¹ e KCl 0,15 mol L⁻¹, pH 7,4), e armazenado a -20°C, nas seguintes concentrações: NADP⁺ 2,5 mmol L⁻¹, glicose-6-fosfato desidrogenase 8,0 U mL⁻¹ e glicose-6-fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹.

5.4.5. Composição do meio e condições de incubação

De maneira geral, o meio de incubação para os estudos de inibição das enzimas do CYP450 pelo TEB foi preparado com 2,5 μL do substrato específico de cada isoforma (**Tabela 17**), 2,5 μL de *rac*-TEB, *S*-(+)-TEB ou *R*-(-)-TEB), individualmente, solubilizados em metanol, 105 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) e 40 μL de HLM.

As amostras foram pré-aquecidas em banho termostático (Dubnoff, Solab, Brasil) a 37°C por 5 minutos e as reações foram iniciadas com a adição de 50 μL de solução do sistema de regeneração de NADPH (concentração final no meio equivalente a 5 mmol L⁻¹ de glicose-6-fosfato, 0,25 mmol L⁻¹ de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato e 0,5 unidades da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase), totalizando um volume final de 200 μL. Controles negativos, sem a adição de TEB, também foram preparados.

As condições de incubação para as reações catalisadas por cada isoforma foram previamente determinadas por nosso grupo de pesquisa e estão resumidas na **Tabela 17** (FONSECA et al., 2019; HABENSCHUS et al., 2017). Transcorridos os tempos de incubação, as reações foram interrompidas com a adição de solvente orgânico, sendo iniciado então o processo de preparo de amostra (**seção 5.4.6**) para posterior análise por CLAE-EM/EM (**seção 5.4.7**).

5.4.6. Preparo de amostra por ELL

As reações de inibição foram interrompidas com a adição de 1000 μL de solvente orgânico, seguido da adição de 50 μL de PI e, em alguns casos, 100 μL de modificador orgânico (**Tabela 17**). As amostras foram então agitadas por 15 minutos a 1000 rpm em agitador do tipo Vibrax VXR[®] e centrifugadas por 10 minutos a 1600 $\times g$ a 4°C em centrífuga Hitachi HIMAC CF 15D2. Por fim, a fase orgânica foi coletada (600 μL) e evaporada em um concentrador de amostras à vácuo da Eppendorf e os resíduos foram solubilizados em 200 μL de metanol: água (90:10 v/v) e analisados por CLAE-EM/EM (**seção 5.4.7**).

5.4.7. Condições de análise por CLAE-EM/EM

As análises por CLAE-EM/EM foram feitas em um sistema CL Prominence (Shimadzu, Japão) composto por bombas LC-20AD (vazão de 0,3 mL min^{-1}), degaseificador online DGU-20A3R, injetor automático SIL-20AGHT (volume de injeção de 10 μL), forno para colunas CTO-20AC (35°C) e um sistema controlador CBM-20A acoplado a um EM do QqQ API 3200 (AB Sciex, Canadá) com interface de ionização por eletrospray.

As pressões dos gases de nebulização, turbo e de colisão foram de 45, 45 e 6 psi, respectivamente, e a tensão e temperatura de secagem do capilar foram de 5000 V e 700 °C, respectivamente. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna Ascentis Express Fused Core C₁₈ (100 mm \times 4,6 mm, 2,7 μm , Supelco, EUA) e coluna de guarda Ascentis Express C₁₈ (3,0 mm \times 4,6 mm, 2,7 μm , Supelco, EUA), utilizando como fase móvel metanol: solução aquosa de ácido fórmico (0,1 %, v/v) 90:10 (v/v) para análises envolvendo a CYP1A2, CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2E1 e CYP2C9 e metanol: solução aquosa de hidróxido de amônio (0,1 %, v/v) 90:10 (v/v) para a CYP2C19. As detecções foram realizadas no modo MRM monitorando transições específicas para quantificação (^Q) e qualificação (^C) (**Tabela 18**). Os dados foram coletados e analisados com o programa Analyst versão 1.5.2 (AB Sciex, Canadá).

Tabela 17- Condições de incubação e de preparo de amostras empregadas nos estudos in vitro de inibição das enzimas do CYP450 por TEB.

Isoforma	Substrato	[Substrato] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[HLM] (mg mL^{-1})	Tempo de reação (min)	Solvente extrator	Padrão Interno	Modificador
CYP1A2	Fenacetina	12,03	0,30	30	Acetato de Etila	Diazepam	-
CYP3A4/5	Nifedipina	7,00	0,15	15	Acetato de Etila	Diazepam	-
CYP3A4/5	Midazolam	5,41	0,10	10	Acetato de Etila	Diazepam	NaOH ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$)
CYP2C9	Diclofenaco	49,45	0,10	20	Clorofórmio	Diazepam	HCl ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$)
CYP2C19	S-mefenitoína	44,83	0,20	60	Acetato de Etila	Bisfenol A-d ₁₆	-
CYP2E1	Clorzoxazona	145,90	0,40	20	Clorofórmio	Tolbutamida	-
CYP2D6	Bufuralol	5,40	0,25	30	Acetato de Etila	Diazepam	NaOH ($1,25 \text{ mol L}^{-1}$)

Fonte: Adaptado de ALBUQUERQUE; DE OLIVEIRA; ANTUNES, 2019; CARRÃO et al., 2019b; FONSECA et al., 2019; e HABENSCHUS et al., 2017.

Tabela 18- Condições de análise por CLAE-EM/EM empregadas nos estudos in vitro de inibição das enzimas do CYP450 por TEB.

Isoforma	Metabólito	Modo de Ionização	Energia de colisão (V)	Transições do MRM	Padrão interno	Energia de colisão (V)	Transições do MRM
CYP1A2	Acetaminofeno	Positivo	19	152,0 \rightarrow 110,0 ^Q e 152,0 \rightarrow 65,2 ^C	Diazepam	35	284,9 \rightarrow 192,9 ^Q e 284,9 \rightarrow 153,9 ^C
CYP3A4/5	Deidronifedipina	Positivo	25	345,0 \rightarrow 283,9 ^Q e 345,0 \rightarrow 267,8 ^C	Diazepam	35	284,9 \rightarrow 192,9 ^Q e 284,9 \rightarrow 153,9 ^C
CYP3A4/5	1'-hidroximidazolam	Positivo	25	342,0 \rightarrow 323,9 ^Q e 342,0 \rightarrow 202,8 ^C	Diazepam	35	284,9 \rightarrow 192,9 ^Q e 284,9 \rightarrow 153,9 ^C
CYP2C9	4'-hidroxiclofenaco	Positivo	37	311,8 \rightarrow 230,8 ^Q e 311,8 \rightarrow 265,8 ^C	Diazepam	35	284,9 \rightarrow 192,9 ^Q e 284,9 \rightarrow 153,9 ^C
CYP2C19	4-hidroximefenitoína	Negativo	24	233,0 \rightarrow 190,0 ^Q e 233,0 \rightarrow 160,9 ^C	Bisfenol A-d ₁₆	24	241,1 \rightarrow 222,6 ^Q e 241,1 \rightarrow 142,0 ^C
CYP2E1	6-hidroxiclorzoxazona	Negativo	44	183,8 \rightarrow 119,7 ^Q e 183,8 \rightarrow 64,1 ^C	Tolbutamida	24	268,9 \rightarrow 169,8 ^Q e 268,9 \rightarrow 105,9 ^C
CYP2D6	1'-hidroxibufuralol	Positivo	21	277,9 \rightarrow 185,9 ^Q e 277,9 \rightarrow 241,9 ^C	Diazepam	35	284,9 \rightarrow 192,9 ^Q e 284,9 \rightarrow 153,9 ^C

^Q – quantificação, ^C – qualificação; MRM - monitoramento de reações múltiplas. **Fonte:** Adaptado de ALBUQUERQUE; DE OLIVEIRA; ANTUNES, 2019; CARRÃO et al., 2019b e FONSECA et al., 2019.

5.4.8. Avaliação do potencial inibitório do TEB e do risco de interações TEB-fármacos

5.4.8.1. Estudo de triagem para inibição direta das isoformas do CYP450

Inicialmente, uma triagem das isoformas do CYP450 inibidas de maneira direta pelo TEB foi feita incubando os substratos específicos de cada isoforma (**Tabela 17**) na presença de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB, individualmente (n=3). A concentração dos substratos foi fixada ao redor do valor de K_M das reações específicas e foi estabelecida previamente por nosso grupo de pesquisa (**Tabela 17**) (DE ALBUQUERQUE et al., 2020; FONSECA et al., 2019; HABENSCHUS et al., 2017). Já a concentração de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB foi fixada em $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

As condições de incubação, preparo de amostra e de análise, por sua vez, foram as mesmas descritas na **seção 5.4.5, 5.4.6 e 5.4.7**, respectivamente. Controles negativos, sem a adição de TEB, também foram preparados (n=3).

A porcentagem de atividade enzimática remanescente de cada isoforma foi calculada de acordo com a **Equação 17**:

$$\% \text{Atividade enzimática remanescente} = (A_i/A_0) \times 100 \quad (17)$$

sendo A_0 – razão entre a área do metabólito específico formado e área do PI, ambas obtidas após análises de amostras de controle negativo (ausência de TEB); A_i – razão entre a área do metabólito específico formado e área do PI, ambas obtidas após análises de amostras incubadas na presença de TEB.

Gráficos correlacionando a isoforma avaliada com a porcentagem de atividade enzimática remanescente foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism[®] versão 8.0.2. Por fim, aquelas isoformas cuja atividade enzimática remanescente foi menor do que 50% foram selecionadas para a determinação do valor de IC_{50} .

5.4.8.2. Determinação do IC_{50}

As atividades enzimáticas da CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4/5 na ausência (controle negativo) e na presença de múltiplas concentrações de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB ($0,001$ - $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram avaliadas com o intuito de determinar a concentração de TEB que inibe em 50% a atividade dessas isoformas.

Para isso, os substratos específicos (**Tabela 17**) foram incubados com HLM e *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB (n=3), individualmente. Controles negativos, sem a adição de TEB, também foram preparados (n=3). As condições de incubação, preparo de amostra e de análise estão descritas na **seção 5.4.5, 5.4.6 e 5.4.7**, respectivamente.

A porcentagem de atividade enzimática remanescente de cada isoforma foi então calculada (**Equação 17**) e gráficos de dose-resposta (concentração de TEB *vs.* % de atividade enzimática remanescente) foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism® versão 8.0.2.

A significância da diferença entre os valores de IC₅₀ obtidos utilizando o *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB foi avaliada através do teste estatístico *One way ANOVA*. Nos testes, para as comparações em que os valores de p foram menores do que 0,05, considerou-se então diferenças estatisticamente significativas entre os valores de IC₅₀ e, portanto, enantiosseletividade na inibição. Além disso, os inibidores foram classificados de acordo com seu potencial inibitório em fracos (IC₅₀ > 100 μmol L⁻¹), moderados (10 μmol L⁻¹ < IC₅₀ < 100 μmol L⁻¹) e fortes (IC₅₀ < 10 μmol L⁻¹) (SPAGGIARI et al., 2014).

5.4.8.3. Determinação do mecanismo e da constante de inibição reversível

A cinética enzimática das reações específicas catalisadas pelas isoformas do CYP450 foi avaliada na presença e na ausência de *rac*-TEB. Para isso, cinco concentrações de substratos específicos das isoformas do CYP450, variando ao redor do valor de K_M, foram incubadas tanto na ausência de *rac*-TEB, quanto na presença de quatro concentrações deste inibidor variando ao redor dos valores de IC₅₀ (**Tabela 19**) (n=3). Novamente, as condições de incubação, preparo de amostra e de análise estão descritas na **seção 5.4.5, 5.4.6 e 5.4.7**, respectivamente.

Tabela 19- Concentrações de substrato e de *rac*-TEB utilizadas nos estudos de determinação do mecanismo e da constante de inibição reversível.

Isoforma	Substrato	[Substrato] (μmol L ⁻¹)	[<i>rac</i> -TEB] (μmol L ⁻¹)
CYP3A4/5	Nifedipina	1,76- 27,99	0- 2,46
CYP3A4/5	Midazolam	1,35- 21,65	0- 4,46
CYP2D6	Bufuralol	1,35- 21,61	0- 36,55
CYP2C9	Diclofenaco	12,36- 197,8	0- 1,24
CYP2C19	<i>S</i> -mefenitoína	11,21- 179,32	0- 0,78

Fonte: Autoria própria

As concentrações de metabólito formado em cada condição foram quantificadas com uma curva de calibração preparada no mesmo dia do ensaio e então os valores de v_0 foram calculados e os gráficos de Lineweaver-Burk (duplo recíproco) foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism® versão 8.0.2.

Os coeficientes angulares e lineares das retas do gráfico de duplos recíprocos foram plotados em função das concentrações de *rac*-TEB utilizadas nos estudos (COPELAND, 2000) para então obter os valores de K_i e αK_i . Análises da regressão linear dessas retas, bem como testes estatísticos F foram feitos para avaliar se os coeficientes angulares e as linhas de tendência eram estatisticamente significativos e, com isso, confirmar os mecanismos de inibição (BARR; FLORA; IWUCHUKWU, 2014).

5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1. Avaliação do potencial inibitório do TEB e do risco de interações TEB- fármacos

Os praguicidas quirais podem influenciar de maneira enantiosseletiva a velocidade de reações catalisadas pelas enzimas do CYP450. Essa influência pode se dar, por exemplo, através da inibição do metabolismo de outros xenobióticos, como fármacos, ou através da indução da expressão de enzimas dessa família. Se um praguicida inibir o metabolismo de um fármaco no organismo humano, pode ocorrer um aumento da concentração plasmática do fármaco até que este se torne tóxico ao paciente. Por outro lado, uma indução da expressão de enzimas do CYP450 levaria a uma diminuição de sua dose disponível, podendo tornar a terapia ineficaz. Essas influências de praguicidas no metabolismo de fármacos podem ser chamadas de interação praguicida-fármaco e são importantes de serem avaliadas, principalmente devido a constante exposição dos seres humanos a ambos os compostos.

As pessoas estão expostas ao TEB seja através da ingestão de alimentos (WANG et al., 2012) e água contaminada (HERRERO-HERNÁNDEZ et al., 2013) ou então através da aplicação desse praguicida na lavoura, como é o caso de trabalhadores rurais (MERCADANTE et al., 2014). Dessa forma, é de extrema importância avaliar a capacidade do TEB inibir, de maneira enantiosseletiva, as enzimas do CYP450. Essa família de enzimas é responsável por catalisar as reações de fase I do metabolismo de cerca de 90% dos fármacos em uso (ARORA et al., 2015) e já existem relatos na literatura de compostos que provocam sua inibição de

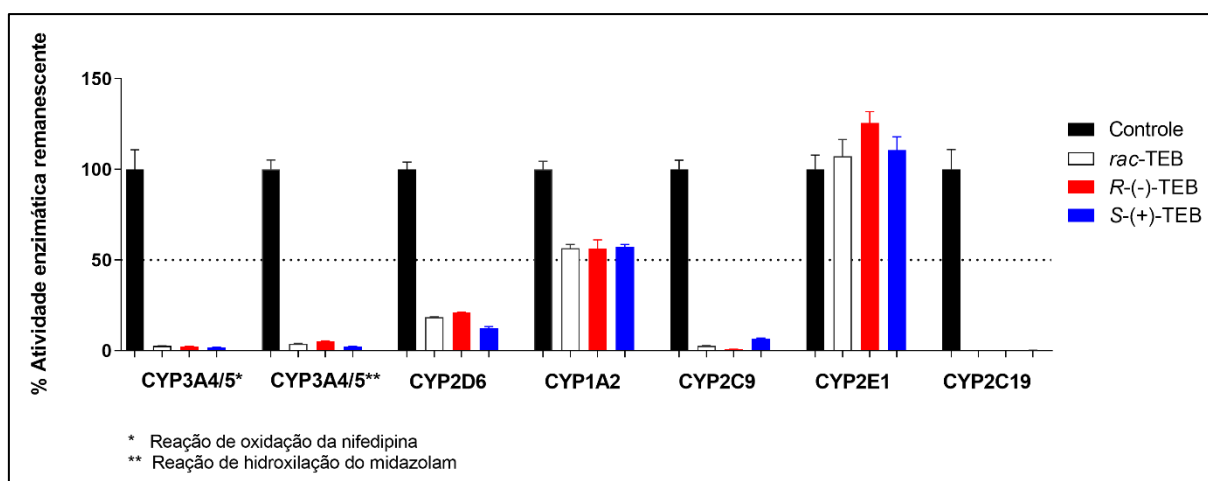
maneira estereosseletiva (BHATERIA et al., 2016; KRASULOVA; DVORAK; ANZENBACHER, 2019).

5.5.1.1. Avaliação inicial (triagem) da inibição das isoformas do CYP450 pelo TEB

A capacidade do TEB de inibir de maneira direta e enantiosseletiva as enzimas do CYP450 foi avaliada, inicialmente, através de estudos de triagem. Para isso, reações específicas catalisadas pela CYP1A2, CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 e CYP2D6 foram avaliadas na presença e na ausência (controle negativo) de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB, individualmente, e os metabólitos formados a partir dessas reações foram monitorados (**Tabela 18**).

Segundo Spaggiari e colaboradores (SPAGGIARI et al., 2014), a partir de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ um inibidor das enzimas do CYP450 é classificado como fraco, e seu potencial inibitório é pouco relevante (SPAGGIARI et al., 2014). Já para valores de IC_{50} entre 10-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o inibidor é classificado como moderado e valores de IC_{50} menores do que 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ele é classificado como um inibidor forte. Tendo isso como base, definiu-se que os valores de IC_{50} seriam determinados apenas para aquelas isoformas cuja porcentagem de atividade enzimática remanescente nos estudos de triagem fosse menor do que 50%.

Figura 28- Triagem de inibição direta pelo TEB das enzimas do CYP450 avaliadas nesse trabalho



Resultados expressos como média e estimativa do desvio padrão (n = 3). **Fonte:** Autoria própria.

A **Figura 28** apresenta os resultados do ensaio de triagem de inibição direta das enzimas do CYP450 pelo TEB. Como é possível observar, dentre todas as isoformas avaliadas, apenas a CYP1A2 e CYP2E1 não tiveram suas atividades enzimáticas inibidas mais do que 50%

quando incubadas com o *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB na concentração fixa de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Portanto, pode-se afirmar que o *rac*-TEB e seus enantiômeros isolados são capazes de inibir grande parte das principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos, o que evidencia a importância de avaliar o seu potencial inibitório de maneira enantiosseletiva.

Com isso, ficou definido que os valores de IC_{50} do *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB seriam determinados para a CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19.

5.5.1.2. Determinação do IC_{50}

Os valores de IC_{50} para a inibição direta das enzimas do CYP450 fornecem informações preliminares importantes a respeito da capacidade que o composto tem de inibir reversivelmente tais enzimas.

A **Tabela 20** e **Figura 29** mostram os valores e gráficos obtidos para a determinação do IC_{50} do *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB para a inibição direta da CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6.

A enantiosseletividade na inibição dessas isoformas foi avaliada através do teste estatístico *one-way ANOVA*. Para isso foi verificada a significância da diferença entre os valores de IC_{50} obtidos empregando o *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB como inibidores ($p < 0,05$) (**Tabela 21**). Além disso, os compostos foram classificados de acordo com seus potenciais inibitórios em fracos ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{mol L}^{-1}$), moderados ($\text{IC}_{50} 10\text{-}100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e fortes ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) (**Tabela 20**) (SPAGGIARI et al., 2014).

Tabela 20- Valores de IC_{50} para a inibição das isoformas do CYP450 por *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB e classificação de acordo com o potencial inibitório.

Isoforma	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			Potencial Inibitório ^c
	<i>rac</i> -TEB	<i>S</i> -(+)-TEB	<i>R</i> -(-)-TEB	
CYP3A4/5 ^a	1,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	Forte
CYP3A4/5 ^b	3,0 \pm 0,4	2,3 \pm 0,3	3,0 \pm 0,5	Forte
CYP2C9	0,58 \pm 0,08	2,9 \pm 0,7	0,23 \pm 0,04	Forte
CYP2C19	0,39 \pm 0,03	0,27 \pm 0,02	0,50 \pm 0,04	Forte
CYP2D6	17 \pm 2	11,1 \pm 0,9	22 \pm 5	Moderado

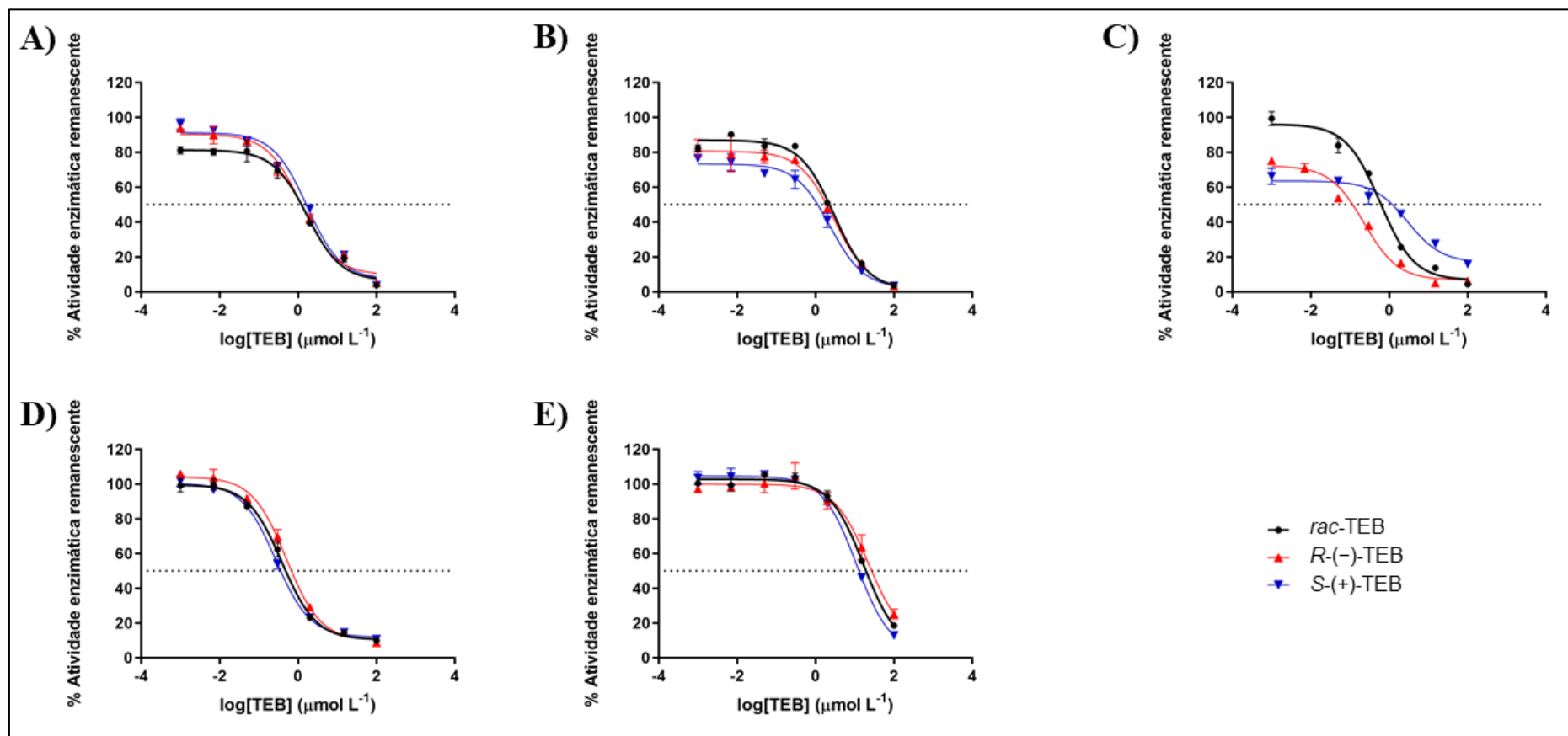
^a Monitorando a oxidação da nifedipina; ^b Monitorando a 1'-hidroxilação do midazolam; ^c Classificado de acordo com critérios definidos por SPAGGIARI et al., 2014.

Tabela 21- *One- way ANOVA* comparando os valores de IC₅₀ obtidos empregando o *rac*-TEB, *S*-(+)-TEB e *R*-(-)-TEB como inibidores.

Isoforma	Comparação	valor de <i>p</i>	Diferença estatística significativa
		>0,9999 ^c	Não
CYP3A4/5 ^a	<i>rac</i> -TEB vs <i>S</i> -(+)-TEB vs <i>R</i> -(-)-TEB	0,0931 ^d	Não
		0,0931 ^e	Não
		0,1700 ^c	Não
CYP3A4/5 ^b	<i>rac</i> -TEB vs <i>S</i> -(+)-TEB vs <i>R</i> -(-)-TEB	> 0,9999 ^d	Não
		0,1700 ^e	Não
		0,0011 ^c	Sim
CYP2C9	<i>rac</i> -TEB vs <i>S</i> -(+)-TEB vs <i>R</i> -(-)-TEB	0,5745 ^d	Não
		0,0005 ^e	Sim
		0,0077 ^c	Sim
CYP2C19	<i>rac</i> -TEB vs <i>S</i> -(+)-TEB vs <i>R</i> -(-)-TEB	0,0116 ^d	Sim
		0,0002 ^e	Sim
		0,1331 ^c	Não
CYP2D6	<i>rac</i> -TEB vs <i>S</i> -(+)-TEB vs <i>R</i> -(-)-TEB	0,2074 ^d	Não
		0,0129 ^e	Sim

^a Oxidação da nifedipine catalizada pela CYP3A4/5; ^b 1'-hidroxilação do midazolam catalizada pela CYP3A4/5; ^c *rac*-TEB vs *S*-(+)-TEB; ^d *rac*-TEB vs *R*-(-)-TEB; ^e *S*-(+)-TEB vs *R*-(-)-TEB. Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa entre os valores de IC₅₀.

Figura 29- Gráficos obtidos para a determinação dos valores de IC_{50} do *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB após inibição da atividade enzimática da **A)** e **B)** CYP3A4/5, **C)** CYP2C9, **D)** CYP2C19 e **E)** CYP2D6.



A) Oxidação da nifedipina catalisada pela CYP3A4/5; **B)** 1'-hidroxilação do midazolam catalisada pela CYP3A4/5; **C)** 4'-hidroxilação do diclofenaco catalisada pela CYP2C9; **D)** 4'-hidroxilação da mefenitoína catalisada pela CYP2C19 e **E)** 1'-hidroxilação do bufuralol catalisada pela CYP2D6. Resultados expressos como média e estimativa do desvio padrão ($n = 3$), sendo (—) referente aos dados obtidos para o *rac*-TEB, (—) para o *R*-(-)-TEB e (—) para o *S*-(+)-TEB. **Fonte:** Autoria própria

Como é possível observar através dos resultados, houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de IC_{50} do *rac*-TEB e *S*-(+)-TEB, *S*-(+)-TEB e *R*-(-)-TEB para a CYP2C9; *rac*-TEB e *S*-(+)-TEB, *rac*-TEB e *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB e *R*-(-)-TEB para a CYP2C19, *S*-(+)-TEB e *R*-(-)-TEB para a CYP2D6, ou seja, nesses casos a inibição foi enantiosseletiva. Em contrapartida, para a inibição da CYP3A4/5, monitorando ambas as reações específicas, não foi observado enantiosseletividade.

Além disso, embora as inibições da CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 tenham sido enantiosseletivas, em todos os casos os potenciais inibitórios do *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB foram os mesmos, sendo inibidores fortes para a CYP2C9, CYP3A4/5 e CYP2C19 e inibidores moderados para a CYP2D6. Portanto, mesmo havendo enantiosseletividade, não foram observadas diferenças de potencial inibitório entre os enantiômeros isolados e a mistura racêmica desse praguicida.

Devido a isso, optou-se por determinar os mecanismos de inibição reversível e os valores de K_i para a inibição da CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 utilizando apenas o *rac*-TEB como inibidor, uma vez que esse praguicida é comercializado e empregado na forma de mistura racêmica.

5.5.1.3. Determinação do mecanismo e da constante de inibição reversível

A maior causa de interações clinicamente significativas que podem provocar reações adversas aos medicamentos é a inibição da atividade das enzimas responsáveis por catalisar o metabolismo de fármacos. Essa inibição ocorre, na maioria dos casos, devido a interações reversíveis dessas enzimas com outros xenobióticos, diminuindo assim a taxa de depuração do fármaco (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014).

O efeito da inibição da biotransformação de um fármaco é o aumento da exposição do paciente a este, e isso pode ocorrer fora da janela terapêutica. Essa exposição aumenta a probabilidade de o paciente apresentar reações adversas ao medicamento, uma vez que a janela terapêutica correlaciona a concentração segura e eficaz do fármaco com as concentrações que provocam efeitos tóxicos (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014).

Dessa forma, estudos a respeito da inibição reversível das enzimas do CYP450 por um praguicida fornecem informações importantes sobre possíveis interações praguicida-fármacos.

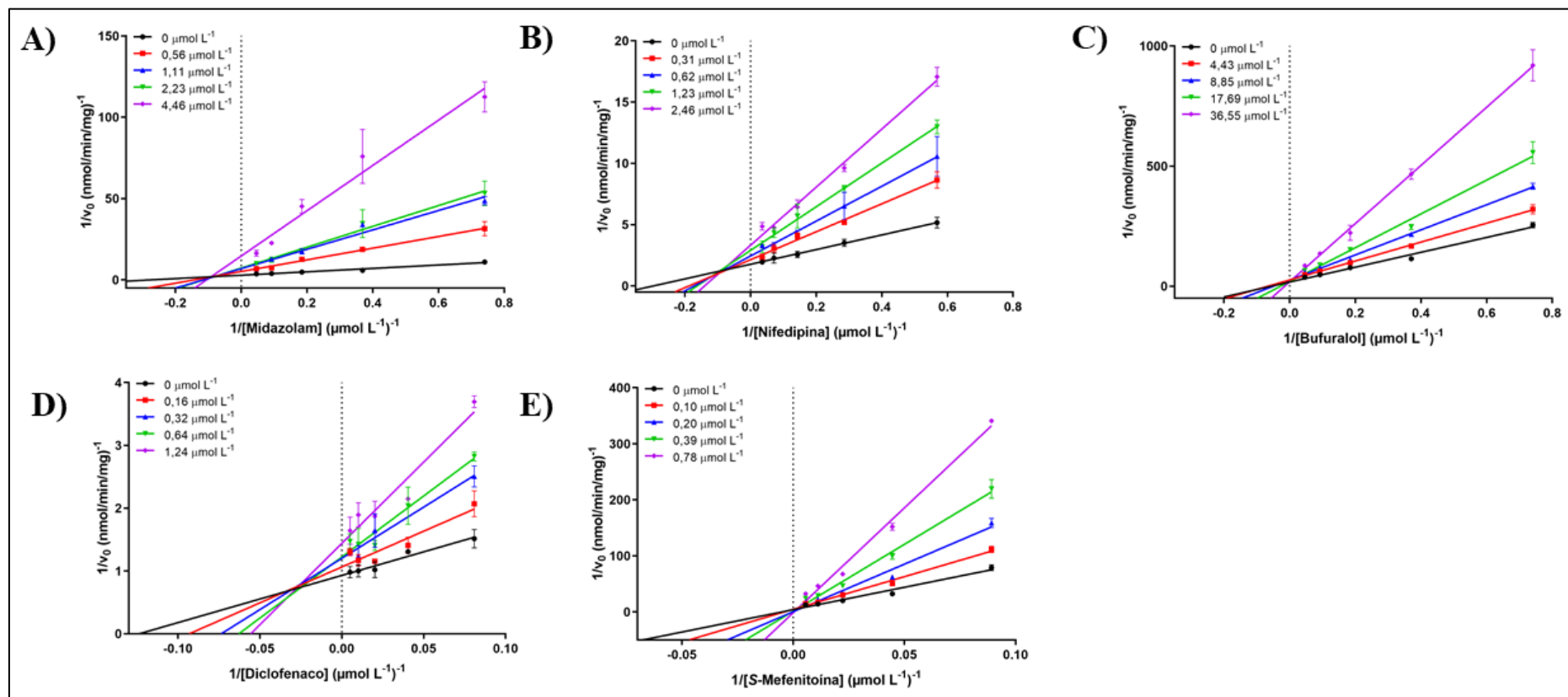
Para caracterizar completamente o potencial inibitório de um composto é necessário determinar, além do valor de IC_{50} , o mecanismo e o valor da constante de inibição. Esses ensaios foram feitos empregando o *rac*-TEB como inibidor e a **Figura 30** apresenta os gráficos de

Lineweaver-Burk obtidos para a avaliação do mecanismo de inibição reversível da CYP3A4/5 (**Figura 30A e B**), CYP2D6 (**Figura 30C**), CYP2C9 (**Figura 30D**) e CYP2C19 (**Figura 30E**).

Como é possível observar, o *rac*-TEB é um inibidor competitivo da CYP2D6 e CYP2C19, ou seja, o *rac*-TEB compete com os substratos dessas isoformas, bufuralol e *S*-mefenitoína, respectivamente, para se ligar ao sítio ativo livre dessas enzimas, provocando o aumento K_M , pois uma maior concentração de substrato passa a ser necessária para atingir metade de V_{max} . Já para a CYP3A4/5 e CYP2C9, o *rac*-TEB demonstrou ser um inibidor do tipo misto (competitivo/não-competitivo). Inibidores mistos interagem tanto com a enzima livre, em um sítio de ligação diferente do sítio ativo, quanto com complexo ES, com diferentes afinidades. Consequentemente, isso afeta tanto a ligação do substrato à enzima quanto a velocidade da reação (aumento de K_M e diminuição de V_{max}).

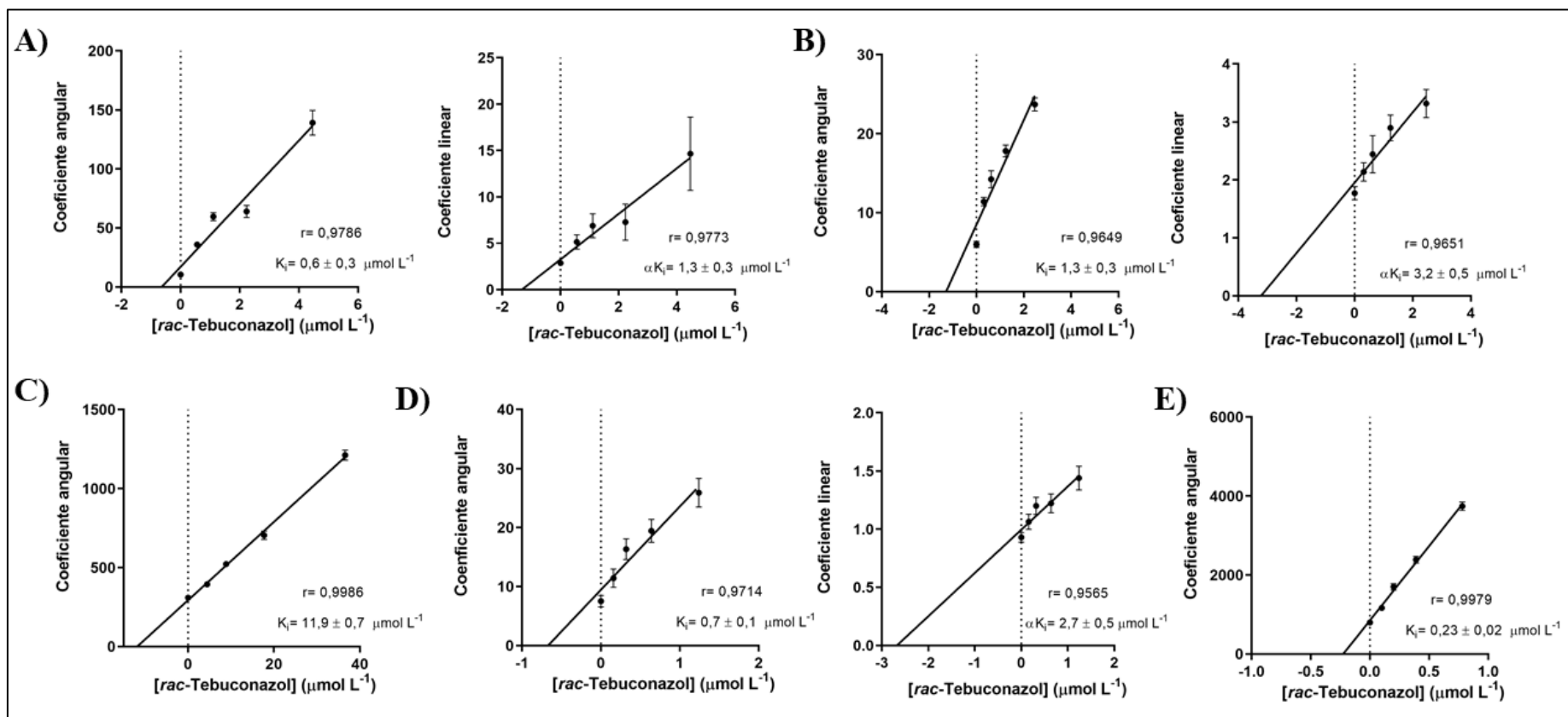
Para avaliar a afinidade do *rac*-TEB por essas isoformas, os coeficientes angulares e lineares das retas do gráfico de duplos recíprocos foram plotados em função das concentrações de *rac*-TEB utilizadas nos estudos de inibição (gráfico secundário de Lineweaver-Burk e gráfico de Dixon, respectivamente) (COPELAND, 2000) e então foram obtidos os valores de K_i e αK_i (**Tabela 22 e Figura 31**).

Figura 30- Gráficos de Lineweaver-Burk obtidos nos estudos de inibição das enzimas do CYP450 por *rac*-TEB empregando HLM.



A) Inibição do tipo mista da CYP3A4/5 causada pelo *rac*-TEB, B) Inibição do tipo mista da CYP3A4/5 causada pelo *rac*-TEB, C) Inibição do tipo competitiva da CYP2D6 causada pelo *rac*-TEB, D) Inibição do tipo mista da CYP2C9 causada pelo *rac*-TEB, E) Inibição do tipo competitiva da CYP2C19 causada pelo *rac*-TEB. Todos os dados representam a média \pm estimativa do desvio padrão (n=3). **Fonte:** Autoria própria.

Figura 31- Gráficos secundários de Lineweaver-Burk e gráficos de Dixon para a determinação de K_i e αK_i para a inibição competitiva e inibição mista das isoformas do CYP450 por *rac*-TEB utilizando HLM.



Reação de A) $1'$ -hidroxilação do midazolam catalisada pela CYP3A4/5, B) Oxidação da nifedipina catalisada pela CYP3A4/5, C) $1'$ -hidroxilação do bufuralol catalisada pela CYP2D6, D) $4'$ -hidroxilação do diclofenaco catalisada pela CYP2C9, E) $4'$ -hidroxilação da *S*-mefenitoína catalisada pela CYP2C19. Todos os dados representam a média \pm estimativa do desvio padrão ($n=3$). **Fonte:** Autoria própria.

Tabela 22- Mecanismos e valores das constantes de inibição das isoformas do CYP450 na presença de *rac*-TEB.

Isoforma	Mecanismo de Inibição	K_i ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	αK_i ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
CYP3A4/5 ^a	Mista	$1,3 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,5$
CYP3A4/5 ^b	Mista	$0,6 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$
CYP2D6	Competitiva	$11,9 \pm 0,7$	-
CYP2C9	Mista	$0,7 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,5$
CYP2C19	Competitiva	$0,23 \pm 0,02$	-

^aOxidação da nifedipina catalisada pela CYP3A4/5; ^b 1'-hidroxilação do midazolam catalisada pela CYP3A4/5.

Para a reação de 1'-hidroxilação do midazolam catalisada pela CYP3A4/5 e inibida pelo *rac*-TEB, os valores de K_i e αK_i foram $0,6 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,3 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente enquanto que para a reação de oxidação da nifedipina, também catalisada pela CYP3A4/5, os valores de K_i e αK_i foram $1,3 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $3,2 \pm 0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (**Tabela 22**). Para a reação de 4'-hidroxilação do diclofenaco catalisada pela CYP2C9, os valores de K_i e αK_i foram $0,7 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,7 \pm 0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (**Tabela 22**). Já para as reações de 1-hidroxilação do bufuralol catalisada pela CYP2D6 e 4'-hidroxilação da *S*-mefenitoína catalisada pela CYP2C19 os valores de K_i foram $11,9 \pm 0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,23 \pm 0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (**Tabela 22**). Todos esses resultados confirmam que o *rac*-TEB é um inibidor forte da CYP3A4/5, CYP2C9 e CYP2C19 e um inibidor moderado da CYP2D6 (SPAGGIARI et al., 2014).

A CYP3A4 é a isoforma mais abundante do fígado e juntamente com a CYP3A5 é responsável pelo metabolismo de cerca de 30% dos fármacos em uso clínico (ZANGER; SCHWAB, 2013), como por exemplo midazolam e verapamil, que são comumente utilizados pela população geral. Além disso, a CYP3A4/5 catalisa o metabolismo de cerca de 30% dos praguicidas mundialmente utilizados, incluindo a atrazina, carbaril, clorpirifós, fipronil, miclobutanil e do próprio TEB (ABASS et al., 2012; FONSECA et al., 2019).

A CYP2C9 também é uma isoforma bem abundante no fígado, sendo a isoforma mais abundante da família 2C (PELKONEN et al., 2008), e é responsável pelo metabolismo de cerca de 13% dos fármacos em uso clínico, tais como a *S*-varfarina, que tem janela terapêutica estreita, a fluoxetina, losartana ibuprofeno e diclofenaco (PELKONEN et al., 2008), além de também catalisar o metabolismo de praguicidas como atrazina, carbaril, clorpirifós e metóxicloro (ABASS et al., 2012).

Já as isoformas CYP2C19 e CYP2D6, por vez, são responsáveis pelo metabolismo de cerca de 7% e 20% dos fármacos em uso clínico (ZANGER; SCHWAB, 2013),

respectivamente, e estão envolvidas no metabolismo de praguicidas como malation, profenofós e metiocarbe (ABASS et al., 2012).

Portanto, apesar de haver uma série de fatores específicos relacionados ao fármaco e ao praguicida que afetarão os níveis de exposição in vivo (BROWN et al., 2005), o risco de interações *rac*-TEB-fármacos não pode ser descartado, principalmente levando em consideração que a CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 são responsáveis, juntas, pelo metabolismo de aproximadamente 70% dos fármacos comumente prescritos e também da maioria dos xenobióticos (ZANGER; SCHWAB, 2013).

5.6. CONCLUSÕES

Nesse capítulo, importantes informações a respeito do potencial inibitório do TEB frente as principais isoformas do CYP450 foram obtidas. Os resultados de IC₅₀ mostraram que o *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB inibiram a atividade enzimática da CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19 e CYP3A4/5. Essa inibição foi enantiosseletiva para a CYP2C9, CYP2D6 e CYP2C19, porém em todos os casos os inibidores tiveram a mesma classificação, fortes para a CYP2C9, CYP3A4/5 e CYP2C9 e moderados para a CYP2D6. Isso indica que, apesar da inibição ser enantiosseletiva, ela não foi suficiente para que houvesse diferença de potencial inibitório entre a mistura racêmica e os enantiômeros isolados e com isso optou-se por determinar o mecanismo e a constante de inibição utilizando apenas o *rac*-TEB.

Os mecanismos e valores das constantes de inibição mostraram que o *rac*-TEB é um inibidor reversível misto (competitivo- não competitivo) forte da CYP3A4/5 e CYP2C9 e um inibidor competitivo moderado e forte da CYP2D6 e CYP2C19, respectivamente. Isso indica que o risco de interações *rac*-TEB-fármacos não pode ser descartado, principalmente interações com fármacos metabolizados majoritariamente pela CYP3A4/5, CYP2C9 e CYP2C19. Portanto, cuidados devem ser tomados com relação a exposição da população ao *rac*-TEB para que assim possíveis efeitos tóxicos sejam evitados.

Capítulo 6. Conclusões Gerais

O uso de praguicidas quirais, em geral, pode representar riscos para a saúde humana, uma vez que estamos expostos a esses compostos diariamente, por exemplo, através da alimentação ou exposição laboral, e os enantiômeros de praguicidas quirais podem apresentar propriedades biológicas distintas, ou seja, enquanto um pode ser inofensivo para o organismo humano, o outro pode causar danos. Nesse contexto, através de estudos *in vitro* enantiosseletivos de metabolismo de fase I e estudos de inibição da atividade das enzimas do CYP450, bem como através de extrapolações *in vitro-in vivo*, o presente trabalho obteve importantes resultados que ajudam a prever a toxicocinética do TEB em humanos, além de resultados que indicam possíveis interações TEB-fármacos.

De acordo com os dados apresentados, o TEB sofre metabolismo de fase I catalisado pelas enzimas do CYP450 presentes nos HLM, havendo a formação de seu metabólito majoritário TEBOH. Múltiplas isoformas do CYP450 são capazes de catalisar essa reação, com destaques para a CYP3A4 e CYP2C9. Então, considerando a contribuição do metabolismo hepático para a eliminação do TEB do organismo humano, a existência de diversas vias de metabolismo hepático (diversas enzimas) possíveis faz com que o acúmulo desse praguicida se torne mais difícil.

Além disso, o TEB pode ser depurado enantiosseletivamente pelo fígado humano, com degradação preferencial do *S*-(+)-TEB, seguido pelo *rac*-TEB e *R*-(-)-TEB. Os valores de E_H (<30%) sugeriram que se o TEB for ingerido, o efeito de primeira passagem pelo fígado pode não ser efetivo para diminuir a sua concentração inicial na corrente sanguínea, ou seja, o TEB pode chegar até a circulação sistêmica, principalmente o *R*-(-)-TEB, e causar outros efeitos no organismo que devem ser investigados. Esses valores de E_H também indicam que a depuração total do TEB ocorrerá apenas após sucessivas passagens pelo fígado, ou após o metabolismo hepático ser catalisado por outras famílias de enzimas, ou então ocorrer em outros órgãos, como os rins.

Já com relação aos ensaios enantiosseletivos de inibição da atividade das enzimas do CYP450 pelo TEB, os resultados mostraram que o *rac*-TEB, *R*-(-)-TEB e *S*-(+)-TEB inibiram a atividade enzimática da CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2D6 e CYP2C19 e, apesar da inibição ser enantiosseletiva para essas três últimas isoformas, ela não foi suficiente para que houvesse diferença significativa de potencial inibitório entre a mistura racêmica e os enantiômeros isolados.

Assim, os mecanismos e valores das constantes de inibição foram determinados empregando o *rac*-TEB e mostraram que este é um inibidor reversível misto (competitivo- não competitivo) forte da CYP3A4/5 e CYP2C9 e um inibidor competitivo moderado e forte da CYP2D6 e CYP2C19, respectivamente. Além disso, os valores das constantes de inibição indicaram que o risco de interações *rac*-TEB-fármacos não pode ser descartado, principalmente interações com fármacos metabolizados majoritariamente pela CYP3A4/5, CYP2C9 e CYP2C19.

Dessa forma, todas essas informações juntas contribuem para a avaliação do risco de exposição humana ao praguicida quiral TEB, de maneira enantiosseletiva, e indicam que estes riscos não devem ser negligenciados, sendo necessário, assim, um maior controle.

Referências Bibliográficas

ABASS, K. et al. Characterization of diuron N-demethylation by mammalian hepatic microsomes and cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**, 2007.

ABASS, K. et al. Metabolism of Pesticides by Human Cytochrome P450 Enzymes *In Vitro* – A Survey. In: **Insecticides - Advances in Integrated Pest Management**. [s.l: s.n.].

ABASS, K. M. From *in vitro* hepatic metabolic studies towards human health risk assessment: Two case studies of diuron and carbosulfan. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2013.

ABASS, K.; PELKONEN, O. The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: Comparison of the N-in-one and single substrate approaches. **Toxicology in Vitro**, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC nº 27, de 17 de maio 2012**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3>.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Chiral Pollutants: Biotransformation, Biodegradation and Metabolism. In: **Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis**. [s.l: s.n.].

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2002.

AMBIENTE, M. DO M. **Produtos Agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/gestao-das-substancias-quimicas/produtos-agrotoxicos.html>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **SciFinder - A cas solution**. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 21 fev. 2021.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2019.

AQUILANTE, C. L. et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 23, n. 12, p. 721–8, dez. 2013.

ARORA, S. et al. *In vivo* prediction of CYP-mediated metabolic interaction potential of formononetin and biochanin A using *in vitro* human and rat CYP450 inhibition data. **Toxicology Letters**, 2015.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in *in vitro* metabolism of drugs-A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010.

BADAWI, N. et al. Degradation and sorption of the fungicide tebuconazole in soils from golf greens. **Environmental Pollution**, 2016.

BARR, J. T.; FLORA, D. R.; IWUCHUKWU, O. F. Case study 1. practical considerations with experimental design and interpretation. **Methods in Molecular Biology**, v. 1113, p. 419–429, 2014.

BARTH, T. et al. *In vitro* metabolism of the lignan (-)-grandisin, an anticancer drug candidate, by human liver microsomes. **Drug Testing and Analysis**, v. 7, n. 9, p. 780–786, 2015.

BAUGROS, J. B. et al. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. **Analytica Chimica Acta**, 2008.

BENDING, G. D.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. S.; LINCOLN, S. D. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. **Chemosphere**, 2007.

BHATERIA, M. et al. Enantioselective inhibition of Cytochrome P450-mediated drug metabolism by a novel antithrombotic agent, S002-333: Major effect on CYP2B6. **Chemico-Biological Interactions**, v. 256, p. 257–265, 25 ago. 2016.

BONNER, M. R.; ALAVANJA, M. C. R. Pesticides, human health, and food security. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 3, p. 89–93, 1 ago. 2017.

BORN, S. L. et al. *In vitro* kinetics of coumarin 3,4-epoxidation: application to species differences in toxicity and carcinogenicity. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 58, n. 1, p. 23–31, 2000.

BOWMAN, C. M.; BENET, L. Z. An examination of protein binding and protein-facilitated uptake relating to *in vitro-in vivo* extrapolation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 123, p. 502–514, 15 out. 2018.

BRIAN HOUSTON, J.; KENWORTHY, K.; GALETIN, A. Typical and Atypical Enzyme Kinetics. In: **Drug Metabolizing Enzymes**. [s.l: s.n.].

BROWN, H. S. et al. Prediction of *in vivo* drug-drug interactions from *in vitro* data: Impact of incorporating parallel pathways of drug elimination and inhibitor absorption rate constant. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2005.

BURA, L. et al. 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 Journal**, 2019.

CARGNIN, M. C. DOS S.; ECHER, I. C.; SILVA, D. R. DA. Fumicultura : uso de equipamento de proteção individual e intoxicação por agrotóxico. **Cuidado é fundamental**, 2017.

CARRÃO, D. B. et al. 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 and Chemical Toxicology**, v. 123, 2019a.

CARRÃO, D. B. et al. *In vitro* inhibition of human CYP2D6 by the chiral pesticide fipronil and its metabolite fipronil sulfone: Prediction of pesticide-drug interactions. **Toxicology Letters**, v. 313, 2019b.

CARRÃO, D. B. et al. Enantioseparation of pesticides: A critical review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2020.

CARVALHO, D. F. P. et al. Determination of environmental exposure to ddt by human hair analysis in Santos and São Vicente Estuary, São Paulo, Brazil. **Orbital**, 2018.

CHANG, G. et al. Strategic use of plasma and microsome binding to exploit *in vitro* clearance in early drug discovery. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, 2010.

CHANG, T. K.; GONZALEZ, F. J.; WAXMAN, D. J. Evaluation of triacetyloleandomycin, alpha-naphthoflavone and diethylthiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. **Archives of biochemistry and biophysics**, 1994.

CHANKVETADZE, B. Liquid chromatographic separation of enantiomers. In: **Liquid Chromatography: Applications: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 2p. 69–86.

CHEN, J. et al. Individual and combined effects of herbicide tribenuron-methyl and fungicide tebuconazole on soil earthworm *Eisenia fetida*. **Scientific Reports**, 2018.

CLASEN, B. et al. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 737–743, jun. 2018.

COE, K. J.; KOUDRIAKOVA, T. Metabolic stability assessed by liver microsomes and hepatocytes. **Methods in Pharmacology and Toxicology**, 2014.

COPELAND, R. A. **Enzymes**. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2000.

COSSI, M. et al. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 669–681, abr. 2003.

COTTON, J. et al. Development and validation of a multiresidue method for the analysis of more than 500 pesticides and drugs in water based on on-line and liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Water Research**, v. 104, p. 20–27, 2016.

CUI, N. et al. Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity, and dissipation in soils. **Environmental Science and Pollution Research**, 2018.

DAMRE, A. A.; IYER, K. R. The Significance and Determination of Plasma Protein Binding. In: **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley &

Sons, Inc., 2012. p. 1–18.

DE ALBUQUERQUE, N. C. P. et al. Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2018.

DE ALBUQUERQUE, N. C. P. **Estudos enantiosseletivos de metabolismo, citotoxicidade e genotoxicidade in vitro do nematocida fenamifós**. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo.

DE ALBUQUERQUE, N. C. P. et al. Risk assessment of the chiral pesticide fenamiphos in a human model: Cytochrome P450 phenotyping and inhibition studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 146, 2020.

DE CAMPOS LOURENÇO, T.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, 2010.

DE LUCCA, D. et al. Vulnerabilidades de trabalhadores rurais frente ao uso de agrotóxicos na produção de hortaliças em região do Nordeste do Brasil. **Rev. bras. Saúde ocup.**, v. 37, n. 125, p. 89–98, 2012.

DE SOUZA, R. M. et al. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, 2020.

DEFRA. Differential Metabolism of Chiral Compounds. 2002.

DVOŘÁK, M. et al. Equivalent peak resolution: Characterization of the extent of separation for two components based on their relative peak overlap. **Electrophoresis**, v. 36, n. 5, p. 646–654, 1 mar. 2015.

ESFA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole. **EFSA Journal**, 2014a.

ESFA. Modern methodologies and tools for human hazard assessment of chemicals. **EFSA Journal**, 2014b.

EUROPEAN CHEMICAL AGENCY. Committee for Risk Assessment RAC Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of tebuconazole. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://echa.europa.eu/harmonised-classification-and-labelling-consultation>>.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on bioanalytical method validation. **EMA Guideline**, v. 44, n. July 2011, p. 1–23, 2012.

FDA. *In Vitro* Drug Interaction Studies-Cytochrome P450 Enzyme-and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. **FDA: Silver Spring**, n. January, p. 43, 2020a.

FDA. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>>. Acesso em: 21 jul. 2020b.

FONSECA, F. S. **Análise enantiosseletiva do praguicida miclobutanil após metabolismo in**

vitro por microsomas hepáticos de humanos. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 21 ago. 2018.

FONSECA, F. S. et al. Myclobutanil enantioselective risk assessment in humans through *in vitro* CYP450 reactions: Metabolism and inhibition studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 202–211, 1 jun. 2019.

FREEMAN, S. et al. Children's diets, pesticide uptake, and implications for risk assessment: An Israeli case study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 87, p. 88–96, 2016.

FUJII, N. D-amino acids in living higher organisms. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, 2002.

FUSTINONI, S. et al. Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 24, n. 6, p. 643–649, 12 nov. 2014.

GABRIELSSON, J.; WEINER, D. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications. **American Journal of Pharmaceutical Education**, 2010.

GODIN, S. J. et al. Identification of rat and human cytochrome P450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroid insecticides deltamethrin and esfenvalerate. **Drug Metabolism and Disposition**, 2007.

GRIMME, S. A simplified Tamm-Dancoff density functional approach for the electronic excitation spectra of very large molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 138, n. 24, p. 244104, jun. 2013.

HABENSCHUS, M. D. **Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural (-)-grandisina utilizando microsomas hepáticos de humanos.** Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 7 out. 2016.

HABENSCHUS, M. D. et al. *In Vitro* Inhibition of Human CYP450s 1A2, 2C9, 3A4/5, 2D6 and 2E1 by Grandisin. **Planta Medica**, v. 83, n. 8, 2017.

HABENSCHUS, M. D. et al. *In vitro* enantioselective study of the toxicokinetic effects of chiral fungicide tebuconazole in human liver microsomes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, 2019.

HARADA, N.; CHEN, S.-M. L.; NAKANISHI, K. Quantitative definition of exciton chirality and the distant effect in the exciton chirality method. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 19, p. 5345–5352, set. 1975.

HERNÁNDEZ, A. F.; GIL, F.; LACASAÑA, M. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. **Archives of Toxicology**. Springer Verlag, , 1 out. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-017-2043-5>>. Acesso em: 18 mar. 2021

HERRERO-HERNÁNDEZ, E. et al. Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. **Journal of Hydrology**, v. 486, p. 234–245, 2013.

HODGSON, E. Future Considerations for Environmental and Human Health. In: **A Textbook of Modern Toxicology**. [s.l: s.n.].

HODGSON, E. Introduction to Pesticide Disposition. In: **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**. [s.l: s.n.].

HODGSON, E. Introduction to Pesticide Biotransformation and Disposition. In: **Pesticide Biotransformation and Disposition**. [s.l: s.n.].

HOSTAŠ, J.; ŘEZÁČ, J. Accurate DFT-D3 Calculations in a Small Basis Set. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2017.

HU, Y.; KUPFER, D. Enantioselective metabolism of the endocrine disruptor pesticide methoxychlor by human cytochromes P450 (P450s): Major differences in selective enantiomer formation by various P450 isoforms. **Drug Metabolism and Disposition**, 2002.

INMETRO. Doq-Cgcre-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, 2016.

JAAKKOLA, T. et al. Pioglitazone is metabolised by CYP2C8 and CYP3A4 *in vitro*: Potential for interactions with CYP2C8 inhibitors. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 99, n. 1, p. 44–51, 2006.

JENNINGS, W. B. Introduction to stereochemistry and conformational analysis. **Endeavour**, 1992.

JESCHKE, P. **Current status of chirality in agrochemicals** *Pest Management Science*, 2018.

JING, W.-H. et al. Identification of cytochrome P450 isoenzymes involved in metabolism of (+)-pramipexole, a calcium channel blocker, by human liver microsomes using ultra high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 77, p. 175–188, 15 abr. 2013.

JÓNSDÓTTIR, S. Ó. et al. Physiologically Based Toxicokinetic Models of Tebuconazole and Application in Human Risk Assessment. **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, n. 5, p. 715–734, 2016.

KALAMARIDIS, D.; PATEL, N. Assessment of Drug Plasma Protein Binding in Drug Discovery. In: [s.l.] Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 21–37.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment** Elsevier B.V., , 1 jan. 2017.

KRAMER, M. A.; TRACY, T. S. Enzyme Kinetics of Drug-Metabolizing Reactions and Drug-Drug Interactions. In: **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. 1–25.

KRASULOVA, K.; DVORAK, Z.; ANZENBACHER, P. *In vitro* analysis of itraconazole *cis*-diastereoisomers inhibition of nine cytochrome P450 enzymes: stereoselective inhibition of CYP3A. **Xenobiotica**, 2019.

- LÄMMERHOFER, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, 2010.
- LI, S. et al. Endocrine disrupting effects of tebuconazole on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, 2019.
- LI, Y. et al. Case study 3. application of basic enzyme kinetics to metabolism studies: Real-life examples. **Methods in Molecular Biology**, v. 1113, p. 441–460, 2014.
- LI, Y. et al. Enantioselectivity in tebuconazole and myclobutanil non-target toxicity and degradation in soils. **Chemosphere**, 2015.
- LIGIERO, C. B. P. et al. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**, 2009.
- LIU, N. et al. Chiral bioaccumulation behavior of tebuconazole in the zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 78–84, 2016.
- LV, X. et al. Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity. **Environmental Pollution**, v. 222, p. 504–512, 2017.
- MA, F. et al. Gestational exposure to tebuconazole affects the development of rat fetal Leydig cells. **Chemosphere**, v. 262, p. 127792, 1 jan. 2021.
- MA, Y.; GAN, J.; LIU, W. Chiral pesticides and environmental safety. **ACS Symposium Series**, v. 1085, p. 97–106, 13 dez. 2011.
- MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. M.; DE KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, 2006.
- MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y. VANDER. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals: IV. Polar organic solvent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, n. 1, p. 48–61, 7 abr. 2006.
- MCMURRY, J. Organic Chemistry, 8th Edition. **Belmont, CA: Brooks Cole/Cengage Learning, 2012.**, 2012.
- MERCADANTE, R. et al. Identification and Quantification of Metabolites of the Fungicide Tebuconazole in Human Urine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 11, p. 1943–1949, 17 nov. 2014.
- NARDINI, V. et al. Citronellal assumes a folded conformation in solution due to dispersion interactions: A joint NMR-DFT analysis. **Journal of Molecular Structure**, 2018.
- NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73–78, jan. 2012.
- NIROGI, R. et al. Chemical inhibitors of CYP450 enzymes in liver microsomes: Combining selectivity and unbound fractions to guide selection of appropriate concentration in phenotyping

assays. **Xenobiotica**, v. 45, n. 2, p. 95–106, 2015.

NOUGADÈRE, A. et al. Dietary exposure to pesticide residues and associated health risks in infants and young children – Results of the French infant total diet study. **Environment International**, 2020.

OGILVIE, B. W.; USUKI, E.; YERINO, P. *In Vitro* Approaches for Studying the Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes and Identifying the Drug-Metabolizing Enzymes Responsible for the Metabolism of Drugs (Reaction Phenotyping) with Emphasis on Cytochrome P450. **Drug-Drug Interactions**, p. 249–376, 8 fev. 2008.

PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. VEGA: A versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2002.

PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. Atom-type description language: A universal language to recognize atom types implemented in the VEGA program. **Theoretical Chemistry Accounts**, 2003.

PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. VEGA - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 2004.

PELKONEN, O. et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: Current status. **Archives of Toxicology**, 2008.

PÉREZ, D. J. et al. Ecological risk assessment of current-use pesticides and biocides in soils, sediments and surface water of a mixed land-use basin of the Pampas region, Argentina. **Chemosphere**, 2021.

PERRIN, C. et al. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals: Part II. Reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 966, n. 1–2, p. 119–134, 2002.

PESCITELLI, G.; BRUHN, T. Good Computational Practice in the Assignment of Absolute Configurations by TDDFT Calculations of ECD Spectra. **Chirality**, v. 28, n. 6, p. 466–474, jun. 2016.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, 2013.

POULSEN, R. et al. Tebuconazole disrupts steroidogenesis in *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, 2015.

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

RIBEIRO, A. R. et al. Enantiomeric fraction evaluation of pharmaceuticals in environmental matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**

A, v. 1363, p. 226–235, 10 out. 2014.

RING, B.; WRIGHTON, S. A.; MOHUTSKY, M. Reversible mechanisms of enzyme inhibition and resulting clinical significance. **Methods in Molecular Biology**, 2014.

RISTHAUS, T.; HANSEN, A.; GRIMME, S. Excited states using the simplified Tamm–Dancoff-Approach for range-separated hybrid density functionals: development and application. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 28, p. 14408–14419, 2014.

RODRIGUES, A. D. Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping. Attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. **Biochemical Pharmacology**, 1999.

ROSE, R. L. et al. Pesticide metabolism in humans, including polymorphisms. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, 2005.

ROSE, R. L.; HODGSON, E. Metabolism of Toxicants. In: **A Textbook of Modern Toxicology**. [s.l: s.n.].

ROSE, R. L.; HODGSON, E. Chemical and Physiological Influences on Xenobiotic Metabolism. In: **A Textbook of Modern Toxicology**. [s.l: s.n.].

RUDGE, C. V. C. et al. Levels of selected persistent organic pollutants in blood from delivering women in seven selected areas of São Paulo State, Brazil. **Environment International**, 2012.

SAITTA, M. et al. Gas chromatography-tandem mass spectrometry multi-residual analysis of contaminants in Italian honey samples. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1–9, 20 fev. 2017.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, S. et al. Pesticide residues in groundwaters and soils of agricultural areas in the Águeda River Basin from Spain and Portugal. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 2013.

SCHMIDT, F. et al. Combination effects of azole fungicides in male rats in a broad dose range. **Toxicology**, 2016.

SCOLLON, E. J. et al. *In vitro* metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome P450 isoforms. **Drug Metabolism and Disposition**, 2009.

SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. In: **Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition**. [s.l: s.n.].

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Fundamentals of enzyme kinetics. **Methods in Molecular Biology**, 2014a.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Different enzyme kinetic models. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 1113p. 23–35.

SHEN, Z. et al. Stereoselective degradation of tebuconazole in rat liver microsomes. **Chirality**, v. 24, n. 1, p. 67–71, 2012.

SHUANG, Y. et al. Simultaneous enantiomeric determination of multiple triazole fungicides in fruits and vegetables by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry on a bridged bis(β -cyclodextrin)-bonded chiral stationary phase. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128842, 30 maio 2021.

SINZ, M. A. *In Vitro* and *In Vivo* Models of Drug Metabolism. In: **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. 1–31.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. [s.l: s.n.].

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 13, 1997.

SOLOMONS, G. T. W.; FRYHKE, C. B. **Química Orgânica: Volume 1**. [s.l: s.n.].

SPAGGIARI, D. et al. A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: An overview of current methodologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2014.

STEHMANN, C.; DE WAARD, M. A. Relationship between chemical structure and biological activity of triazole fungicides against *Botrytis cinerea*. **Pesticide Science**, 1995.

STEPAN, A. F. et al. **Metabolism-guided drug design** *MedChemComm*, 2013.

STEVENS, J.; WIENKERS, L. Cytochrome P450 Reaction Phenotyping. In: **Drug Metabolizing Enzymes**. [s.l: s.n.].

STRICKLAND, T. C.; POTTER, T. L.; JOO, H. Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. **Pest Management Science**, 2004.

TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, 2001.

TANG, J. et al. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, 2001.

TANG, J. et al. *In vitro* metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. **Chemico-Biological Interactions**, 2002.

TANG, J. et al. *In vitro* metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. **Chemico-Biological Interactions**, 2004.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2004.

TSATSAKIS, A. M. et al. Determination of dialkyl phosphates in human hair for the biomonitoring of Exposure to organophosphate pesticides. **Journal of Chromatography B:**

Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2010.

UN. Pesticide residues in food : 1994, report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues, Rome, 19-28 September 1994. [s.l.] Rome : FAO, 1994.

UN. World population projected to reach 9.7 billion by 2050 | UN DESA | United Nations Department of Economic and Social Affairs. Disponível em: <<https://www.un.org/en/development/desa/news/population/2015-report.html>>. Acesso em: 28 jun. 2020.

USEPA. US EPA-Pesticides; Tebuconazole | US EPA ARCHIVE DOCUMENT | Enhanced Reader.

USEPA. Basic Information about Pesticide Ingredients | Ingredients Used in Pesticide Products | US EPA. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos na berlinda. **Revista Pesquisa Fapesp**. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/agrotoxicos-na-berlinda/>>. Acesso em: 9 jun. 2020.

VOLAK, L. P.; GREENBLATT, D. J.; VON MOLTKE, L. L. *In Vitro* Approaches to Anticipating Clinical Drug Interactions. In: **Drug-Drug Interactions in Pharmaceutical Development**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007. p. 31–74.

WALSKY, R. L.; OBACH, R. S. A comparison of 2-phenyl-2-(1-piperidinyl)propane (ppp), 1,1',1''-phosphinothioylidynetrisaziridine (thioTEPA), clopidogrel, and ticlopidine as selective inactivators of human cytochrome P450 2B6. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 35, n. 11, p. 2053–9, 1 nov. 2007.

WANG, X. et al. Enantioselective degradation of tebuconazole in cabbage, cucumber, and soils. **Chirality**, v. 24, n. 2, p. 104–111, 2012.

WANG, Y. H.; GIBSON, C. R. Variability in human *in vitro* enzyme kinetics. **Methods in Molecular Biology**, v. 1113, p. 337–362, 2014.

WATERS, N. J.; OBACH, R. S.; DI, L. Consideration of the unbound drug concentration in enzyme kinetics. **Methods in Molecular Biology**, 2014.

WHITE, R. E. Review of Drug Metabolism in Drug Discovery and Development. In: **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. 1–40.

WHO. WHO | PesticidesWho, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em: 7 jun. 2020

WUSTROW, I. et al. *In vitro* identification of the cytochrome P450 isozymes involved in the N-demethylation of the active opioid metabolite nortilidine to bisnortilidine. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 6, p. 633–639, 2012.

YANG, J. DI et al. Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. **Environmental Toxicology**, 2018.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology and Therapeutics**, 2013.

ZHANG, H. et al. Cytochrome P450 reaction-phenotyping: An industrial perspective. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, 2007.

ZHANG, Q. et al. Study on the stereoselective degradation of three triazole fungicides in sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2015.

ZHAO, P. et al. Simultaneous enantioselective determination of 22 chiral pesticides in fruits and vegetables using chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 2019.

ZHOU, J. et al. Triazole fungicide tebuconazole disrupts human placental trophoblast cell functions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 294–302, 2016.

ZHOU, Y. et al. Enantiomer separation of triazole fungicides by high-performance liquid chromatography. **Chirality**, v. 21, n. 4, p. 421–427, 2009.

ZHU, W. et al. Stereoselective degradation kinetics of tebuconazole in rabbits. **Chirality**, v. 19, n. 2, p. 141–147, 2007.

ZIENTEK, M. A.; YODIM, K. Reaction phenotyping: Advances in the experimental strategies used to characterize the contribution of drug-metabolizing enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**, 2015.

Apêndice

APÊNDICE A- Condições avaliada durante a triagem para o desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por PO- CLAE. A temperatura da coluna foi mantida em $20\pm 2^\circ\text{C}$.

Coluna Quiral	Fase Móvel	Proporção da fase móvel (% v/v)	Vazão (mL min^{-1})	Rs dos enantiômeros do TEB	Rs dos enantiômeros do TEBOH	Observações
Chiralpak AD-H[®]	Acetonitrila	100	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Metanol	50:50	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Etanol	50:50	0,3	0,87	-	Não foi possível aumentar a porcentagem de Etanol devido a pressão máxima permitida para a coluna
		70:30	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Isopropanol	50:50	0,2	1,06	-	Não foi possível aumentar a porcentagem de Etanol devido a pressão máxima permitida para a coluna
		Metanol	100	0,3	0	-
	Metanol: Etanol	50:50	0,3	0	-	-
	Metanol: Isopropanol	50:50	0,3	0	-	-
	Etanol	100	0,3	0	-	-

	Etanol: Isopropanol	50:50	0,3	0	-	-
	Isopropanol	100	0,3	0	-	-
Chiralpak AS®	Acetonitrila	100	0,3	0,37	-	-
	Acetonitrila: Metanol	85:15	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Etanol	50:50	0,4	0	-	-
	Acetonitrila: Isopropanol	85:15	0,3	0	-	-
	Metanol	100	0,4	0	-	-
	Metanol: Etanol	50:50	0,3	0	-	-
	Metanol: Isopropanol	85:15	0,3	0	-	-
	Etanol	100	0,4	0	-	-
	Etanol: Isopropanol	85:15	0,3	0	-	-
	Isopropanol	100	0,3	-	-	Não foi possível avaliar devido à alta pressão gerada na coluna
Chiralcel OD-H®	Acetonitrila	100	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Metanol	50:50	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Etanol	85:15	0,3	0	-	-

	Acetonitrila: Isopropanol	50:50	0,3	0	-	-
	Metanol	100	0,3	0	-	-
	Metanol: Etanol	50:50	0,3	0	-	-
	Metanol: Isopropanol	50:50	0,3	0	-	-
	Etanol	100	0,3	0	-	-
	Etanol: Isopropanol	50:50	0,15	0	-	-
	Isopropanol	100	0,15	-	-	Os picos não eluíram até 15 minutos
Chiralcel OJ[®]	Acetonitrila	100	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB, E2 TEBOH e E2 TEB coeluíram
	Acetonitrila: Metanol	85:15	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB coeluíram
	Acetonitrila: Etanol	85:15	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB, E2 TEBOH e E2 TEB coeluíram
	Acetonitrila: Isopropanol	50:50	0,5	0	-	-
	Metanol	100	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB coeluíram
	Metanol: Etanol	50:50	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB coeluíram
	Metanol: Isopropanol	50:50	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB coeluíram

	Etanol	100	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB coelúram
	Etanol: Isopropanol	50:50	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB coelúram
	Isopropanol	100	0,3	>1,5	>1,5	E1 TEBOH, E1 TEB e E2 TEBOH coelúram
Lux Cellulose-1®	Acetonitrila	100	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Metanol	50:50	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Etanol	50:50	0,3	0	-	-
	Acetonitrila: Isopropanol	85:15	0,3	0	-	-
	Metanol	100	0,3	0	-	-
	Metanol: Etanol	50:50	0,3	0	-	-
	Metanol: Isopropanol	50:50	0,3	0	-	-
	Etanol	100	0,3	0	-	-
	Etanol: Isopropanol	50:50	0,3	0	-	-
	Isopropanol	100	0,3	0	-	-
Lux Amylose-2®	Acetonitrila	100	0,5	>1,5	-	E2 TEB eluiu pós 15 minutes
	Acetonitrila: Metanol	50:50	0,3	0	-	-
						E1 TEBOH, E1 TEB e

Acetonitrila: Etanol	85:15	0,5	>1,5	>1,5	E2 TEBOH coeluíram e E2 TEB eluiu muito depois
	85:15	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEBOH e E1 TEB coeluíram
	70:30	0,5	>1,5	>1,5	E2 TEBOH e E1 TEB coeluíram
Acetonitrila: Isopropanol	50:50	0,5	>1,5	1,27	-
Metanol	100	0,5	0	-	-
Metanol: Etanol	50:50	0,5	0	-	-
Metanol: Isopropanol	50:50	0,3	0	-	-
Etanol	50:50	0,5	0	-	-
Etanol: Isopropanol	50:50	0,3	>1,5	0	-
Isopropanol	100	0,3	0	-	-

APÊNDICE B- Condições avaliada durante a triagem para o desenvolvimento do método analítico enantiosseletivo por FR-CLAE. A temperatura da coluna foi mantida em $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Coluna Quiral	Fase Móvel	Proporção da fase	Vazão	Rs dos enantiômeros	Rs dos enantiômeros	Observações
		móvel (% v/v)	(mL min ⁻¹)	do TEB	do TEBOH	
Chiralpak AD-H[®]	Metanol: Água	90:10	0,6	>1,5	-	Baixa simetria dos picos
	Acetonitrila: Água	85:15	0,6	0,99	-	-
		75:25	0,6	1,14	-	Baixa simetria dos picos
Chiralpak AS[®]	Metanol: Água	85:15	0,8	0,64	-	-
		80:20	0,8	0,89	-	-
		70:30	0,8	1,30	-	Os picos eluíram após 15 minutos
	Acetonitrila: Água	85:15	0,8	0,17	-	-
		80:20	0,8	0,22	-	-
		70:30	0,8	0,34	-	-
		50:50	0,8	0,84	-	Os picos eluíram após 15 minutos
Chiralcel OD-H[®]	Metanol: Água	85:15	0,6	0	-	-
		70:30	0,6	0	-	-
	Acetonitrila: Água	85:15	0,6	0	-	-
		70:30	0,6	0	-	-
Chiralcel OJ[®]	Metanol: Água	90:10	0,5	>1,5	>1,5	Condição de separação promissora

		85:15	0,5	>1,5	>1,5	E1 TEB e E2 TEBOH coeluíram
		90:10	0,7	>1,5	>1,5	E1 TEB e E2 TEBOH coeluíram
	Acetonitrila: Água	80:20	0,7	>1,5	>1,5	E1 TEB e E2 TEBOH coeluíram
		60:40	0,7	>1,5	>1,5	Condição de separação promissora
Lux Cellulose-1®	Metanol: Água	85:15	0,6	>1,5	-	Baixa simetria dos picos
	Acetonitrila: Água	85:15	0,6	0	-	-
		70:30	0,6	0	-	-
Lux Cellulose-2®	Metanol: Água	85:15	0,6	0	-	-
		75:25	0,6	0	-	-
	Acetonitrila: Água	85:15	0,6	0	-	-
		70:30	0,6	0,21	-	-
		60:40	0,6	0,42	-	-
		50:50	0,6	0,28	-	-
Lux Amylose-2®	Metanol: Água	85:15	0,7	0	-	-
		60:40	0,7	0	-	Os picos eluíram após 15 minutos

Acetonitrila: Água

75:25

0,7

>1,5

>1,5

Baixa simetria do pico
do E2 TEB, além de
eluição tardia
