



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

Análise enantiosseletiva do praguicida imazamox: estudos de permeabilidade com células CACO-2 e metabolismo in vitro com microsomas hepáticos de humanos

Carolina Oliveira Serpellone

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Análise enantiosseletiva do praguicida imazamox: estudos de permeabilidade com células CACO-2 e metabolismo in vitro com microsomas hepáticos de humanos.

Carolina Oliveira Serpellone

Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023

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

Serpellone, Carolina Oliveira

Análise enantiosseletiva do praguicida imazamox: estudos de permeabilidade com células CACO-2 e metabolismo *in vitro* com microsomas hepáticos de humanos. Carolina Oliveira Serpellone; orientador, Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira – 2023.

Dissertação (Mestrado 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, 2023.

Versão Original

1. Imazamox
2. Praguicida quiral
3. Análise enantiosseletiva
4. Metabolismo *in vitro*
5. Células CACO-2
6. Microsomas hepáticos de humanos
7. inibição do CYP450.

Nome: SERPELLONE, Carolina Oliveira

Título: Análise enantiosseletiva do praguicida imazamox: estudos de permeabilidade com células CACO-2 e metabolismo in vitro com microsomas hepáticos de humanos.

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: Química

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

Eu simplesmente sou grata pela minha vida, por ter saúde e poder acordar todos os dias para viver!

Agradeço aos meus queridos pais Marcel e Ivanilda por todo suporte e força que sempre me deram em todas as fases na minha vida, vocês são os meus maiores exemplos, aos meus lindos irmãos Marcel Henrique e João Meigo Pedro, vocês são meninos especiais e a toda minha família.

Agradeço ao professor Anderson pela confiança e por poder permitir que esse projeto se cumpra. Muito obrigada por toda orientação e conselhos, todo conhecimento obtido aqui foi fundamental para que a vida me desse oportunidades incríveis e que eu jamais conseguiria se não tivesse passado por aqui.

Agradeço aos meus inteligentíssimos amigos do LABMETS em especial ao Maike e Icaro por toda parceria, conhecimento e ajuda que vocês me proporcionaram durante minha passagem por aqui. Foi um prazer enorme poder trabalhar com vocês pessoal, eu aprendi demais. Que vocês tenham uma carreira de sucesso.

Agradeço a toda equipe da ELEVE SCIENCE por poder proporcionar estrutura para grande parte da realização desse projeto, em especial, Giulia, Nayara e Fran. Desejo muito sucesso para essa empresa que promove um trabalho inovador e super importante para o setor farmacêutico brasileiro.

Agradeço aos meus amigos de faculdade pela companhia em todos os momentos que vivenciei aqui em Ribeirão Preto, vocês são minha família daqui.

Agradeço as agências de fomento CNPq pela bolsa concedida, a CAPES (código de financiamento 001) e FAPESP por proporcionarem o financiamento de pesquisas brasileiras tão necessárias para sociedade. Que cada vez mais essas instituições sejam reconhecidas. E por fim agradeço a Universidade de São Paulo, por garantir minha formação superior e agora em nível pós, a melhor universidade da América Latina, que preza pela ciência e é pública e gratuita. Que seja sempre assim e cada vez mais pessoas tenham oportunidades de vivenciar essa formação de qualidade.

## RESUMO

O imazamox (IMX) é um herbicida quiral da classe imidazolinona indicado para combater plantas daninhas. Em ambientes aquirais enantiômeros se comportam de maneira idêntica apresentando as mesmas propriedades físico-químicas, no entanto, quando colocados em um ambiente quiral (ambientes bióticos) podem apresentar diferentes comportamentos e interações. Nesse trabalho foram realizados estudos *in vitro* de permeabilidade e metabolismo da mistura racêmica e dos enantiômeros isolados do IMX empregando células CACO-2 e microsomas hepáticos de humanos, respectivamente. Além disso, foi avaliado a capacidade do IMX em inibir as principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos. Para tanto, dois métodos cromatográficos enantiosseletivos foram desenvolvidos e otimizados através do planejamento fatorial experimental. As condições empregadas para avaliação do IMX nos estudos com células CACO-2 foram empregando a coluna Chiralcel-OD-H® (150 x 4,6 mm; 5µm) e fase móvel contendo H<sub>2</sub>O:ACN (79:21 v/v) e vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Para quantificação dos estudos de permeabilidade foi realizado a validação do método que atendeu os parâmetros de seletividade, linearidade, efeito residual, limite inferior de quantificação, precisão e exatidão e estabilidade. Os valores obtidos de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) para o *rac*-IMX, (+)-IMX e (-)-IMX foram respectivamente,  $3,57 \times 10^{-5}$ ,  $5,54 \times 10^{-5}$  e  $7,26 \times 10^{-5}$  cm s<sup>-1</sup>, indicando que os três compostos avaliados podem ser classificados como de alta permeabilidade ( $P_{app} > 1 \times 10^{-5}$  cm s<sup>-1</sup>). Já nos estudos de metabolismo *in vitro* com microsomas hepáticos de humanos, o método analítico empregado para análise do IMX e seu metabólito Des-IMX utilizou a mesma coluna citada acima, entretanto a eluição dos analitos foi realizada por gradiente e a vazão empregada foi de 0,38 mL min<sup>-1</sup>. A partir dos resultados obtidos no estudo prévio de metabolismo *in vitro* foi constatado que as enzimas do CYP450 não são capazes de metabolizar a mistura racêmica do IMX e nem os enantiômeros isolados do IMX nas condições avaliadas nesse estudo. Já na avaliação do potencial inibitório do IMX frente as principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos o *rac*-IMX não diminuiu a atividade enzimática remanescente (AR%) das isoformas avaliadas, entretanto, avaliando os enantiômeros isolados, o (+)-IMX apresentou um potencial inibitório frente a isoforma CYP3A4/5 (AR% <50%). Os resultados desse trabalho mostraram que apesar da alta permeabilidade apresentada pela praguicida, provavelmente o IMX não é substrato para as enzimas do CYP450 e portanto, o metabolismo desse substrato por fase I é pouco provável.

Palavras-chave: Imazamox, praguicida quiral, análise enantiosseletiva, metabolismo *in vitro*, células CACO-2, microsomas hepáticos de humanos, inibição do CYP450

## ABSTRACT

Imazamox (IMX) is a chiral herbicide of the imidazolinone class indicated to combat weeds. In achiral environments enantiomers behave identically presenting the same physicochemical properties, however, when placed in a chiral environment (biotic environments) they can present different behaviors and interactions. In this work, in vitro permeability and metabolism studies of the racemic mixture and isolated enantiomers of IMX were carried out using CACO-2 cells and human liver microsomes, respectively. In addition, the ability of IMX to inhibit key CYP450 enzymes involved in drug metabolism was evaluated. For that, two enantioselective chromatographic methods were developed and optimized through experimental factorial design. The conditions used to evaluate the IMX in the studies with CACO-2 cells were using the Chiralcel-OD-H<sup>®</sup> column (150 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m) and mobile phase containing H<sub>2</sub>O:ACN (79: 21 v/v) and flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>. To quantify the permeability studies, the validation of the method that met the parameters of selectivity, linearity, residual effect, lower limit of quantification, precision and accuracy, and stability was carried out. The values obtained for apparent permeability ( $P_{app}$ ) for *rac*-IMX, (+)-IMX and (-)-IMX were, respectively,  $3.57 \times 10^{-5}$ ,  $5.54 \times 10^{-5}$  and  $7.26 \times 10^{-5}$  cm s<sup>-1</sup>, indicating that the three evaluated compounds can be classified as high permeability ( $P_{app} > 1 \times 10^{-5}$  cm s<sup>-1</sup>). In the in vitro metabolism studies with human liver microsomes, the analytical method used for the analysis of IMX and its metabolite Des-IMX used the same column mentioned above, however, the elution of the analytes was performed by gradient and the flow rate used was 0.38 mL min<sup>-1</sup>. From the results obtained in the previous study of in vitro metabolism, it was verified that the CYP450 enzymes are not able to metabolize the racemic mixture of IMX nor the isolated enantiomers of IMX under the conditions evaluated in this study. In the evaluation of the inhibitory potential of IMX against the main CYP450 enzymes involved in drug metabolism, *rac*-IMX did not decrease the remaining enzymatic activity (REA%) of the evaluated isoforms, however, evaluating the isolated enantiomers, (+)-IMX showed an inhibitory potential against the CYP3A4/5 isoform (REA% <50%). The results of this work showed that despite the high permeability presented by the pesticide, probably IMX is not a substrate for CYP450 enzymes and therefore, the metabolism of this substrate by phase I is unlikely.

Keywords: Imazamox, chiral pesticide, enantioselective analysis, in vitro metabolism, Caco-2 Cells, human liver microsomes, CYP450 inhibition

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do IMX e de seu possível metabólito Des-IMX .....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo do modelo de absorção com células CACO-2.....	7
<b>Figura 3.</b> Cromatograma relativo ao início da separação quiral do IMX e seu metabólito Des-IMX .....	28
<b>Figura 4.</b> Gráfico de Pareto para enantioresolução do IMX .....	30
<b>Figura 5.</b> Gráfico de Pareto para enantioresolução do Des-IMX.....	30
<b>Figura 6.</b> Gráficos de superfície de resposta para resolução do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX .....	34
<b>Figura 7.</b> Cromatograma relativo à separação quiral do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX .....	35
<b>Figura 8.</b> Cromatograma relativo a separação quiral do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX em adição do padrão interno (PI) paracetamol .....	36
<b>Figura 9.</b> Gráfico de superfície de resposta para resolução do IMX e do tempo do último enantiômero de IMX a eluir .....	37
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de separação quiral do praguicida IMX.....	38
<b>Figura 11.</b> Espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros do IMX.....	39
<b>Figura 12.</b> Gráfico de barras da área do grupo controle e amostra para o teste de solubilidade em solução tampão HHBS .....	40
<b>Figura 13.</b> Gráfico de barras da área dos grupos controle e amostra para o teste de solubilidade em STF pH 7,4.....	41
<b>Figura 14.</b> Cromatograma referente ao estudo da seletividade do método.....	41
<b>Figura 15.</b> Gráfico de resíduo para análise dos enantiômeros do IMX com ponderação de $1/x^2$ .....	42
<b>Figura 16.</b> Viabilidade celular das diferentes concentrações avaliadas para mistura racêmica do IMX .....	45
<b>Figura 17.</b> Viabilidade celular das diferentes concentrações avaliadas para os enantiômeros isolados do IMX.....	45
<b>Figura 18.</b> Viabilidade celular das diferentes concentrações avaliadas para cafeína .....	49
<b>Figura 19.</b> Cromatograma obtido após ELL em pH 2,4 .....	51
<b>Figura 20.</b> Cromatograma obtido após ELL em pH 7,4 .....	51
<b>Figura 21.</b> Cromatograma obtido após ELL em pH 12 .....	51
<b>Figura 22.</b> Gráfico de barras da área dos grupos controle e amostras em meio de incubação para o teste de estabilidade .....	54

<b>Figura 23.</b> Estudo piloto de metabolismo in vitro com HLM em diferentes concentrações de rac-IMX e proteínas microssomais .....	55
<b>Figura 24.</b> Estudo piloto de metabolismo in vitro com HLM empregando os enantiômeros isolados do IMX.....	56
<b>Figura 25.</b> Atividade enzimática remanescente das isoformas do CYP450 na presença de IMX ....	57
<b>Figura 26.</b> Gráfico de barras relacionando a AR% com as isoformas do CYP450 para o enantiômero (+) – IMX.....	58
<b>Figura 27.</b> Gráficos de barras relacionado a AR% com as isoformas do CYP450 para o enantiômero (-) - IMX.....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Algumas propriedades físico-químicas do IMX .....	3
<b>Tabela 2.</b> Resumo dos trabalhos encontrados na literatura sobre a interação do IMX e organismos não-alvo.....	5
<b>Tabela 3.</b> Solventes e aditivos avaliados na coluna Chiralpak AD-H® .....	13
<b>Tabela 4.</b> Solventes e aditivos avaliados na coluna Chiralcel OD-H® .....	13
<b>Tabela 5.</b> Solventes e aditivos avaliados na coluna Chiralcel OJ® .....	14
<b>Tabela 6.</b> Valores dos níveis para os fatores avaliados .....	14
<b>Tabela 7.</b> Matriz do delineamento experimental e respostas obtidas no planejamento fatorial fracionado.....	15
<b>Tabela 8.</b> Valores dos níveis para os fatores otimizados .....	16
<b>Tabela 9.</b> Matriz do delineamento experimental e respostas obtidas na otimização .....	16
<b>Tabela 10.</b> Valores dos níveis para os fatores avaliados .....	22
<b>Tabela 11.</b> Matriz do delineamento experimental e respostas obtidas no planejamento fatorial fracionado.....	22
<b>Tabela 12.</b> Valores dos níveis para os fatores otimizados .....	23
<b>Tabela 13.</b> Matriz do delineamento experimental e resposta obtida na otimização.....	23
<b>Tabela 14.</b> Relação de cada substrato, concentração e metabólito para cada isoforma específica ...	25
<b>Tabela 15.</b> Avaliação da separação quiral na coluna Chiralpak-AD-H® .....	26
<b>Tabela 16.</b> Avaliação da separação na coluna Chiralcel-OD-H® .....	27
<b>Tabela 17.</b> Avaliação da separação na coluna Chiralcel-OJ® .....	27
<b>Tabela 18.</b> Respostas obtidas no planejamento fatorial fracionado .....	29
<b>Tabela 19.</b> Efeitos dos fatores estimados para enantioresolução do IMX e do Des-IMX, respectivamente.....	30
<b>Tabela 20.</b> Respostas obtidas na otimização .....	31
<b>Tabela 21.</b> Coeficientes de regressão do DCCR para a resolução do IMX e do Des-IMX, respectivamente.....	32
<b>Tabela 22.</b> ANOVA para a resolução do IMX e Des-IMX, respectivamente.....	32
<b>Tabela 23.</b> Gradiente empregado para enantioseparação do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX.....	34
<b>Tabela 24.</b> Comparativo entre as enantioresoluções antes e depois da etapa de otimização .....	35
<b>Tabela 25.</b> Algumas propriedades físico-químicas do paracetamol.....	36
<b>Tabela 26.</b> Linearidade do método para análise de IMX em estudos de permeabilidade .....	42

<b>Tabela 27.</b> Precisão e exatidão intraensaio para análise do IMX em estudos de permeabilidade ....	43
<b>Tabela 28.</b> Precisão e exatidão interensaio para análise do IMX em estudos de permeabilidade ....	43
<b>Tabela 29.</b> Estabilidade do IMX nas condições do estudo da permeabilidade com células CACO-2 .....	44
<b>Tabela 30.</b> Quantificação do tempo 0 no compartimento apical do IMX.....	46
<b>Tabela 31.</b> Quantificação do compartimento basolateral em relação ao tempo do composto rac-IMX .....	47
<b>Tabela 32.</b> Quantificação do compartimento basolateral em relação ao tempo do composto (+)-IMX .....	47
<b>Tabela 33.</b> Quantificação do compartimento basolateral em relação ao tempo do composto (-)-IMX .....	47
<b>Tabela 34.</b> Permeabilidade aparente do rac-IMX, (+)-IMX e (-)-IMX.....	47
<b>Tabela 35.</b> Quantificação no tempo 0 no compartimento apical do composto cafeína.....	49
<b>Tabela 36.</b> Quantificação do compartimento basolateral em relação ao tempo do composto cafeína .....	50
<b>Tabela 37.</b> Efeitos dos fatores estimados para recuperação do Des-IMX.....	52
<b>Tabela 38.</b> Coeficientes de regressão do DCCR para a recuperação do Des-IMX.....	52
<b>Tabela 39.</b> ANOVA para a recuperação do Des-IMX.....	53

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Praguicidas</b> .....	1
<b>1.2. Praguicidas Quirais</b> .....	2
<b>1.3. Imazamox</b> .....	2
<b>1.4. Planejamento Experimental e Otimização</b> .....	6
<b>1.5. Permeabilidade por células CACO-2</b> .....	7
<b>1.6. Metabolismo in vitro utilizando microsomas hepáticos de humanos</b> .....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	10
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
<b>3.1. Preparo das soluções</b> .....	11
<b>3.2. Reagentes e solventes</b> .....	11
<b>3.3. Culturas de células CACO-2</b> .....	12
<b>3.4. Microsomas hepáticos</b> .....	12
<b>3.5. Desenvolvimento de um método enantiosseletivo para análise do IMX e Des-IMX por HPLC</b> .....	12
3.5.1. Identificação da fase móvel e estacionária .....	13
3.5.2. <i>Screening</i> .....	14
3.5.3. Otimização .....	15
<b>3.6. Método para o isolamento dos enantiômeros do IMX</b> .....	16
<b>3.7. Identificação da atividade óptica dos enantiômeros do IMX</b> .....	16
<b>3.8. Estudo de solubilidade do IMX em solução tampão HHBS</b> .....	17
<b>3.9. Estudo de solubilidade do IMX em meio microsomal</b> .....	17
<b>3.10. Validação do método analítico para análise do IMX em estudos de permeabilidade com células CACO-2</b> .....	18
3.10.1. Seletividade.....	18
3.10.2. Linearidade.....	19
3.10.3. Efeito residual .....	19

3.10.4.	Limite inferior de quantificação.....	19
3.10.5.	Precisão e Exatidão .....	19
3.10.6.	Estabilidade.....	20
<b>3.11.</b>	<b>Estudos de permeabilidade em células CACO-2 .....</b>	<b>20</b>
3.11.1.	Citotoxicidade .....	20
3.11.2.	Absorção intestinal.....	21
<b>3.12.1.</b>	<b>Preparo da amostra para o estudo de metabolismo.....</b>	<b>21</b>
<b>3.13.</b>	<b>Estabilidade do IMX em meio microsomal.....</b>	<b>23</b>
<b>3.14.</b>	<b>Estudo piloto de metabolismo in vitro .....</b>	<b>24</b>
<b>3.15.</b>	<b>Triagem do potencial inibitório do IMX sobre as principais enzimas do CYP450 ..</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.</b>	<b>Desenvolvimento de um método enantiosseletivo para análise do IMX e Des-IMX ...</b>	<b>26</b>
4.1.1.	Identificação da fase móvel e estacionária .....	26
4.1.2.	<i>Screening</i> .....	28
4.1.3.	Otimização .....	31
<b>4.2.</b>	<b>Isolamento e quantificação dos enantiômeros do IMX.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.</b>	<b>Identificação da atividade óptica dos enantiômeros do IMX.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.</b>	<b>Estudo de solubilidade do IMX em meio celular CACO-2.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5.</b>	<b>Estudo de solubilidade do IMX em meio microsomal.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6.</b>	<b>Validação do método analítico para quantificação do IMX nos estudos de permeabilidade.....</b>	<b>41</b>
4.6.1.	Seletividade.....	41
4.6.2.	Linearidade .....	42
4.6.3.	Efeito residual .....	42
4.6.4.	Limite inferior de quantificação .....	43
4.6.5.	Precisão e Exatidão.....	43
4.6.6.	Estabilidade.....	44
<b>4.7.</b>	<b>Estudos de permeabilidade em células CACO-2.....</b>	<b>44</b>

4.7.1. Citotoxicidade.....	44
4.7.2. Absorção intestinal in vitro.....	46
4.7.3. Validação do modelo in vitro utilizando marcadores de permeabilidade.....	48
<b>4.8. Estudos de metabolismo in vitro com microsomas hepáticos de humanos .....</b>	<b>50</b>
4.8.1. Preparo de amostra para estudos de metabolismo in vitro .....	50
4.8.2. Estabilidade do IMX em meio microsomal .....	53
4.8.3. Estudo piloto de metabolismo in vitro.....	54
<b>4.9. Triagem do potencial inibitório do IMX sobre as principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos .....</b>	<b>57</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>59</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Praguicidas

A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que a população mundial deve crescer em 2 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos, passando dos atuais 7,7 bilhões para 9,7 bilhões de pessoas (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2019). Paralelamente ao crescimento populacional, a expectativa de vida também aumenta. O número de idosos com 65 anos ou mais dobrará e presume-se que o número de pessoas com 80 anos ou mais triplique até 2050 (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2019). Para atender essa demanda é necessário a produção de mais alimentos, um desafio, que implica em novos conhecimentos, recursos e tecnologias.

As perdas em culturas agrícolas em decorrência de pragas, ervas daninhas e doenças no plantio é um problema enfrentado por agricultores em todo mundo, por isso, para conter e minimizar esse prejuízo, o uso de praguicidas em plantações agrícolas é um recurso que vem sendo amplamente empregado (TUDI et al., 2021) e sua aplicação cresce cada vez mais. Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), de 1990 até 2018 o consumo de praguicidas aumentou de 1,55 para 2,63 kg ha<sup>-1</sup> de área cultivada (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2021). A FAO define praguicidas como qualquer substância ou mistura de substâncias de ingredientes químicos ou biológicos destinados a repelir, destruir ou controlar quaisquer pragas ou regular o crescimento das plantas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2014). Sem o seu uso, estima-se que as perdas de frutas, vegetais e cereais causadas por pragas e doenças seria de 78%, 54% e 32%, respectivamente (TUDI et al., 2021).

No entanto, seu uso intensivo oferece riscos ao meio ambiente e a organismos não-alvo, como a população humana (MD MEFTAUL et al., 2020). Tem sido relatado diversos casos de intoxicação de agricultores, trabalhadores rurais e de suas famílias durante os ciclos de aplicações dos praguicidas (CARVALHO, 2017). A dispersão de resíduos de praguicidas no ecossistema também causa contaminação, intoxicação e morte em massa da fauna, da flora e de outros seres vivos, como abelhas, pássaros, anfíbios, peixes e pequenos mamíferos (KÖHLER; TRIEBSKORN, 2013).

Além da exposição direta, existe também a exposição indireta. Estudos mostram que os praguicidas aplicados nas plantações se estendem aos alimentos e atingem diversos organismos através da cadeia alimentar (TUDI et al., 2021). O contato direto ou indireto dos seres humanos com praguicidas pode estar relacionado com diversas doenças, como câncer, desregulação endócrina e problemas neurológicos (MICHAEL C. R. ALAVANJA; MATTHEW R. BONNER, 2017; RICHARDSON et al., 2019; SHARMA et al., 2020). A contaminação indireta de praguicidas alcança

também diversos locais do meio ambiente podendo poluir recursos naturais vitais aos seres vivos como por exemplo a água e solos (CHEN et al., 2018; PASCUAL AGUILAR et al., 2017). Dessa forma, é fundamental a obtenção de novos conhecimentos e estudos científicos sobre a segurança dos praguicidas, avaliando, portanto, seu risco para sociedade e meio ambiente.

## 1.2. Praguicidas Quirais

Praguicidas quirais são moléculas que possuem os mesmos átomos e ligações, entretanto, devido ao centro de assimetria se apresentam como duas espécies enantioméricas diferentes que são imagens especulares não sobreponíveis (GARRISON, A., 2011). Em ambientes aquirais os enantiômeros se comportam de maneira idêntica apresentando as mesmas propriedades físico-químicas, no entanto, quando presentes em um ambiente quiral (enzimas, solventes, reagentes ou catalisadores) podem apresentar diferentes comportamentos, (SIMEONOV; MACAEV; SIMEONOVA, 2013).

Aproximadamente 30% dos praguicidas comercializados atualmente são quirais e, devido ao alto custo no processo de produção e purificação, somente 7% são vendidos em sua forma enantiomérica pura (CARRÃO et al., 2020).

As enzimas com suas estruturas proteicas e ambientes bióticos como, por exemplo, plantas e organismos animais, oferecem um excelente meio quiral que podem proporcionar diferentes interações com moléculas quirais (SIMEONOV; MACAEV; SIMEONOVA, 2013). Estudos revelaram que praguicidas quirais possuem bioatividade enantiosseletiva em organismos animais, como toxicidade (LIU et al., 2021) e metabolismo (FONSECA et al., 2019). Além disso, o enantiômero ativo pode apresentar os efeitos necessários em um organismo-alvo, mas o enantiômero inativo pode ser prejudicial a organismos não-alvo (YE et al., 2015).

Embora tenham sido desenvolvidos praguicidas que alcançam maior seletividade em relação as espécies alvo e causem menores impactos para o meio ambiente e saúde humana, as informações e conhecimentos sobre efeitos toxicológicos e toxicocinéticos dos praguicidas quirais em modelos humanos ainda são limitados (DE ALBUQUERQUE et al., 2018). Neste cenário, compreender os efeitos tóxicos ambientais em organismos não-alvo se faz necessário e para isso o desenvolvimento de métodos enantiosseletivos e estudos relativos ao metabolismo de praguicidas quirais em espécies não-alvo (humanos), possui um importante papel para avaliação toxicológica e do seu risco.

## 1.3. Imazamox

O imazamox (IMX) é um herbicida quiral da classe imidazolinona (*ácido (RS)-2-(4-isopropil-4-metil-5oxo-2-imidazolin-2-il-5-metoximetilnicotínico)*), indicado para combater, de maneira pré- ou

pós emergencial, plantas daninhas, atuando como inibidor da enzima acetolactato sintase (ALS) envolvida na síntese dos aminoácidos essenciais de cadeia ramificada isoleucina, leucina e valina (GIL-MONREAL; ROYUELA; ZABALZA, 2020). Sua aplicação é amplamente empregada em culturas de cereais e de oleaginosas. Sua comercialização é permitida em diversos países como da União Europeia (EU, 2018), Estados Unidos (EPA, 2020) e Brasil (ANVISA, 2018).

O IMX é um herbicida com alta solubilidade em água se tornando fracamente retido pelas partículas do solo e, portanto, é considerado um herbicida móvel com alto risco de poluição das águas superficiais e subterrâneas (CABRERA; CELIS; HERMOSÍN, 2016; SAKALIENE et al., 2007). Dessa maneira, o risco de exposição ao praguicida por espécies não-alvo pode ser maior. Apesar dos efeitos adversos que o IMX causa as plantas daninhas, as agências regulatórias o consideram seguro quando expostos a espécies não-alvo (mamíferos) (SEVIM et al., 2019).

Algumas propriedades físico-químicas do IMX são apresentadas na Tabela 1. O coeficiente de partição indica que o IMX se apresenta como uma molécula altamente polar, além disso, nota-se que o IMX possui 2 constantes de ionização. O conhecimento dessas propriedades foi importante para definir estratégias experimentais desse projeto, como desenvolvimento do método analítico e preparo de amostra.

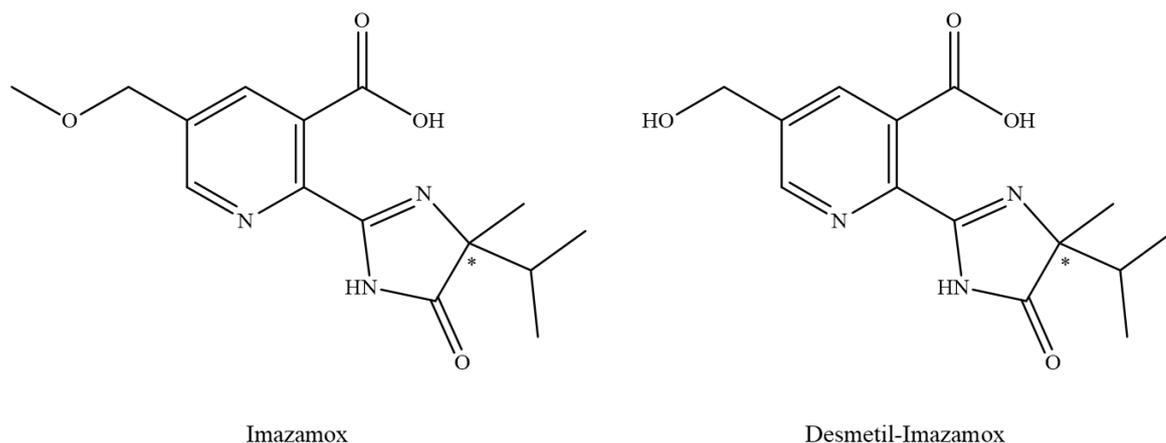
**Tabela 1.** Algumas propriedades físico-químicas do IMX

<b>Propriedades Físico-Químicas</b>	
<b>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</b>	305,33
<b>Coefficiente de partição octanol-água (Log K<sub>ow</sub>)</b>	0,73
<b>Valores de pKa</b>	2,3 e 3,3
<b>Solubilidade em água (mg L<sup>-1</sup>)</b>	4,16

Fonte: Pubchem (Imazamox | C15H19N3O4 - PubChem (nih.gov))

Através da Figura 1 podemos observar a estrutura química do IMX e seu possível metabólito, desmetil-imazamox (Des-IMX). Note que ambos possuem um centro assimétrico (indicado com asterisco).

**Figura 1.** Estrutura química do IMX e de seu possível metabólito Des-IMX



\*centro assimétrico (Fonte: autoria própria)

Comercializado na forma de mistura racêmica, estudos e dados sobre a exposição e toxicidade do IMX em organismos não-alvo são raros. Na Tabela 2 **Tabela 2** é descrito um resumo sobre os trabalhos encontrados na literatura que avaliam a toxicidade e o efeito da exposição do IMX em organismos não-alvo. Sobre o comportamento enantiosseletivo do IMX no meio ambiente, um estudo indicou diferenças enantiosseletivas na degradação do IMX na maioria dos 18 solos investigados (BUERGE et al., 2019). Os estudos mostraram que em solos com valores de pH levemente ácidos, as diferenças de degradação entre os enantiômeros do IMX não foram pronunciadas; por outro lado, em solos com valores de pH fortemente ácidos ocorreu degradação enantiosseletiva do (-)-IMX. Esse mesmo estudo mostrou também que em solos neutros a degradação enantiosseletiva foi ainda mais rápida para o (+)-IMX (BUERGE et al., 2019). Em outro trabalho, reportado por Wei et al., o IMX apresentou fitotoxicidade enantiosseletiva em mudas de milho (organismo não-alvo) quando expostas ao racemato e enantiômeros isolados em experimentos hidropônicos, sendo que o *R*-IMX se mostrou mais tóxico (WEI et al., 2016).

**Tabela 2.** Resumo dos trabalhos encontrados na literatura sobre a interação do IMX e organismos não-alvo

<b>Organismo não-alvo / modelo</b>	<b>Efeitos</b>	<b>Referência</b>
<b>Rato</b>	Avaliação da toxicidade aguda hepática e no tecido pancreático em ratos após administração de um herbicida à base de IMX em doses equivalentes de IMX de 12, 24 e 36 mg kg <sup>-1</sup> corporal. O trabalho mostrou que o herbicida induziu efeitos tóxicos mesmo com a menor dose testada, e as duas mais altas causaram citotoxicidade estatisticamente significativas nas células das ilhotas de Langerhans e alterações necróticas e degenerativas foram detectadas nos hepatócitos; além disso, a formulação de herbicida à base de IMX induziu uma elevação sérica de glicose e cálcio, mostrando que as formulações comerciais de IMX podem ter efeitos tóxicos hepáticos e pancreáticos	(SEVIM et al., 2019)
<b>Rato</b>	Investigação do efeito a longo prazo da exposição de ratos a doses muito baixas de uma mistura de seis praguicidas que estão associados à deficiência de vitaminas hidrofílicas, entre eles o IMX. A investigação concluiu que a deficiência de vitaminas e a exposição crônica da mistura dos praguicidas, mesmo que em doses muito baixas, causou efeitos no sistema nervoso central, como diminuição da atividade locomotora, aumento dos níveis de ansiedade e efeitos na memória a longo prazo.	(TSATSAKIS et al., 2019)
<b>Peixe</b>	Pesquisadores investigaram a toxicidade subletal de quatro herbicidas, entre eles, o IMX, em uma espécie de peixe ameaçada de extinção “Delta Smelt” ( <i>Hypomesus transpacificus</i> ). Esses herbicidas são aplicados para controlar ervas daninhas aquáticas invasivas no Estuário de São Francisco. Nesse estudo, os pesquisadores mediram a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro de peixes de ambos os sexos após 6 horas de exposição de cada um dos quatro herbicidas e concluíram que o IMX causou inibição da atividade da AChE cerebral. O estado comportamental de peixes é relacionado com os níveis de neurotransmissores cerebrais e por isso, é provável que disfunções neurológicas induzidas por poluentes, como IMX, a longo prazo possa resultar em mudanças comportamentais nos peixes, como no modo de nadar e na alimentação (JIN et al., 2018).	(JIN et al., 2018)
<b>Linhagem celular CHOK1</b>	Nesse estudo, a desregulação endócrina enantiosseletiva de herbicidas quirais foi avaliada através da observação dos efeitos agonista/antagonistas do IMX no receptor de glicocorticoide e receptor de mineralocorticoide com a linhagem celular CHOK1 e sua influência na produção de corticosteroides. Os resultados dessa investigação mostraram que o <i>S</i> -IMX possuiu maior atividade anti-glicocorticoide, sugerindo, portanto, que o <i>S</i> -IMX possui efeito de desregulação endócrina mais forte quando comparado com seu enantiômero <i>R</i> -IMX	(SHEN et al., 2020)

Como já citado, existem poucos trabalhos que avaliam o risco do uso e exposição de espécies não-alvo ao herbicida IMX e informações enantiosseletivas ainda são mais raras. Dessa maneira, o presente trabalho fornecerá novas informações quanto a exposição por humanos ao herbicida IMX de maneira enantiosseletiva.

#### 1.4. Planejamento Experimental e Otimização

Para realização de estudos enantiosseletivos de praguicidas quirais é necessário o desenvolvimento de um método analítico adequado para quantificação dos enantiômeros. Diversas técnicas analíticas são utilizadas para separação de enantiômeros e, dentre elas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) destaca-se devido as suas vantagens como muitos instrumentos disponíveis, diversidades de colunas quirais e seletores quirais, compatibilidade com vários detectores e disponibilidade de diferentes modos de eluição que contribui para o reconhecimento quiral (CARRÃO et al., 2020).

Durante o desenvolvimento do método enantiosseletivo por HPLC, vários parâmetros, como, vazão, pH e composição da fase móvel, tipo e natureza da fase estacionária e temperatura de análise devem ser avaliados para avaliar suas influências nas respostas desejadas, como a enantioresolução e tempo de análise (SAHU et al., 2018). Dessa maneira, vários experimentos, que demandam tempo e recursos, são necessários para o desenvolvimento de um método analítico enantiosseletivo.

Não obstante, a etapa de separação quiral dos analitos, na etapa de preparo de amostra vários fatores normalmente são avaliados. Devido à natureza da matriz em que se encontra o praguicida, muitas vezes é necessário o desenvolvimento de uma técnica de preparo de amostra para remoção dos interferentes e concentração do analito a ser analisado.

Quando se trata de métodos de preparo de amostras, a extração líquido-líquido (ELL) é muito utilizada por ser um método simples e com adequada eficiência de extração (NASIRI; AHMADZADEH; AMIRI, 2020; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). A ELL baseia-se na partição do analito entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) e a eficiência do processo de extração depende de vários fatores, como a polaridade e volume do solvente extrator, do tempo de extração e até mesmo da adição de sais neutros, que podem diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa, favorecendo a extração dos analitos de interesse (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Mais uma vez, numerosos experimentos são necessários para o desenvolvimento do método de extração a fim de se obter a maior recuperação possível dos analitos a serem quantificados assim como cromatogramas livres de interferentes.

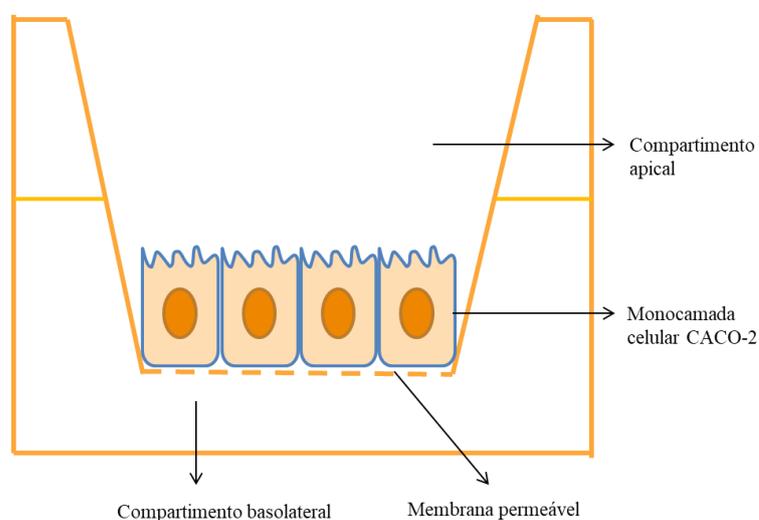
Com o intuito de reduzir o número de experimentos, de consumo de reagentes e de esforços, abordagens de planejamento experimental multivariado tem se tornado populares na otimização de técnicas analíticas de separação e de métodos de preparo de amostra (MOUSAVI; TAMIRI; KHOSHAYAND, 2018; SAHU et al., 2018; VERA CANDIOTI et al., 2014). Ao passo que na abordagem experimental univariada, um fator por vez é variado enquanto os outros fatores são mantidos constantes, poucas informações podem ser obtidas, além de muitas vezes, resultar na realização de muitos experimentos para obtenção de uma condição que pode estar significativamente

longe da condição ótima (HIBBERT, 2012). Dessa maneira, a abordagem multivariada objetiva extrair o máximo de informações sobre o comportamento do processo a ser desenvolvido por um número mínimo de experimentos, além da possibilidade de determinar as interações entre as variáveis, o que pode levar a uma real condição ótima (PEROVANI; SERPELLONE; DE OLIVEIRA, 2021).

### 1.5. Permeabilidade por células CACO-2

A avaliação da absorção intestinal de xenobióticos é essencial para a determinação da sua biodisponibilidade e a exposição sistêmica do organismo (MOREIRA, 2016) Existem muitos métodos *in vitro* disponíveis para estudos de permeabilidade que avalia a absorção intestinal, entre eles, podemos citar os baseados em sistemas lipídicos artificiais, tecidos de animal e culturas celulares, como a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (CACO-2), que emprega monocamadas dispostas em suportes com filtros semipermeáveis (MOREIRA, 2016). A Figura 2 esquematiza e ilustra como essas células são dispostas nas placas permeáveis.

**Figura 2.** Esquema ilustrativo do modelo de absorção com células CACO-2



(Fonte: autoria própria)

A cultura de células CACO-2 é um modelo *in vitro* bem estabelecido e eficaz que pode prever a absorção intestinal de compostos químicos além de ser capaz de determinar o mecanismo de transporte (ARAUJO et al., 2020). Essas células são cultivadas em placas por um período de 21 a 25 dias; se diferenciam e crescem em rede, formando uma monocamada de células epiteliais semelhantes aos enterócitos encontrados no intestino delgado (ARAUJO et al., 2020; TADINI et al., 2022).

Esse modelo de estudo possui propriedades de barreira comparáveis ao intestino humano in vivo e é muito conhecido e utilizado no meio científico para prever a taxa e extensão da absorção de xenobióticos em humanos, além de desempenharem um papel muito importante durante a fase de desenvolvimento de um novo fármaco (TADINI et al., 2022).

A reconstituição in vitro adequada de uma monocamada de células epiteliais humanas diferenciadas permite, portanto, a previsão da absorção oral de xenobióticos em humanos, pois no intestino somente uma única camada de células epiteliais cobre a parede intestinal e assim forma a barreira limitante para a absorção dos compostos dissolvidos no meio (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

A passagem dos xenobióticos pela monocamada de células CACO-2 é determinada pelo cálculo da permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ), parâmetro que define o transporte transcelular do xenobiótico pela membrana (ARAUJO et al., 2020). Valores de  $P_{app}$  abaixo de  $1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$  indicam que o composto não será bem absorvido (0–20%). Valores de  $P_{app}$  entre  $1 \times 10^{-6}$  e de  $1 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$  indicam que o composto será moderadamente absorvido (20–70%) e bem absorvido (70–100%) se o valor de  $P_{app}$  for acima de  $1 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$  (SHIYIN YEE, 1997).

### **1.6. Metabolismo in vitro utilizando microsomas hepáticos de humanos**

O metabolismo de xenobióticos é essencial para sua eliminação do organismo. A biotransformação de moléculas gera metabólitos mais polares que são posteriormente excretados. As reações de biotransformação ocorrem predominantemente no fígado e são classificadas em duas fases. No metabolismo de fase I ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise e no metabolismo de fase II reações de conjugação (CRETOL; PETROVIC; MURRAY, 2010). Os processos metabólicos possuem natureza enzimática e a família de enzimas do citocromo P450 (CYP450) é a principal catalisadora das reações de fase I e atuam no metabolismo da maioria dos compostos endógenos e exógenos, incluindo os praguicidas (BRUNTON, 2014).

Modelos in vitro vêm sendo utilizados para avaliação e estudo do metabolismo de praguicidas. Essas técnicas apresentam diversas vantagens como a simplicidade de execução dos experimentos, baixa quantidade de substrato necessária para os estudos, custo relativamente baixo e, principalmente, a menor ou ausência utilização de animais. Dentre os diversos modelos para estudo de metabolismo in vitro utilizados, podemos citar: fígado isolado perfundido, fatias de fígado, hepatócitos, frações S9 hepáticas, frações citosólicas hepáticas, microsomas hepáticos e isoformas recombinantes (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

Os microsomas hepáticos de humanos (HLM) é o principal modelo empregado nos estudos de metabolismo *in vitro*, pois possuem diversas vantagens, como a facilidade de uso e estocagem, estabilidade quando mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$  e é um modelo bem caracterizado para estudo de metabolismo *in vitro* pois são ricos em enzimas do CYP450 (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

Os estudos de metabolismo *in vitro* possuem grande relevância pois podem fornecer parâmetros cinéticos importantes como a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e a velocidade máxima da reação ( $V_{\max}$ ) além de permitir a investigação e determinação dos metabólitos que são formados. Nesse contexto, o estudo de metabolismo *in vitro* enantiosseletivo também permite avaliar se existe diferença no perfil metabólico entre os enantiômeros. No estudo desenvolvido por Fonseca et al (2019) foram determinados os parâmetros enzimáticos *in vitro* do praguicida quiral miclobutanil (MCL), um fungicida da classe dos triazóis, após metabolismo por microsomas hepático de humanos. Os resultados demonstraram que as enzimas do CYP450 de humanos presentes no HLM metabolizaram somente o enantiômero *S*-(+)-MCL, o que realça a importância dos estudos de metabolismo enantiosseletivos (FONSECA et al., 2019).

## **2. OBJETIVOS**

Este projeto teve como objetivo a realização de um estudo in vitro de permeabilidade e metabolismo da mistura racêmica e dos enantiômeros isolados do herbicida IMX empregando células CACO-2 e microsomas hepáticos de humanos, respectivamente. Além disso, a capacidade do IMX em inibir as principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos também foi avaliado.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Preparo das soluções

O padrão imazamox ( $\geq 98,0\%$ ) foi obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e a solução padrão foi preparada em acetonitrila na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O propranolol ( $\geq 98,0\%$ ), citalopram ( $\geq 98,0\%$ ), paracetamol ( $\geq 98,0\%$ ) e ciprofloxacina ( $\geq 98,0\%$ ), avaliados como padrão interno, também foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e foram preparados em metanol nas respectivas concentrações  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $780 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $480 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os substratos e os padrões internos utilizados nos ensaios de triagem do potencial inibitório do IMX sobre as principais enzimas do CYP450 foram: fenacetina ( $\geq 98,0\%$ ), diclofenaco ( $\geq 98,0\%$ ), clorzoxazona ( $\geq 98,0\%$ ), nifedipina ( $\geq 98,0\%$ ) e diazepam ( $\geq 99,0\%$ ) adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA); *S*-mefenitoína ( $\geq 98,0\%$ ) e bufuralol ( $\geq 98,0\%$ ) obtidos da empresa Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá); midazolam ( $\geq 98,0\%$ ) adquirido da empresa Cayman Chemicals (Ann Arbor, EUA). As soluções dos substratos foram preparadas nas seguintes concentrações e solventes: fenacetina ( $962 \mu\text{mol L}^{-1}$ , acetonitrila), diclofenaco ( $3956 \mu\text{mol L}^{-1}$ , metanol), *S*-mefenitoína ( $8000 \mu\text{mol L}^{-1}$ , acetonitrila), bufuralol ( $432 \mu\text{mol L}^{-1}$ , acetonitrila), clorzoxazona ( $11672 \mu\text{mol L}^{-1}$ , acetonitrila), nifedipina ( $560 \mu\text{mol L}^{-1}$ , acetonitrila), midazolam ( $433 \mu\text{mol L}^{-1}$ , acetonitrila). A solução de diazepam, utilizada como padrão interno, foi preparada na concentração de  $175,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  em acetonitrila. Todas as soluções padrão foram estocadas em tubo âmbar a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 3.2. Reagentes e solventes

Água ultrapura foi obtida no Sistema Direct-Q 3 MilliQ da Millipore (Massachusetts, EUA). As soluções tampão que compõem o meio microsomal foram preparadas utilizando fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico diidratado adquiridos da Synth (Diadema, São Paulo); tris(hidroximetil)aminometano da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA) e cloreto de potássio granular da Mallinckrodt Chemicals (Xalostoc, México), todos grau analítico.

A solução tampão que compõe as células CACO-2 foram preparadas utilizando cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e fosfato de sódio dibásico adquiridos da Synth (Diadema, São Paulo), sulfato de magnésio da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, EUA); cloreto de potássio granular da Mallinckrodt Chemicals (Xalostoc, México); fosfato de potássio dibásico da Qhemis (Indaiatuba, São

Paulo), bicarbonato de sódio; cloreto de sódio da J.T. Baker (Xalostoc, México); D-glucose da Sigma-Aldrich (São Paulo) e HEPES da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA).

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas e no preparo das amostras foram acetonitrila (ACN), etanol (EtOH), metanol (MeOH) e acetato de etila, todos grau HPLC obtidos da Panreac (Barcelona, Espanha).

### 3.3. Culturas de células CACO-2

A linhagem CACO-2, derivada de adenocarcinoma de cólon humano foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), L-glutamina (292 mg L<sup>-1</sup>), piruvato de sódio (110,04 mg L<sup>-1</sup>), glicose (1 g L<sup>-1</sup>), penicilina (100 U mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (0,1 mg mL<sup>-1</sup>). O cultivo das células CACO-2 foi realizado em garrafas de cultura de tecido de 125 cm<sup>2</sup> e cultivadas em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C e umidade saturada. Ao atingirem 70-90% de confluência, foram realizados novos tratamentos das células como uso de 0,25% de tripsina e 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA para transferência para placas tipo Transwell®.

### 3.4. Microssomas hepáticos

Um pool de microssomas hepáticos de humanos de 150 doadores distintos, de ambos os sexos, na concentração proteica de 20 mg mL<sup>-1</sup>, foi obtido da empresa Corning Life Science (Arizona, EUA) e armazenado a -80°C.

### 3.5. Desenvolvimento de um método enantiosseletivo para análise do IMX e Des-IMX por HPLC

O desenvolvimento do método enantiosseletivo para análise do IMX e seu metabólito Des-IMX foi dividido em três etapas: i) identificação da fase móvel e estacionária, ii) *screening* e iii) otimização. O método foi desenvolvido em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Shimadzu (Quioto, Japão), composto por duas bombas LC-6AD, controladora SCL-10AVP e detector UV/VIS SPD-10AV operando em 254 nm. O software empregado para aquisição e processamento de dados foi LC Solution Versão 1.25 SP5 adquirido também da Shimadzu.

## 3.5.1. Identificação da fase móvel e estacionária

Inicialmente, três colunas quirais foram avaliadas: Chiralpak AD-H<sup>®</sup> (fase estacionária a base de amilose tris-3,5-dimetilfenilcarbamato) (150 x 4,6 mm; 5 µm), Chiralcel OD-H<sup>®</sup> (fase estacionária a base de celulose tris-3,5-dimetilfenilcarbamato) (150 x 4,6 mm; 5 µm) e Chiralcel OJ<sup>®</sup> (fase estacionária a base de celulose tris 4-metilbenzoato) (250 x 4,6 mm; 10 µm). Todas as colunas foram obtidas da Daicel Chemical Industries (Tóquio, Japão). A separação foi avaliada no modo polar orgânico e reverso, avaliando três solventes orgânicos, MeOH, EtOH e ACN com a adição ou não de aditivo, conforme descrito nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Solventes e aditivos avaliados na coluna Chiralpak AD-H<sup>®</sup>

Modo	Proporção	Aditivo
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% MeOH	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% EtOH	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	0,1% Ácido Fórmico
<b>Reverso</b>	80% ACN:20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido fórmico
Reverso	80% MeOH: 20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico
Reverso	80% EtOH :20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico
Reverso	70% H <sub>2</sub> O :30% ACN	0,1% Ácido Fórmico
Reverso	70% H <sub>2</sub> O:30% MeOH	0,1% Ácido Fórmico

Tabela 4. Solventes e aditivos avaliados na coluna Chiralcel OD-H<sup>®</sup>

Modo	Proporção	Aditivo
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% MeOH	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% EtOH	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	0,1% Ácido Fórmico
Reverso	80% ACN:20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido fórmico
Reverso	80% MeOH:20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico
Reverso	80% EtOH:20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico
Reverso	70% H <sub>2</sub> O:30% ACN	0,1% Ácido Fórmico
Reverso	70% H <sub>2</sub> O:30% MeOH	0,1% Ácido Fórmico

**Tabela 5.** Solventes e aditivos avaliados na coluna Chiralcel OJ®

<b>Modo</b>	<b>Proporção</b>	<b>Aditivo</b>
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% MeOH	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% EtOH	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	0,1% Ácido Fórmico
<b>Reversa</b>	80% ACN: 20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido fórmico
<b>Reversa</b>	80% MeOH: 20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico
<b>Reversa</b>	80% EtOH: 20% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico
<b>Reversa</b>	70% H <sub>2</sub> O: 30% ACN	0,1% Ácido Fórmico
<b>Reversa</b>	70% H <sub>2</sub> O: 30% MeOH	0,1% Ácido Fórmico

### 3.5.2. Screening

Nessa etapa utilizou-se um planejamento fatorial fracionado em que o número de experimentos é dado através da Equação 1, onde N é o número de experimentos, L o número de níveis, k o número de fatores e p descreve a magnitude da fração.

$$N = L^{(k-p)} \quad \text{Equação 1}$$

Para tanto, foi avaliado em dois níveis cinco fatores: proporção da fase móvel, porcentagem de ácido fórmico, vazão, temperatura e volume de injeção, totalizando-se, portanto, em  $2^{5-1} = 16$  ensaios mais 5 ensaios no ponto central. Os níveis de cada fator e os experimentos foram conduzidos conforme descritos nas Tabelas 6 e 7. Os dados estatísticos foram tratados no software Minitab 18 Statistical Software (State College, EUA).

**Tabela 6.** Valores dos níveis para os fatores avaliados

<b>Nível</b>	<b>Proporção (H<sub>2</sub>O:ACN, v/v)</b>	<b>Ácido fórmico (%)</b>	<b>Vazão (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Volume de injeção (µL)</b>
<b>-1</b>	70:30	0,1	0,4	25	5
<b>0</b>	75:25	0,5	0,6	30	10
<b>1</b>	80:20	1	1	35	20

**Tabela 7.** Matriz do delineamento experimental e respostas obtidas no planejamento fatorial fracionado

Ensaio	Proporção (H <sub>2</sub> O:ACN)	Ácido fórmico (%)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Volume de injeção (µL)
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0

### 3.5.3. Otimização

Para a otimização do método foi empregado o delineamento composto central rotacional (DCCR). Os experimentos são distribuídos da seguinte forma: (i) pontos fatoriais, (ii) pontos axiais (+ $\alpha$  e - $\alpha$ ), e (iii) pontos centrais que estimam o erro experimental. O número de execuções necessárias é apresentado na Equação 2, onde  $L$  é o número de níveis,  $k$  corresponde ao número de fatores e  $C_0$  representa o número de pontos centrais.

$$N = L^k + L \times k + C_0 \quad \text{Equação 2}$$

Dessa maneira, foi avaliado em dois níveis e nos pontos axiais a proporção e a vazão da fase móvel totalizando-se  $2^2 + 2 \times 2 = 8$  ensaios mais 3 ensaios no ponto central. Os níveis de cada fator otimizado e os experimentos foram conduzidos conforme descrito nas Tabelas 8 e 9. Na execução dos experimentos, os fatores avaliados na etapa anterior, o *screening*, foram fixados nos seguintes valores: porcentagem de ácido fórmico 1%, temperatura do forno 30°C e volume de injeção 10 µL.

Os dados estatísticos foram tratados no software Minitab 18 Statistical Software (State College, EUA).

**Tabela 8.** Valores dos níveis para os fatores otimizados

Nível	Proporção (H <sub>2</sub> O:ACN, v/v)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )
-1,41	72:28	0,38
-1	74:26	0,50
0	79:21	0,80
1	83:17	1,10
1,41	85:15	1,22

**Tabela 9.** Matriz do delineamento experimental e respostas obtidas na otimização

Ensaio	Proporção (H <sub>2</sub> O:ACN, v/v)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

### 3.6. Método para o isolamento dos enantiômeros do IMX

A coleta para o isolamento dos enantiômeros do IMX foi realizada utilizando a coluna Chiralcel OD-H<sup>®</sup> e fase móvel composta por H<sub>2</sub>O:ACN (85:15, v/v) + 1% ácido fórmico. A vazão foi de 0,4 mL min<sup>-1</sup> e a coluna foi mantida a temperatura ambiente (23 ± 2°C). Após a injeção da mistura racêmica no sistema cromatográfico, o pico correspondente a cada enantiômero foi coletado, a fase móvel evaporada em concentrador de amostras a vácuo, e em seguida, o resíduo foi solubilizado em ACN e a solução armazenada a -20°C.

### 3.7. Identificação da atividade óptica dos enantiômeros do IMX

A atividade ótica dos enantiômeros foi realizada por dicroísmo circular da marca Jasco (J-810, Easton, EUA). Cada enantiômero isolado foi solubilizado na fase móvel e em seguida as leituras foram realizadas no intervalo de 210 a 300 nm, em um total de quatro acumulações, após correção

com o branco. As análises foram realizadas a 25°C, utilizando-se uma cubeta de 1 mm de comprimento.

### 3.8. Estudo de solubilidade do IMX em solução tampão HHBS

A avaliação da solubilidade do IMX em solução tampão HHBS foi realizada pois as células CACO-2 tem como matriz essa solução tampão. Dessa forma, para esse estudo foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida da Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, forno CTO-20A, detector SPD-M20A e controladora CBM-20A. Para a análise foi empregada uma coluna Ascentis Express Fused Core® C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm) (Supelco, PA, EUA) e uma coluna de guarda Ascentis Express® C18 (5 x 4,6 mm, 2,7 µm, também da Supelco). A fase móvel empregada foi ACN:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) +1% de ácido fórmico e vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

Nessa etapa, foi avaliada a solubilidade do IMX na concentração de 150 µg mL<sup>-1</sup> em solução HHBS, em triplicata. Para tanto, no grupo controle foi adicionado 74 µL de uma solução de IMX de concentração de 1020 µg mL<sup>-1</sup> em tubo do tipo Eppendorf®; posteriormente, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e em seguida foi adicionado 500 µL de ACN. Após homogeneização essa solução foi centrifugada a 1600 x g por 10 min a 4°C e em seguida injetada do sistema cromatográfico.

O ensaio de solubilidade foi avaliado adicionando em um outro tubo do tipo Eppendorf® 74 µL da solução de IMX na concentração de 1020 µg mL<sup>-1</sup>; posteriormente o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e, em seguida foi adicionado 500 µL de solução tampão HHBS. Após homogeneização essa solução foi centrifugada a 1600 x g por 10 min a 4°C e em seguida injetada do sistema cromatográfico.

Posteriormente os valores de área do grupo controle (100% solúvel) e do ensaio foram comparados utilizando o programa GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, EUA) através do teste t bicaudal (considerando estatisticamente significativo p<0,05).

### 3.9. Estudo de solubilidade do IMX em meio microsomal

A solubilidade do IMX em meio microsomal foi determinada por meio de uma análise aquiral utilizando um equipamento de cromatografia líquida da Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, forno CTO-20A, detector SPD-M20A e controladora CBM-20A. Para isso foi empregada uma coluna Ascentis Express Fused Core® C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm) (Supelco, PA, EUA) e uma coluna de guarda Ascentis Express® C18 (5 x 4,6 mm, 2,7 µm, Supelco). A fase móvel empregada foi ACN:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) e vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. Nessa etapa, foi avaliada a solubilidade do IMX nas concentrações de 100 µmol L<sup>-1</sup> e 200 µmol L<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato (STF) (pH 7,4, 0,1 mol L<sup>-1</sup>) em quintuplicata. Para tanto, para cada respectiva concentração um grupo controle foi realizado,

em que se adicionou 5  $\mu\text{L}$  da solução de IMX e 195  $\mu\text{L}$  de ACN (100 % de solubilidade) em um tubo do tipo Eppendorf<sup>®</sup>. Após homogeneização, coletou-se 100  $\mu\text{L}$  e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da STF pH 7,4 homogeneizou-se em seguida essa solução foi injetada no sistema cromatográfico.

O ensaio de solubilidade foi avaliado adicionando em um outro tubo do tipo Eppendorf<sup>®</sup> 5  $\mu\text{L}$  da solução de IMX em 50  $\mu\text{L}$  de solução tampão Tris-KCl e 145  $\mu\text{L}$  de STF pH 7,4. Após homogeneização, essa solução foi centrifugada por 10 min a 4°C 1600  $\times$  g. Posteriormente, coletou-se 100  $\mu\text{L}$  dessa solução e nesse tubo foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de ACN, após homogeneização essa solução foi injetada no sistema cromatográfico.

Posteriormente os valores de área do grupo controle e do ensaio foram comparados utilizando o programa GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, EUA) através do teste t bicaudal (considerando estatisticamente significativo  $p < 0,05$ ).

### **3.10. Validação do método analítico para análise do IMX em estudos de permeabilidade com células CACO-2**

O método analítico foi validado pela avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito residual, limite inferior de quantificação (LIQ), precisão, exatidão e estabilidade. Em tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup> foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de IMX e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Após a secura, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de solução tampão HHBS, 75  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O ultrapura e 50  $\mu\text{L}$  da solução de PI, paracetamol. Não houve necessidade de um preparo de amostra, pois os estudos em células CACO-2 tinham como matriz a solução tampão HHBS a qual não apresentou incompatibilidade com o sistema de análise. Além disso, as concentrações empregadas na validação foram relativamente altas, não havendo necessidade de concentração das amostras. Os critérios de aceitabilidade foram baseados no guia de validação de métodos bioanalíticos, Resolução RDC N° 27, 2021, da ANVISA (ANVISA, 2012).

#### **3.10.1. Seletividade**

Para a avaliação da seletividade do método foram analisadas (n=3) amostras contendo 25  $\mu\text{L}$  de solução tampão HHBS, 50  $\mu\text{L}$  de MeOH e 75  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O, sem adição de IMX e PI. Nesse ensaio foi observado a ocorrência de interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção do IMX e do PI. As respostas de picos interferentes no mesmo tempo de retenção do analito e PI foram consideradas aceitáveis se inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e 5% da resposta para o PI (ANVISA, 2012).

### 3.10.2. Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi realizada no intervalo de concentração de IMX de 0,103  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para cada enantiômero. A curva analítica foi construída pela correlação entre as concentrações e as razões da área do IMX e do PI obtidas, com ponderação de  $1/x^2$ . A correlação dos dados foi avaliada a partir do coeficiente de correlação ( $r$ ) das curvas, do erro relativo de cada ponto e do gráfico de resíduos.

### 3.10.3. Efeito residual

O efeito residual foi avaliado através da injeção de uma amostra “branco” (sem adição de IMX e PI), seguida pela injeção de uma amostra correspondente ao limite superior de quantificação e na sequência, outras duas amostras “branco”. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito e do PI foram consideradas aceitáveis se inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e 5% da resposta para o padrão interno (ANVISA, 2012).

### 3.10.4. Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação foi definido como primeiro ponto da curva analítica, ou seja, 0,103  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Como critério de aceitabilidade foi definido como erro padrão relativo e desvio padrão relativo de até  $\pm 20\%$  e até 20%, respectivamente. A determinação foi realizada em quintuplicata.

### 3.10.5. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas ( $n=5$ ) nas concentrações de cada enantiômero de IMX correspondente ao LIQ, 0,103  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ao controle de qualidade baixo (CQB), 0,296  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ao controle de qualidade médio (CQM), 25,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e ao controle de qualidade alto (CQA), 37,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A exatidão foi expressa como erro padrão relativo percentual (ER%) e foi considerada aceitável se estivesse entre  $\pm 20\%$  para o LIQ e  $\pm 15\%$  para as demais concentrações (ANVISA, 2012). Já a precisão foi avaliada como desvio padrão relativo percentual (DPR%) e foram consideradas aceitáveis até 20% para o LIQ e até 15% para as demais concentrações (ANVISA, 2012).

Na determinação da precisão/exatidão intraensaio foram realizados experimentos no mesmo dia. Já na precisão/exatidão interensaio, os experimentos foram realizados em 3 dias consecutivos, sendo realizadas curvas analíticas para quantificação do IMX diariamente.

### 3.10.6. Estabilidade

A estabilidade do *rac*-IMX foi avaliada (n=3) em duas concentrações (uma baixa e outra alta), correspondente ao CQB e ao LSQ. Para tanto, as amostras foram incubadas em solução tampão HHBS em estufa a 37°C por 3 horas, simulando o mesmo processo que ocorre no estudo de permeabilidade. Após esse período, as amostras foram quantificadas com o emprego de curvas analíticas preparadas no mesmo dia do estudo. A concentração média obtida para esta foi comparada com a concentração de um grupo controle que não passou pelo processo. As amostras foram consideradas estáveis se os valores de ER% e DPR% fossem inferiores  $\pm 15\%$  e 15%, respectivamente.

## 3.11. Estudos de permeabilidade em células CACO-2

Nos estudos de permeabilidade em células CACO-2 foi avaliado como substrato a mistura racêmica do IMX e os enantiômeros isolados, (+)-IMX e (-)-IMX.

### 3.11.1. Citotoxicidade

Previamente aos estudos *in vitro* de absorção intestinal, foi realizado a avaliação da citotoxicidade das amostras em células CACO-2 para definir a concentração a ser utilizada nos ensaios de permeabilidade. Para isso, 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de células CACO-2 com densidade celular de  $5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram semeadas em placas de 96 poços, deixando uma fileira de poços em cada placa sem células para serem considerados como “brancos”. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa por 3 dias (37°C; 5%  $\text{CO}_2$ ) para a realização do experimento no quarto dia.

Para o preparo das amostras, soluções de *rac*-IMX em uma faixa de concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dos enantiômeros isolados, (+)-IMX e (-)-IMX, na faixa de 12,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ambos em solução tampão HHBS, foram preparadas. Além das amostras, uma placa de 96 poços também foi utilizada como controle positivo contendo somente dodecil sulfato de sódio (SDS).

Para os ensaios de citotoxicidade celular, o meio de cultura foi removido das placas semeadas com as células CACO-2 e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  das soluções contendo as amostras em diferentes concentrações e dos controles, em seus respectivos poços. Após 3 horas de incubação a 37°C em atmosfera saturada com água e 5% de  $\text{CO}_2$ , as células foram lavadas com D-PBS estéril. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de vermelho neutro (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) preparada em meio DMEM foi adicionada em cada poço, seguido de 3 horas de incubação, nas mesmas condições. Após esse período, a solução com o corante foi removida, as placas foram lavadas com 200  $\mu\text{L}$  de D-PBS e, em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Com essa solução, as placas

permaneceram agitando por 45 minutos em agitador automático e, em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 540 nm para análise da viabilidade celular.

### 3.11.2. Absorção intestinal

Para os ensaios de permeabilidade, as células CACO-2 foram semeadas na densidade de  $1,14 \times 10^5$  células  $\text{cm}^2$  em placas Transwell<sup>®</sup> de 12 poços e incubadas por 21 dias. O meio de cultura do compartimento apical (500  $\mu\text{L}$ ) e do compartimento basolateral (1500  $\mu\text{L}$ ) foram trocados três vezes por semana. No dia do experimento, as células foram cuidadosamente lavadas com D-PBS, antes da incubação com as amostras. Para avaliação do transporte absorptivo, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da solução de *rac*-IMX, (+)-IMX e (-)-IMX, ambas nas concentrações de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no compartimento apical, enquanto o compartimento basolateral foi preenchido com 1500  $\mu\text{L}$  de solução tampão HHBS. A permeabilidade foi monitorada pela análise de amostras obtidas da solução receptora nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos. O volume da solução tampão removido foi repostado a cada tempo.

O coeficiente de permeabilidade aparente,  $P_{app}$  ( $\text{cm s}^{-1}$ ) foi o parâmetro usado para descrever o transporte do *rac*-IMX e de seus enantiômeros e foi estimado de acordo com a Equação 3 (SHIYIN YEE, 1997).

$$P_{app} = \frac{\frac{\Delta Q}{\Delta t} \times v}{A \times M_0} \quad \text{Equação 3}$$

Onde,  $\Delta Q/\Delta t$  é a taxa de aparecimento do composto no compartimento receptor ( $\text{ng s}^{-1}$ ),  $v$  é o volume do compartimento receptor ( $\text{cm}^3$ ),  $A$  é a área da superfície da monocamada de células ( $\text{cm}^2$ ) e  $M_0$  é a massa inicial no compartimento doador ( $\text{ng}$ ). Os valores de  $v$  e  $A$  são fixos nesse experimento, 1,5  $\text{cm}^3$  e 1,12  $\text{cm}^2$ .

## 3.12. Estudo de metabolismo in vitro com microsomas hepáticos de humanos

### 3.12.1. Preparo da amostra para o estudo de metabolismo

A extração do IMX do meio microsomal foi realizada empregando-se a extração líquido-líquido (ELL) utilizando como solvente extrator o acetato de etila. Primeiro avaliou-se a extração em meio ácido, básico e neutro utilizando soluções tampão fosfato de pH 2,4, 12,0 e 7,4. Posteriormente um planejamento experimental multivariado foi empregado para a otimização do preparo da amostra.

Os dados estatísticos foram tratados no software Minitab 18 Statistical Software (State College, EUA).

Na etapa de *screening* foi empregado o planejamento fatorial fracionado avaliado em dois níveis os seguintes fatores: volume do solvente extrator, tempo de agitação, velocidade de agitação e adição de NaCl. Os níveis de cada fator e os experimentos foram conduzidos conforme descrito nas Tabelas 10 e 11.

**Tabela 10.** Valores dos níveis para os fatores avaliados

Nível	Volume Acetato de etila ( $\mu\text{L}$ )	Tempo de agitação (minutos)	Velocidade de agitação (rpm)	Concentração NaCl (%) ( $\text{m v}^{-1}$ )
-1	600	5	500	0
0	800	10	1000	10
1	1000	15	1500	20

**Tabela 11.** Matriz do delineamento experimental e respostas obtidas no planejamento fatorial fracionado

Ensaio	Volume Acetato de etila ( $\mu\text{L}$ )	Tempo de agitação (minutos)	Velocidade de agitação (rpm)	Concentração NaCl (%) ( $\text{m v}^{-1}$ )
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0

Após a identificação dos fatores que influenciavam na extração, a extração foi otimizada por DCCR. Na execução dos experimentos, os fatores avaliados na etapa anterior (*screening*), foram fixados nos seguintes valores: velocidade de agitação em 1500 rpm sem adição de NaCl. Os níveis de cada fator otimizado e os experimentos foram conduzidos conforme descrito nas Tabelas 12 e 13.

**Tabela 12.** Valores dos níveis para os fatores otimizados

Nível	Volume de acetato de etila (µL)	Tempo de agitação (minutos)
-1,41	1000	15
-1	1100	17,2
0	1350	22,5
1	1600	27,8
1,41	1700	30

**Tabela 13.** Matriz do delineamento experimental e resposta obtida na otimização

Ensaio	Volume de acetato de etila (µL)	Tempo de agitação (minutos)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

As amostras foram agitadas em agitador orbital Vibrax VXR Basic<sup>®</sup> da IKA (Staufen, Alemanha) e posteriormente centrifugadas à 1600 x g por 10 min na temperatura de 4°C em centrífuga Hitachi HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão). Posteriormente foi coletado 80% da fração orgânica e evaporada sob fluxo de ar comprimido, em seguida, o resíduo foi solubilizado em 100 µL de uma solução de H<sub>2</sub>O:ACN 85:25 (v/v) e injetado no sistema cromatográfico. A eficiência do processo de preparação da amostra foi determinada através da avaliação da porcentagem de recuperação e da seletividade. Para tanto, foi feita a comparação das áreas obtidas para as amostras extraídas, com amostras que não passaram pelo processo de extração as quais continham apenas o analito e o padrão interno, considerados como 100% de recuperação. A seletividade foi avaliada pela análise do “branco” microsomal (amostras isentas do IMX e PI). Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 8.0 (La Jolla, CA, EUA).

### 3.13. Estabilidade do IMX em meio microsomal

A fim de avaliar a estabilidade do IMX durante o metabolismo in vitro, um estudo prévio foi realizado nas condições de incubação em três diferentes concentrações de proteínas microsomais

(37°C). O meio microsomal foi composto por 5 µL da solução de IMX em ACN, 50 µL de microsomas hepáticos humanos (HLM) na concentração proteica final de 0,2, 0,5 e 0,8 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, 95 µL de STF e substituindo o cofator NADPH, foi adicionado 50 µL de solução tampão Tris/KCl. A estabilidade do IMX foi avaliada em duas concentrações, 5 e 50 µmol L<sup>-1</sup>, no tempo de 40 minutos (tempo máximo de incubação). Posteriormente as amostras foram submetidas ao procedimento de preparo e analisadas por HPLC. Os resultados obtidos foram analisados através do GraphPad Prism 8.0, pelo teste estatístico t-Student bicaudal (não pareado). As amostras que apresentaram valores de p superiores a 0,05 foram consideradas estáveis, para as quais não há diferença significativa entre o controle e as amostras que foram submetidas ao tempo máximo de incubação. Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

### 3.14. Estudo piloto de metabolismo in vitro

Um estudo prévio de metabolismo in vitro com o IMX foi realizado, a fim de avaliar se as enzimas do CYP450 presentes nos HLM poderiam metabolizar o IMX. Para tanto foi avaliado as seguintes concentrações proteicas 0,2; 0,5 e 0,8 mg mL<sup>-1</sup>, combinando as concentrações de 50 µmol L<sup>-1</sup> e 5 µmol L<sup>-1</sup> de *rac*-IMX e de 50 µmol L<sup>-1</sup> de cada enantiômero de IMX. Nesse ensaio foi adicionado 5 µL da solução de IMX, 95 µL de STF pH 7,4, 50 µL da solução microsomal e 50 µL do sistema de regeneração de NADPH. Em todos os ensaios, as amostras foram incubadas a 37°C durante 5 minutos e em seguida a reação foi iniciada pela adição do sistema de regeneração de NADPH. Simultaneamente, controles (sem adição de NADPH) e brancos (sem adição de IMX) foram realizados. Após 40 minutos de incubação, a reação foi encerrada pelo início do procedimento de preparo de amostra e posteriormente analisadas por HPLC.

### 3.15. Triagem do potencial inibitório do IMX sobre as principais enzimas do CYP450

Nessa etapa foi avaliado o potencial inibitório do IMX sobre as principais enzimas do CYP450 empregando uma concentração fixa do IMX de 100 µmol L<sup>-1</sup>. Nesse experimento foram realizados ensaios de metabolismo in vitro com substratos específicos para cada isoforma do CYP450 (Tabela 14) na ausência do IMX (grupo controle) e na presença do IMX.

**Tabela 14.** Relação de cada substrato, concentração e metabólito para cada isoforma específica

Isoforma	Substrato	Concentração do substrato no meio ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Metabólito marcador
CYP1A2	Fenacetina	12,03	Acetaminofeno
CYP2C9	Diclofenaco	49,45	4'-hidroxidiclofenaco
CYP2C19	S-mefenitoína	44,83	4'- hidroximefenitoína
CYP2D6	Bufuralol	5,40	1'- hidroxibufuralol
CYP2E1	Clorzoxazona	145,90	6-hidroxiclorzoxazona
CYP3A4/5*	Midazolam	5,41	1'-hidroximidazolam
CYP3A4/5*	Nifedipina	7,00	Deidrofedipina

\*Dada a importância dessa isoforma, dois diferentes marcadores são empregados na sua avaliação

Após incubação, realizou-se o preparo de amostra e as amostras foram analisados por HPLC. A atividade enzimática remanescente porcentual (AR%) de cada isoforma foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\%AR = \left( \frac{A_i}{A_0} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde  $A_0$  é a razão entre a área do metabólito marcador formado e o padrão interno nas amostras correspondente ao controle negativo e  $A_i$  é a razão entre a área do metabólito marcador formado e o padrão interno nas amostras incubadas com o IMX.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Desenvolvimento de um método enantiosseletivo para análise do IMX e Des-IMX

Dois métodos cromatográficos enantiosseletivos, um método que inclui o metabólito Des-IMX para as análises realizadas no estudo de metabolismo *in vitro* e um outro método que não inclui o metabólito para as análises realizadas no estudo com células CACO-2, foram desenvolvidos. Entretanto, o desenvolvimento dos dois métodos se baseou nos mesmos estudos de otimização através do planejamento experimental. Dessa forma, primeiro foi otimizado o método que incluía o metabólito Des-IMX e depois, a fim de economizar tempo de análise foi feita uma otimização do método sem incluir o Des-IMX.

#### 4.1.1. Identificação da fase móvel e estacionária

Anterior as etapas de *screening* e otimização, é necessário verificar qual fase estacionária e móvel são mais seletivas para enantioseparação do IMX e seu metabólito Des-IMX. As Tabelas 15, 16 e 17 informam indícios ou não de separação do IMX e Des-IMX ao se utilizar cada fase estacionária com a respectiva fase móvel, na presença de aditivo ou não.

**Tabela 15.** Avaliação da separação quiral na coluna Chiralpak-AD-H®

Modo	Proporção	Aditivo	Separação dos enantiômeros	
			IMX	Des-IMX
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	Não	Indícios <sup>a</sup>	Indícios <sup>a</sup>
<b>Polar Orgânico</b>	100% MeOH	Não	Indícios <sup>a</sup>	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% EtOH	Não	Não	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% ACN	0,1% Ácido fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% MeOH	0,1% Ácido Fórmico	Indícios <sup>a</sup>	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% EtOH	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	30% ACN: 70% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	30% MeOH: 70% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não

<sup>a</sup>Indícios de separação: resolução superior a 0,5

**Tabela 16.** Avaliação da separação na coluna Chiralcel-OD-H®

Modo	Proporção	Aditivo	Separação dos enantiômeros	
			IMX	Des-IMX
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	Não	Não	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% MeOH	Não	Não	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% EtOH	Não	Não	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% ACN	0,1% Ácido fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% MeOH	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% EtOH	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	30% ACN: 70% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico	Indícios <sup>a</sup>	Indícios <sup>a</sup>
<b>Reverso</b>	30% MeOH: 70% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não

<sup>a</sup>Indícios de separação: resolução superior a 0,5

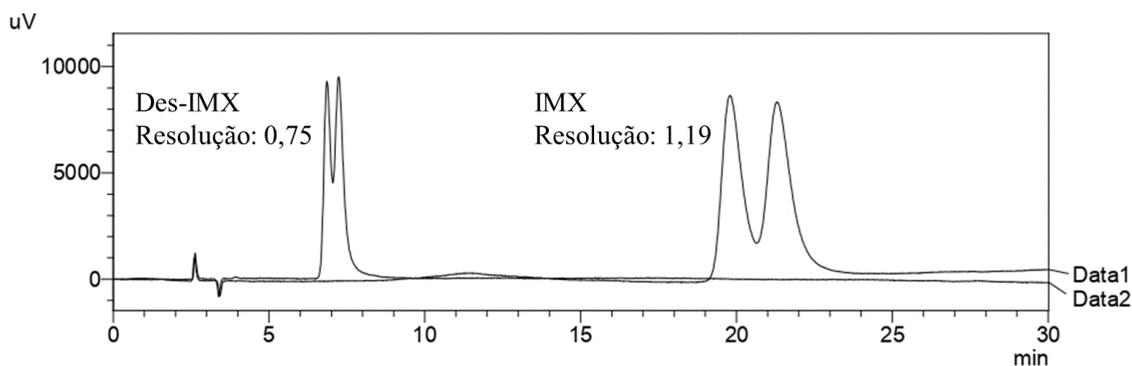
**Tabela 17.** Avaliação da separação na coluna Chiralcel-OJ®

Modo	Proporção	Aditivo	Separação dos enantiômeros	
			IMX	Des-IMX
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	Não	Não	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% MeOH	Não	Não	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% EtOH	Não	Não	Não
<b>Polar Orgânico</b>	100% ACN	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% ACN	0,1% Ácido fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% MeOH	0,1% Ácido Fórmico	Indícios <sup>a</sup>	Não
<b>Reverso</b>	20% H <sub>2</sub> O: 80% EtOH	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	30% ACN: 70% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não
<b>Reverso</b>	30% MeOH: 70% H <sub>2</sub> O	0,1% Ácido Fórmico	Não	Não

<sup>a</sup>Indícios de separação: resolução superior a 0,5

A coluna mais seletiva para enantioseparação do IMX e seu metabólito Des-IMX foi a Chiralcel OD-H® utilizando o modo reverso de eluição e fase móvel com maior proporção de H<sub>2</sub>O em relação ao solvente orgânico ACN. Na **Figura 3** pode-se observar o cromatograma da enantioseparação; ainda que com baixa resolução (Rs) (IMX, Rs:1,19 e Des-IMX, Rs: 0,75). Essa condição proporcionou um início de separação para os enantiômeros do IMX e do Des-IMX.

**Figura 3.** Cromatograma relativo ao índice da separação quiral do IMX e seu metabólito Des-IMX



Condições cromatográficas: Coluna: Chiralcel OD-H® (150 x 4,6 mm; 5µm); fase móvel: 70% H<sub>2</sub>O e 30%ACN; vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10 µL e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. A concentração de IMX é 27,8 µg mL<sup>-1</sup> e Des-IMX é de 12,0 µg mL<sup>-1</sup>. Fonte: autoria própria

#### 4.1.2. *Screening*

A etapa de *Screening* busca identificar quais são os fatores que influenciam de forma significativa as respostas avaliadas e a serem otimizadas, dessa forma, os fatores que não são significativos são descartados na etapa de otimização. Essa etapa é necessária, pois regula o número de experimentos e garante que a utilização dos recursos seja mínima (PEROVANI; SERPELLONE; DE OLIVEIRA, 2021).

O delineamento experimental empregado foi o planejamento fatorial fracionado. Esse planejamento proporciona uma redução no número de experimentos de acordo com o princípio de que os efeitos de ordem inferior afetam mais as respostas do que os efeitos de ordem superior, assim, os efeitos de ordem superior são desprezíveis, implicando que menos experimentos se façam necessários para se obter a mesma informação quando comparados com planejamento fatorial completo (PEROVANI; SERPELLONE; DE OLIVEIRA, 2021).

Nesse estágio, as respostas avaliadas, enantioresolução do IMX e do Des-IMX, respectivamente, foram avaliadas e são descritas na Tabela 18. Os resultados apresentados na Tabela 18 mostram como a enantioresolução de ambos os analitos avaliados variam de acordo com os parâmetros avaliados. É interessante observar como as pequenas variações desses parâmetros influenciam as enantioressoluções que variam desde 0 para o Des-IMX (ensaios 5, 7, 9 e 13), até de 1,28 na condição 12. Entretanto, como se trata de uma etapa de *screening*, só é possível afirmar quais os fatores são significativos após os cálculos estatísticos.

**Tabela 18.** Respostas obtidas no planejamento fatorial fracionado

Ensaio	Resolução IMX	Resolução Des-IMX
1	0,991	0,103
2	1,530	0,993
3	1,314	0,348
4	1,993	1,253
5	0,559	0
6	1,098	0,649
7	0,907	0
8	1,366	0,932
9	0,941	0
10	1,600	0,981
11	1,253	0,256
12	2,083	1,283
13	0,600	0
14	1,116	0,628
15	0,935	0,115
16	1,443	0,907
17	1,413	0,682
18	1,416	0,687
19	1,411	0,685
20	1,415	0,684
21	1,416	0,690

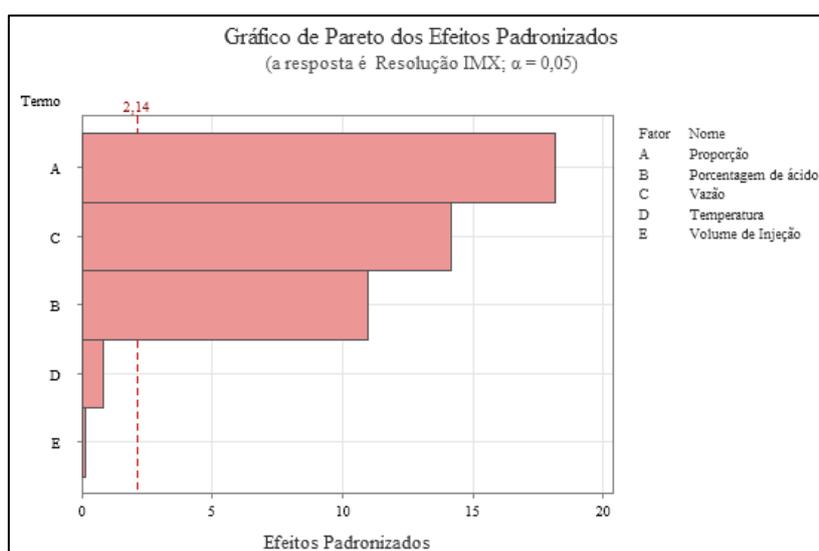
Os efeitos dos fatores nas respostas avaliadas, resolução entre os enantiômeros de IMX e Des-IMX, para  $\alpha = 0,05$  e  $p < 0,05$ , são descritos na Tabela 19 e sumarizados nas Figuras 4 e 5 (gráfico de Pareto).

Baseado na análise dos efeitos, para a resolução entre os enantiômeros do IMX e do Des-IMX, os fatores que possuem efeitos significativos nas respostas, valor de  $p < 0,05$ , são a proporção entre H<sub>2</sub>O e ACN, a vazão (mL min<sup>-1</sup>) e a porcentagem de ácido fórmico.

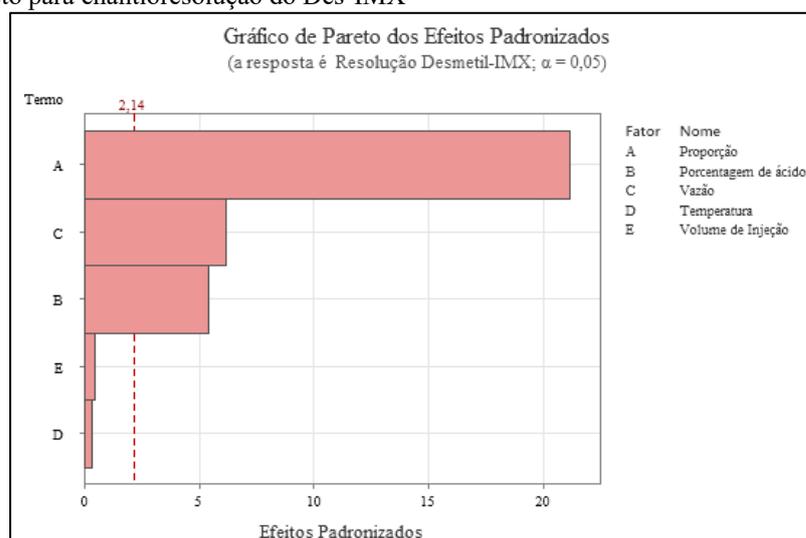
Como podemos observar na Tabela 19, o efeito da porcentagem de ácido fórmico é positivo, ou seja, quanto maior a porcentagem de ácido fórmico presente no meio, maior valor de resolução será obtido. Entretanto, a adição de ácido fórmico é um fator limitado experimentalmente; ou seja, não é recomendado que se adicione mais que 1% de ácido fórmico na fase móvel, pois pode danificar a fase estacionária (GOMES; SANTOS; FARIA, 2020). Isso torna o aumento de adição de ácido fórmico um fator limitado para variação dos níveis na etapa otimização, dessa forma, para etapa posterior foi fixado a porcentagem de ácido fórmico no nível 1, ou seja, em 1% de ácido fórmico.

**Tabela 19.** Efeitos dos fatores estimados para enantioresolução do IMX e do Des-IMX, respectivamente

Fator	Efeito ( $\alpha$ )		Valor de p	
	IMX	Des-IMX	IMX	Des-IMX
Proporção (H <sub>2</sub> O:ACN)	0,5911	0,8505	0,000	0,000
Ácido fórmico (%)	0,3574	0,2175	0,000	0,000
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	-0,4601	-0,2482	0,000	0,000
Temperatura (°C)	0,0266	-0,0135	0,426	0,741
Volume de injeção (μL)	0,0051	-0,0187	0,877	0,647

**Figura 4.** Gráfico de Pareto para enantioresolução do IMX

Fonte: autoria própria

**Figura 5.** Gráfico de Pareto para enantioresolução do Des-IMX

Fonte: autoria própria

Outro fator que influencia positivamente as enantioresoluções do IMX e do Des-IMX é a proporção entre a fase aquosa e a fase orgânica, nesse caso, a ACN. É possível notar que o aumento da proporção da fase aquosa possui um grande efeito na enantioresolução do IMX e ainda mais na do Des-IMX (valores do efeito,  $\alpha$ ). Por isso, esse fator será um fator avaliado na próxima etapa de otimização a fim de encontrar qual é a proporção ótima para que se obtenha um valor aceitável de resolução ( $\geq 1,5$ ), principalmente para o metabólito Des-IMX, visto que o valor máximo encontrado nessa etapa de *screening* foi de 1,28.

Além dos fatores citados que influenciam positivamente, observa-se que a vazão também possui efeito sobre as respostas avaliadas, entretanto, possui um efeito negativo, isso é, quanto menor for a vazão da fase móvel maior será o valor das enantioresoluções, por isso, esse fator também será avaliado na próxima etapa de otimização para que seja possível adequar e combinar o valor de vazão e proporção entre a fase móvel ideal para obter a melhor resposta possível (Resolução  $\geq 1,5$ ).

#### 4.1.3. Otimização

Posterior a determinação dos fatores significativos, a etapa de otimização foi realizada. Nessa etapa foi empregado o delineamento composto central rotacional (DCCR). Na execução dos experimentos, os fatores avaliados na etapa anterior, *screening*, foram fixados nos seguintes valores: porcentagem de ácido fórmico 1%, temperatura do forno 30°C e volume de injeção 10  $\mu$ L. As respostas obtidas são descritas na Tabela 20.

**Tabela 20.** Respostas obtidas na otimização

Ensaio	Resolução IMX	Resolução Des-IMX
1	1,443	0,648
2	1,09	0
3	2,1	1,448
4	1,442	0,997
5	1,139	0,317
6	1,668	1,214
7	1,928	1,114
8	1,245	0,666
9	1,464	0,875
10	1,462	0,846
11	1,464	0,851

Os coeficientes de regressão, erro padrão e o valor de p para a resolução do IMX e do Des-IMX, respectivamente, são apresentados na Tabela 21.

**Tabela 21.** Coeficientes de regressão do DCCR para a resolução do IMX e do Des-IMX, respectivamente

Fatores	Coeficiente de regressão		Erro padrão		Valor de p	
	IMX	Des-IMX	IMX	Des-IMX	IMX	Des-IMX
<b>Constante</b>	1,4633	0,8573	0,0257	0,0675	0	0
<b>Proporção<sup>a</sup></b>	0,2196	0,3832	0,0157	0,0414	0	0
<b>Vazão</b>	-0,2471	-0,2166	0,0157	0,0414	0	0,003
<b>Proporção<sup>a</sup> x Proporção</b>	-0,0240	-0,0595	0,0187	0,0492	0,256	0,280
<b>Vazão x Vazão</b>	0,0675	0,0027	0,0187	0,0492	0,015	0,958
<b>Proporção<sup>a</sup> x Vazão</b>	-0,0763	0,0492	0,0222	0,0585	0,019	0,438

<sup>a</sup> Proporção (H<sub>2</sub>O:ACN)

De acordo com a Tabela 21, para a resolução do IMX considerando  $p < 0,05$ , foram significativos os termos lineares da proporção e vazão, o termo quadrático da vazão e o termo proporção x vazão. Dessa forma, a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 22, considera somente os termos estatisticamente significativos.

**Tabela 22.** ANOVA para a resolução do IMX e Des-IMX, respectivamente

Dados	Graus de Liberdade		Soma dos Quadrados		Quadrados Médios		F <sub>calculado</sub>		F <sub>tabelado</sub> ( $\alpha=0,05$ )	
	IMX	Des-IMX	IMX	Des-IMX	IMX	Des-IMX	IMX	Des-IMX	IMX	Des-IMX
<b>Regressão</b>	4	2	0,93	1,55	0,23	0,77	106,40	61,59	4,53	4,46
<b>Resíduo</b>	6	8	0,01	0,10	0	0,01				
<b>Falta de ajuste</b>	4	6	0,01	0,10	0	0,02	2189,5	69,57	19,25	19,33
<b>Erro puro</b>	2	2	0	0	0	0	0			
<b>Total</b>	10	10	0,95	1,65						

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 98,61% e o teste F foi significativo, sendo assim, o modelo é adequado para descrever o resultado através da superfície de resposta ilustrada na Figura 6a para o IMX.

Para a resolução do Des-IMX, também considerando  $p < 0,05$ , foram significativos somente os termos lineares da proporção e vazão. A ANOVA, apresentada na Tabela 22, também considera somente os termos estatisticamente significativos. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a

93,90% e o teste F foi significativo, portanto, o modelo é adequado para descrever o resultado através da superfície de resposta ilustrada na Figura 6b.

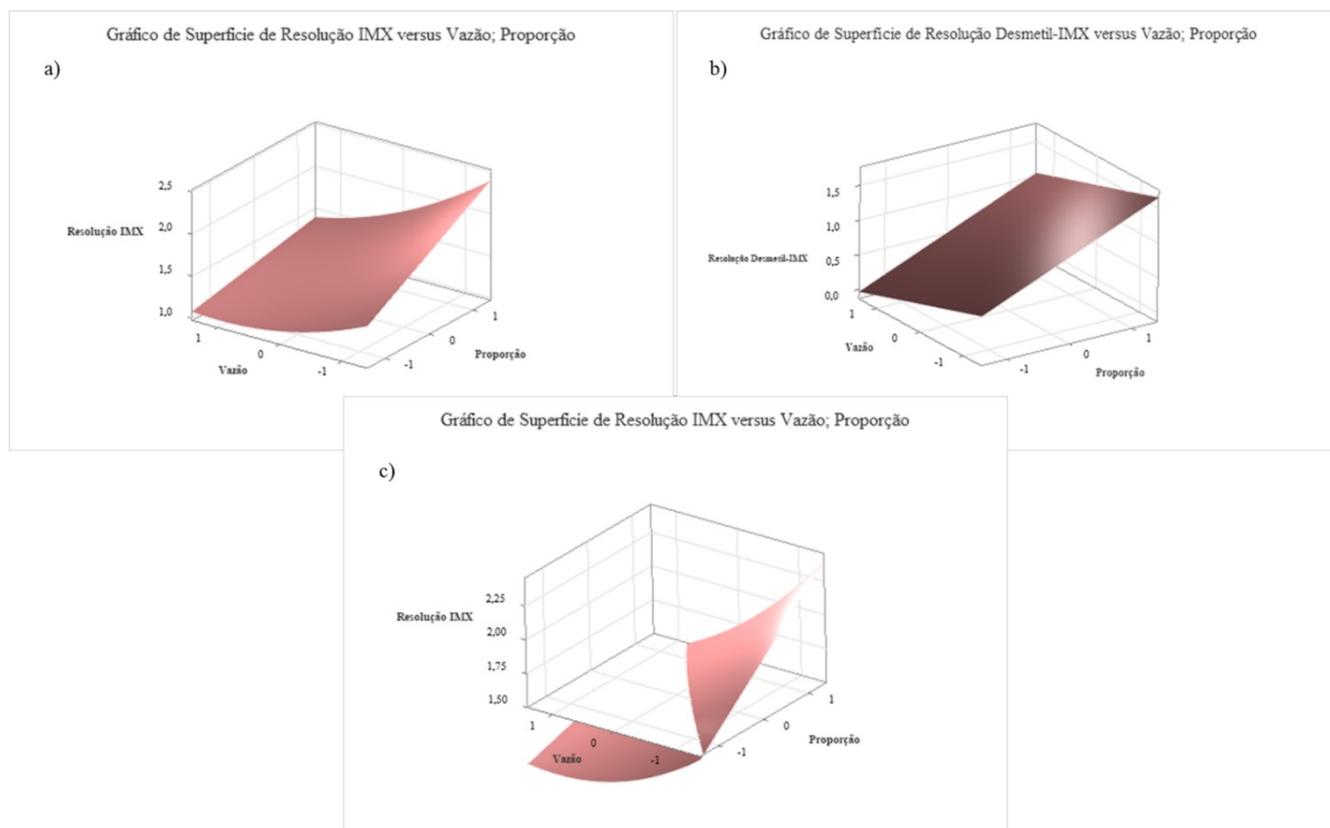
Os modelos matemáticos obtidos são expressos através das Equações 5 e 6, respectivamente para cada resposta, onde P é a proporção de H<sub>2</sub>O: ACN da fase móvel e V é a vazão. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo.

$$Resolução_{IMX} = 1,4408 + 0,2196P - 0,2471V + 0,0746V^2 - 0,0763 PxV \quad \text{Equação 5}$$

$$Resolução_{Des-IMX} = 0,8160 + 0,3832P - 0,2166V \quad \text{Equação 6}$$

Através da análise da superfície de resposta (Figuras 6a e 6b), para a otimização das duas respostas, resolução entre os enantiômeros do Des-IMX e do IMX, para ambas atingirem valores aceitáveis ( $R_s \geq 1,5$ ), vazões menores e maiores proporções de H<sub>2</sub>O em relação a ACN são necessárias. Por isso, foi estabelecido um método cromatográfico com a vazão de 0,38 mL min<sup>-1</sup> (valor codificado: -1,41) e proporção de 85:15 v/v (H<sub>2</sub>O:ACN) (valor codificado: 1,41). Porém, esse método, apesar de apresentar um adequado valor de resolução entre os enantiômeros ( $R_{S_{Des-IMX}}$ : 1,6 e  $R_{S_{IMX}}$ : 2,3), apresentou um tempo de análise muito longo (tempo de retenção do último pico > 40 minutos).

Dessa maneira, estabeleceu-se um método de eluição por gradiente (Tabela 23) baseado nos dados obtidos pela otimização. Sabe-se que para a separação entre os enantiômeros do Des-IMX é necessário a vazão de 0,38 mL min<sup>-1</sup> e proporção de 85:15 v/v (H<sub>2</sub>O:ACN), entretanto, após a separação do Des-IMX, a fim de diminuir o tempo de análise, existem valores aceitáveis para diminuir a proporção entre H<sub>2</sub>O:ACN e ainda sim, a resolução entre os enantiômeros do IMX ser maior que 1,5 (Figura 6c).

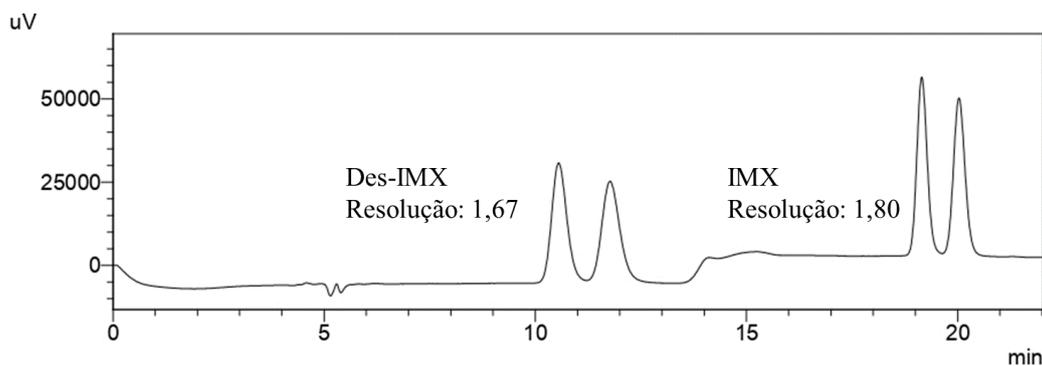
**Figura 6.** Gráficos de superfície de resposta para resolução do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX

a) Gráfico de superfície de resposta para resolução do IMX. b) Gráfico de superfície de resposta para resolução do metabólito Des-IMX. c) Gráfico de superfície de resposta para resolução do IMX considerando somente resoluções acima de 1,5. Fonte: autoria própria

**Tabela 23.** Gradiente empregado para enantioseparação do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX

Tempo (min)	Proporção ACN
0,01	15
7,00	15
7,50	27
16,00	27
16,50	15
22,00	15
22,01	Fim

O cromatograma de separação quiral do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX pode ser visualizado na Figura 7. Além disso, na Tabela 24 é apresentado um comparativo entre os valores de resolução entre os enantiômeros IMX e Des-IMX, respectivamente, antes e depois da etapa de otimização. Podemos observar que a otimização, através do planejamento experimental, proporcionou um aumento significativo das respostas otimizadas realizando experimentos de forma consciente a fim de economia de tempo e de recursos. Dessa forma, foi possível obter resoluções adequadas, principalmente do metabólito Des-IMX, para os próximos estudos de metabolismo in vitro que serão discutidas mais adiante nesse trabalho.

**Figura 7.** Cromatograma relativo à separação quiral do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX

Condições cromatográficas: Coluna: Chiralcel OD-H® (150 x 4,6 mm; 5µm); fase móvel: solvente A (1% de ácido fórmico em H<sub>2</sub>O) e solvente B (1% de ácido fórmico em ACN) usando um gradiente de eluição (0 min, 85% A; 7,5 min, 73% A; 16,5 min, 15%); vazão: 0,38 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10 µL e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. A concentração de IMX é 27,8 µg mL<sup>-1</sup> e Des-IMX é de 39,5 µg mL<sup>-1</sup>. Fonte: autoria própria

**Tabela 24.** Comparativo entre as enantioresoluções antes e depois da etapa de otimização

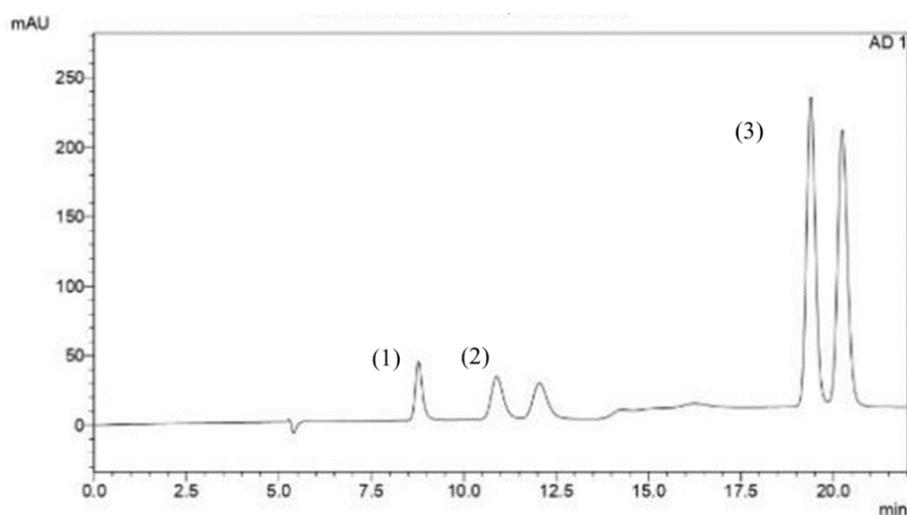
	Não otimizada	Otimizada
<b>Enantioresolução IMX</b>	1,19	1,80
<b>Enantioresolução Des-IMX</b>	0,75	1,67

Após o desenvolvimento do método para análise enantiosseletiva do IMX e seu metabólito Des-IMX, alguns analitos foram avaliados como possíveis padrão interno. Dentre os avaliados, o paracetamol foi selecionado pois apresenta características físico-químicas semelhantes ao praguicida estudado, como o coeficiente de partição octanol-água, como pode ser visto na Tabela 25e, além disso, não coeluiu com os analitos de interesse. O cromatograma obtido para separação quiral do IMX e seu metabólito Des-IMX em adição ao PI paracetamol pode ser observado na Figura 8.

**Tabela 25.** Algumas propriedades físico-químicas do paracetamol

Propriedades Físico-Químicas	
Massa molecular ( $\text{g mol}^{-1}$ )	151,16
Coefficiente de partição octanol-água ( $\text{Log } K_{ow}$ )	0,46
pKa	9,38

Fonte: Pubchem (Acetaminophen | C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub> - PubChem (nih.gov))

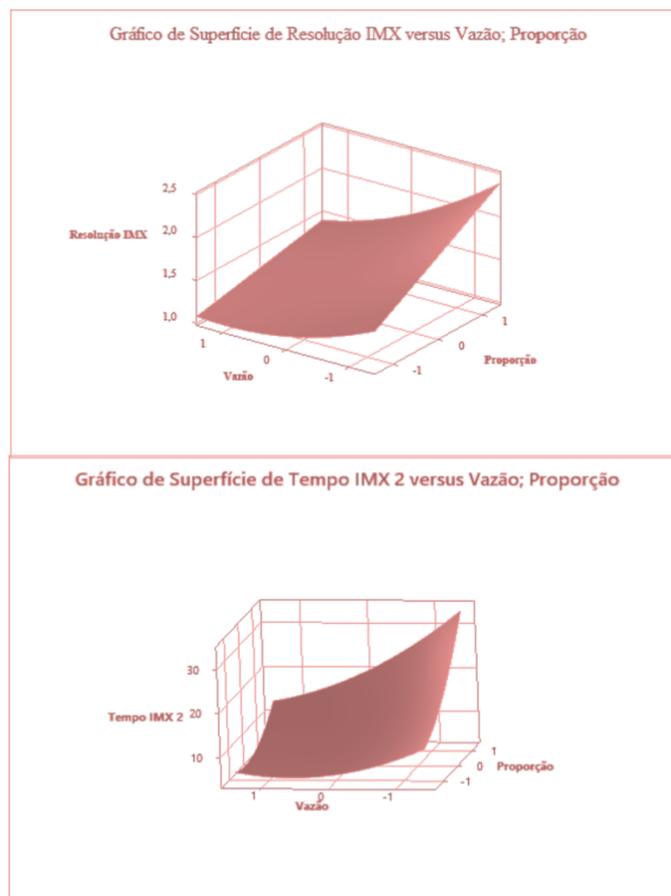
**Figura 8.** Cromatograma relativo a separação quiral do praguicida IMX e seu metabólito Des-IMX em adição do padrão interno (PI) paracetamol

Condições cromatográficas: Coluna: Chiralcel OD-H® (150 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ ); fase móvel: solvente A (1% de ácido fórmico em H<sub>2</sub>O) e solvente B (1% de ácido fórmico em ACN) usando um gradiente de eluição (0 min, 85% A; 7,5 min, 73% A; 16,5 min, 15%); vazão: 0,38 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$  e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. (1): PI, (2): Des-IMX e (3): IMX. A concentração de paracetamol é de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de IMX é de 27,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e de Des-IMX é de 39,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Fonte: autoria própria

A fim de economizar tempo de análise foi aproveitado os dados da otimização acima para realizar uma otimização somente com o IMX, pois nos estudos de permeabilidade com células CACO-2 não será monitorado o metabólito Des-IMX. Dessa forma, o objetivo dessa etapa foi de diminuir o tempo de análise e ainda sim obter resolução igual ou maior que 1,5.

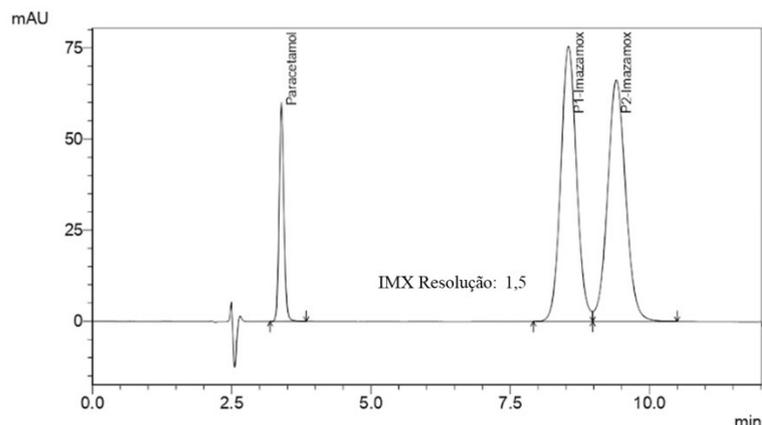
A partir da etapa de otimização, avaliando o gráfico de superfície de resposta, na Figura 9, pode-se notar que os fatores que maximizam a resolução fazem com que o tempo de retenção também aumente, e conseqüentemente, aumentando o tempo de corrida cromatográfica. Por isso, é interessante escolher uma condição que equilibre uma análise com um tempo curto e com resolução maior ou igual a 1,5.

**Figura 9.**Gráfico de superfície de resposta para resolução do IMX e do tempo do último enantiômero de IMX a eluir



Fonte: autoria própria

Desta forma, a condição compromisso, que utiliza os pontos centrais, vazão  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e proporção de fase móvel 79%  $\text{H}_2\text{O}$  e 21% ACN, fornece uma análise com tempo inferior a 12 minutos e resolução acima de 1,5, como visto na Figura 10.

**Figura 10.** Cromatograma de separação quiral do praguicida IMX

Condições cromatográficas: Coluna: Chiralcel-OD-H® (150 x 4,6 mm; 5µm); fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (79: 21 v/v); vazão: 0,8 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10 µL e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. A concentração de paracetamol é de 50 µg mL<sup>-1</sup> e de IMX é de 27,8 µg mL<sup>-1</sup>. Fonte: autoria própria

#### 4.2. Isolamento e quantificação dos enantiômeros do IMX

A separação realizada para a coleta dos enantiômeros do IMX foi feita com o objetivo de obtê-los de forma isolada para serem empregados nos estudos de absorção intestinal com células CACO-2 e metabolismo in vitro com HLM. Para isso, foi utilizada a condição descrita no item 3.6., no modo reverso com uma proporção elevada de H<sub>2</sub>O. Optou-se por utilizar essa condição, pois o IMX é muito solúvel em água. Dessa maneira, o modo reverso, proporcionou poucas injeções pois foi possível solubilizar uma concentração elevada de IMX para injeções, separações e coletas. Deve ser destacado que as coletas foram realizadas em escala analítica, pois não dispúnhamos de uma coluna preparativa para separação desses enantiômeros.

A fração enantiomérica foi calculada de acordo com a Equação 7.

$$\text{Fração enantiomérica (\%)} = \frac{\text{Área Pico 1}}{\text{Área Pico 1} + \text{Área Pico 2}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

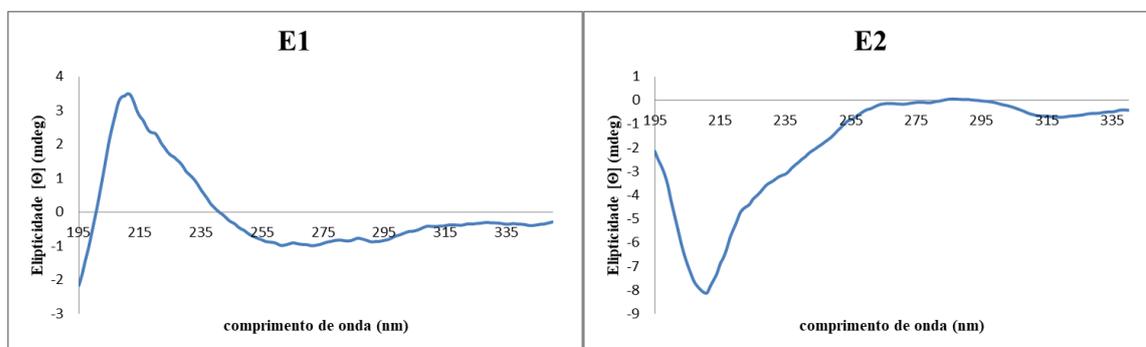
A fração enantiomérica obtida para o pico correspondente ao primeiro enantiômero a eluir (E1) foi 99% e para o segundo (E2) de 98%.

#### 4.3. Identificação da atividade óptica dos enantiômeros do IMX

A determinação da atividade óptica dos enantiômeros do IMX foi realizada por dicroísmo circular. Para isso, a fração coletada correspondente a cada enantiômero foi solubilizada na fase móvel até uma concentração na qual fosse possível observar uma resposta dentro dos limites considerados aceitáveis pelo equipamento. Como pode ser observado na Figura 11, o primeiro

enantiômero a eluir (E1) corresponde ao (+)-IMX, apresentando um efeito Cotton positivo em 212 nm, enquanto que o segundo enantiômero a eluir (E2) apresentou um efeito Cotton negativo, no mesmo comprimento de onda, correspondendo ao (-)-IMX.

**Figura 11.** Espectros de dicroísmo circular dos enantiômeros do IMX



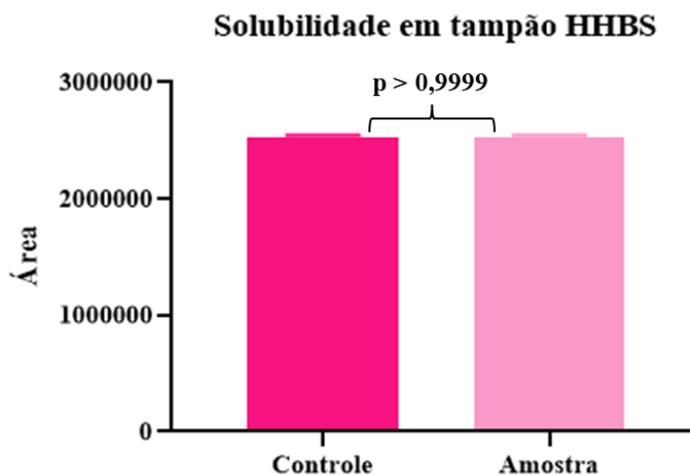
Fonte: autoria própria

#### 4.4. Estudo de solubilidade do IMX em meio celular CACO-2

O estudo da solubilidade do IMX em meio celular CACO-2 é necessário para realização dos estudos de permeabilidade. Segundo dados da literatura, a solubilidade do IMX em ACN é de 1,85 g 100 mL<sup>-1</sup> (0,06 mol L<sup>-1</sup>) (O'NEIL, 2013), portanto, esse solvente foi considerado como grupo controle (100% de solubilidade).

De acordo com a Figura 12 é possível observar que para concentração de IMX avaliada, 150 µg mL<sup>-1</sup> (n = 3), o valor de p é maior que 0,05, ou seja, não existe diferença significativa entre o grupo controle e o grupo que contém a solução tampão HHBS. Em face ao exposto sabe-se, portanto, que o IMX é solúvel em solução tampão HHBS pelo menos até na concentração de 150 µg mL<sup>-1</sup>, concentração essa maior da qual será utilizada nos estudos de permeabilidade.

**Figura 12.** Gráfico de barras da área do grupo controle e amostra para o teste de solubilidade em solução tampão HHBS



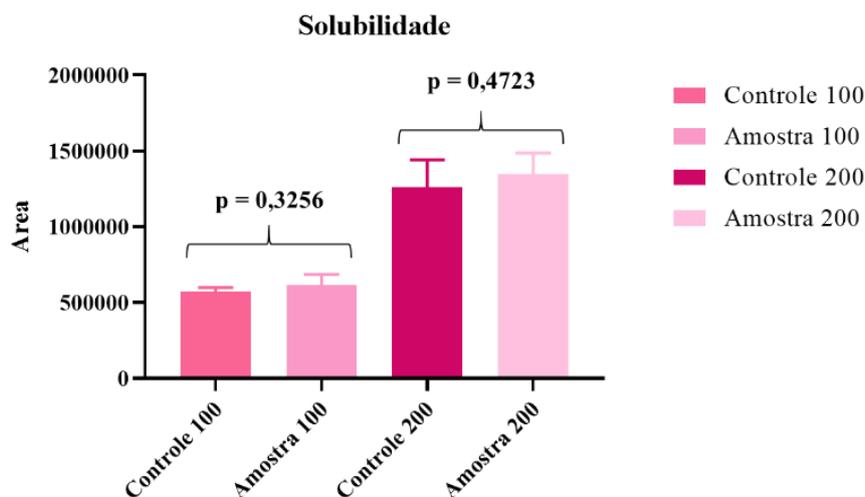
Fonte: autoria própria

#### 4.5. Estudo de solubilidade do IMX em meio microssomal

O estudo da solubilidade do IMX em meio microssomal é necessário para realização dos estudos de metabolismo *in vitro* pois é importante garantir que todo o IMX adicionado ao meio esteja disponível para interagir com as enzimas do CYP450. Como já foi citado anteriormente, a solubilidade do IMX em ACN é de  $1,85 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$  ( $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ ) (O'NEIL, 2013), portanto, esse solvente foi considerado como grupo controle (100% de solubilidade).

Conforme apresentado na Figura 13, para ambas as concentrações de IMX avaliadas, 100 e  $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 5$ ), o valor de  $p$  é maior que 0,05, isso significa que não existe diferença significativa entre os grupos controle e os ensaios com IMX, dessa forma é concluído que o IMX é solúvel nas concentrações de 100 e  $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  em STF pH 7,4.

**Figura 13.** Gráfico de barras da área dos grupos controle e amostra para o teste de solubilidade em STF pH 7,4



Fonte: autoria própria

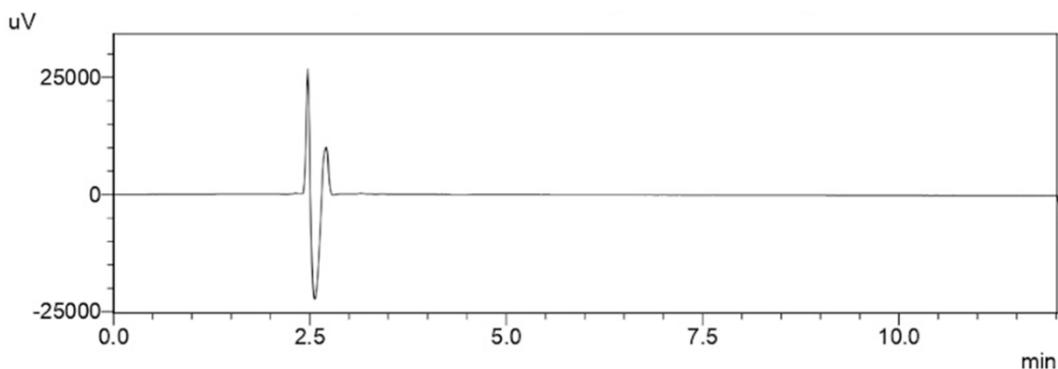
#### 4.6. Validação do método analítico para quantificação do IMX nos estudos de permeabilidade

##### 4.6.1. Seletividade

A seletividade garante que a análise do IMX e do padrão interno ocorra sem interferentes de outros constituintes da amostra (ANVISA, 2012). A Figura 14 apresenta um cromatograma referente a análise da solução tampão HHBS na ausência do IMX e padrão interno.

Como pode ser observado, não há identificação de interferentes na matriz avaliada nos tempos de retenção que equivalem aos enantiômeros do IMX (entre 8 a 10 min) ou do PI (3,5 min). Dessa forma, o método analítico obedece e garante a condição de seletividade.

**Figura 14.** Cromatograma referente ao estudo da seletividade do método



Condições cromatográficas: Coluna: Chiralcel-OD-H® (150 x 4,6 mm; 5µm); fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (79: 21 v/v); vazão: 0,8 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10 µL e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. Fonte: autoria própria.

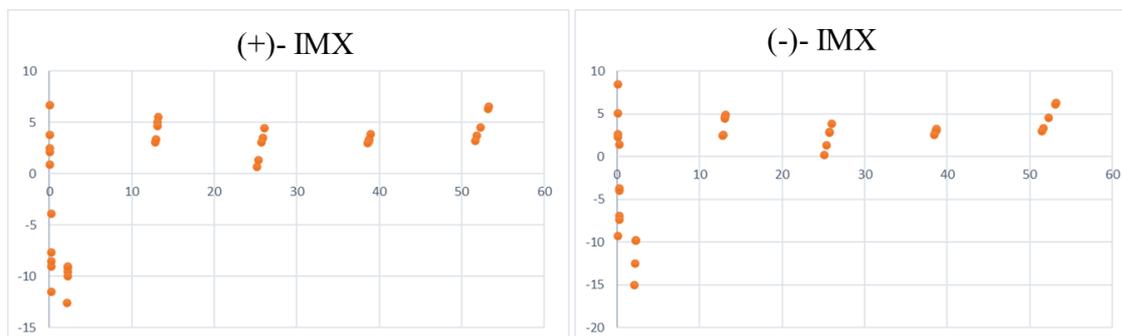
#### 4.6.2. Linearidade

A linearidade para cada enantiômero do IMX foi avaliada no intervalo de 0,103  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a 50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Não foi possível garantir a linearidade do método utilizando os métodos dos mínimos quadrados sem ponderação, pois, ao realizar a regressão linear, não foi obtida a exatidão para todas as concentrações avaliadas. Para tanto, foram realizadas regressões lineares com ponderação de diferentes pesos ( $1/x$ ,  $1/x^2$  e  $1/x^{1/2}$ ). A ponderação com peso  $1/x^2$  apresentou o menor valor para a soma dos erros relativos dos valores nominais e por isso foi utilizado.

**Tabela 26.** Linearidade do método para análise de IMX em estudos de permeabilidade

Analito	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
(+)-IMX	$y = 0,0651x - 0,0015$	0,997
(-)-IMX	$y = 0,0659x - 0,0028$	0,997

**Figura 15.** Gráfico de resíduo para análise dos enantiômeros do IMX com ponderação de  $1/x^2$



Fonte: autoria própria

A equação da reta e o coeficiente de correlação são apresentados na Tabela 26. O erro relativo para cada ponto da curva foi inferior a 15% e o gráfico de resíduos, apresentados na Figura 15, mostra a distribuição dos pontos ao longo da curva analítica o qual não apresenta tendência na distribuição, garantindo assim uma linearidade adequada para o desenvolvimento do método.

#### 4.6.3. Efeito residual

O efeito residual foi avaliado através da injeção de amostras do “branco” antes e depois das amostras correspondentes ao limite superior de quantificação e as respostas obtidas para estas foram inferiores aos limites preconizados pela ANVISA (resposta de 15% para interferentes no tempo de

retenção do analito quando comparadas as respostas obtidas pelo LIQ e 5% para o padrão interno) (ANVISA, 2012). Dessa forma, podemos concluir que o método desenvolvido não apresentou efeito residual entre as análises garantindo assim que não ocorra interferência das análises anteriores nas análises seguintes.

#### 4.6.4. Limite inferior de quantificação

A quantificação mínima permitida pelo método desenvolvido foi de  $0,103 \mu\text{g mL}^{-1}$  de IMX para os estudos de permeabilidade em células CACO-2, com erro relativo percentual de 3,18% e um desvio padrão relativo de 2,73 % para (+)-IMX e 1,84% e 11,09%, respectivamente, para o (-)-IMX. Esses valores estão dentro dos critérios de aceitabilidade (ANVISA, 2012).

#### 4.6.5. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas intra- e interensaio em quatro concentrações que correspondem ao LIQ, CQB, CQM e CQA. Nas Tabelas 27 e 28 podem ser observados os valores obtidos do erro relativo e do desvio padrão relativo os quais corroboram com os critérios de aceitabilidade da ANVISA (ANVISA, 2012).

**Tabela 27.** Precisão e exatidão intraensaio para análise do IMX em estudos de permeabilidade

	(+)-IMX	(-)-IMX
$C_{\text{nom}} (\mu\text{g mL}^{-1})$	0,103 / 0,296 / 25,004 / 37,507	0,103 / 0,296 / 25,004 / 37,507
$C_{\text{exp}} (\mu\text{g mL}^{-1})$	0,106 / 0,272 / 25,649 / 38,746	0,104 / 0,284 / 25,565 / 38,620
ER (%)	3,17 / -8,14 / 2,58 / 3,30	1,85 / -4,12 / 2,24 / 2,97
DPR (%)	2,73 / 3,27 / 1,54 / 0,35	11,09 / 4,32 / 1,41 / 0,24

$C_{\text{nom}}$  - Concentração nominal;  $C_{\text{exp}}$  - Concentração experimental; ER (%) - Erro relativo percentual; DPR (%) - Desvio padrão relativo

**Tabela 28.** Precisão e exatidão interensaio para análise do IMX em estudos de permeabilidade

	(+)-IMX	(-)-IMX
$C_{\text{nom}} (\mu\text{g mL}^{-1})$	0,103 / 0,296 / 25,004 / 37,507	0,103 / 0,296 / 25,004 / 37,507
$C_{\text{exp}} (\mu\text{g mL}^{-1})$	0,106 / 0,271 / 26,254 / 37,393	0,105 / 0,275 / 26,311 / 37,450
ER (%)	2,56 / -8,26 / 5,00 / -0,30	2,23 / -7,17 / 5,23 / -0,15
DPR (%)	0,43 / 0,26 / 7,77 / 4,58	0,64 / 3,21 / 7,99 / 4,46

$C_{\text{nom}}$  - Concentração nominal;  $C_{\text{exp}}$  - Concentração experimental; ER (%) - Erro relativo percentual; DPR (%) - Desvio padrão relativo

#### 4.6.6. Estabilidade

A estabilidade do *rac*-IMX foi avaliada nas concentrações referentes ao CQB e ao LSQ, 0,591 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. As amostras foram mantidas em estufa por 3 horas a 37°C, e posteriormente quantificadas com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia. Os resultados apresentados na Tabela 29, mostram a estabilidade do IMX, assegurando-se que o IMX não sofrerá degradação nas condições em que o estudo será realizado.

**Tabela 29.** Estabilidade do IMX nas condições do estudo da permeabilidade com células CACO-2

	<i>rac</i> -IMX	<i>rac</i> -IMX
$C_{\text{cont}}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,505	105,80
$C_{\text{exp}}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,508	110,54
ER (%)	0,50	4,47
DPR (%)	3,50	8,25

$C_{\text{cont}}$  - Concentração grupo controle;  $C_{\text{exp}}$  - Concentração experimental; ER (%) – Erro relativo percentual; DPR (%) – Desvio padrão relativo

### 4.7. Estudos de permeabilidade em células CACO-2

#### 4.7.1. Citotoxicidade

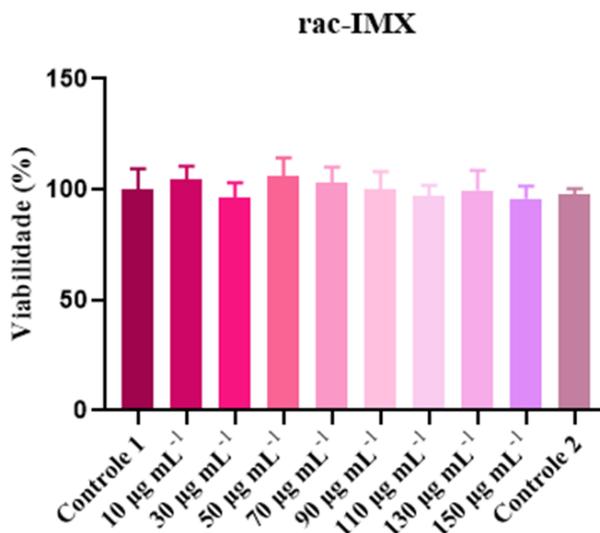
Anterior aos estudos de permeabilidade é necessário averiguar se o IMX apresenta efeitos tóxicos sobre as células CACO-2, e, além disso, determinar a concentração em que será possível a realização dos estudos sem que ocorra danos a monocamada das células CACO-2.

Dessa forma, foi realizado um ensaio colorimétrico utilizando o vermelho neutro, que avalia a viabilidade e o estado metabólico das células através da capacidade de entrar no seu interior e corar os lisossomos, ou seja, se o xenobiótico ou o praguicida avaliado levar a morte celular, estas não serão coradas pelo vermelho neutro.

Os ensaios para determinar a viabilidade das células CACO-2 foram realizados com *rac*-IMX em uma faixa de concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e com os enantiômeros isolados, (+)-IMX e (-)-IMX, na faixa de 12,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

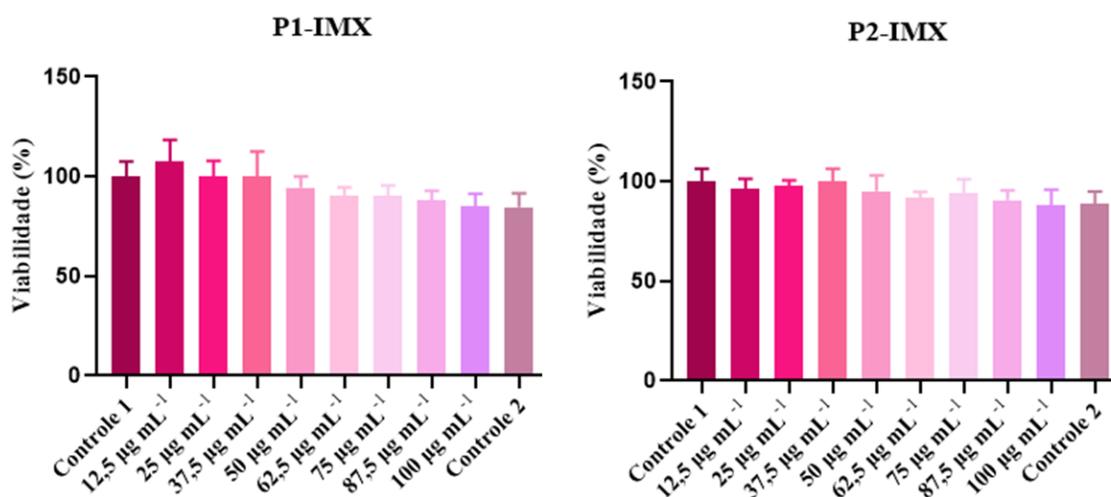
A viabilidade foi avaliada após 3 horas de incubação a 37°C, tempo que simula os experimentos de permeabilidade *in vitro*. Os resultados indicaram que a viabilidade celular não é alterada com relação a diferentes concentrações avaliadas tanto para a mistura racêmica como para os enantiômeros isolados, conforme apresentado nas Figuras 16 e 17.

**Figura 16.** Viabilidade celular das diferentes concentrações avaliadas para mistura racêmica do IMX



Fonte: autoria própria

**Figura 17.** Viabilidade celular das diferentes concentrações avaliadas para os enantiômeros isolados do IMX



Fonte: autoria própria

Como não houve diferença significativa para as concentrações avaliadas podemos concluir que nenhuma dessas concentrações foram tóxicas para as células CACO-2 pelo menos até o período de 3 horas de incubação. Com base nesses resultados as concentrações que serão utilizadas no estudo de permeabilidade podem contemplar qualquer valor da faixa para o respectivo analito avaliado pois não houve efeito citotóxico.

#### 4.7.2. Absorção intestinal in vitro

As células diferenciadas CACO-2 são consideradas referências para estudos de permeabilidade intestinal in vitro de fármacos e produtos químicos e tem sido amplamente utilizado para prever a absorção e metabolismo in vivo, além de caracterizar o transporte de compostos através do epitélio intestinal (ARAUJO et al., 2020)

O coeficiente de permeabilidade aparente,  $P_{app}$  ( $\text{cm s}^{-1}$ ) foi o parâmetro usado para descrever o transporte do *rac*-IMX e seus enantiômeros e foi estimado de acordo com a Equação 3.

Nesse estudo, as células CACO-2 foram semeadas em placas Transwell® e mantidas em cultura por 21 dias. O transporte dos compostos avaliados foi avaliado na direção absorptiva e os perfis de permeabilidade foram obtidos pela sua quantificação no meio do compartimento receptor nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.

No tempo 0 foi quantificado os compostos individualmente do compartimento apical ( $M_0$ ), ou seja, o compartimento doador em que é inserido o composto. A quantificação da massa no compartimento apical da mistura racêmica do IMX e de seus enantiômeros isolados está apresentada na Tabela 30

**Tabela 30.** Quantificação do tempo 0 no compartimento apical do IMX

IMX	Massa média ( $\mu\text{g}$ )	DPR (%)
<i>rac</i> -IMX	56 ( $\pm 3$ )	5
(+)-IMX	39 ( $\pm 1$ )	2
(-)-IMX	46 ( $\pm 1$ )	2

DPR = desvio padrão relativo em porcentagem (n = 3)

Já as quantificações no meio do compartimento receptor nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos nos fornece a informação do coeficiente angular entre a massa acumulada e o tempo ( $\Delta Q/\Delta t$ ) e são apresentadas nas Tabelas 31, 32 e 3, respectivamente para cada composto avaliado.

**Tabela 31.** Quantificação do compartimento basolateral em relação ao tempo do composto *rac*-IMX

Tempo (s) <sup>a</sup>	Massa basolateral (ng)	Massa na alíquota (ng)	Massa acumulada (ng)	$\Delta Q/\Delta t$
0	0	0	0	
3600	8819	147	8819	
7200	16639	277	16786	1,49
10800	15092	252	15275	

<sup>a</sup> cada tempo foi avaliado em triplicata

**Tabela 32.** Quantificação do compartimento basolateral em relação ao tempo do composto (+)-IMX

Tempo (s) <sup>a</sup>	Massa basolateral (ng)	Massa na alíquota (ng)	Massa acumulada (ng)	$\Delta Q/\Delta t$
0	0	0	0	
3600	7517	125	7517	
7200	15119	252	15245	1,61
10800	16528	275	16690	

<sup>a</sup> cada tempo foi avaliado em triplicata

**Tabela 33.** Quantificação do compartimento basolateral em relação ao tempo do composto (-)-IMX

Tempo (s) <sup>a</sup>	Massa basolateral (ng)	Massa na alíquota (ng)	Massa acumulada (ng)	$\Delta Q/\Delta t$
0	0	0	0	
3600	12367	206	12367	
7200	20696	345	20902	2,48
10800	26445	441	26885	

<sup>a</sup> cada tempo foi avaliado em triplicata

Com base nos resultados obtidos, o valor de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) de cada composto foi calculado e é apresentado na Tabela 34.

**Tabela 34.** Permeabilidade aparente do *rac*-IMX, (+)-IMX e (-)-IMX

Composto	$P_{app}$ (cm/s)
<i>rac</i> -IMX	$3,57 \times 10^{-5}$
(+)-IMX	$5,54 \times 10^{-5}$
(-)-IMX	$7,26 \times 10^{-5}$

Os valores da  $P_{app}$  indicam que os três compostos avaliados, tanto a mistura racêmica, quanto os enantiômeros isolados do IMX são compostos que possuem alta permeabilidade ( $P_{app} > 1 \times 10^{-5}$

cm s<sup>-1</sup>) (EMA, 2020), dessa forma podemos concluir que não existe diferença de classificação de permeabilidade entre as formas enantioméricas e a mistura racêmica do IMX (*rac*-IMX, (+)-IMX e (-)-IMX).

#### 4.7.3. Validação do modelo in vitro utilizando marcadores de permeabilidade

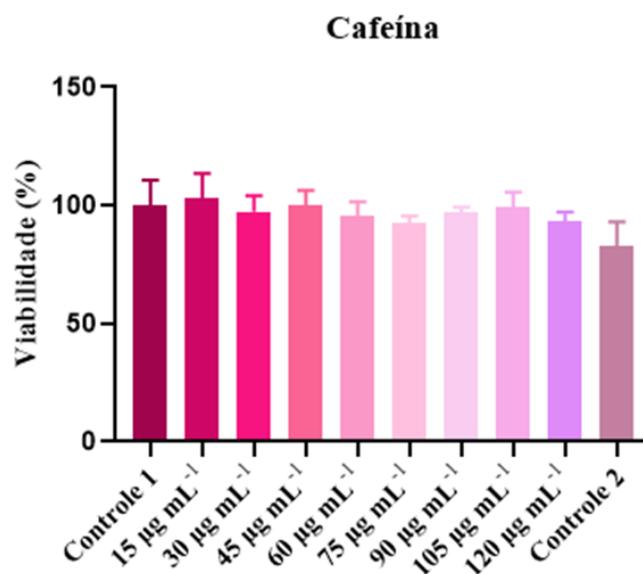
Para garantir que os estudos in vitro tenham um desempenho comparável a um estudo in vivo, ou seja, propor uma similaridade em termos de segurança e eficácia, são predefinidos limites aceitáveis de bioequivalência e biodisponibilidade entre substâncias. A abordagem baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS, do inglês, *Biopharmaceutics Classification System*) reduz a necessidade de estudos de bioequivalência in vivo e assim fornecem substitutos para bioequivalência in vivo.

O BCS é uma abordagem científica baseada nas características de solubilidade e permeabilidade intestinal de substâncias e as categoriza em quatro classes: i) alta solubilidade e alta permeabilidade, ii) baixa solubilidade e alta permeabilidade, iii) alta solubilidade e baixa permeabilidade e iv) baixa solubilidade e baixa permeabilidade (EMA, 2020).

Dados da literatura são fornecidos para fundamentar e apoiar as determinações de solubilidade, já a avaliação da permeabilidade pode ser avaliada por métodos in vitro validados e padronizados usando células CACO-2. A adequabilidade dos ensaios de células CACO-2 nos estudos de permeabilidade segundo a abordagem BCS deve ser demonstrada estabelecendo uma relação de ordem de classificação entre os valores de permeabilidade experimental e a extensão da absorção do fármaco em seres humanos usando como modelo fármacos de zero, baixa (<50%), moderada (50-84%) e alta (≥85%) permeabilidade.

Como o *rac*-IMX e seus enantiômeros, (+)-IMX e (-)-IMX, apresentaram ser compostos de alta permeabilidade foi feito uma validação do modelo utilizando um composto de alta permeabilidade segundo dados da literatura (EMA, 2020), a cafeína.

Inicialmente foi avaliado a citotoxicidade da cafeína frente às células CACO-2. Os ensaios para determinar a viabilidade foi realizado em uma faixa de concentração de 15 µg mL<sup>-1</sup> a 150 µg mL<sup>-1</sup>. Os resultados indicaram que a viabilidade celular não é alterada em relação a concentração avaliada conforme apresentado na Figura 18.

**Figura 18.** Viabilidade celular das diferentes concentrações avaliadas para cafeína

Fonte: autoria própria

Como não houve diferença significativa para nenhuma das concentrações avaliadas, pode-se concluir que nenhuma dessas concentrações foram tóxicas para as células CACO-2 pelo menos até o período de 3 horas de incubação. Com base nesses resultados a concentração de cafeína que será utilizada será de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

Após o ensaio de citotoxicidade um método analítico para quantificação de cafeína em estudos de permeabilidade foi validado. O resultado da validação assim como procedimento experimental estão descritos no Anexo 1.

Após validação, a quantificação da cafeína no compartimento apical ( $M_0$ ) foi realizada e os resultados estão apresentados na Tabela 35.

**Tabela 35.** Quantificação no tempo 0 no compartimento apical do composto cafeína

Analito	Massa média (µg)	DPR (%)
cafeína	224 (±5)	2

DPR = desvio padrão relativo em porcentagem (n = 3)

Já a quantificação no meio do compartimento receptor nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos que fornece a informação do coeficiente angular entre a massa acumulada e o tempo ( $\Delta Q/\Delta t$ ) é apresentada na Tabela 36.

**Tabela 36.** Quantificação do compartimento basolateral em relação ao tempo do composto cafeína

Tempo (s) <sup>a</sup>	Massa basolateral (ng)	Massa na alíquota (ng)	Massa acumulada (ng)	$\Delta Q/\Delta t$
0	0	0	0	
3600	141998	2367	141998	18,1
7200	178445	2974	180030	
10800	191209	3187	194824	

<sup>a</sup> cada tempo foi avaliado em triplicata

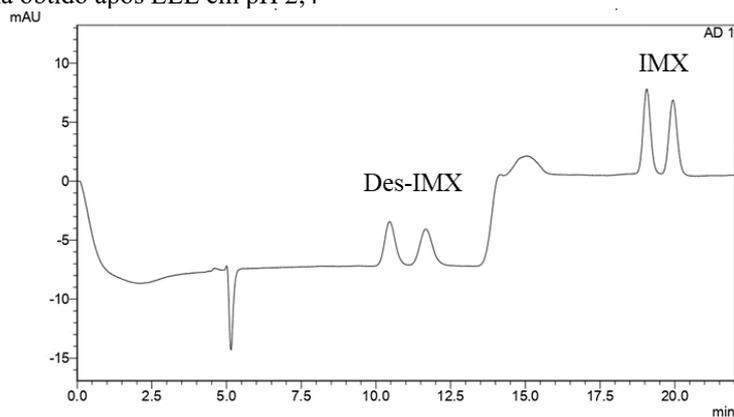
O valor da  $P_{app}$  calculada da cafeína é de  $1,08 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ . Esse valor corrobora com os dados da literatura que indicam que a cafeína é um composto que possui alta permeabilidade ( $P^{app} > 1 \times 10^{-5}$ ) (EMA, 2020). Dessa forma podemos concluir que os dados obtidos para o IMX de alta permeabilidade respondem da mesma forma que um fármaco modelo de alta permeabilidade.

#### 4.8. Estudos de metabolismo in vitro com microsomas hepáticos de humanos

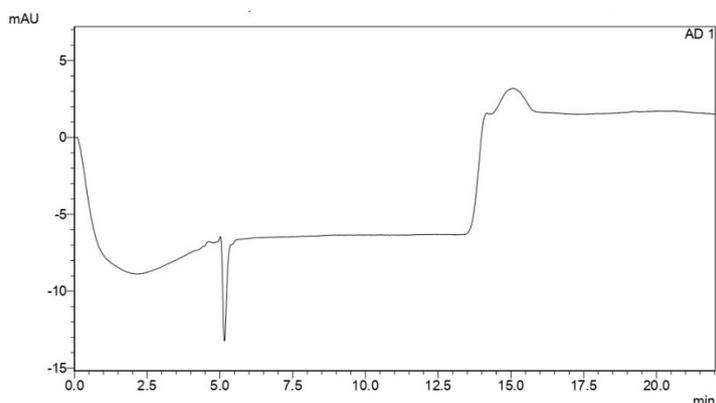
##### 4.8.1. Preparo de amostra para estudos de metabolismo in vitro

O preparo de amostra para os estudos de metabolismo in vitro é necessário, pois os microsomas hepáticos de humanos são matrizes biológicas que contém diversos compostos endógenos, como proteínas e sais; portanto a extração líquido-líquido (ELL) foi empregada como técnica de extração. Essa técnica baseia-se na partição do analito entre duas fases, uma aquosa e outra orgânica e para garantir que essa partição da fase aquosa ocorra para fase orgânica (fase extratora) é necessário que o analito se encontre na forma neutra. Portanto, o controle do pH para a extração de compostos ionizáveis é uma importante etapa a se avaliar no preparo de amostras por ELL.

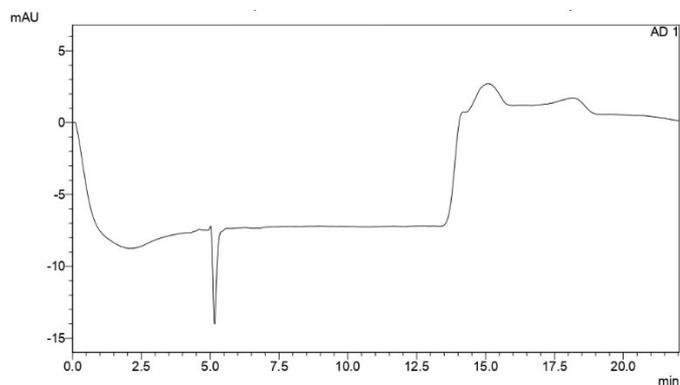
A fim de determinar qual o melhor valor de pH para extração do IMX e seu metabólito Des-IMX, três valores de pH foram avaliados: 2,4, 7,4 e 12,0, utilizando o acetato de etila como solvente extrator. Os cromatogramas exibidos nas Figuras 19, 20 e 21 apresentam os perfis de extração nos diferentes valores de pH avaliados. Como pode ser observado na Figura 19 é possível notar que a extração do IMX e do Des-IMX ocorre somente em meio ácido (pH 2,4). Dessa maneira, nas etapas de *screening* e otimização da extração dos analitos do meio microsomal as amostras foram acidificadas com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2 mol  $\text{L}^{-1}$ , de forma a garantir que o pH da extração ocorra em pH ácido (pH entre 2 e 3).

**Figura 19.** Cromatograma obtido após ELL em pH 2,4

Condições cromatográficas: Coluna: Chiralcel OD-H® (150 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m); fase móvel: solvente A (1% de ácido fórmico em H<sub>2</sub>O) e solvente B (1% de ácido fórmico em ACN) e eluição por gradiente (0 min, 85% A; 7,5 min, 73% A; 16,5 min, 15%); vazão: 0,38 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10  $\mu$ L e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. A concentração da solução de IMX é de 27,8  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e da solução de Des-IMX é de 39,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Fonte: autoria própria.

**Figura 20.** Cromatograma obtido após ELL em pH 7,4

Condições cromatográficas: Coluna: Chiralcel OD-H® (150 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m); fase móvel: solvente A (1% de ácido fórmico em H<sub>2</sub>O) e solvente B (1% de ácido fórmico em ACN) e eluição por gradiente (0 min, 85% A; 7,5 min, 73% A; 16,5 min, 15%); vazão: 0,38 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10  $\mu$ L e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. Fonte: autoria própria.

**Figura 21.** Cromatograma obtido após ELL em pH 12

Condições cromatográficas: Coluna: Chiralcel OD-H® (150 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m); fase móvel: solvente A (1% de ácido fórmico em H<sub>2</sub>O) e solvente B (1% de ácido fórmico em ACN) e eluição por gradiente (0 min, 85% A; 7,5 min, 73% A; 16,5 min, 15%); vazão: 0,38 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10  $\mu$ L e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. Fonte: autoria própria

A extração em meio ácido garante que os compostos a serem extraídos se mantenham de forma neutra, isso pode ser explicado a partir da estrutura do IMX e seu metabólito Des-IMX (Figura 1), que apresentam um grupamento ácido, além disso, os valores de pKa referentes à ionização do IMX (Tabela 1) são de 2,3 e 3,3, portanto os compostos não estarão totalmente ionizados em pH entre 2,0 e 3,0 (pH que ocorre a extração).

Na etapa de *screening* utilizou-se um planejamento fatorial fracionado. A resposta avaliada aqui será a recuperação somente do metabólito, Des-IMX, pois esse será o analito quantificado após o metabolismo do IMX. Os efeitos dos fatores na resposta avaliada, recuperação do metabólito Des-IMX, para  $\alpha = 0,10$  e  $p < 0,10$ , são descritos na Tabela 37.

**Tabela 37.** Efeitos dos fatores estimados para recuperação do Des-IMX

Fator	Efeito	Valor de p
Volume Acetato de etila ( $\mu\text{L}$ )	0,0757	0,071
Tempo de agitação (minutos)	0,0992	0,027
Velocidade de agitação (rpm)	0,0517	0,189
Concentração NaCl (%) ( $\text{m v}^{-1}$ )	-0,0006	0,987

Baseado na análise dos efeitos, para a recuperação do Des-IMX, os fatores que possuem efeitos significativos nas respostas, valor de  $p < 0,10$ , são o volume de acetato de etila e o tempo de agitação. Além disso, esses dois fatores possuem efeitos positivos para recuperação, sendo assim, para etapa de otimização os níveis desses dois fatores foram aumentados até condições experimentalmente viáveis.

Na etapa de otimização foi empregado o DCCR. Os coeficientes de regressão, erro padrão e o valor de p para a recuperação do Des-IMX, são apresentados na Tabela 38.

**Tabela 38.** Coeficientes de regressão do DCCR para a recuperação do Des-IMX

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor de p
Constante	0,4917	0,0361	0,000
Volume acetato de etila	0,1030	0,0221	0,006
Tempo de agitação	0,0100	0,0221	0,670
Volume acetato de etila x Volume acetato de etila	0,0056	0,0263	0,841
Tempo de agitação x Tempo de agitação	0,0188	0,0263	0,508
Volume acetato de etila x Tempo de agitação	0,0024	0,0313	0,941

De acordo com a Tabela 38, considerando  $p < 0,05$ , o único efeito significativo foi o termo linear do volume de acetato de etila. Ao mudar a região experimental do tempo de agitação, esse fator se tornou não mais significativo.

Dessa forma, a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 39, considera somente o termo estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 79,10% e o teste F foi significativo. Entretanto, como somente um fator foi significativo não foi possível obter uma superfície de resposta que correlacione os fatores significativos com a resposta.

**Tabela 39.** ANOVA para a recuperação do Des-IMX

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub> ( $\alpha=0,05$ )
<b>Regressão</b>	1	0,08	0,085	34,06	5,12
<b>Resíduo</b>	9	0,02	0,002		
<b>Falta de ajuste</b>	7	0,02	0,002	0,89	19,35
<b>Erro puro</b>	2	0,01	0,003		
<b>Total</b>	10	0,11			

O modelo matemático obtido é expresso através da Equação 8 onde V é o volume de acetato de etila. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo.

$$\text{Recuperação}_{\text{Des-IMX}} = 0,5094 + 0,1030V \quad \text{Equação 8}$$

Podemos observar um efeito positivo do volume de acetato de etila na recuperação do Des-IMX. Dessa maneira, a fim de obter uma alta recuperação de Des-IMX, escolheu-se o maior valor codificado (1,41) de volume de acetato de etila, 1700  $\mu\text{L}$  e fixou-se o tempo de agitação no menor valor codificado (-1,41), em 15 minutos, já que em tempos de agitação maiores, esse valor não possui efeito significativo a ponto de aumentar a recuperação de Des-IMX. Nessas condições, foi possível obter uma taxa de recuperação do metabólito Des-IMX de 66% com coeficiente de variação de 8%.

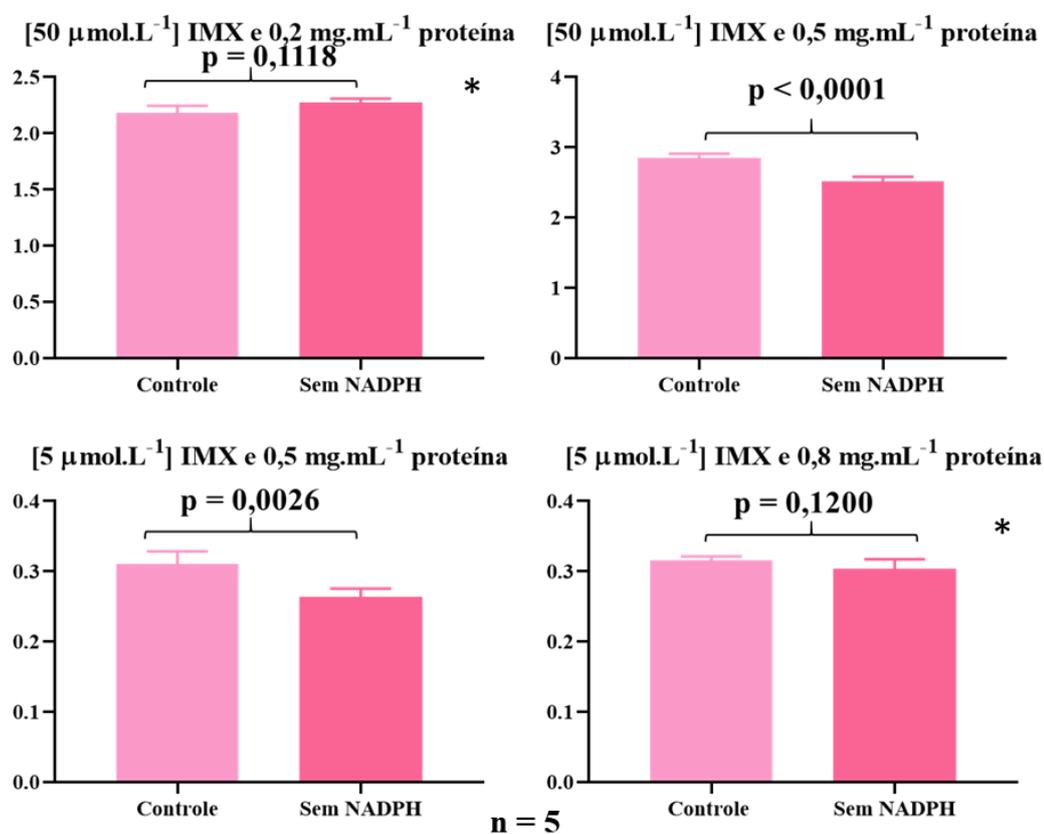
#### 4.8.2. Estabilidade do IMX em meio microssomal

No estudo de estabilidade do IMX em meio microssomal, foram comparadas as áreas entre os grupos controles que não foram submetidos ao processo de incubação e amostras que são submetidas ao processo de incubação. Para tanto, foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram valores de p superiores a 0,05, para as quais não há diferença significativa entre o controle e as amostras que foram submetidas ao tempo máximo de incubação (marcados com asterisco na Figura

22). Como pode ser observado na Figura 22, o IMX se manteve estável no meio de incubação nas concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de proteína microsomal e de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  de proteína microsomal.

Apesar de nas concentrações de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de proteína microsomal o valor de p ser inferior a 0,05 e, portanto, haver diferença significativa entre o grupo controle e amostra, não houve a formação de produtos de degradação que poderiam interferir na análise do metabolismo. Dessa forma, podemos considerar os estudos até mesmo nessas condições pois não haveria a formação de possíveis interferentes que atrapalhariam a quantificação dos metabólitos.

**Figura 22.** Gráfico de barras da área dos grupos controle e amostras em meio de incubação para o teste de estabilidade



Fonte: autoria própria

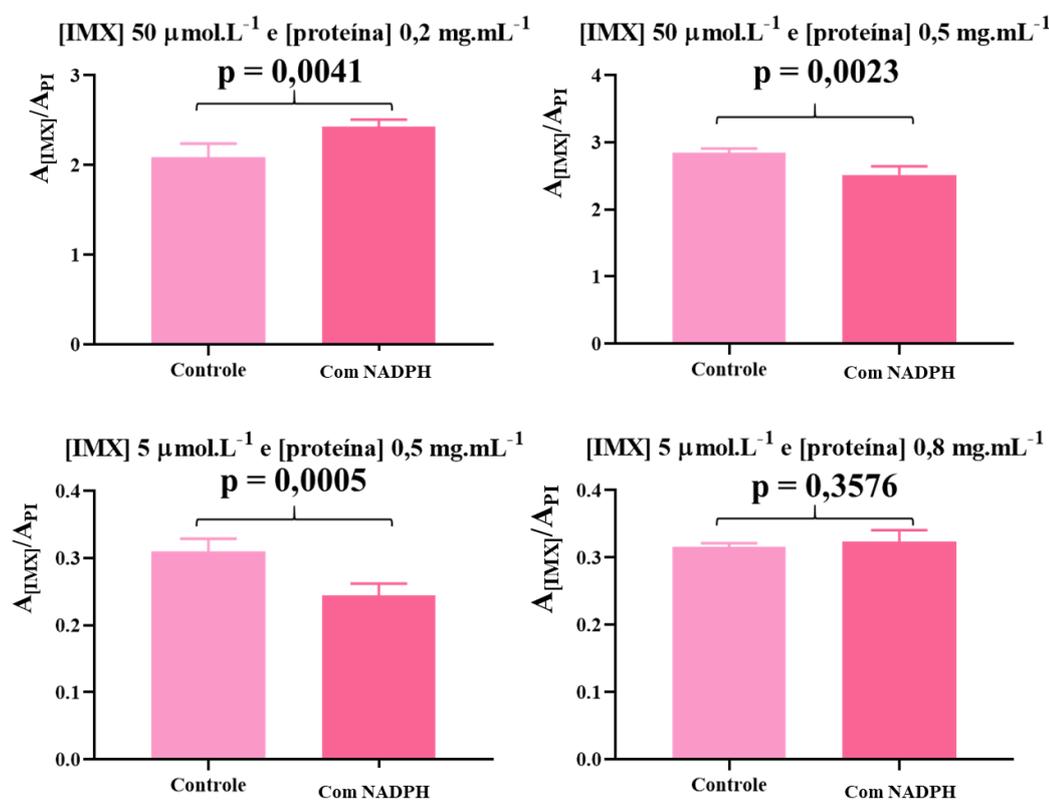
#### 4.8.3. Estudo piloto de metabolismo in vitro

Um estudo prévio de metabolismo in vitro foi realizado para investigar se as enzimas do CYP450 presentes nos microsomas hepáticos de humanos são capazes de metabolizar o herbicida IMX assim confirmar um possível metabolismo de fase I. Para tanto, foi feita uma triagem

empregando diferentes concentrações da mistura racêmica do IMX e de diferentes concentrações de proteínas microsossomais. As reações foram realizadas a 37°C por 40 minutos na presença do cofator NADPH. Grupos controles, na ausência do cofator, também foram realizados.

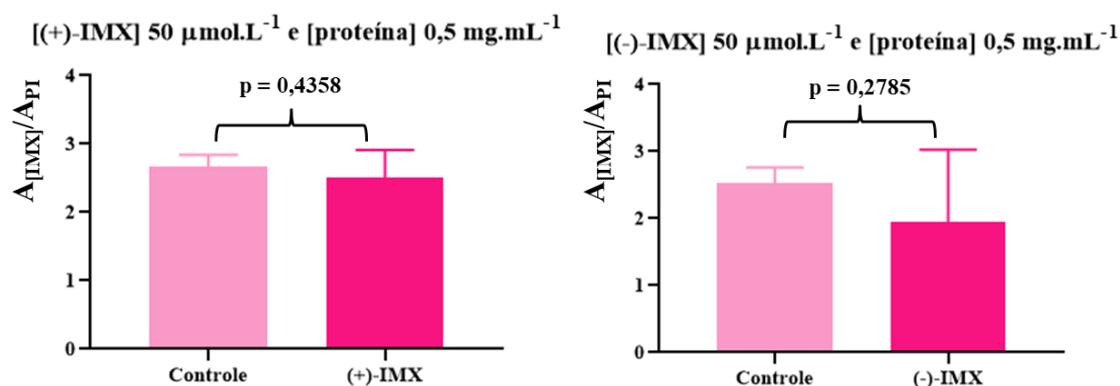
Como pode ser observado na Figura 23, apesar do decaimento significativo (considerando  $p < 0,05$ ) da área das amostras que continham os cofatores em comparação com os controles, para as concentrações de proteína  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , não foi observado a formação do metabólito Des-IMX em qualquer concentração de proteína ou de *rac*-IMX avaliadas. Já para os ensaios feitos com os enantiômeros isolados (Figura 24) não houve um decaimento significativo do IMX e, além disso, mais uma vez, não foi possível observar a formação do metabólito Des-IMX.

**Figura 23.** Estudo piloto de metabolismo in vitro com HLM em diferentes concentrações de *rac*-IMX e proteínas microsossomais



Fonte: autoria própria

**Figura 24.** Estudo piloto de metabolismo in vitro com HLM empregando os enantiômeros isolados do IMX



Fonte: autoria própria

A partir dos resultados obtidos no estudo prévio de metabolismo in vitro é possível constatar que as enzimas do CYP450 não são capazes de metabolizar a mistura racêmica do IMX e nem os enantiômeros isolados do IMX nas condições avaliadas nesse estudo. O metabolismo de xenobióticos (in vitro e in vivo) é ocasionado por um conjunto de reações enzimáticas que (bio)transformam essas moléculas em metabólitos mais polares para que sejam excretados, normalmente pela urina (BARREIRO; FRACA, 2015). Essas reações ocorrem principalmente em duas fases: reações de fase I e fase II. Na primeira fase, um grupo funcional é introduzido na molécula original que a torna mais polar. As reações químicas mais comuns nessa fase são hidroxilação aromática, hidroxilação alifática, N-desalquilação oxidativa, O-desalquilação oxidativa, S-oxidação, redução e hidrólise (CRETOL; PETROVIC; MURRAY, 2010). Além disso, as isoformas das enzimas do CYP450 são as responsáveis por essas reações de fase I. Já nas reações de fase II o produto obtido na fase I, ou o próprio substrato, é convertido em produtos mais polares por conjugação com grupos endógenos hidrofílicos tais como ácido glicurônico (CRETOL; PETROVIC; MURRAY, 2010).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos inferir que o IMX não é sofre reação de fase I. Entretanto, seu metabolismo ainda pode ocorrer por outras vias, como por exemplo, nas reações de fase II ou ser excretado inalterado pela urina. Tal hipótese pode ser corroborada pela alta solubilidade em água do IMX (Tabela 1).

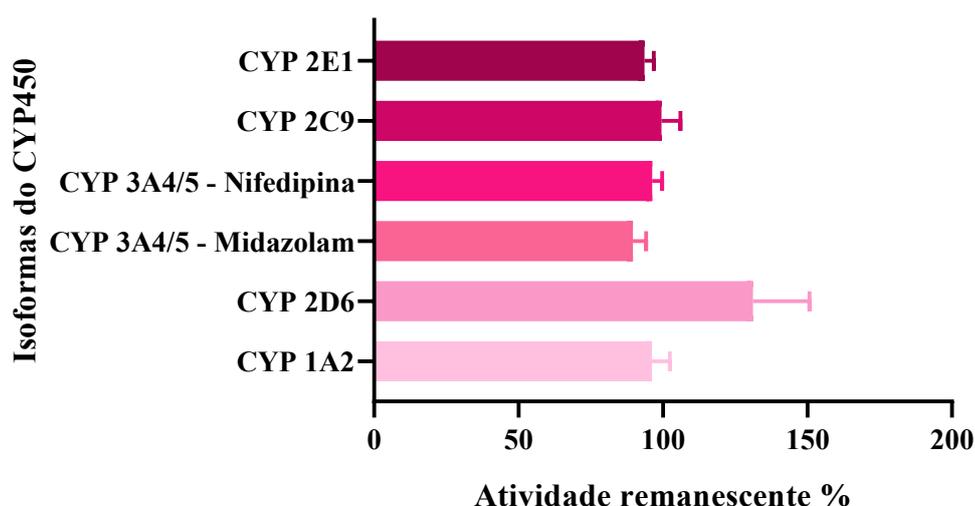
#### 4.9. Triagem do potencial inibitório do IMX sobre as principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos

As principais enzimas envolvidas no metabolismo da maioria dos xenobióticos são as enzimas do CYP450. Devido possibilidade de exposição humana a praguicidas e nesse caso ao IMX torna-se importante a avaliação do potencial inibitório do IMX sobre as principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos. O uso concomitante de medicamentos e a exposição a praguicidas pode acarretar interações que resultam em inibição enzimática (WALSKY; BOLDT, 2008). A inibição enzimática (por exemplo das enzimas dos CYP450) causa uma diminuição ou perda da atividade enzimática, levando a um aumento da concentração do fármaco no organismo e possíveis efeitos tóxicos (PELKONEN et al., 1998).

Nos estudos de inibição, inicialmente é realizado uma etapa de triagem do potencial inibitório do praguicida sobre as principais enzimas do CYP450 avaliando a atividade enzimática remanescente (AR%), ou seja, a porcentagem de inibição de uma da enzima avaliada pelo praguicida considerando apenas uma única concentração. Se o praguicida inibir 50% da atividade enzimática abre a possibilidade de etapas mais avançadas, tais como determinação do valor de IC<sub>50</sub>, constante de inibição (K<sub>i</sub>) e mecanismo de inibição.

A triagem inicial para avaliar se o *rac*-IMX poderia inibir algumas das principais enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos mostrou que, na concentração avaliada (100 μmol L<sup>-1</sup>), o IMX não diminui a AR% das isoformas avaliadas (Figura 25).

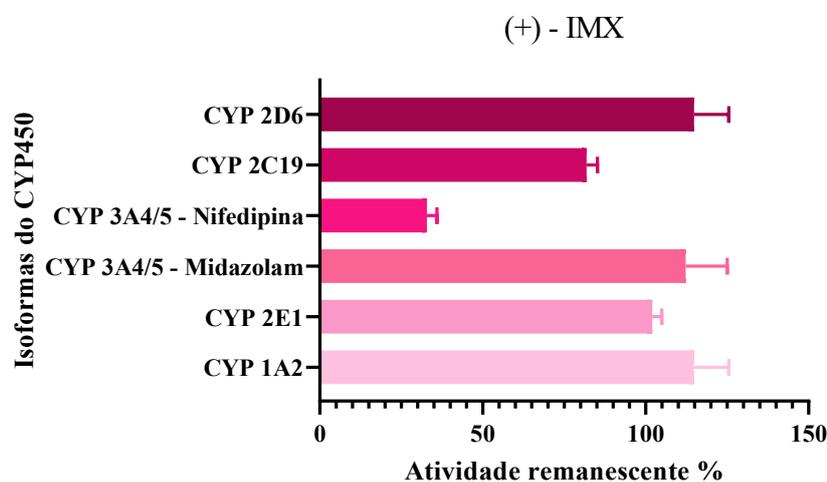
**Figura 25.** Atividade enzimática remanescente das isoformas do CYP450 na presença de IMX



Já avaliando o potencial inibitório dos enantiômeros isolados frente as principais enzimas do CYP450 na concentração avaliada ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), os resultados (Figuras 26 e 27) demonstraram que o enantiômero (+)-IMX apresentou um potencial inibição frente a isoforma CYP 3A4/5 (quando nifedipina foi utilizada como marcador) pois resultou em uma AR% menor que 50%. Os resultados obtidos para CYP 2C9 na presença dos enantiômero isolados não foram adequados, por isso não serão apresentados aqui e serão refeitos em etapas futuras. Ademais, nenhuma outra isoforma avaliada foi inibida pelos enantiômeros isolados.

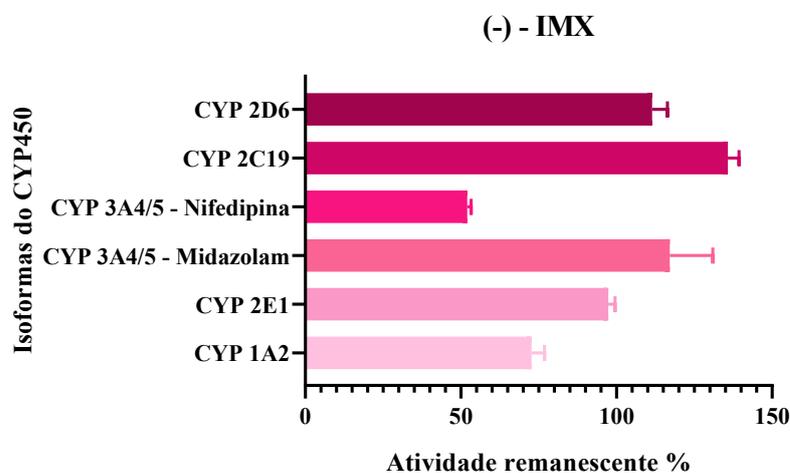
Esse resultado de potencial inibitório do enantiômero (+)-IMX sobre a CYP 3A4/5 abre a possibilidade de estudos para etapas mais avançadas como a determinação do  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{K}_i$  e mecanismo de inibição.

**Figura 26.** Gráfico de barras relacionando a AR% com as isoformas do CYP450 para o enantiômero (+) – IMX



Fonte: autoria própria

**Figura 27.** Gráficos de barras relacionado a AR% com as isoformas do CYP450 para o enantiômero (-) - IMX



Fonte: autoria própria

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho, através do desenvolvimento de métodos enantiosseletivos para análise do herbicida IMX e seu metabólito Des-IMX, otimizados por planejamento experimental, foi possível a realização dos estudos *in vitro* de permeabilidade empregando células CACO-2 e de metabolismo utilizando microsomas hepáticos de humanos. Os métodos desenvolvidos apresentaram tempo de análise e resolução adequada. Além disso, o método desenvolvido para a análise enantiomérica do IMX para os estudos de permeabilidade empregando células CACO-2 foram validados e os resultados obtidos corroboraram com os critérios de aceitabilidade da ANVISA.

Por meio dos estudos de permeabilidade empregando células CACO-2 foram obtidos os valores da permeabilidade aparente para a mistura racêmica do IMX e para os enantiômeros isolados. A partir dos valores obtidos nesse trabalho, podemos concluir que os três compostos avaliados do IMX apresentam a mesma classificação, alta permeabilidade.

Já através dos resultados obtidos do metabolismo *in vitro* utilizando microsomas hepáticos de humanos, pode-se observar que as enzimas do CYP450 presentes nos HLM não foram capazes de metabolizar o IMX (tanto a mistura racêmica quanto os enantiômeros isolados). Entretanto, não se descarta a possibilidade de metabolismo por outras vias metabólicas. Além disso, na triagem do potencial inibitório do IMX sobre as principais enzimas do CYP450, a mistura racêmica do IMX e o (-)-IMX não apresentaram potencial inibitório, no entanto, a forma enantiomérica (+)-IMX apresentou um potencial inibitório sobre a isoforma CYP 3A4/5, que abre a possibilidade de estudos de inibição mais avançados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Guia de validação de métodos bioanalíticos. **Resolução RDC N.º 27**, 2012.
- ANVISA. Imazamox. **Índice Monográfico ANVISA**, p. 63–73, 2018.
- ARAUJO, M. et al. Assessment of intestinal absorption/metabolism of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and three 3-MCPD monoesters by Caco-2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 67, 1 set. 2020.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1699–1722, 2010.
- BARREIRO, E. J.; FRACA, C. A. M. **Química Medicinal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BRUNTON, L. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. [s.l: s.n.].
- BUERGE, I. J. et al. Behavior of the Chiral Herbicide Imazamox in Soils: PH-Dependent, Enantioselective Degradation, Formation and Degradation of Several Chiral Metabolites. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 5725–5732, 2019.
- CABRERA, A.; CELIS, R.; HERMOSÍN, M. C. Imazamox-clay complexes with chitosan- and iron(III)-modified smectites and their use in nanoformulations. **Pest Management Science**, v. 72, n. 7, p. 1285–1294, 2016.
- CARRÃO, D. B. et al. Enantioseparation of pesticides: A critical review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 122, 2020.
- CARVALHO, F. P. Pesticides , environment , and food safety. 2017.
- CHEN, Y. et al. Occurrence, distribution and risk assessment of pesticides in a river-reservoir system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, n. September, p. 320–327, 2018.
- CRETOL, S.; PETROVIC, N.; MURRAY, M. **Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Drug Metabolism** **Current Pharmaceutical Design**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.hapmap.>>.
- DE ALBUQUERQUE, N. C. P. et al. Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 89–109, 2018.
- EMA. ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers Step 5. **Science Medicines Health**, 2020.
- EPA, U. Imazamox Technical. **U.S. Environmental Protection Agency**, 2020.

EU, C. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imazamox. **EFSA Journal**, v. 14, n. 4, p. 39–42, 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, n. April, p. 202–211, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Pesticides indicators**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>>. Acesso em: 29 mar. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The International Code of Conduct on Pesticide Management**. Rome: [s.n.].

GARRISON, A., ET AL. **Chiral Pesticides : Stereoselectivity and Its Consequences**. Washinton: ACS Symposium Series; American Chemical Society, 2011.

GIL-MONREAL, M.; ROYUELA, M.; ZABALZA, A. Hypoxic treatment decreases the physiological action of the herbicide imazamox on pisum sativum roots. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1–14, 2020.

GOMES, K. A.; SANTOS, A. L. R.; FARIA, A. M. EVALUATION of MOBILE PHASE ADDITIVES and TEMPERATURE on COLUMN LIFETIME for HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. **Quimica Nova**, v. 43, n. 3, p. 300–306, 1 mar. 2020.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 910, p. 2–13, 2012.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2111–2119, 2007.

JIN, J. et al. Sub-lethal effects of herbicides penoxsulam, imazamox, fluridone and glyphosate on Delta Smelt (*Hypomesus transpacificus*). **Aquatic Toxicology**, v. 197, n. January, p. 79–88, 2018.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond? **Science**, v. 341, n. 6147, p. 759–765, 2013.

LIU, Y. et al. Enantioselective toxicity and oxidative stress effects of acetochlor on earthworms (*Eisenia fetida*) by mediating the signaling pathway. **Science of the Total Environment**, v. 766, p. 142630, 2021.

MD MEFTAUL, I. et al. Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134612, 2020.

MICHAEL C. R. ALAVANJA; MATTHEW R. BONNER. Occupation pesticide exposures and cancer risk. A review. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.

MOREIRA, R. Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X. p. 1–2, 2016.

MOUSAVI, L.; TAMIJI, Z.; KHOSHAYAND, M. R. Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review. **Talanta**, v. 190, n. August, p. 335–356, 2018.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. **População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

NASIRI, M.; AHMADZADEH, H.; AMIRI, A. Sample preparation and extraction methods for pesticides in aquatic environments: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 123, p. 115772, 2020.

O'NEIL, M. J. (ED. ). **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013.

PASCUAL AGUILAR, J. A. et al. Pesticide occurrence in the waters of Júcar River, Spain from different farming landscapes. **Science of the Total Environment**, v. 607–608, p. 752–760, 2017.

PELKONEN, O. et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes For personal use only. **Xenobiotica**, v. 28, p. 1203–1253, 1998.

PEROVANI, I. S.; SERPELLONE, C. O.; DE OLIVEIRA, A. R. M. An appraisal of experimental designs: Application to enantioselective capillary electromigration techniques. **Electrophoresis**, p. 1–18, 2021.

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.

RICHARDSON, J. R. et al. Neurotoxicity of pesticides. **Acta Neuropathologica**, v. 138, n. 3, p. 343–362, 2019.

SAHU, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590–611, 2018.

SAKALIENE, O. et al. Sorption and predicted mobility of herbicides in Baltic soils. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 42, n. 6, p. 641–647, 2007.

SEVIM, Ç. et al. An imazamox-based herbicide causes apoptotic changes in rat liver and pancreas. **Toxicology Reports**, v. 6, n. November 2018, p. 42–50, 2019.

SHARMA, R. K. et al. Insecticides and ovarian functions. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n. January, 2020.

SHEN, Y. et al. In vitro assessment of corticosteroid effects of eight chiral herbicides. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 55, n. 2, p. 91–102, 2020.

SHIYIN YEE. In vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man-Fact or Myth. **Pharmaceutical Research**, v. 14, 1997.

SIMEONOV, L. I.; MACAEV, F. Z.; SIMEONOVA, B. G. Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe. **NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security**, v. 134, 2013.

TADINI, M. C. et al. Predicting absorption of amphotericin B encapsulated in a new delivery system by an in vitro Caco-2 cell model. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 71, 1 maio 2022.

TSATSAKIS, A. et al. The effect of chronic vitamin deficiency and long term very low dose exposure to 6 pesticides mixture on neurological outcomes – A real-life risk simulation approach. **Toxicology Letters**, v. 315, n. July, p. 96–106, 2019.

TUDI, M. et al. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 1–24, 2021.

VERA CANDIOTI, L. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

WALSKY, R. L.; BOLDT, S. E. **In Vitro Cytochrome P450 Inhibition and Induction Current Drug Metabolism**. [s.l.: s.n.].

WEI, J. et al. Enantioselective Phytotoxicity of Imazamox Against Maize Seedlings. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 242–247, 2016.

YE, J. et al. Enantioselective environmental toxicology of chiral pesticides. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 325–338, 2015.

## ANEXO 1

### *Validação do método analítico para quantificação de cafeína em estudos de permeabilidade utilizando células CACO-2*

#### **1. Materiais e métodos**

A condição cromatográfica para a quantificação de cafeína emprega uma coluna aquiral Ascentis Express Fused Core<sup>®</sup> C18 (100 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m) (Supelco, PA, EUA) e uma coluna de guarda Ascentis Express<sup>®</sup> C18 (5 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m, Supelco), com o modo de eluição isocrático utilizando as proporções de fase móvel H<sub>2</sub>O (0,1 % de ácido fórmico):ACN (50: 50 v/v); vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10  $\mu$ L e temperatura: 30°C. O analito foi analisado no comprimento de onda de 280 nm e o tempo de corrida foi de 5 minutos.

O método analítico foi validado pela avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito residual, limite inferior de quantificação (LIQ) e precisão e exatidão.

Em tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup> foram adicionados 20  $\mu$ L de solução de cafeína e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Após a secagem, foram adicionados 25  $\mu$ L de solução tampão HHBS, 75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura e 50  $\mu$ L da solução de PI, cetoprofeno. Não houve necessidade de um preparo de amostra, pois os estudos em células CACO-2 tinham como matriz a solução tampão HHBS a qual não apresentou incompatibilidade com o sistema de análise. Além disso, as concentrações empregadas na validação foram relativamente altas, não havendo necessidade de concentração das amostras. Os critérios de aceitabilidade foram baseados no guia de validação de métodos bioanalíticos, Resolução RDC N<sup>o</sup> 27, 2021, da ANVISA (ANVISA, 2012).

##### 1.1. Seletividade

Para a avaliação da seletividade do método foram analisadas (n=3) amostras contendo 25  $\mu$ L de solução tampão HHBS, 50  $\mu$ L de MeOH e 75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, sem adição de cafeína e PI, observando a ocorrência de interferentes da matriz com o mesmo tempo de retenção destes. As respostas de picos interferentes no mesmo tempo de retenção do analito e PI foram consideradas aceitáveis se inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e 5% da resposta para o PI (ANVISA, 2012).

## 1.2. Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi realizada no intervalo de concentração de cafeína de 9,999  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 35,089  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A curva analítica foi construída pela correlação entre as concentrações e as razões da área da cafeína e do PI obtidas, sem a necessidade de ponderação. A correlação dos dados foi avaliada a partir do coeficiente de correlação ( $r$ ) das curvas, do erro relativo de cada ponto e do gráfico de resíduos.

## 1.3. Efeito residual

O efeito residual foi avaliado através da injeção de uma amostra “branco” (sem adição de cafeína e PI), seguida pela injeção de uma amostra correspondente ao limite superior de quantificação e na sequência, outras duas amostras “branco”. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito e do PI foram consideradas aceitáveis se inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e 5% da resposta para o PI (ANVISA, 2012).

## 1.4. Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação foi definido como primeiro ponto da curva analítica, ou seja, 9,999  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Como critério de aceitabilidade foi definido como erro padrão relativo e desvio padrão relativo  $\pm 20\%$  e  $20\%$ , respectivamente. A determinação foi realizada em quintuplicata.

## 1.5. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas ( $n=5$ ) nas concentrações de cafeína correspondente ao LIQ, 9,999  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ao controle de qualidade baixo (CQB), 15,092  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ao controle de qualidade médio (CQM), 25,091  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e ao controle de qualidade alto (CQA), 29,996  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A exatidão foi expressa como erro padrão relativo percentual (ER%) e foi considerada aceitável se estivesse entre  $\pm 20\%$  para o LIQ e  $\pm 15\%$  para as demais concentrações (ANVISA, 2012). Já a precisão foi avaliada como desvio padrão relativo percentual (DPR%) e foram consideradas aceitáveis até 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações (ANVISA, 2012).

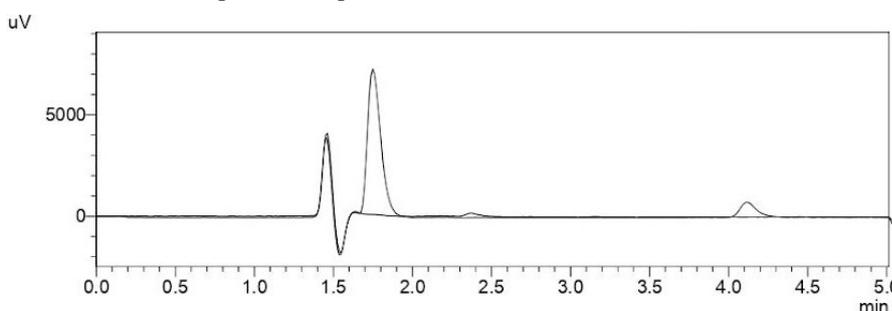
Na determinação da precisão/exatidão intraensaio foram realizados experimentos no mesmo dia. Já na precisão/exatidão interensaio, os experimentos foram realizados em 3 dias consecutivos, sendo realizadas curvas analíticas para quantificação do IMX diariamente.

## 2. Resultados e Discussão

### 2.1. Seletividade

A seletividade garante que a análise da cafeína e do PI ocorra sem interferentes de outros constituintes da amostra. A Figura 1 apresenta um cromatograma referente a análise da solução tampão HHBS na ausência da cafeína e PI sobreposto a um cromatograma da análise de cafeína do PI. Como pode ser observado, não há identificação de interferentes na matriz avaliada nos tempos de retenção que equivalem a cafeína e PI. Dessa forma, o método analítico obedece e garante a condição de seletividade.

Figura 1. Seletividade do método analítico para o composto cafeína



Condições cromatográficas: Coluna: Ascentis® Express C18 (15 cm x 4,6 mm; 2,7  $\mu$ m); fase móvel: 50% H<sub>2</sub>O e 50%ACN + 0,1% ácido fórmico; vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 10  $\mu$ L e temperatura: 30°C. Os analitos foram analisados no comprimento de onda de 280 nm. Fonte: autoria própria.

### 2.2. Linearidade

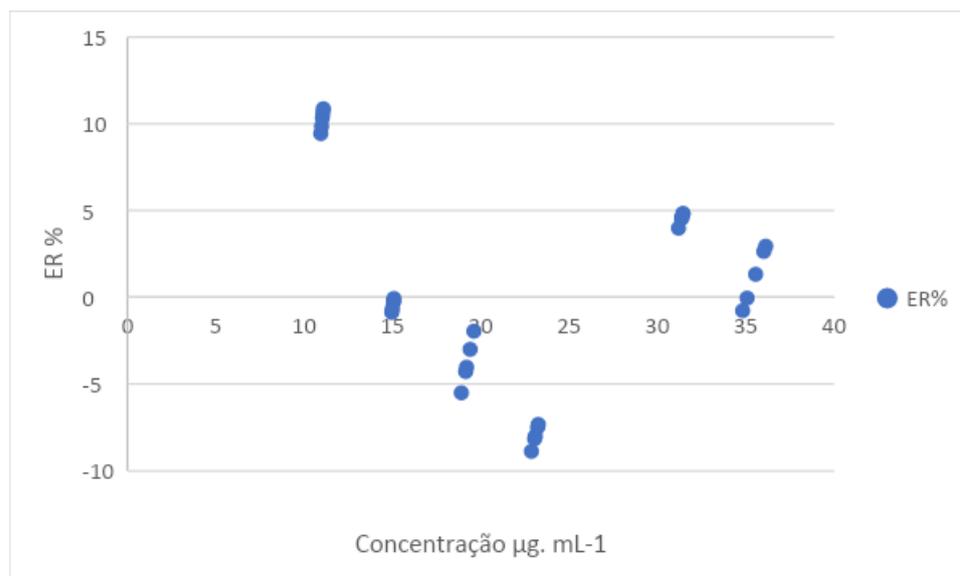
A linearidade para foi avaliada no intervalo de 9,99  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> a 35,089  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. A linearidade do método empregado foi assegurada sem a necessidade de ponderação, uma vez que, ao realizar a regressão linear, a exatidão foi obtida para todas as concentrações avaliadas (ER% > 15%).

A equação da reta e o coeficiente de correlação encontram-se na Tabela 1. O erro relativo para cada ponto da curva foi inferior a 15% e o gráfico de resíduos (Figura 2) mostrou uma distribuição aleatória dos pontos ao longo da curva analítica, garantindo assim uma adequada linearidade para o método desenvolvido.

**Tabela 1.** Linearidade do método para análise da permeabilidade da cafeína em células CACO-2

Equação linear	R <sup>2</sup>
y = 0,8083x – 6,3923	0,9821

**Figura 2.** Gráfico de resíduo para a cafeína sem ponderação



Fonte: Autoria própria

### 2.3. Efeito residual

O efeito residual foi avaliado através da injeção de amostras do “branco” antes e depois das amostras correspondentes ao limite superior de quantificação e as respostas obtidas para estas foram inferiores aos limites preconizados pela ANVISA (resposta de 15% para interferentes no tempo de retenção do analito quando comparadas as respostas obtidas pelo LIQ e 5% para o padrão interno), (ANVISA 2012). Dessa forma, podemos concluir que o método desenvolvido não apresentou efeito residual entre as análises garantindo assim que não ocorra interferência das análises anteriores nas análises seguintes.

### 2.4. Limite inferior de quantificação

A quantificação mínima permitida pelo método desenvolvido foi de 9,999 µg mL<sup>-1</sup> de cafeína para os estudos de permeabilidade em células CACO-2, com erro relativo percentual de 10,227% e um desvio padrão relativo de 1,860%. Esses valores estão dentro dos critérios de aceitabilidade (ANVISA, 2012).

### 2.5. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas intra- e interensaio em quatro concentrações que correspondem ao LIQ, CQB, CQM e CQA. Na Tabela 2 e Tabela 3 podem ser observados os valores obtidos do erro relativo e do desvio padrão relativo os quais corroboram com os critérios de aceitabilidade da ANVISA (ANVISA, 2012).

**Tabela 2.** Precisão e exatidão intraensaio para análise da permeabilidade da cafeína em células CACO-2

	<b>LIQ</b>	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>
<b>C<sub>nom</sub> (µg. mL<sup>-1</sup>)</b>	9,999	15,092	25,091	29,996
<b>C<sub>exp</sub> (µg. mL<sup>-1</sup>)</b>	11,021	15,029	23,090	31,362
<b>ER (%)</b>	10,226	-0,418	-7,972	4,554
<b>DPR (%)</b>	1,859	0,706	1,012	0,437

C<sub>nom</sub>- Concentração nominalC<sub>exp</sub> – Concentração experimental

ER (%) – Erro relativo percentual

DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

**Tabela 3.** Precisão e exatidão interensaio para análise da permeabilidade da cafeína em células CACO-2

	<b>LIQ</b>	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>
<b>C<sub>nom</sub> (µg. mL<sup>-1</sup>)</b>	9,960	15,068	25,028	29,976
<b>C<sub>exp</sub> (µg. mL<sup>-1</sup>)</b>	10,233	14,889	24,557	30,503
<b>ER (%)</b>	2,727	-1,187	-1,874	1,755
<b>DPR (%)</b>	2,289	2,907	4,146	1,993

C<sub>nom</sub>- Concentração nominalC<sub>exp</sub> – Concentração experimental

ER (%) – Erro relativo percentual

DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual