

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo de biotransformação de fármacos através de
Cunninghamella elegans ATCC 9245

Julia Medeiros Sorrentino

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo de biotransformação de fármacos através de
Cunninghamella elegans ATCC 9245

Dissertação apresentada por Julia Medeiros Sorrentino para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de março de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr^a. Amanda Thomas Barden

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr^a. Fátima Menezes Bento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Sorrentino, Julia Medeiros
Estudo de biotransformação de fármacos através de
Cunninghamella elegans ATCC 9245 / Julia Medeiros
Sorrentino. -- 2017.
129 f.

Orientador: Martin Steppe.
Coorientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Biotransformação. 2. Fármacos. 3. Metabólitos.
4. Cunninghamella elegans ATCC 9245. 5. CLAE. I.
Steppe, Martin, orient. II. Fuentefria, Alexandre
Meneghello, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos, do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre. O autor recebeu bolsa de estudos CAPES.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas felizmente, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Ao PPGCF pela oportunidade da realização da pós-graduação de excelência reconhecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste projeto

À banca examinadora pelas contribuições e discussões enriquecedoras deste trabalho

Aos meus orientadores, Prof. Martin Steppe e Alexandre M. Fuentefria, pela oportunidade, orientação e convívio.

Aos professores do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos, que sempre foram muito prestativos e exemplares de dedicação ao ensino.

Aos meus colegas de laboratório que, em pouco tempo de convivência, se revelaram amigos. Grata pelo acolhimento, auxílio analítico, estudos e discussões.

Às bolsistas de iniciação científica, Natália Olegário, Sendy Sales e Karina Gallé, pelo auxílio essencial para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos que apoiaram e torceram a favor das minhas decisões e por compreenderem minhas eventuais ausências devido ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao meus pais, João e Vera, e meus irmãos, Lucas e Matheus, pelo incentivo e suporte para a realização do mestrado, gratidão eterna.

Enfim, agradeço a todas as pessoas envolvidas direta e indiretamente na minha formação pessoal e profissional durante a construção deste trabalho.

RESUMO

Os fungos filamentosos apresentam sistema enzimático semelhante à via de metabolismo enzimático formado pelo citocromo P450 de mamíferos. Através desse sistema, reações de fase I (oxidativa) e fase II (conjugação) biotransformam diferentes classes de fármacos com o objetivo de facilitar a excreção desses pelo organismo. Os estudos de biotransformação de fármacos surgem como uma alternativa aos estudos farmacológicos e de desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com investimento reduzido. Além disso, permitem uma possibilidade de produção de padrões analíticos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de biotransformação dos fármacos linagliptina, vildagliptina, ticagrelor, rivaroxabana e metronidazol utilizando o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. Para o monitoramento do processo de biotransformação deste estudo, amostras de biotransformação e de controle de degradação do fármaco foram coletadas e tratadas com diferentes solventes orgânicos a fim de otimizar o processo de extração líquido-líquido dos fármacos e metabólitos formados. O acompanhamento da formação dos metabólitos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas (EM) ou ultravioleta (UV). A biotransformação dos fármacos metronidazol e ticagrelor resultou num consumo do fármaco em cultivo e formação de novos picos cromatográficos de estruturas químicas. Os resultados relacionados à linagliptina e rivaroxabana demonstram que ocorre um consumo dos fármacos pela *C. elegans*, representado pela redução das concentrações dos fármacos. Entretanto, houve aumento das concentrações após determinado período de incubação. Devido às características químicas da vildagliptina, a extração líquido-líquido não se apresentou adequada para a execução desta etapa dificultando as análises. Este trabalho ainda apresenta o desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica por CLAE aplicada ao metronidazol por ser o único fármaco a apresentar a formação de metabólito detectável por CLAE-UV.

Palavras-chave: biotransformação; metabólitos; gliptinas; rivaroxabana; ticagrelor; metronidazol; CLAE; validação.

ABSTRACT

Filamentous fungi model can be used for simulating the mammalian metabolism of many molecules of pharmacological importance. The common way of metabolizing drugs involves the alteration of functional groups, as well documented via the cytochrome P450 enzymes. Reactions of phase I (oxidative) and phase II (conjugation) can biotransform different classes of drugs with the objective of facilitating the excretion of the organism. Drug biotransformation studies appear as an alternative to pharmacological studies of metabolites, development of new drug candidates with reduced investment as well as the most efficient production of chemical structures involves and drug quality control studies. The objective of this study was to evaluate the capacity of drugs biotransformation to linagliptin, vildagliptin, ticagrelor, rivaroxaban and metronidazole through the filamentous fungus *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. For the monitoring of the biotransformation process, samples of biotransformation assay and drug degradation control were collected and treated with different organic solvents to optimize the liquid-liquid extraction process of the formed drugs and metabolites. The monitoring of metabolite formation was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass or ultraviolet (UV) spectrophotometry. The results of the biotransformation of metronidazole and ticagrelor drugs showed drug consumption in culture and formation of new chromatographic peaks of chemical structures not elucidated. Results related to linagliptin and rivaroxaban demonstrate that they occur in a consumption of drugs by *C. elegans* ATCC 9245, represented by the reduction of drug concentrations in the culture medium, with the subsequent return as initial concentrations of the experiments. Due to the chemical characteristics of vildagliptin, a liquid-liquid extraction did not present adequate for an execution of this stage and difficult the analyses. This work also presents the development and the validation of the bioanalytical methodology applied to HPLC for metronidazole because it is the only drug to present a metabolite formation detectable by HPLC-UV.

Keywords: biotransformation; metabolites; vildagliptin; linagliptin; rivaroxaban; ticagrelor; metronidazole; HPLC; bioanalytical method validation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura I - 1 Estrutura química da linagliptina | 48 |
| Figura I - 2 Metabólitos formados a partir da linagliptina em humanos.. | 48 |
| Figura I - 3 Estrutura química da vildagliptina. | 49 |
| Figura I - 4 Metabolismo da vildagliptina em humanos. | 50 |
| Figura I - 5 Cromatograma de padrão de linagliptina em fase móvel com metanol..... | 57 |
| Figura I - 6 Cromatograma padrão de linagliptina em fase móvel TEA 1 % : ACN (80:20, v/v).. | 58 |
| Figura I - 7 Cromatograma comparativo entre padrão de linagliptina e o fármaco após etapa extrativa com 4 ciclos de diclorometano.. | 59 |
| Figura I - 8 Cromatograma da análise de amostra de controle positivo após processo de extração..... | 60 |
| Figura I - 9 Cromatograma representativo de meio de cultivo Czapek submetido a processo extrativo..... | 61 |
| Figura I - 10 Cromatogramas comparativos entre Controle Negativo e Biotransformação..... | 61 |
| Figura I - 11 Espectrograma em perspectiva 3D da amostra biotransformação da linagliptina em meio de cultivo Czapek após 8 dias de incubação.. | 62 |
| Figura I - 12 Cromatograma do padrão de vildagliptina utilizando fase móvel tampão fosfato de potássio 50 mM. | 63 |
| Figura I - 13 Cromatograma do padrão de vildagliptina em fase móvel composta por TEA 0,3 % (pH 7,0) : ACN (85:15, v/v).. | 64 |
| Figura I - 14 Cromatogramas comparativos do meio de cultivo Czapek submetido ao processo de extração e cromatograma representativo de amostra de vildagliptina submetida a extração do meio de cultivo Czapek | 66 |
| | |
| Figura II - 1 Estrutura química do ticagrelor. | 71 |
| Figura II - 2 Estruturas químicas dos principais metabólitos de ticagrelor | 72 |
| Figura II - 3 Estrutura química da rivaroxabana | 72 |
| Figura II - 4 Proposta de metabólitos da rivaroxabana em humanos..... | 74 |
| Figura II - 5 Cromatograma do padrão de ticagrelor em fase móvel ACN:TEA 0,5%..... | 81 |

| | |
|---|-----|
| Figura II - 6 Cromatogramas sobrepostos de controle negativo e biotransformação com 240 horas de incubação..... | 82 |
| Figura II - 7 Cromatogramas representativos do ensaio de biotransformação de amostras de 5 dias de incubação em meio Czapek..... | 83 |
| Figura II - 8 Cromatograma do padrão de rivaroxabana (50 µg.mL ⁻¹) eluído e fase móvel TEA 0,5 % : ACN, 43:57 (v/v). | 84 |
| Figura II - 9 Cromatogramas resultantes da análise por CLAE de amostras após etapa de extração da rivaroxabana por diclorometano em meio Czapek e padrão do fármaco. | 85 |
| Figura II - 10 Gráfico demonstrativo do perfil de consumo de rivaroxabana por <i>C. elegans</i> ATCC 9245 em meio Czapek 50 %..... | 86 |
| Figura II - 11 Cromatogramas comparativos entre controle negativo e biotransformação de 96 horas..... | 86 |
| Figura II - 12 Cromatograma e espectro de massas da rivaroxabana..... | 87 |
| Figura II - 13 Cromatogramas de meio Czapek, Controle positivo, Controle negativo e Biotransformação..... | 88 |
| Figura II - 14 Cromatogramas das análises por UHPLC das amostras de biotransformação e controle negativo. | 89 |
| Figura III - 1 Estrutura química do metronidazol..... | 93 |
| Figura III - 2 Metabólitos derivados do metronidazol em humanos | 94 |
| Figura III - 3 Cromatogramas comparativos de amostra do controle negativo.e de amostra submetida à biotransformação com <i>C. elegans</i> ATCC 9245 após 96 horas de incubação..... | 101 |
| Figura III - 4 Gráfico do perfil de consumo de metronidazol em sistema de biotransformação por <i>C. elegans</i> ATCC 9245 em meio Czapek..... | 102 |
| Figura III - 5 Cromatograma representativo de seletividade do método bioanalítico para metronidazol..... | 103 |
| Figura III - 6 Gráfico de Pareto representando os efeitos dos fatores e da interação entre os fatores para as respostas | 106 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela I- 1 Composição do meio de cultivo caldo Czapek..... | 54 |
| Tabela I- 2 Composição do meio de cultivo ágar Sabouraud..... | 55 |
| Tabela I- 3 Composição do ensaio de biotransformação | 56 |
| Tabela I - 4 Parâmetros obtidos para análise de linagliptina em fase móvel composta por TEA 1 % : ACN (80 : 20, v/v)..... | 58 |
| Tabela I - 5 Parâmetros cromatográficos obtidos na análise do padrão de linagliptina..... | 59 |
| Tabela I - 6 Parâmetros resultantes da análise do padrão de vildagliptina (500 µg.mL ⁻¹) em fase móvel constituída por tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0) : ACN (85:15)..... | 63 |
| Tabela I - 7 Parâmetros obtidos da análise do padrão de vildagliptina (500 µg.mL ⁻¹) utilizando a fase móvel TEA 0,3 % (pH 7,0) : ACN (85 : 15). | 64 |
| Tabela II - 8 Condições cromatográficas iniciais para a análise de ticagrelor (GOBETTI et al., 2015)...... | 80 |
| Tabela II - 9 Modificações avaliadas na otimização cromatográfica para o ticagrelor..... | 80 |
| Tabela III - 10 Linearidade do método para determinação de metronidazol em meio de cultivo Czapek..... | 103 |
| Tabela III - 11 Precisão e exatidão do método de validação para análise de metronidazol em meio de cultivo Czapek. | 104 |
| Tabela III - 12 Estabilidade do metronidazol em meio de cultivo Czapek nos ciclos de congelamento/ descongelamento e bancada por 12 horas | 105 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

bbCID - *Broadband Collision Induced Dissociation*

BTX – benzeno, tolueno e isômeros do xileno

CG – Cromatografia Gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CYP450 – Citocromo P 450

DDP-4 - Dipeptidil peptidase-4

DMF - Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMT2 – Diabetes *Mellitus* Tipo 2

DO – Densidade óptica

DPR – Desvio Padrão Relativo

E % - Erro relativo

EC – Eletroforese Capilar

EFS – Extração fase sólida

ELL – Extração Líquido-líquido

EM – Espectrometria de Massas

GIP – *Gastric inhibitory peptide*

GLP-1 - Glucagon-*Like* peptídeo-1

LABIOCON – Laboratório de Bioconversões

LD – Limite de Detecção

LIQ – Limite Inferior de Quantificação

NADPH - Fosfato de dinucleotidio de nicotinamida e adenina

P.A. – Pró-Análise

PDA – *Photo Diode Array* (arranjo de fotodiodo)

PTBI - 2-[4-(3-metoxipropoxi)-3-metilpiridina-2-il]

RPM – Rotações por minuto

TEA – Trietilamina

Tr – Tempo de retenção

UFG – Universidade Federal de Goiás

UHPLC – *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

UHPLC-QTOF-MS - Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a analisador de massas por tempo de voo

UV – Ultravioleta

v/v - Volume/Volume

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO..... | 25 |
| OBJETIVOS | 29 |
| Objetivo Geral..... | 31 |
| Objetivos Específicos | 31 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 33 |
| Estudos de biotransformação por micro-organismos | 35 |
| Citocromo P450..... | 39 |
| Técnicas extrativas..... | 40 |
| Técnicas analíticas..... | 42 |
| CAPÍTULO I Biotransformação de linagliptina e vildagliptina | 45 |
| 1 Introdução | 47 |
| 2 Materiais e métodos | 51 |
| 2.1 Otimização das condições cromatográficas..... | 51 |
| 2.1.1 Linagliptina..... | 51 |
| Fármacos, solventes e reagentes | 51 |
| Equipamentos | 51 |
| Método | 51 |
| 2.1.2 Vildagliptina | 52 |
| Fármacos, solventes e reagentes | 52 |
| Equipamentos | 52 |
| Métodos..... | 52 |
| 2.2 Processo de extração dos analitos | 53 |
| Reagentes e solventes..... | 53 |
| 2.3 Biotransformação..... | 54 |
| Reagentes e solventes..... | 54 |
| Equipamentos | 54 |
| Métodos..... | 54 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 3 | Resultados e discussão | 57 |
| 3.1 | Linagliptina | 57 |
| 3.1.1 | Otimização das condições cromatográficas | 57 |
| 3.1.2 | Otimização do processo de extração do analito | 59 |
| 3.1.3 | Biotransformação | 60 |
| 3.2 | Vildagliptina | 62 |
| 3.2.1 | Otimização das condições cromatográficas | 62 |
| 3.2.2 | Otimização do processo de extração do analito | 65 |
| 4 | Conclusões | 67 |
| CAPÍTULO II Biotransformação de ticagrelor e rivaroxabana..... | | 69 |
| 1 | Introdução | 71 |
| 1.1 | Ticagrelor | 71 |
| 1.2 | Rivaroxabana | 72 |
| 2 | Materiais e métodos..... | 76 |
| 2.1 | Otimização das condições cromatográficas | 76 |
| Materiais | 76 | |
| Métodos | 76 | |
| 2.2 | Etapa de extração dos fármacos em meio Czapek | 77 |
| Materiais | 77 | |
| Métodos | 77 | |
| 2.3 | Ensaio de biotransformação..... | 78 |
| Materiais | 78 | |
| Métodos | 78 | |
| 2.4 | Análise das amostras de biotransformação da rivaroxabana por UHPLC - QTOF - MS | 79 |
| 3 | Resultados e discussão | 80 |
| 3.1 | Ticagrelor | 80 |
| 3.1.1 | Otimização das condições cromatográficas | 80 |
| 3.1.2 | Etapa de extração do fármaco | 81 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1.3 | Biotransformação..... | 82 |
| 3.2 | Rivaroxabana..... | 83 |
| 3.2.1 | Otimização das condições cromatográficas..... | 83 |
| 3.2.2 | Biotransformação..... | 85 |
| 4 | Conclusões..... | 90 |

CAPÍTULO III Biotransformação de metronidazol e validação analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 91

| | | |
|-----|---|-----|
| 1 | Introdução | 93 |
| 2 | Materiais e métodos | 95 |
| 2.1 | Processo de extração | 95 |
| | Materiais..... | 95 |
| | Método | 95 |
| | Análise por cromatografia líquida | 96 |
| 2.2 | Ensaio de Biotransformação do metronidazol | 96 |
| | Materiais..... | 96 |
| | Método | 97 |
| 2.3 | Validação do método cromatográfico para a determinação de metronidazol em meio de cultivo Czapek..... | 98 |
| | Materiais..... | 98 |
| | Métodos..... | 98 |
| 3 | Resultados e discussão..... | 101 |
| 3.1 | Etapa de extração do fármaco..... | 101 |
| 3.2 | Biotransformação..... | 101 |
| 3.3 | Validação bioanalítica | 102 |
| | Seletividade..... | 102 |
| | Linearidade..... | 103 |
| | Limite de Detecção (LD) e Limite Inferior de Quantificação (LIQ) | 103 |
| | Precisão e Exatidão | 104 |
| | Estabilidade..... | 105 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Robustez..... | 105 |
| 4 Conclusões | 108 |
| DISCUSSÃO GERAL e CONCLUSÕES..... | 109 |
| REFERÊNCIAS..... | 119 |

INTRODUÇÃO

A biotransformação pode ser compreendida como o uso de sistemas biológicos para a síntese de compostos químicos através de metodologias biotecnológicas e analíticas. Como modelo de sistema de biotransformação, o uso do metabolismo de micro-organismos permite modificações de grupamentos funcionais de compostos biologicamente ativos que, geralmente, só seriam possíveis através de reações químicas convencionais. Sendo assim, os estudos de biotransformação apresentam-se aplicados em diferentes áreas como nos estudos de biodegradação de compostos poluentes na recuperação de ambientes quimicamente comprometidos, síntese de estruturas químicas com potencial farmacêutico além de estudos farmacológicos de novos fármacos (BORGES *et al.*, 2009; SAKAKI *et al.*, 2002; SHERAFATMAND; NG, 2015).

Entre os diversos organismos empregados nos estudos de biotransformação, os fungos do gênero *Cunninghamella* são considerados um dos mais importantes em processos de biotransformação de diversas classes de fármacos. Diversos estudos demonstram a capacidade desses fungos em metabolizar uma grande variedade de fármacos, fazendo uso de mecanismos semelhantes à Fase I (oxidativa) e Fase II (conjugação) da CYP450 de mamíferos. Sendo assim, eficiente nos estudos de biotransformação de fármacos, em função da esteroespecificidade de suas enzimas, é possível produzir metabólitos de interesse (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; BARTH, 2012; QUINN *et al.*, 2015; SRISAILAM *et al.*, 2010).

Contudo, para o monitoramento dos metabólitos formados nos estudos de biotransformação, são necessários o desenvolvimento de técnicas analíticas adequadas de recuperação, identificação e quantificação dos analitos. O tratamento das amostras é essencial para que se obtenha resultados confiáveis e satisfatórios nas análises de separação e na detecção de compostos presentes em matriz complexa, composta por meio de cultivo e presença de células fúngicas. Para isso, são empregadas técnicas de extração dos analitos em matriz complexa. Através de técnicas como as extrações líquido-líquido, por fase sólida ou através de fluido supercrítico são utilizadas a fim de extrair os metabólitos do meio de cultivo, eliminando possíveis interferentes, além de concentrar os metabólitos a serem analisados (ERNY; CIFUENTES, 2006).

Entre as principais técnicas analíticas relacionadas a estes estudos para identificação e quantificação, são aplicadas as análises cromatográficas associadas às espectrométricas. As análises cromatográficas são importantes nos ensaios de biotransformação, pois permitem a separação dos compostos, baseada na distribuição desses componentes em duas fases, uma móvel e outra estacionária. Dentre as técnicas cromatográficas, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A detecção por ultravioleta (UV) e/ou por espectrometria de massas (EM) acoplada ao CLAE, permitem que esses compostos sejam identificados adequadamente. Nos estudos de biotransformação, a CLAE acoplada à EM possibilita a determinação com maior exatidão dos compostos formados por biotransformação e a determinação de possíveis rotas metabólicas, em paralelo à síntese de compostos de interesse.

Diante do exposto, os estudos de biotransformação têm-se mostrado como um campo de investigação muito eficiente na produção de compostos de interesse farmacêutico além de ser uma alternativa promissora de modelo de estudos de metabolômica de fármacos. Diferentes classes terapêuticas de fármacos que apresentam metabolismo via CYP450, surgem como possíveis candidatos a substratos para as reações enzimáticas mediadas por fungos endofíticos. A capacidade de biotransformação de fármacos de diferentes classes terapêuticas por fungos endofíticos, constitui objeto de investigação científica relevante por diversos grupos de pesquisa. Neste contexto, ainda não estão relatados na literatura pertinente estudos de biotransformação por fungos filamentosos endofíticos de fármacos hipoglicemiantes, antitrombóticos e antiparasitários. O presente estudo avaliou a capacidade de biotransformação de fármacos dessas classes terapêuticas e monitoramento dos possíveis metabólitos formados. Este trabalho constitui o primeiro estudo de biotransformação desenvolvido no grupo do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de biotransformação de linagliptina, vildagliptina, rivaroxabana, ticagrelor e metronidazol empregando o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 9245, bem como desenvolver metodologias analíticas para monitoramento dos possíveis metabólitos formados.

Objetivos Específicos

- Estabelecer metodologia de extração adequada para os fármacos e seus respectivos metabólitos;
- Desenvolver e validar metodologia analítica empregando CLAE-UV para identificação e quantificação dos fármacos linagliptina, vildagliptina, ticagrelor, rivaroxabana e metronidazol, e seus possíveis metabólitos produzidos pelo fungo;
- Verificar a formação dos possíveis metabólitos no período de incubação em meio de cultivo;
- Verificar o perfil de decaimento da concentração dos fármacos no período de incubação em meio Czapek;
- Caracterizar os possíveis metabólitos gerados pelo processo de biotransformação, através da espectrometria de massas;
- Validar ensaio analítico para estudo de biotransformação utilizando metronidazol como substrato.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estudos de biotransformação por micro-organismos

A elevada capacidade de modificar estruturalmente diversos compostos orgânicos através do sistema enzimático de micro-organismos, permite que sejam reportadas inúmeras aplicabilidades biológicas, sendo o modelo de biotransformação de compostos orgânicos e os modelos de mimetização de metabolismo humano de fármacos bastante representativos. Somado a isso, essa demanda veio acompanhada da ideia de “química verde”, ou seja, da produção de moléculas de interesse farmacêutico com reduzida geração de resíduos orgânicos, que são comuns na síntese orgânica tradicional (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; BORGES *et al.*, 2007; MURPHY, 2015; POLLARD; WOODLEY, 2007).

Historicamente, os relatos de biotransformação surgem no século XIX, com um estudo desenvolvido por Pasteur, que utilizou o fungo *Penicillium glaucum* na obtenção de L-tartarato de amônia a partir de DL-tartarato de amônia. Entretanto, somente entre os séculos XX e XXI os estudos de biotransformação receberam maior atenção. O motivo de destaque é devido à necessidade de criar novas estruturas químicas de interesse farmacêutico, envolvendo menor investimento financeiro na síntese dessas estruturas. A biotransformação por meio de micro-organismos permite que reações estereo e regioespecíficas ocorram de maneira que por via sintética não seriam viáveis. Posto isto, a biotransformação é uma estratégia biotecnológica e economicamente acessível, sendo ainda necessários estudos sobre novas rotas de produção de moléculas bioativas.

As aplicabilidades de biotransformação são diversas. Frente a problemática gerada devido à compostos orgânicos em meio ambiente, o modelo de biotransformação através de micro-organismos surge como alternativa de biodegradação destes poluentes. Entre os principais poluentes de solo, estão os derivados de petróleo, como a gasolina. O estudo desenvolvido por Teixeira (2007) teve como objetivo a biodegradação de compostos monoaromáticos conhecidos como BTX (benzeno, tolueno e isômeros do xileno), presentes na gasolina comercial, empregando cepas bacterianas de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses compostos são contaminantes de solo em destaque devido às características como maior solubilidade em água, elevada volatilidade, difícil degradação e grande potencial de toxigenicidade. Além do potencial de biodegradação dos compostos BTX

por micro-organismos, o estudo verificou que houve a produção de biossurfactantes pelas bactérias durante o processo de biodegradação da gasolina.

Além de biodegradação, os estudos de biotransformação direcionados ao metabolismo envolvendo fármacos também são de grande importância na descoberta de potenciais estruturas candidatas a fármacos, nos estudos de desenvolvimento e segurança destas estruturas. Neste contexto, a utilização de fungos e bactérias tem se tornado uma estratégia para os estudos envolvendo processos de biotransformação de fármacos, devido à fácil manipulação das células, além de biotransformar de maneira eficiente e rápida, quesitos fundamentais sob o ponto de vista de produção. Além disso, a separação, identificação e isolamento de metabólitos permite que sejam avaliados os potenciais terapêuticos de cada um deles.

Estudos *in vitro* se apresentam como modelos alternativos para a produção de metabólitos de fármacos. Geralmente, são utilizados animais de diferentes espécies ou células isoladas. Pesquisas mais recentes indicam que micro-organismos, em especial os fungos filamentosos, apresentam sistema enzimático muito semelhante ao observado em humanos. Com isso, ensaios de biotransformação empregando estes micro-organismos são utilizados como modelos de estudos farmacológicos, avaliação de toxicidade de novos fármacos e dos metabólitos produzidos. Esses modelos têm como principais vantagens frente aos modelos animais a facilidade de manipulação, maior diversidade de produção de metabólitos, produção em escala industrial de estruturas de interesse e fornecimento de enantiosseletividade às reações (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; SUN *et al.*, 2004).

Em literatura pertinente, Smith e Rosazza (1974) são mencionados como pioneiros em explorar a possibilidade da utilização de micro-organismos como modelos de metabolismo de mamíferos e apresentaram a grande semelhança existente entre o citocromo P450 de mamíferos e de micro-organismos. Os autores lançaram a hipótese através de um *screening* de fungos e bactérias com capacidade de modificar compostos aromáticos, cuja transformação é bem descrita para mamíferos. Os resultados demonstraram que os compostos formados pelos micro-organismos são muito semelhantes aos produtos formados nos estudos *in vivo*.

Posteriormente, surgiram diversos outros estudos a respeito de biotransformação utilizaram uma vasta gama de espécies microbiológicas para esse

fim, associados ou não a outras espécies. Dentre os fungos utilizados em biotransformação, destacam-se os filamentosos endofíticos. Geralmente, esses fungos são encontrados no solo e associados à vegetais saudáveis em uma relação simbiótica. Como resultado dessa interação, os fungos endofíticos se apresentam como fontes alternativas de síntese estereoespecífica de novas substâncias com potencial farmacêutico. Na literatura são encontradas diferentes espécies com potencial de biotransformação de fármacos e de produtos naturais, como por exemplo: *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* e *Xylaria* sp (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; BORGES *et al.*, 2009; MURPHY, 2015; QUINN *et al.*, 2015; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Muitos metabólitos secundários de vegetais e micro-organismos representam notáveis matérias-primas para a produção de fármacos e medicamentos. Alguns fármacos atualmente empregados no tratamento de diversas enfermidades, são produzidos via biotransformação, como, por exemplo, o taxol. O taxol é um agente antitumoral muito utilizado na clínica para tratamento de vários tipos de câncer. Trata-se de diterpenóide encontrado na casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). A produção do taxol está relacionada ao fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, presente na casca do Teixo do Pacífico. Em um estudo, observou-se a produção de taxol entre outros compostos após o isolamento de *T. andreanae* e seu cultivo em meio semissintético. Dessa maneira, este estudo apresentou-se como uma estratégia disponível para a síntese e descoberta de novos fármacos através de micro-organismos (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Um recente trabalho indicou a produção de metabólitos pela biotransformação de oxandrolona, um derivado da testosterona inserido no tratamento de diversas doenças relacionadas à perda de massa muscular e desordens neuromusculares. Neste estudo, a oxandrolona foi biotransformada em quatro diferentes metabólitos através do cultivo com o fungo *Macrophomina phaseolina* e um metabólito obtido da biotransformação por *C. blakesleeana*. No estudo, observou-se a hidroxilação e a oxidação estereoseletivas em várias posições da oxandrolona. Ainda, os autores sugerem que esses metabólitos formados sejam úteis na investigação sobre o metabolismo do fármaco em organismo humano (BAYDOUN *et al.*, 2015).

Através dos estudos de biotransformação de fármacos de diferentes classes terapêuticas é possível prever as reações metabólicas que podem ocorrer em humanos. Um estudo apontou a biotransformação do metoprolol através de cinco espécies de *Cunninghamella*, obtendo-se sete metabólitos por uma espécie, sendo cinco desses metabólitos muito similares aos metabólitos formados em mamíferos. Os outros dois novos metabólitos gerados no estudo, foram identificados como produtos de reação de *N*-desalquilação do metoprolol e um conjugado glicosídeo de *O*-desmetil-metoprolol. Somado aos resultados apresentados, os autores destacam a eficiência e o rendimento de produção desses metabólitos, prospectando, dessa maneira, estudos farmacológicos e toxicológicos desses metabólitos produzidos no estudo (MA *et al.*, 2007). Em outro estudo, Amadio e colaboradores (2010) observaram que o anti-inflamatório não esteroide flurbiprofeno, quando submetido à biotransformação por *C. elegans*, foi biotransformado majoritariamente em 4'-hidroxiflurbiprofeno. Em humanos, essa transformação é catalisada exclusivamente pelo CYP2C9 além de ser, igualmente, metabólito majoritário (TRACY *et al.*, 1995, 1996).

Uma outra vantagem sob o ponto de vista de biossíntese de moléculas via micro-organismos é a possibilidade de produção de estruturas de interesse farmacêutico com elevada pureza enantiomérica. No estudo de Yoshida e colaboradores (2001), foi empregado o fungo *Cunninghamella echinulata* MK 40 na biotransformação do precursor do rabeprazol, 2-[4-(3-metoxipropoxi)-3-metilpiridina-2-il] metiltiobenzimidazol (PTBI). Por meio desse método, os autores obtiveram *S*-rabeprazol com 99% de pureza enantiomérica. Demonstrando que a biotransformação de fármacos mediada por micro-organismos é uma alternativa à via clássica de síntese do fármaco. Um outro estudo retratou a biotransformação de flumequina por *C. elegans*. O fármaco foi biotransformado em dois diastereoisômeros, a 7-hidroxiflumequina e 7-oxoflumequina, ambas com potencial farmacêutico (WILLIAMS *et al.*, 2007).

Conclui-se que o uso de sistemas microbiológicos permite a produção de metabólitos novos e/ou já existentes, constituindo, dessa maneira, uma via economicamente interessante e uma alternativa promissora de futuras aplicações pela indústria farmacêutica. Estes estudos reforçam a importância dos estudos de biotransformação de fármacos visando a previsão de formação de metabólitos.

Ademais, a possibilidade de ampliação de escala produtiva de biotransformação de fármacos permite que o método seja um potencial para a síntese de metabólitos como padrões analíticos.

Citocromo P450

A biotransformação de fármacos em mamíferos acontece predominantemente através do sistema enzimático do citocromo P450 (CYP450), localizado em diversas células, sendo majoritariamente em hepatócitos. Os genes que formam o complexo enzimático CYP450 estão presentes em diversas espécies de diferentes organismos, incluindo vegetais, micro-organismos e mamíferos. Algumas enzimas que constituem o CYP450 ficam localizadas na membrana mitocondrial interna e seus sítios catalíticos expostos à matriz celular. Entre diversos substratos, os fármacos (xenobióticos) são metabolizados pela via da CYP450 com a finalidade de modificar estruturalmente as moléculas, tornando-as mais solúveis em meio aquoso e, assim, facilitando a excreção pelo organismo. (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; NELSON; COX, 2011).

O sistema enzimático do CYP450 requer NADPH (fosfato de dinucleotídio de nicotinamida e adenina) como coenzima e oxigênio como substrato. As reações por elas catalisadas podem ser categorizadas em quatro classes, conforme a quantidade de elétrons transferidos do NADPH que são entregues no sítio catalítico. O complexo enzimático P450 apresenta isoformas já bem documentas na literatura, que são responsáveis por mais de 90% do metabolismo de fármacos em humanos. Estas isoformas também foram identificadas em diferentes espécies de eucariotos e procariotos (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; MURPHY, 2015; WERCK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

O metabolismo de fármacos em humanos pode ser dividido em duas fases. A fase I ocasiona a modificação estrutural do fármaco através de reações de oxidação, redução e hidrólise. Na administração de pró-fármacos, essa fase é fundamental para a que a substância se torne farmacologicamente ativa. Na fase II ocorrem reações de conjugação do fármaco com outras substâncias endógenas. Dessa maneira, o objetivo principal das reações de fase II é facilitar a excreção do fármaco. Essa fase também é denominada de fase de conjugação. As reações de fase I e de fase II

ocorrem independentes, logo, os fármacos podem sofrer apenas uma fase ou ambas. De uma maneira geral, CYP450 utiliza elétrons do NADPH para catalisar a ativação do oxigênio molecular, conduzindo o ataque oxidativo estéreo e régio-especificidade ao substrato. Embora, frequentemente, as reações de hidroxilação sejam majoritárias, outras reações também ocorrem contribuindo para o processo de biotransformação de fármacos, como hidrólise e conjugação (ISIN; GUENGERICH, 2007; STRECK; COSTA, 1999; WERCK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

As enzimas que formam o complexo enzimático apresentam isoformas, que são variações de uma enzima que catalisa um mesmo tipo de reação. Cada isoforma apresenta diferentes indutores e inibidores. As isoformas mais estudadas são CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19 e a CYP1A2, pois são as principais envolvidas nas reações de biotransformação de fármacos no organismo humano. Em humanos, existem cerca de 57 isoformas da CYP, de variadas funções. Dessas, cinco isoformas, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 E 3A4 são as principais responsáveis pela fase I do metabolismo de fármacos (KUMAR, 2011; STRECK; COSTA, 1999).

A semelhança entre os sistemas enzimático de humanos e de micro-organismos é reconhecido na literatura. O perfil de transformação de fármacos e xenobióticos pelo gênero *Cunninghamella*, abrange uma série de reações catalisadas por isoformas de CYP de mamíferos. Sendo assim, o processo de biotransformação de moléculas químicas através de micro-organismos ocorre de maneira muito semelhante ao desenvolvido no organismo de mamíferos. (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; MURPHY, 2015; WERCK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

Técnicas extrativas

A produção e acompanhamento de metabólitos produzidos via biotransformação por micro-organismos, exige atenção prévia às análises de identificação e de quantificação destes metabólitos por técnicas cromatográficas. Com isso, a preparação de amostras representa uma etapa crítica nos estudos de biotransformação, uma vez que os analitos de interesse se encontram em matrizes contendo proteínas e outros compostos diferentes que podem ser adsorvidos nas colunas cromatográficas, prejudicando a reprodutibilidade do método, bem como o

comprometimento do instrumento analítico. Técnicas de extração de amostras permitem que os analitos em concentrações a nível de traço possam ser concentrados para que se obtenham os limites de detecção adequados para os fins desejados. Além disso, a extração adequada possibilita que os analitos sejam separados de forma mais eficiente e livre de interferentes (BARTH, 2012; ERNY; CIFUENTES, 2006; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Diante da necessidade de isolar analitos de interesse em matrizes complexas, diferentes técnicas foram desenvolvidas para essa finalidade. Dentre as técnicas de extração de compostos em matrizes complexas são comumente utilizadas: a extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS), extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas. Atualmente, estas técnicas vêm sendo automatizadas pois evitam erros de manipulação, contaminação de amostras bem como reduzem os riscos inerentes às substâncias tóxicas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; WATSON, 2005).

A ELL é considerada uma técnica clássica de preparo de amostras muito utilizada em análises de fluidos biológicos e amostras dos ensaios de biotransformação. A técnica consiste na partição da amostra entre duas fases imiscíveis (aquosa e orgânica). A afinidade do soluto pelo solvente é determinante para a eficiência da extração, assim como o número de extrações (repetições do procedimento). Como vantagens, a ELL apresenta maior simplicidade devido aos materiais utilizados e possibilita a utilização de uma grande variedade de solventes disponíveis comercialmente, conduzindo a uma solubilidade seletiva dos analitos. Adicionalmente, proteínas presentes nas amostras podem ser desnaturadas, evitando assim a contaminação da coluna cromatográfica (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A técnica extrativa mais aplicada nos ensaios de biotransformação é a extração líquido-líquido. Apresenta-se como uma técnica simples, pois se faz uso de solventes orgânicos imiscíveis em meio aquoso permitindo uma ampla faixa de solubilidade e seletividade de analitos. Entre os solventes mais comumente utilizados na ELL de analitos de biotransformação, estão o acetato de etila, diclorometano e hexano. A afinidade do analito pelo solvente permite melhor recuperação do analito da matriz complexa. O tempo de extração e ciclo de repetições da extração garantem,

juntamente com a escolha do solvente, o sucesso da etapa extrativa. (ERNY; CIFUENTES, 2006; MARTINS et al., 2012; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A técnica de extração por fase sólida (EFS) é mais elaborada, empregando membranas, colunas descartáveis em formato de seringa ou cartuchos. O interior desses materiais é composto por uma fase sólida (extratora). Os compostos a serem extraídos ficam retidos na fase extratora e são eluídos com uso de solventes orgânicos. Existem diversos tipos de fase extratora disponíveis comercialmente. Por exemplo, octadecil (C18) ligado à sílica é uma fase sólida amplamente utilizada. Os grupos funcionais ligados à fase sólida atraem os compostos hidrofóbicos presentes na amostra por meio de interações tipo Van der Waals, extraíndo-os da solução aquosa. As demais técnicas citadas, apresentam maior complexidade em relação a equipamentos e, conseqüentemente, o investimento financeiro se torna maior, como, por exemplo, a extração por fluido supercrítico (SKOOG, 2007).

De maneira geral, a escolha do tipo de técnica extrativa a ser empregada, deve levar em consideração as seguintes características: simplicidade, rapidez, baixo custo, seletividade e boa recuperação dos analitos de interesse. Além disso, a técnica extrativa deve oferecer o menor risco de impacto ambiental. Com isso, a ELL é a mais empregada nos grupos de pesquisa em biotransformação de fármacos e preparo de amostras para posterior análise por CLAE. A etapa de extração dos analitos é fundamental para o sucesso da etapa analítica.

Técnicas analíticas

Nos ensaios de biotransformação de fármacos, conforme mencionado, é necessária aplicação de técnicas analíticas para monitoramento do processo de formação, identificação e quantificação de metabólitos no meio de cultivo. Entre as técnicas destacadas para análise de metabólitos estão a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa (CG) e a eletroforese capilar (EC).

A CLAE é uma técnica versátil em que a separação dos analitos é baseada na migração diferencial por afinidade com a fase estacionária e a fase móvel. Os analitos dispersos na fase móvel (líquida) são carregados ao longo da fase estacionária. A

interação entre os analitos e a fase estacionária é que permite a separação dos mesmos. (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; WATSON, 2005).

Essa técnica cromatográfica é amplamente utilizada na identificação de compostos, quando realizada a comparação do tempo de retenção obtido para o pico de uma solução padrão do analito e a amostra contendo o analito em questão. Nos estudos de biotransformação, a CLAE é a mais utilizada para o monitoramento da formação de metabólitos. Diversos estudos demonstram a eficiência do uso de CLAE para as análises de metabólitos. Em um estudo, após o tratamento das amostras, as análises por CLAE-UV identificam a produção de dois novos derivados da espirolactona por *Cunninghamella elegans* (MEI *et al.*, 2014).

Entretanto, técnicas de detecção por espectrofotometria no UV, muitas vezes, não são suficientes para a identificação de compostos desconhecidos. A combinação de diferentes métodos de detecção associados a CLAE possibilita a elucidação estrutural de compostos desconhecidos. A espectrometria de massas combinada ao CLAE (CLAE-EM) consiste atualmente a principal técnica de análise de misturas de substâncias nas áreas de pesquisa e desenvolvimento. Além disso, permite que as análises sejam realizadas com maior sensibilidade e que concentrações muito baixas de analitos possam ser separados e identificados com maior exatidão (BARDEN, 2014; KUCHARSKA; GRABKA, 2010).

CAPÍTULO I
Biotransformação de linagliptina e vildagliptina

1 Introdução

O diabetes é uma doença crônica causada em decorrência do mal funcionamento do pâncreas, que passa a não produzir insulina suficiente ou quando o organismo não consegue utilizar com eficiência a insulina produzida. Como consequência, a hiperglicemia pode levar a sérios danos no organismo, principalmente ao sistema nervoso e aos vasos sanguíneos. O diabetes tem acometido milhões de pessoas no mundo, afetando principalmente os países em desenvolvimento. Além disso, há o agravamento de casos de obesidade e sobrepeso influenciando negativamente para o desenvolvimento do diabetes (WHO, 2016).

Existem três tipos de diabetes: tipo 1, tipo 2 e gestacional. O diabetes do tipo 1 está relacionado com o mal funcionamento do pâncreas e, com isso, exige que o paciente administre insulina diariamente para o controle glicêmico. O diabetes gestacional é considerado uma condição temporária em que os níveis de glicose estão elevados, porém em níveis inferiores aos outros tipos de diabetes. O diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) é responsável por 90 a 95% dos casos de diabetes e sua incidência vem aumentando, sendo considerado uma epidemia que requer maior atenção na terapêutica (WHO, 2016; WILD et al., 2004).

Entre as diversas estratégias terapêuticas no tratamento do DMT2, é destacada a inibição da enzima dipeptidil peptidase-4 (DDP-4), responsável pela inativação de incretinas hormonais, o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (*Glucagon-like peptide-1*, GLP-1) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (*gastric inhibitory polipeptide*, GIP), que têm como função fundamental realizar a manutenção da homeostase da glicose no organismo. Após a ingestão de alimentos, o intestino passa a produzir GLP-1 para sinalizar a produção de insulina pelo pâncreas. Entretanto, o GLP-1 é rapidamente degradado pela enzima DDP-4. Os inibidores da DDP-4 representam uma nova classe de fármacos que permitem a ativação prolongada do GLP-1 e, assim, ocorre a produção de insulina pelo pâncreas por estímulo fisiológico (secreção de insulina glicose-dependente) (DRUCKER, 2007; DRUCKER; NAUCK, 2006; HOLST; GROMADA, 2004; MENTLEIN, 1999; WHO, 2016; WILD et al., 2004).

Entre os fármacos utilizados no tratamento do DMT2, a classe das gliptinas se destaca por apresentar diversos fármacos. Entre eles, a linagliptina (Figura I - 1) é um potente fármaco inibidor da DDP-4 e apresenta metabolismo via CYP450 em

humanos. A excreção do fármaco ocorre predominantemente sob a sua forma inalterada e apresenta dezenove metabólitos inativos no organismo humano (Figura I - 2). Desses, o metabólito denominado M474 corresponde a pouco mais de 10% e é formado através da desaminação oxidativa seguida de redução estereosseletiva via enzimas aldo-ceto redutases. Outros metabólitos de maior percentual de formação são o M489 e o M490 (BLECH *et al.*, 2008).

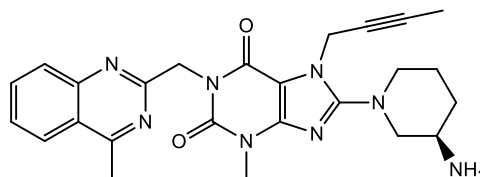


Figura I - 1 Estrutura química da linagliptina (8-[(3R)-3-aminopiperidina-1-il]-7-(but-2-in-1-il)-3- metil-1-[(4-metilquinazolina-2-il)metil]-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona).

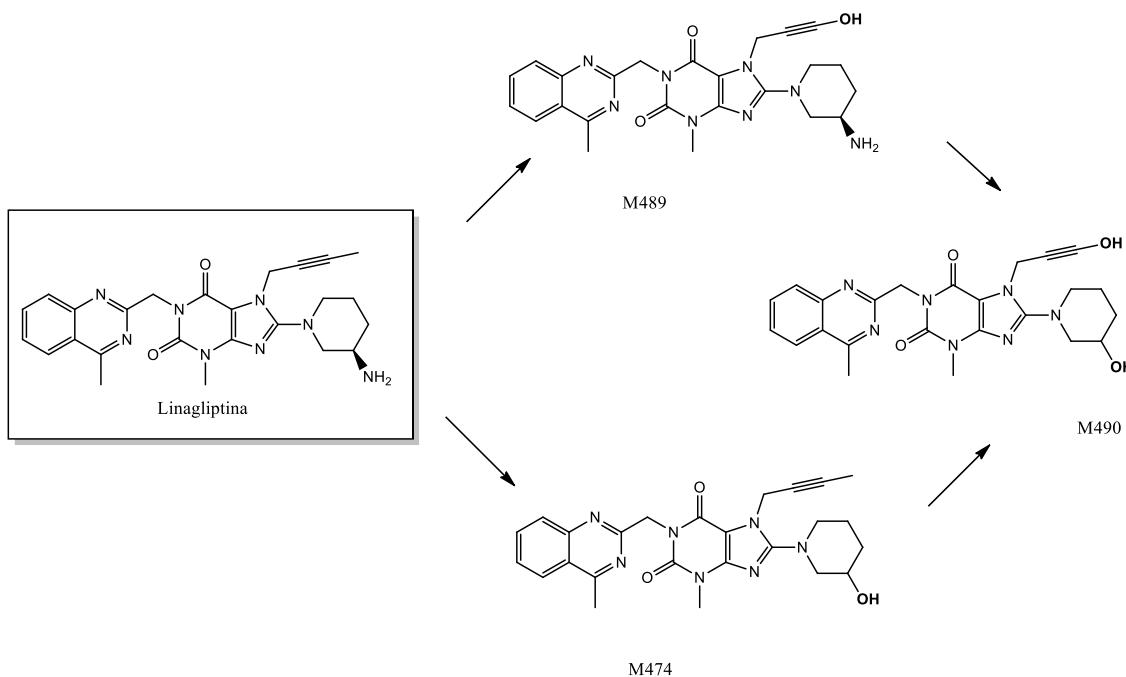


Figura I - 2 Metabólitos formados a partir da linagliptina em humanos. Fonte: adaptado de Blench et al (2010).

Estudos analíticos sobre a linagliptina são pouco relatados. No estudo apresentado por El-Bagary e colaboradores (2012), foi desenvolvido um método para determinação de linagliptina por CLAE, aplicando duas técnicas de detecção: por UV

e por fluorimetria. A preparação da amostra foi realizada através da precipitação das proteínas presentes no plasma e análise direta ao cromatógrafo (BADUGU, 2012; SUJATH; SESHAGIRI RAO, 2013; VEERESHAM *et al.*, 2015).

Um outro fármaco da classe das gliptinas é a vildagliptina (Figura I - 3), rapidamente absorvida, apresenta uma biodisponibilidade oral de 85 % e sofre biotransformação no organismo via metabolismo do CYP450. Os metabólitos são a principal rota de eliminação em mamíferos, cerca de 70 % da dose. O principal metabólito, M20.7, é farmacologicamente inativo sendo um produto de hidrólise do grupamento ciano da molécula. Outros metabólitos são produtos da hidrólise da amida (M15.3) e do conjugado glicuronídeo (M20.2) (HE *et al.*, 2009).

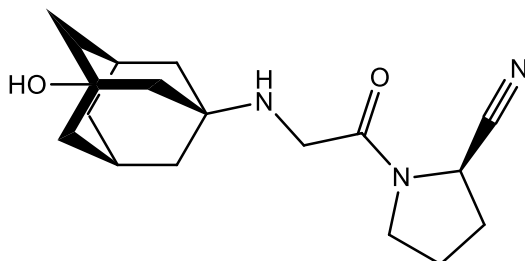


Figura I - 3 Estrutura química da vildagliptina ((2S)-1-[N-(3-hidroxi-1-adamantil)glicil]pirrolidina-2-carbonitrila).

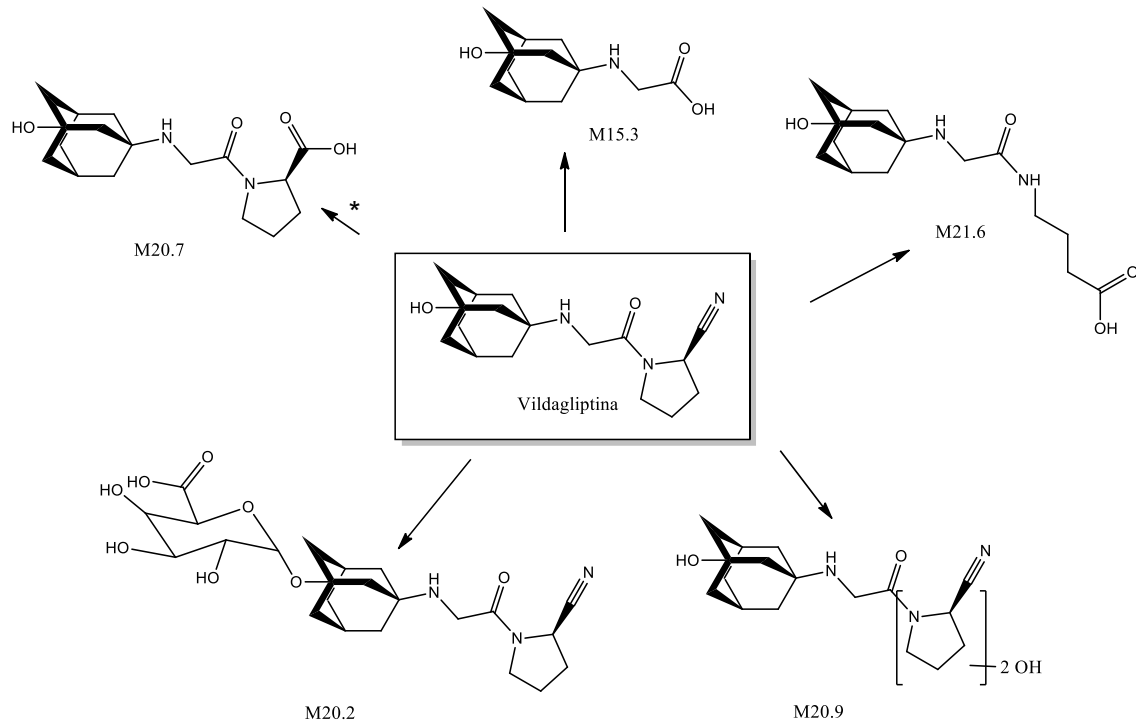


Figura I - 4 Metabolismo da vildagliptina em humanos. O metabólito majoritário (M20.7) está indicado com asterisco.

Diante do exposto a respeito dos inibidores da DDP-4, estudos envolvendo esses fármacos e o metabolismo *in vitro* são pouco explorados. A biotransformação envolvendo fármacos hipoglicemiantes e micro-organismos ainda não está relatada, até o momento. Portanto, o objetivo deste capítulo foi avaliar a capacidade de biotransformação dos fármacos linagliptina e vildagliptina através do fungo endofítico *C. elegans* ATCC 9245. Para viabilizar a análise do fármaco e dos possíveis metabólitos formados em meio de cultivo Czapek, foi necessário desenvolver metodologia analítica para cada fármaco.

2 Materiais e métodos

2.1 Otimização das condições cromatográficas

2.1.1 Linagliptina

Fármacos, solventes e reagentes

O padrão de referência da linagliptina (log P: 2,8) foi adquirido da Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canadá) apresentando pureza de 99,8 %. Utilizou-se acetonitrila (ACN) e trietilamina (TEA) obtidas da Merck (Darmstadt, Alemanha) e metanol adquirido da Vetec (Duque de Caxias/ Rio de Janeiro, Brasil) para o preparo das fases móveis, todas de grau cromatográfico. Utilizou-se etanol absoluto P.A., da Dinâmica (Diadema, São Paulo), para a solubilização do padrão do fármaco. O ácido fosfórico 85 % de grau P.A. utilizado para ajuste de pH das fases móveis foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura utilizada para o preparo das fases móveis foi obtida através de sistema Millipore Direct-Q3UV (Darmstadt, Alemanha).

Equipamentos

O fármaco foi pesado em balança eletrônica analítica da marca AND, modelo HM-202 e o ajuste de pH da fase móvel foi realizado em potenciômetro digital (Digimed). Para a filtração das amostras, foram utilizados filtros para seringa com membrana de nylon de poro 0,45 µm, da Millipore Millex® (Darmstadt, Alemanha). Para análise da linagliptina, usou-se uma coluna Agilent Technologies® Zorbax Eclipse Plus C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). O sistema cromatográfico utilizado foi um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo 20-A equipado com sistema controlador CBM-20A, bombas de fluxo LC-20AT, injetor automático SIL-20A/C, forno e detector de arranjo de fotodiodos (Photo Diode Array, PDA). Para controle de aquisição de dados utilizou-se o software LCSolution versão 1.25.

Método

A linagliptina foi solubilizada em etanol e água ultrapura (20:80, v/v), para o preparo de uma solução estoque de 1,5 mg.mL⁻¹. A partir da solução estoque,

preparou-se uma solução padrão diluída em fase móvel, atingindo concentração final de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As fases móveis avaliadas foram baseadas no trabalho apresentado por Engel (2014):

(a) TEA 1% (pH 4,5) : ACN (80:20)

(b) metanol : água ultrapura (pH 4,1), 83:17

A detecção da linagliptina foi feita em comprimento de onda em 293 nm.

2.1.2 Vildagliptina

Fármacos, solventes e reagentes

O padrão de referência da vildagliptina (log P: 1,1), com pureza de 99,5 %, foi obtido da empresa Sequoia Research Products (Pangbourne, Reino Unido). Utilizou-se ACN, TEA (grau cromatográfico), fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico anidro obtidos da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil) para o preparo de solução tampão e ácido fosfórico 85 % de grau P.A. utilizado para ajuste de pH das fases móveis. Utilizou-se água ultrapura para o preparo das fases móveis.

Equipamentos

Para a vildagliptina utilizou-se coluna Phenomenex® Luna C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm). O ajuste de pH das fases móveis preparadas foi realizado em potenciômetro da Digimed.

Métodos

O padrão de vildagliptina foi solubilizado em solução de metanol a 20 % na concentração de $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (solução estoque). Em seguida uma alíquota foi diluída em fase móvel a concentração final de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (solução padrão). Foram avaliadas duas fases móveis na etapa de otimização das condições cromatográficas. São elas:

(a) água ultrapura + 0,3% de TEA (pH 7,0) : ACN (85:15, v/v)

(b) tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0): ACN (85:15, v/v).

As condições de análise das duas fases móveis para a vildagliptina foram baseadas no estudo apresentado por Barden e colaboradores (2012). A detecção foi realizada em 207 nm.

2.2 Processo de extração dos analitos

Reagentes e solventes

Os solventes orgânicos utilizados como extratores dos fármacos foram: diclorometano da Dinâmica (Diadema/SP, Brasil), clorofórmio e acetato de etila, obtidos da Shynt (Diadema/SP, Brasil), grau P.A.

Método

Separadamente, uma alíquota da solução estoque de cada fármaco foi adicionada ao meio de cultivo Czapek, atingindo concentração final de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O processo de extração foi formado pelo sistema bifásico produzido pela porção orgânica (4 mL) e aquosa (2 mL de meio de cultivo enriquecido com padrão do fármaco). Agitou-se vigorosamente a mistura por 1 minuto. Após a separação de fases do sistema bifásico, a fase orgânica foi isolada da fase aquosa e submetida a evaporação do solvente. Avaliou-se a recuperação dos fármacos para repetição de 2 e 4 ciclos de extração.

Os solventes foram volatilizados sob fluxo de ar em capela de exaustão. Após, os resíduos depositados foram ressuspensos em 2 mL de fase móvel determinada durante a etapa de otimização cromatográfica, para cada fármaco. Os volumes obtidos da ressuspensão foram filtrados em membranas de Nylon de porosidade de 0,45 μm (Millipore Millex[®]) para posterior análise cromatográfica. Todo o processo de extração foi realizado em capela de exaustão.

2.3 Biotransformação

Reagentes e solventes

Para a etapa de biotransformação dos fármacos, foram utilizados meios de cultivo Caldo Czapek, obtido da Kasvi (Itália) (Tabela I- 1), solução 0,9 % de NaCl estéril para o preparo do inóculo e etanol a 20 % para solubilização dos fármacos.

Tabela I- 1 Composição do meio de cultivo caldo Czapek.

| Componente | g/L |
|-----------------------|-------|
| Sacarose | 30,00 |
| Nitrato de Sódio | 2,00 |
| Difosfato de potássio | 1,00 |
| Sulfato de Magnésio | 0,5 |
| Cloreto de Potássio | 0,5 |
| Sulfato ferroso | 0,01 |

pH final (25°C): 7,3 ± 0,2

Equipamentos

Para a esterilização de materiais e meios de cultivo foi utilizada uma autoclave vertical Webeco (Alemanha). Para a quantificação das células fúngicas, utilizou-se fotocolorímetro Analyser, modelo 800 M, e para incubação sob agitação, plataforma de agitação orbital (Innova® 2300) programada a 120 rpm.

Métodos

Manutenção da Cepa

A cepa de *C. elegans* ATCC (*American Type Culture Collection*) 9245 foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Bioconversões (LABIOCON) da

Universidade Federal de Goiás (UFG). A cepa foi armazenada em estufa bacteriológica (De Leo), sob a temperatura de 27° C. O cultivo para o preparo do inóculo foi realizado a partir da cepa de manutenção em tubos de ensaio contendo meio ágar Sabouraud (Tabela I- 2) e incubados em estufa bacteriológica a mesma temperatura durante 72 horas, para induzir a formação de conídios e esporangiosporos.

Tabela I- 2 Composição do meio de cultivo ágar Sabouraud

| Componente | g/L |
|--------------------|------------|
| Peptona micológica | 10 |
| Dextrose | 40 |
| Ágar | 15 |

pH final (25° C): 5,6 ± 0,2

Inóculo

A suspensão de esporos e conídios foi realizada após 72 horas de cultivo da cepa em ágar Sabouraud. Utilizou-se solução salina 0,9 % estéril para o preparo do inóculo que foi padronizado através do uso de fotocolorímetro em comprimento de onda de 570 nm, ajustando a densidade óptica (DO) de 0,15 a 0,17 (transmitância de 68 a 70%). Através da obtenção da DO adequada, a concentração final atingida foi de cerca de 10⁸ UFC /mL, conforme apresentado no trabalho de Jesus e colaboradores (2013). Essa técnica de padronização foi adaptada do protocolo do M38 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para fungos filamentosos (CLSI, 2002). O volume de 1 mL do inóculo foi adicionado ao Caldo Czapek diluído a 50 % e incubado sob agitação constante a 120 rpm em agitador orbital de bancada, a 27° C durante 72 horas.

Estudo de biotransformação

Para o estudo de biotransformação, a linagliptina foi solubilizada em solução de etanol a 20 % e adicionada a 150 mL de meio de cultivo caldo Czapek

(concentração final: 0,1 mg.mL⁻¹) após 48 horas do cultivo dos inóculos padronizados em meio de cultivo Czapek. As condições de incubação foram mantidas. Realizou-se o monitoramento de degradação do fármaco em meio de cultivo através do controle negativo. A Tabela I- 3 apresenta a composição do estudo de biotransformação e controles do ensaio.

Tabela I- 3 Composição do ensaio de biotransformação

| Frasco | Meio Czapek | Fármaco | Inóculo |
|-------------------|--------------------|----------------|----------------|
| Branco | ✓ | | |
| Controle Positivo | ✓ | | ✓ |
| Controle Negativo | ✓ | ✓ | |
| Biotransformação | ✓ | ✓ | ✓ |

Foram realizadas coletas em dias intercalados após 24 horas da adição do fármaco com a intenção de obter o rendimento da biotransformação e acompanhamento da formação dos metabólitos formados. As coletas foram executadas em triplicata e armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o momento do processo de extração.

3 Resultados e discussão

3.1 Linagliptina

3.1.1 Otimização das condições cromatográficas

O objetivo desta etapa foi ajustar as condições cromatográficas para que o fármaco e os metabólitos apresentassem um tempo de retenção adequado de análise. Em virtude dos metabólitos, de maneira geral, apresentarem características mais polares que os fármacos de origem, os mesmos devem apresentar tempo de eluição menor que o fármaco. Desta forma, adaptações do método cromatográfico foram executadas no intuito de estabelecer tempo de análise cromatográfica inferior a 10 minutos.

Para a linagliptina, o desempenho da fase móvel composta por metanol : água ultrapura (pH 4,1, 83:17, v/v) não foi satisfatório, pois o fármaco foi eluído em cerca de 2 minutos de análise e o sinal cromatográfico apresentou elevada assimetria (Figura I - 5 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). A proporção de fase orgânica da fase móvel foi modificada a para ajuste do tempo de retenção do pico da linagliptina. Entretanto, o pico cromatográfico não demonstrou melhora em relação a sua assimetria.

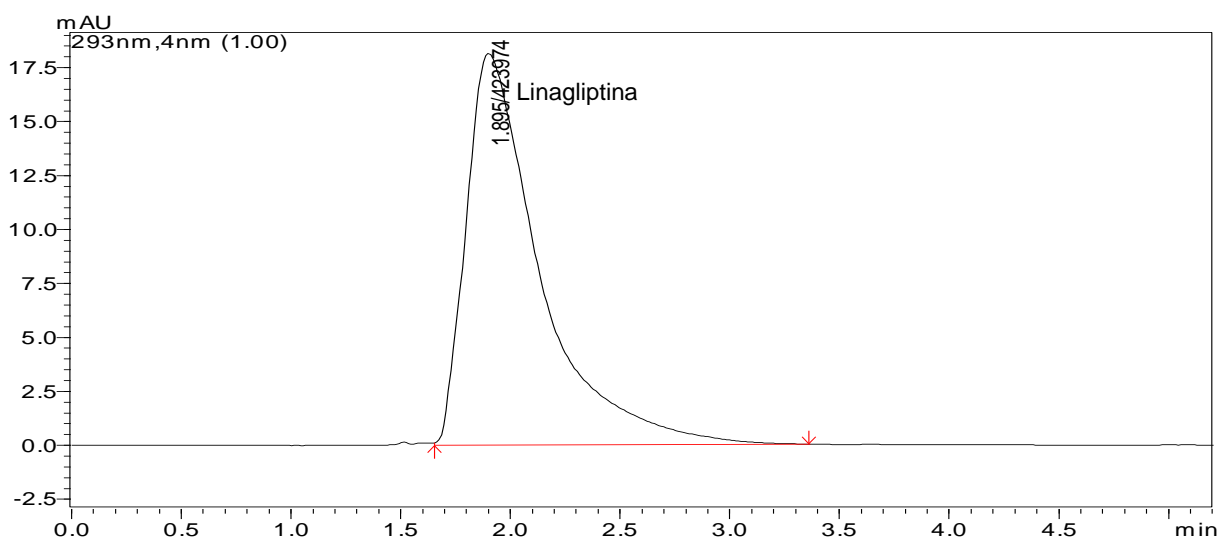


Figura I - 5 Cromatograma de padrão de linagliptina ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em fase móvel formada por metanol : água (pH 4,1), na proporção 87:13 (v/v). Condições cromatográficas: coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 μm), volume de injeção de 20 μL , vazão: 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura de forno a 30 $^{\circ}\text{C}$. Parâmetros obtidos: fator cauda = 2448; Pratos Teóricos = 176564

A fase móvel composta por água ultrapura acrescida de 1 % de trietilamina (pH 4,5) e acetonitrila (ACN) na proporção 80:20, (v/v) apresentou um tempo de retenção para o fármaco de, aproximadamente, 7,6 minutos (Figura I - 6). A concentração de análise da linagliptina para esta composição de fase móvel foi modificada para 500 µg/mL. Sendo assim, as condições cromatográficas adotadas para as análises do fármaco e seus metabólitos no ensaio de biotransformação da linagliptina estão apresentadas na Tabela I - 4 e o resultados dos parâmetros obtidos estão representados na

Tabela I - 5.

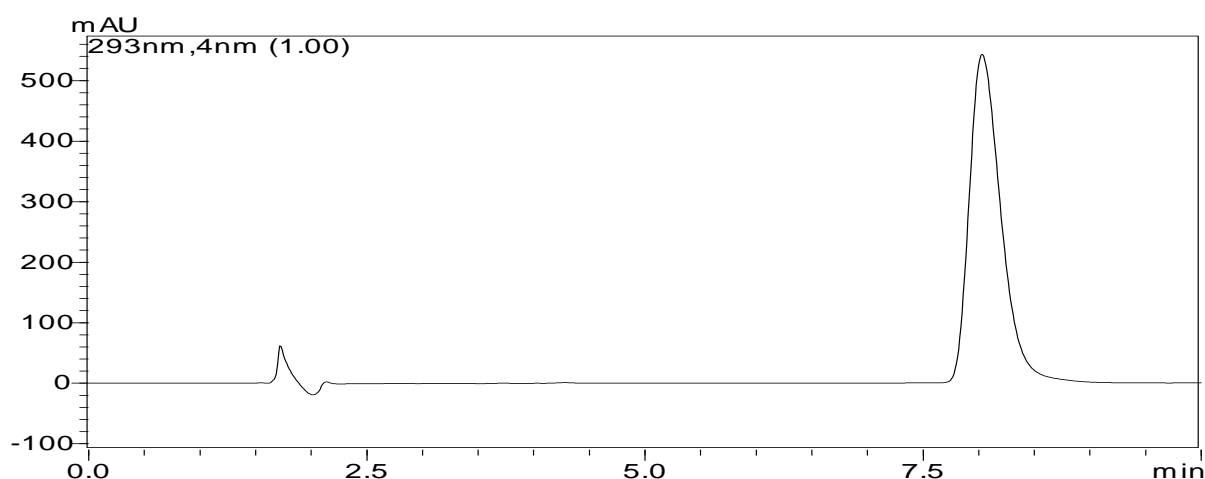


Figura I - 6 Cromatograma padrão de linagliptina (500 µg/mL) em fase móvel TEA 1 % : ACN (80:20, v/v). Condições cromatográficas: fase móvel TEA 1 % (pH 4,5) : ACN (80 : 20, v/v), coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 20 µL, vazão: 1,2 mL.min⁻¹ e temperatura de forno a 30 °C.

Tabela I - 4 Parâmetros obtidos para análise de linagliptina em fase móvel composta por TEA 1 % : ACN (80 : 20, v/v).

| Parâmetro | Descrição |
|-------------------|---|
| Fase móvel | Trietilamina 1 % (pH 4,5) : acetonitrila (80/20, v/v) |
| Coluna | Zorbax Eclipse Plus C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) |
| Vazão | 1,2 mL.min ⁻¹ |
| Temperatura | 30 °C |
| Detecção | 293 nm |
| Volume de injeção | 20 µL |

Tabela I - 5 Parâmetros cromatográficos obtidos na análise do padrão de linagliptina.

| Parâmetro | Valor |
|-------------------|-------------|
| Pratos teóricos | 3377354 |
| Fator cauda | 1,489 |
| Área | 10769764 |
| Tempo de retenção | 7,6 minutos |

*Condições cromatográficas: fase móvel TEA 1 % (pH 4,5) : ACN (80 : 20, v/v), coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 20 µL, vazão: 1,2 mL.min⁻¹ e temperatura de forno a 30 °C.

3.1.2 Otimização do processo de extração do analito

Variações da técnica de extração líquido-líquido foram testadas a fim de obter o melhor rendimento dos analitos. A combinação de diclorometano aplicado a 4 ciclos de 3 mL (totalizando volume final de 12 mL de diclorometano) à solução aquosa demonstrou ser a mais eficiente e, portanto, considerada satisfatória. A recuperação do fármaco foi de aproximadamente 85 % (Figura I - 7). Conforme a literatura, a ELL é uma técnica simples e clássica de preparação de amostras e, por isso, amplamente utilizada. Estudos reportam a importância dos parâmetros como agitação vigorosa, tempo de extração e a quantidade de ciclos de extração (BARTH, 2012). Observou-se que ciclos de extração superiores a quatro não foram significativos na recuperação do fármaco.

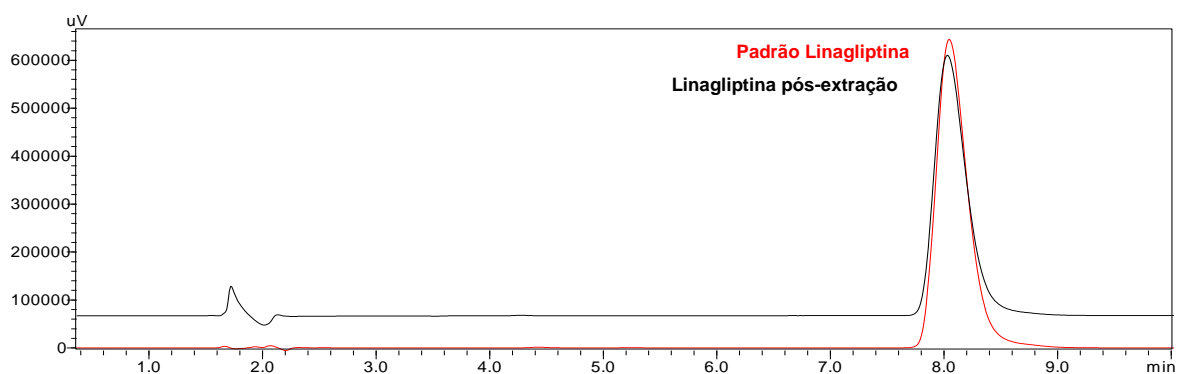


Figura I - 7 Cromatograma comparativo entre padrão de linagliptina e o fármaco após etapa extrativa com 4 ciclos de diclorometano. Condições cromatográficas: fase móvel TEA 1 % (pH 4,5) : ACN (80 : 20, v/v), coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 20 µL, vazão: 1,2 mL.min⁻¹ e temperatura de forno a 30 °C.

3.1.3 Biotransformação

Após a padronização das condições cromatográficas e estabelecimento das condições de extração, iniciou-se a etapa de biotransformação dos fármacos. A etapa de extração das amostras foi realizada em um único dia visando redução das variáveis interdia. De acordo com o período de incubação do fármaco com a *C. elegans*, observou-se que houve redução na concentração de linagliptina no meio de cultivo, demonstrando existir um consumo do fármaco pelo micro-organismo. Entretanto, após 12 dias, a concentração do fármaco determinada no meio de cultivo apresentou valores próximos aos primeiros dias de incubação do fármaco.

A análise do cromatograma do controle positivo (Figura I - 8) demonstra que após o processo de extração dos analitos, não há detecção de picos que representem algum interferente de origem fúngica.

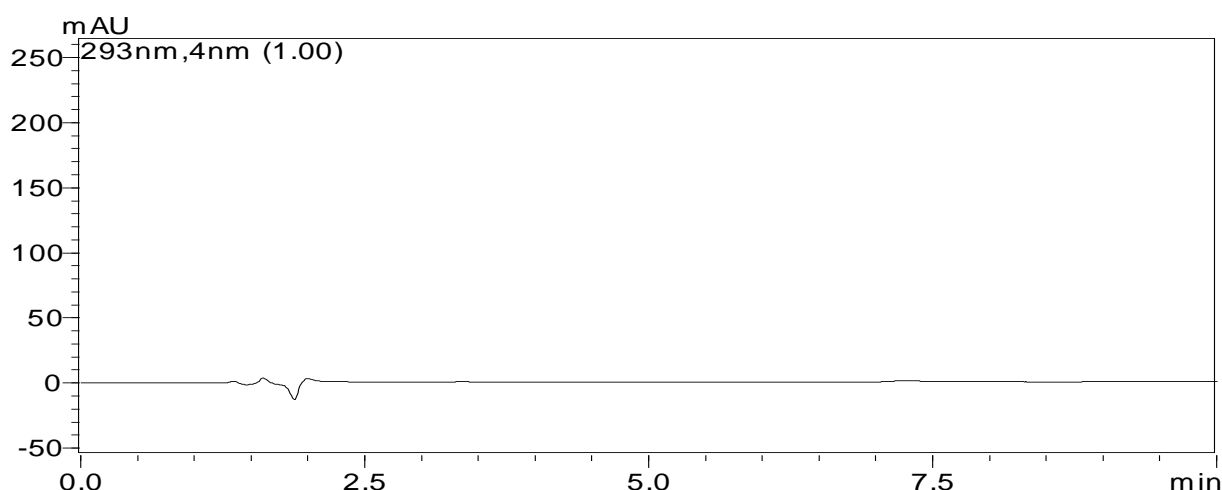


Figura I - 8 Cromatograma da análise de amostra de controle positivo após processo de extração. Condições cromatográficas: fase móvel TEA 1% (pH 4,5): ACN (80 : 20, v/v), coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 20 µL, vazão: 1,2 mL.min⁻¹ e temperatura de forno a 30°C.

Adicionalmente, o perfil do cromatograma do meio de cultivo Czapek após etapa de extração (Figura I - 10), apresenta-se muito semelhante ao perfil cromatográfico do controle positivo. A análise cromatográfica entre amostras de 8 dias do frasco biotransformação e controle negativo indica que não há formação de novos compostos (Figura I - 9), observado pela ausência de picos indicativos de novas estruturas.

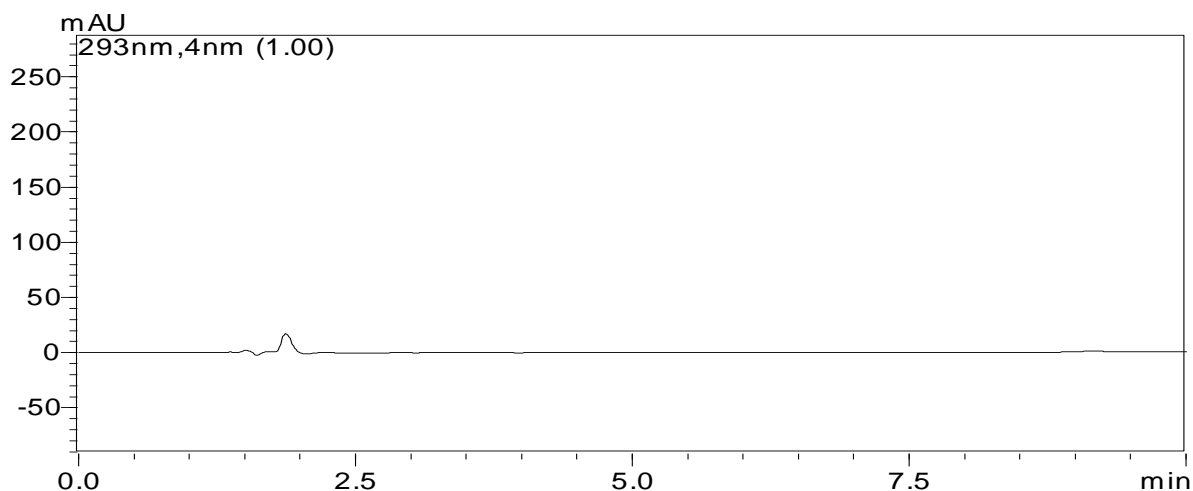


Figura I - 9 Cromatograma representativo de meio de cultivo Czapek submetido a processo extrativo. Condições cromatográficas: fase móvel TEA 1 % (pH 4,5) : ACN (80 : 20, v/v), coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 20 µL, vazão: 1,2 mL.min⁻¹ e temperatura de forno a 30 °C

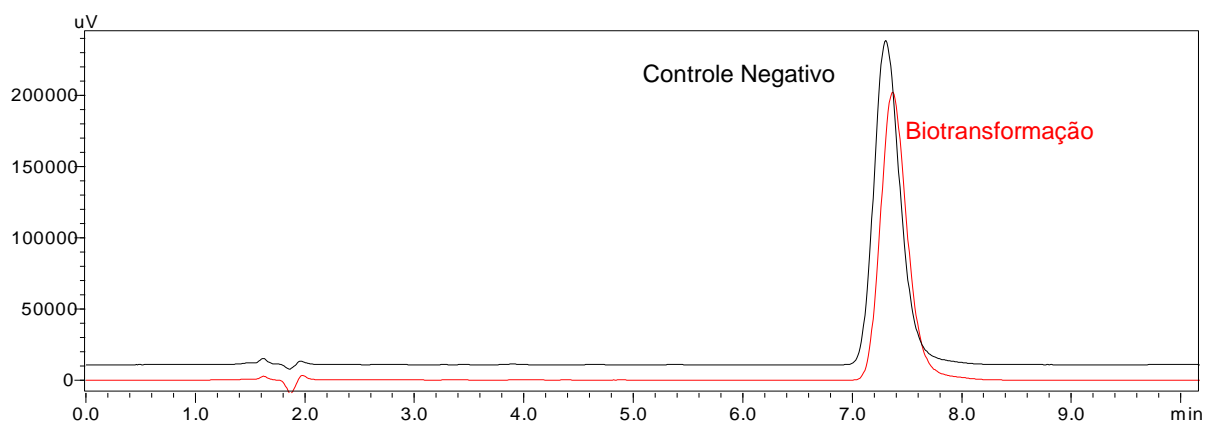


Figura I - 10 Cromatogramas comparativos entre Controle Negativo e Biotransformação. Condições cromatográficas: fase móvel TEA 1 % (pH 4,5) : ACN (80 : 20, v/v), coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 20 µL, vazão de 1,2 mL.min⁻¹ e temperatura de forno a 30 °C.

O cromatógrafo equipado com detector PDA permitiu varredura por espectroscopia no UV das amostras analisadas. Entretanto, nenhum novo sinal foi detectado no meio reacional de biotransformação.

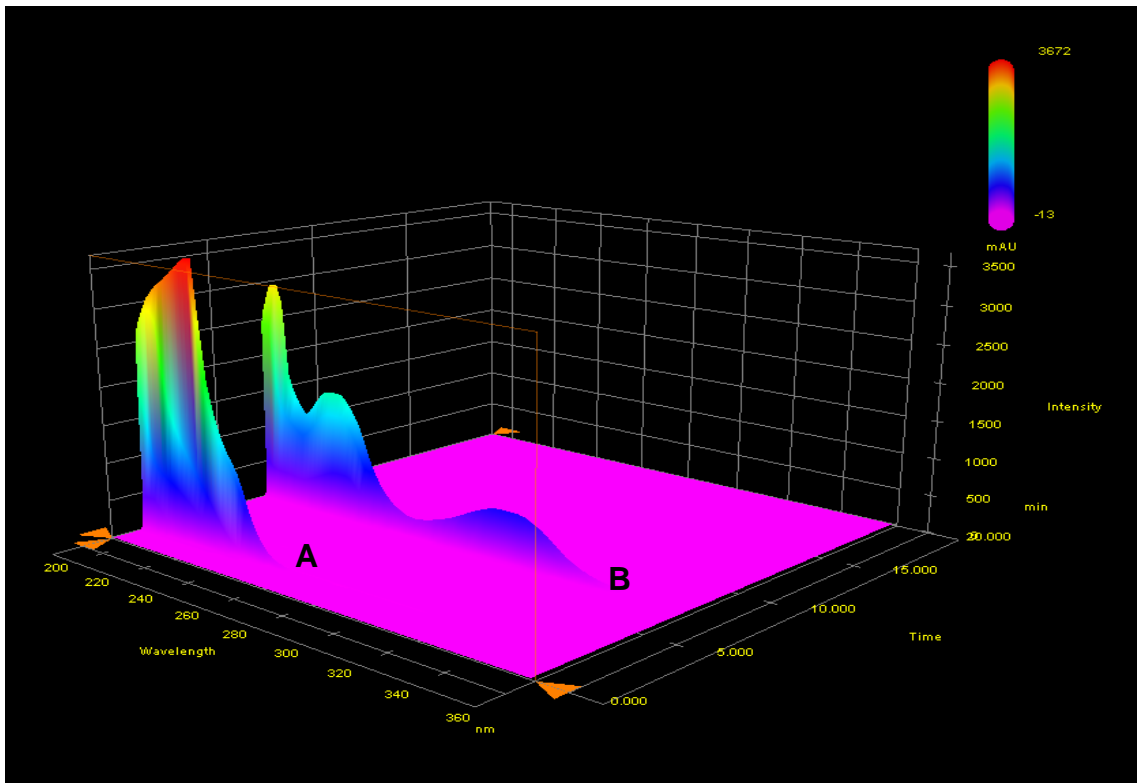


Figura I - 11 Espectrograma em perspectiva 3D da amostra biotransformação da linagliptina em meio de cultivo Czapek após 8 dias de incubação. (A) espectro referente ao volume morto da análise e (B) espectro característico da linagliptina.

Observou-se que a variação da concentração de linagliptina no meio de cultivo é indicativo de que o fármaco não foi consumido e nem metabolizado pela *C. elegans*. Este resultado corrobora com o resultado apresentado no cromatograma de biotransformação que não indicou a formação de novo picos indicativos de possíveis metabólitos (Figura I - 9 e Figura I - 11).

3.2 Vildagliptina

3.2.1 Otimização das condições cromatográficas

Modificações do método cromatográfico foram efetuadas com a finalidade de estabelecer tempo de análise próximo a 10 minutos por amostra e avaliação dos parâmetros cromatográficos obtidos. Sendo assim, duas composições de fase móvel foram avaliadas. A fase móvel tampão fosfato de potássio (Figura I - 12) foi satisfatória,

bem como os parâmetros obtidos (Tabela I - 6). Entretanto, foi necessário maior tempo de estabilização do sistema cromatográfico, ao contrário do ocorrido com a fase móvel contendo TEA. Além disso, o tempo de retirada do tampão do sistema cromatográfico após as análises é mais prolongado, o que demanda maior consumo de reagentes para efetuar a limpeza do sistema.

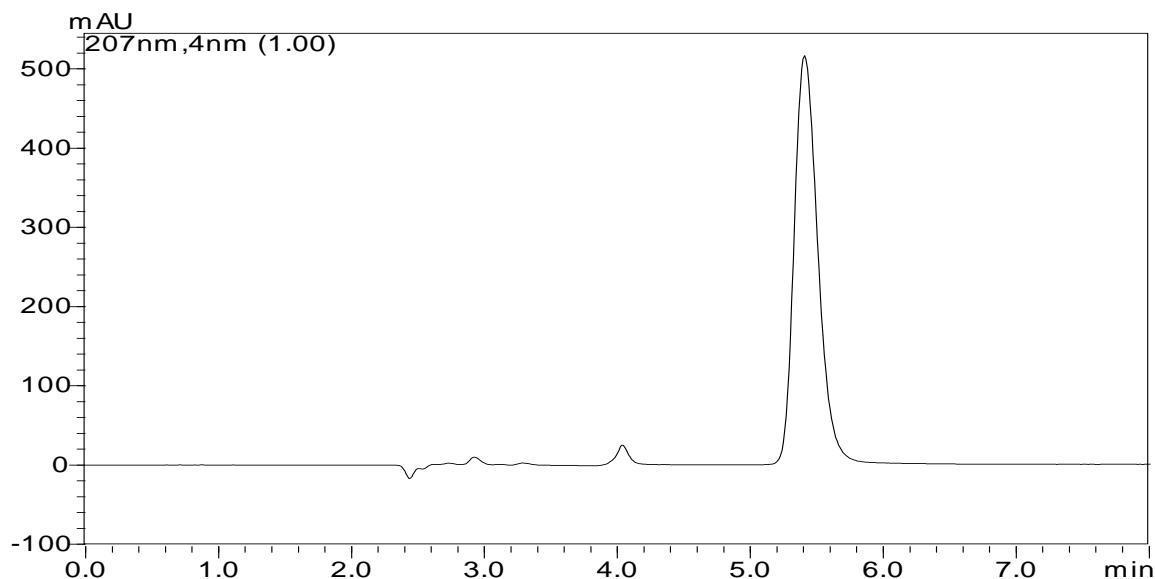


Figura I - 12 Cromatograma do padrão de vildagliptina ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) utilizando fase móvel tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) : ACN (85 :15). Condições cromatográficas: fase móvel TEA 0,3 % (pH 7,0) : ACN (85 : 15, v/v), coluna C8 (250 x 4,6 mm, 5 μm), volume de injeção de 20 μL , vazão: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura de forno a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Tabela I - 6 Parâmetros resultantes da análise do padrão de vildagliptina ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em fase móvel constituída por tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0) : ACN (85:15).

| Parâmetro | Valor |
|-------------------|-------------|
| Pratos teóricos | 4262.455 |
| Fator cauda | 1,326 |
| Área | 6434405 |
| Tempo de retenção | 5,4 minutos |

Os parâmetros cromatográficos foram avaliados e a fase móvel composta por TEA 0,3% (pH 7,0) : ACN, na proporção 85:15 (v/v) demonstrou desempenho

satisfatório na análise da vildagliptina. O tempo de retenção foi de aproximadamente 11 minutos (Figura I - 13) mantendo a pureza do pico cromatográfico. Os parâmetros obtidos estão apresentados na Tabela I - 7.

Tabela I - 7 Parâmetros obtidos da análise do padrão de vildagliptina ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizando a fase móvel TEA 0,3 % (pH 7,0) : ACN (85 : 15).

| Parâmetro | Valor |
|-------------------|--------------|
| Pratos teóricos | 5075.099 |
| Fator cauda | 1,196 |
| Área | 6710574 |
| Tempo de retenção | 11,6 minutos |

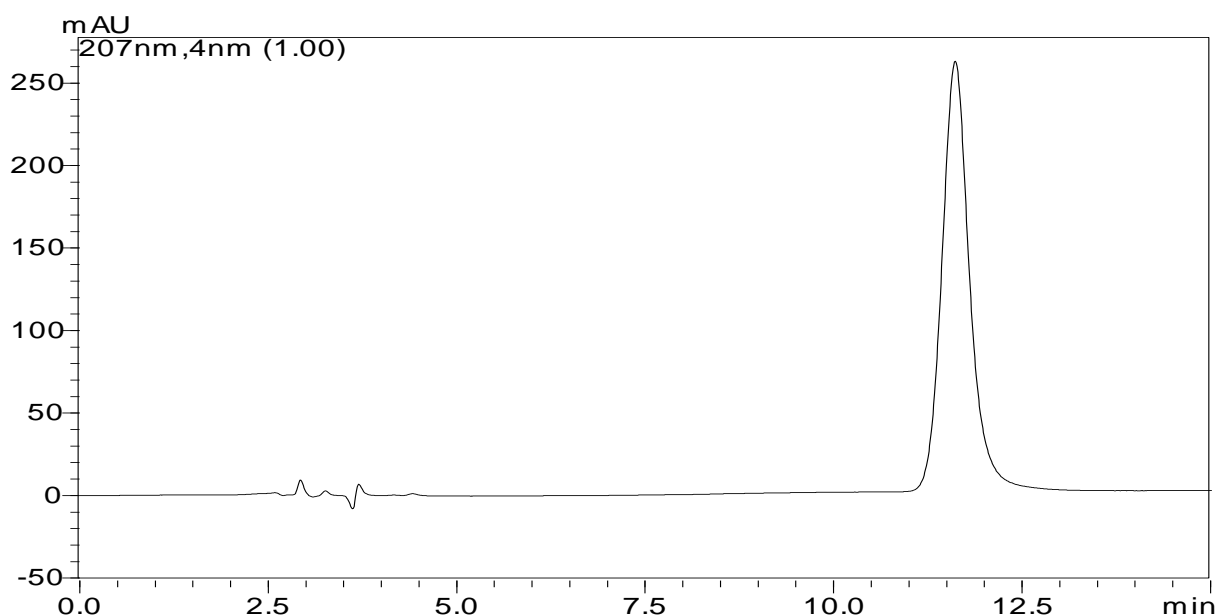


Figura I - 13 Cromatograma do padrão de vildagliptina ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em fase móvel composta por TEA 0,3 % (pH 7,0) : ACN (85:15, v/v). Condições cromatográficas: fase móvel TEA 0,3 % : ACN (85 : 15, v/v), coluna C8 (250 x 4,6 mm, 5 μm), volume de injeção de 20 μL , vazão: 1 mL.min^{-1} e temperatura de forno a 25 °C.

De acordo com os resultados dos parâmetros obtidos dos cromatogramas nas fases móveis avaliadas, o tempo de retenção determinado pela fase composta pelo tampão fosfato demonstrou-se mais adequado, pois ofereceu menor tempo de análise e manteve a pureza do pico. Entretanto uma análise mais minuciosa revela que a linha

de base desta fase móvel é mais instável que a apresentada para a fase móvel composta pela TEA e ACN. Portanto, a fase móvel constituída por TEA 0,3 % (pH 7,0): ACN (85 :15) foi a escolhida para as análises da vildagliptina.

3.2.2 Otimização do processo de extração do analito

Foram utilizados diclorometano, clorofórmio e acetato de etila na etapa de extração da vildagliptina no meio Czapek, e variações de 2 a 4 ciclos de extração. Para todas os solventes e variações avaliadas no processo extrativo do fármaco a recuperação do fármaco foi prejudicada. A análise do cromatograma da amostra após extração com diclorometano indica a presença de dois picos cromatográficos próximos no tempo de retenção do fármaco (picos 1 e 2 da Figura I - 14). Foram realizadas novas modificações na composição da fase móvel, bem como no fluxo e na vazão durante a etapa de ajuste das condições cromatográficas, a fim de melhorar a resolução entre os picos. Contudo, não foi observada melhoria na resolução dos mesmos. Através da análise comparativa dos cromatogramas do padrão do fármaco e o cromatograma do meio de cultivo submetido ao processo de extração, nota-se que a matriz apresenta interferentes.

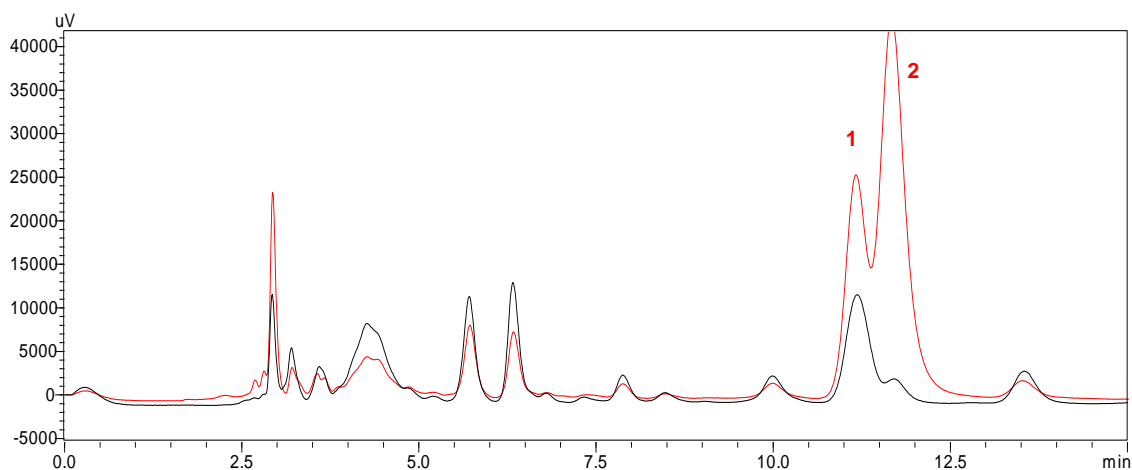


Figura I - 14 Cromatogramas comparativos do meio de cultivo Czapek submetido ao processo de extração (preto) e cromatograma representativo de amostra de vildagliptina ($t_r = 11,3$ minutos) submetida a extração do meio de cultivo Czapek (vermelho). 1) pico interferente e 2) vildagliptina. As condições cromatográficas das análises foram: fase móvel TEA 0,3 % (pH 7,0): ACN (85: 15, v/v), coluna C8 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), volume de injeção de 20 μ L, vazão de 1 mL.min⁻¹ e temperatura de forno a 25 °C.

Considerando as características químicas da molécula da vildagliptina, como a baixa absorção de comprimento de onda ($\lambda = 207$ nm), é possível inferir que a detecção nesse comprimento de onda não é adequada para avaliar o acompanhamento do ensaio de biotransformação. Tal comprimento de onda é capaz de detectar interferentes da matriz e dificultar a análise do fármaco e, conseqüentemente, dos possíveis metabólitos formados no ensaio.

Devido aos resultados pouco promissores nesta etapa, o ensaio de biotransformação não foi iniciado. Para contornar essa problemática e permitir o seguimento dos estudos de biotransformação, outros métodos de extração devem ser avaliados permitindo uma extração mais eficiente a fim de obter resultados promissores na recuperação do fármaco.

4 Conclusões

- As condições cromatográficas para análise dos fármacos propostos foram otimizadas com sucesso;
- O processo de extração da linagliptina utilizando apenas diclorometano em 4 ciclos de 3 mL foi o de melhor desempenho;
- A biotransformação da linagliptina não foi observada;
- A análise da extração da vildagliptina não foi efetiva devido à característica altamente polar do fármaco, sendo nenhum dos solventes avaliados adequados para a recuperação do fármaco em matriz complexa.
- A baixa absorção no UV da vildagliptina (207 nm) interfere na análise cromatográfica por detecção por UV, resultando em baixa resolução dos sinais após a etapa extrativa.
- Necessidade de avaliação de métodos extrativos mais seletivos e eficientes para a vildagliptina.

CAPÍTULO II

Biotransformação de ticagrelor e rivaroxabana

1 Introdução

1.1 Ticagrelor

No mercado farmacêutico, tem-se observado um crescimento exponencial de agentes anticoagulantes e antiplaquetários para uso clínico com o objetivo de substituir fármacos que apresentam maiores riscos de erro de dose, bem como auxiliar no tratamento de doença arterial coronariana. No Brasil, fármacos como a rivaroxabana, o prasugrel e o ticagrelor já foram aprovados pela ANVISA e fazem parte de um arsenal farmacológico no tratamento e profilaxia de eventos trombóticos (SBC, 2013).

O ticagrelor (Figura II - 1) pertence à classe de fármacos antiplaquetários conhecidos como ciclopentiltriazolpirimidinas. O fármaco foi desenvolvido pela AstraZeneca, aprovado pela ANVISA em 2010 e comercializado com o nome de Brilinta® (comprimidos contendo 90 mg de ticagrelor). O ticagrelor é um antiplaquetário de uso oral atuando como antagonista do receptor de adenosina difosfato P2Y₁₂ (SPRINGTHORPE *et al.*, 2007). Um estudo *in vitro* apresentado por Van Giezen e colaboradores (2009) demonstrou que o ticagrelor se liga de maneira reversível ao receptor, permitindo que sua administração em pacientes submetidos a cirurgias possa ser suspenso.

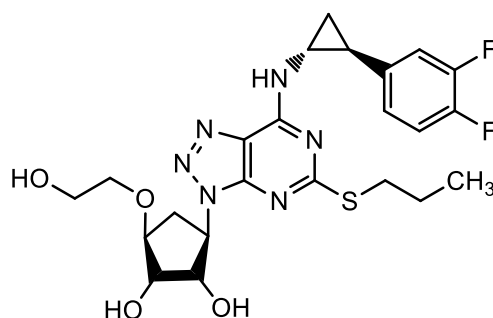


Figura II - 1 Estrutura química do Ticagrelor ((1S,2S,3R,5S) -3-[7-[(1R,2S) -2-(3,4-Difluorofenil) ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3] triazol [4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxiétoxi) ciclopentano-1,2-diol).

O ticagrelor é amplamente metabolizado via CYP3A4 e apresenta menor metabolização pela CYP3A5 (ZHOU *et al*, 2011). No estudo apresentado por LI e colaboradores (2011), foram detectados 14 metabólitos resultantes do metabolismo do ticagrelor em diferentes mamíferos, incluindo humanos. Entre esses, dois se apresentam em maior quantidade, sendo um metabólito ativo (AR-C124910) e o outro (AR-C133913) inativo, conforme apresentados na Figura II - 2.

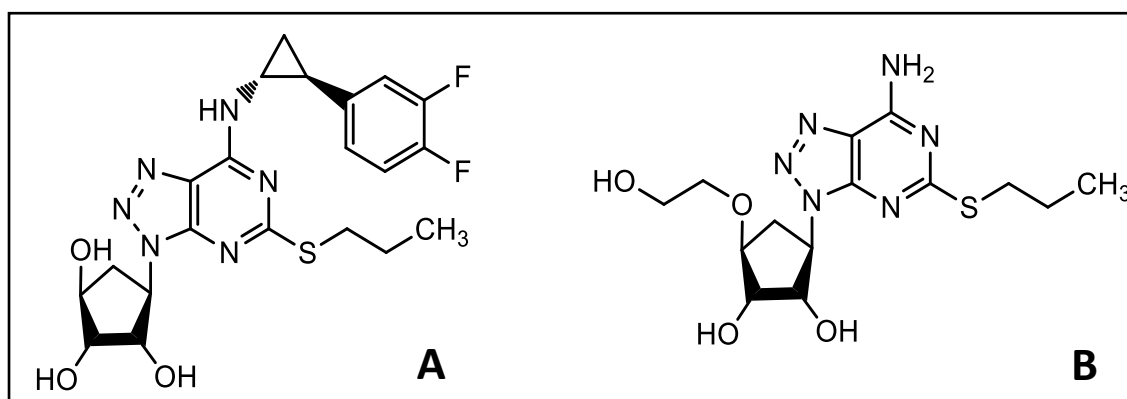


Figura II - 2 Estruturas químicas dos principais metabólitos de ticagrelor. A) AR-C124910 e B) AR-C133913.

1.2 Rivaroxabana

A rivaroxabana, (5-cloro-N-(((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinil)fenil]-1,3-oxazolidina-5-il)metil)-2-tiofenocarboxamida, C₁₉H₁₈ClN₃O₅S) (Figura II - 3), de massa molar 435,90 g/mol é um anticoagulante oral utilizado na profilaxia da embolia pulmonar e do tromboembolismo venoso profundo em cirurgias ortopédicas de grande porte de membros inferiores (LANG *et al*, 2009; ROHDE, 2008).

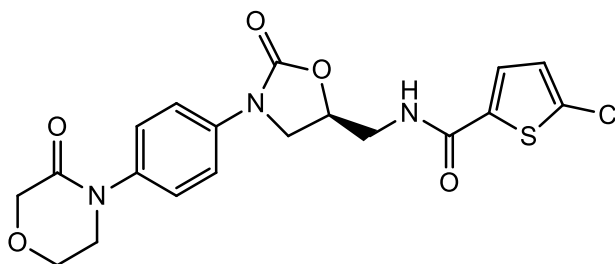


Figura II - 3 Estrutura química da rivaroxabana

A rivaroxabana é um inibidor altamente seletivo do fator Xa (FXa). A ativação do fator X à FXa, desempenha fator fundamental a cascata da coagulação sanguínea. Com a inibição do FXa, ocorre a inibição da geração de trombina e, por consequência, no processo de coagulação sanguínea (SBC, 2013).

A metabolização da rivaroxabana em humanos ocorre por meio de CYP3A4 e CYP2J2, isoformas da CYP450. Segundo um estudo de metabolismo *in vitro*, desenvolvido pela Bayer, utilizando microsomas e hepatócitos de mamíferos, foram encontrados e identificados 18 metabólitos de rivaroxabana. A Figura II - 4 apresenta uma proposta metabólica para a rivaroxabana e seus metabólitos no organismo humano (WEINZ *et al.*, 2009).

Os fármacos ticagrelor e rivaroxabana são metabolizados via CYP450 em mamíferos e como consequência, diversos metabólitos são produzidos. Diante da capacidade de metabolização de substratos via sistema análogo ao CYP450 de *C. elegans*, a possibilidade de formação de grande número de metabólitos e a ausência de estudos de biotransformação desses fármacos, justificaram a elaboração desses estudos. Este capítulo teve como objetivo a biotransformação do ticagrelor, bem como da rivaroxabana, utilizando o fungo *C. elegans* ATCC 9245. Para a execução dos experimentos, foi necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas, para as análises por CLAE, dos fármacos e seus possíveis metabólitos gerados em meio de cultivo Czapek.

2 Materiais e métodos

2.1 Otimização das condições cromatográficas

Materiais

O padrão de referência do ticagrelor (log P: 2,3), foi obtido comercialmente pela empresa Sequoia Research Products (Reino Unido) com pureza de 99,70%. O padrão de referência da rivaroxabana (log P: 1,9), com pureza de 99,635%, foi obtido comercialmente da empresa BOC Science (Shirley/NY, Estados Unidos). Utilizou-se ACN e TEA (grau cromatográfico) obtidas da Merck (Darmstadt, Alemanha) para o preparo da fase móvel. Utilizou-se DMSO adquirido da Vetec (Duque de Caxias/RJ, Brasil) e Tween 80 USP, adquirido da Synth (Diadema/ SP, Brasil), como diluentes do fármaco e ácido fosfórico 85 % (P.A.) para ajuste de pH da fase móvel, adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura utilizada para o preparo da fase móvel foi obtida através de sistema Millipore Direct-Q3UV (Darmstadt, Alemanha).

As pesagens dos padrões dos fármacos foram realizadas em balança eletrônica analítica da marca AND, modelo HM-202. Para a filtração das amostras, usou-se filtros para seringa de membrana de nylon de poro 0,45 μ m, da Millipore Millex[®] (Darmstadt, Alemanha). Para análise da rivaroxabana e do ticagrelor, utilizou-se uma coluna Phenomenex[®] Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Os pHs das fases móveis foram ajustados em potenciômetro digital da Digimed. O sistema cromatográfico utilizado para ambos fármacos foi um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo 20-A equipado com sistema controlador CBM-20A, bombas de fluxo LC-20AT, injetor automático SIL-20A/C, forno e detector PDA. Para controle de aquisição de dados utilizou-se o software LCSolutions versão 1.25.

Métodos

Usou-se fase móvel composta por ACN : água ultrapura + 0,5 % TEA (pH 7,0, ajustado com ácido fosfórico) para a análise dos dois fármacos. Preparou-se uma solução-estoque de ticagrelor (1 mg.mL⁻¹) solubilizado em metanol com 0,001 % de DMSO + 0,001 % de Tween 80. A partir da solução-estoque, foi preparada uma

solução-padrão diluída em fase móvel (70 : 30, v/v) atingindo concentração final de 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A solução-padrão foi filtrada em filtro (0,45 μm) e analisada por CLAE-UV. A detecção do ticagrelor foi realizada em comprimento de onda em 255 nm. Foram avaliadas diferentes proporções da fase móvel, além de ajustes no fluxo do método na análise.

Para a análise da rivaroxabana, utilizou-se uma solução-padrão de rivaroxabana a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a partir de uma solução-estoque de 0,5 mg.mL^{-1} preparada com DMSO + 0,001 % de Tween 80. A solução-padrão foi diluída em fase móvel composta por ACN : TEA 0,5 % (pH 7,0) (57:43, v/v) e, em seguida, filtrada e analisada por CLAE-UV. A temperatura de análise foi realizada a 25°C, com fluxo de 1 mL.min^{-1} , volume de injeção de 20 μL , eluição no modo isocrático em comprimento de onda em 249 nm.

2.2 Etapa de extração dos fármacos em meio Czapek

Materiais

Os solventes orgânicos utilizados na etapa de extração dos fármacos foram: diclorometano adquirido da Dinâmica (Diadema/ São Paulo, Brasil), acetato de etila e hexano obtido da Synth (Diadema/ SP, Brasil) e clorofórmio da Vetec (Duque de Caxias/ Rio de Janeiro, Brasil), todos grau P.A. Para a fase móvel, foram utilizados ACN e TEA, de grau cromatográfico. Utilizou-se meio de cultivo Caldo Czapek diluído a 50 % para o preparo das amostras.

Métodos

Foram preparadas soluções-estoque dos fármacos conforme etapa anterior. Para o preparo das amostras, alíquotas de cada solução-estoque foram adicionadas ao meio de cultivo Czapek diluído a 50 % separadamente. A concentração para a amostra de rivaroxabana foi de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de ticagrelor foi de 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O processo de extração líquido-líquido foi realizado através da mistura de um volume de 2 mL da amostra com 4 mL de solvente orgânico. Agitou-se vigorosamente o sistema bifásico. Após a separação completa de fases do sistema, a porção orgânica foi coletada e separada para cada amostra. O processo foi repetido por outras duas vezes, totalizando 3 volumes de 4 mL de cada solvente para cada fármaco. Os solventes orgânicos foram evaporados sob fluxo constante de ar em capela de exaustão. Após completa secagem, os resíduos foram ressuspensos com 2 mL de fase móvel e filtrados em membranas de porosidade de 0,45 µm para análise por CLAE-UV.

2.3 Ensaio de biotransformação

Materiais

Usou-se o meio de cultivo ágar Sabouraud (Tabela I- 2) para o pré-cultivo e Caldo Czapek (Tabela I- 1) diluído a 50 % para cultivo da cepa de *C. elegans* ATCC 9245; solução de NaCl 0,9 % estéril para o preparo do inóculo e solução de DMSO e 0,001 % de Tween 80 para a solubilização dos fármacos.

A esterilização dos materiais, meios de cultivo e solução salina foi realizada em autoclave vertical da Webeco. A padronização do inóculo fúngico foi realizada com o auxílio de fotocolorímetro (Analyser 800-M). A incubação do sistema de biotransformação, bem como os controles do estudo, foi realizada à temperatura constante (27°C) sobre plataforma de agitação horizontal a 120 rpm.

Métodos

Após o preparo do inóculo fúngico, os frascos contendo 100 mL de meio Czapek a 50 % estéril receberam 2 mL do inóculo padronizado. Os frascos foram incubados a 27 °C sob agitação constante a 120 rpm. Após 72 horas da incubação, aos frascos *controle negativo* e *biotransformação* foram adicionadas soluções dos fármacos diluídos em DMSO + 0,001 % Tween 80. A concentração final de ticagrelor foi de 20 µg.mL⁻¹ e de rivaroxabana foi de 33 µg.mL⁻¹. Importante salientar que, nesta

etapa, os fármacos foram adicionados em frascos diferentes, não ocasionando a mistura entre os fármacos. A composição do experimento segue conforme apresentado na Tabela I- 3.

Após 24 horas da adição dos fármacos, e sob condições assépticas, foram realizadas coletas (2 mL, $n = 3$) dos frascos biotransformação, controle positivo e controle negativo. As amostras foram coletadas e armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o momento de extração dos analitos.

2.4 Análise das amostras de biotransformação da rivaroxabana por UHPLC - QTOF - MS

Para a execução das análises de biotransformação da rivaroxabana foi utilizado equipamento cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a analisador de massas por tempo de voo com ionizador *electrospray* (UHPLC-QTOF-MS) da Waters 3200.

Amostras analisadas por CLAE foram filtradas em filtros para seringa de porosidade 0,22 μm e utilizadas para análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas apropriado para a análise de compostos desconhecidos. As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química desta Universidade, onde foi desenvolvido o método analítico para determinação dos analitos. As amostras foram analisadas no modo de ionização positivo. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Shim-pack XR-ODS III (50 mm x 2mm, tamanho de partícula de 1,6 μm), temperatura a 35 °C e fase móvel composta por água (0,1 % ácido fórmico) e ACN (0,1% ácido fórmico). Utilizou-se gradiente de fase móvel de: 0 - 3 minutos 95 % de ACN; 3 – 7 minutos 95 % a 15 % de ACN; 7 – 9 minutos 15 % de ACN; 9 - 11 minutos 15 % a 95 % de ACN e de 11 - 15 minutos de 95% de ACN. A vazão da fase móvel pela coluna foi de 0,3 mL.L⁻¹. Os parâmetros da fonte foram: voltagem de 4000 V, pressão do gás nebulizador: 3 bars, vazão de gás secante de 9 L.min⁻¹ e temperatura de secagem a 190 °C. Para aquisição dos dados da EM foi utilizado o método bbCID (*Broadband Collision Induced Dissociation*).

3 Resultados e discussão

3.1 Ticagrelor

3.1.1 Otimização das condições cromatográficas

Foram avaliadas diferentes condições cromatográficas para o ticagrelor utilizando como base as condições propostas no estudo de Gobetti e colaboradores (2015), apresentadas na Tabela II - 8.

Tabela II - 8 Condições cromatográficas iniciais para a análise de ticagrelor (GOBETTI *et al.*, 2015).

| Condições iniciais | |
|---------------------------|--|
| Fase móvel | Acetonitrila : trietilamina 0,5% (57:43) |
| pH | 7,0 |
| Fluxo da fase móvel | 0,7 mL/min |
| Coluna cromatográfica | Phenomenex C18 Luna (250 x 4,6 mm, 5,0 µm) |
| Temperatura da coluna | 25°C |
| Volume de injeção | 20 µl |

Utilizando as condições propostas, exceto a coluna que foi substituída por uma de 150 mm de comprimento, o tempo de retenção obtido foi de 9 minutos. Para tanto, as modificações realizadas foram na proporção de fase orgânica e alterações no fluxo do sistema, conforme especificado na Tabela II - 9. O objetivo desta etapa foi ajustar o tempo de retenção do fármaco para tempo inferior a 10 minutos, devido ao elevado número de amostras.

Tabela II - 9 Modificações avaliadas na otimização cromatográfica para o ticagrelor.

| Modificações cromatográficas | | |
|---|---|-------------------------|
| Proporção Fase móvel (ACN: TEA 0,5%, v/v) | Fluxo da fase móvel (mL.min ⁻¹) | Tempo de retenção (min) |
| 55:45 | 0,7 | 10,7 |
| 57:43 | 0,7 | 9,7 |
| 60:40 | 0,7 | 8,36 |
| 70:30 | 0,7 | 7,02 |
| 70:30 | 1,0 | 4,27 |

Entre as modificações que foram avaliadas, a proporção 70:30 e fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ foi a de escolha para seguimento do ensaio (Figura II - 5).

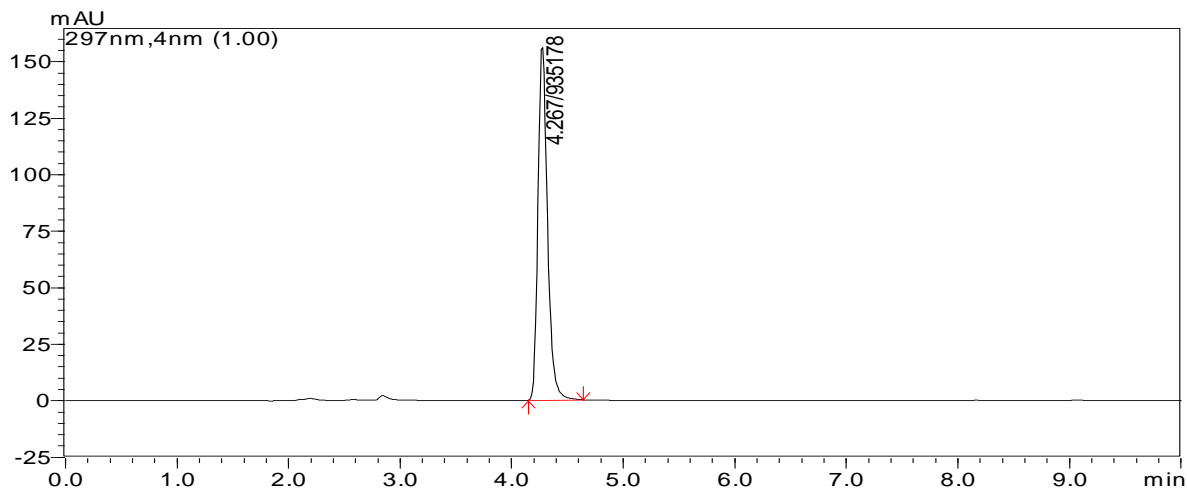


Figura II - 5 Cromatograma do padrão de ticagrelor (70 µg.mL⁻¹) em fase móvel ACN:TEA 0,5% (pH 7,0) (70 : 30, v/v) e fluxo de 1 mL.min⁻¹.

Conforme os resultados apresentados, o tempo de retenção determinado pela fase móvel ACN : TEA 0,5 % (pH 7,0) com fluxo de 1 mL.min⁻¹ foi de 4,27 minutos. O tempo de retenção do ticagrelor foi ajustado a fim de obter tempo de análise inferior a 10 minutos. A pureza do pico foi próxima à unidade.

3.1.2 Etapa de extração do fármaco

Para a extração do fármaco foram avaliados o desempenho do diclorometano, acetato de etila e clorofórmio na extração do ticagrelor. Dentre os solventes orgânicos, o diclorometano foi o selecionado para a etapa de extrações do fármaco e de seus possíveis metabólitos. A recuperação foi de aproximadamente 70 %.

3.1.3 Biotransformação

A literatura oferece poucas informações a respeito da análise cromatográfica dos metabólitos do ticagrelor em humanos quando analisados por cromatografia líquida (ZHONG *et al.*, 2016; ZHOU; ANDERSSON; GRIMM, 2011). No presente estudo, as análises dos cromatogramas do ticagrelor revelaram que o fármaco sofre provável processo de degradação quando em meio de cultivo. A presença dos picos 1, 2 e 4 nos cromatogramas do controle negativo e de biotransformação sugerem que o fármaco está sofrendo alguma forma de degradação em meio de cultivo após 10 dias de incubação. Entretanto, a presença do pico 3 (Figura II - 6) é detectado unicamente no cromatograma de biotransformação, indicando formação de um possível metabólito.

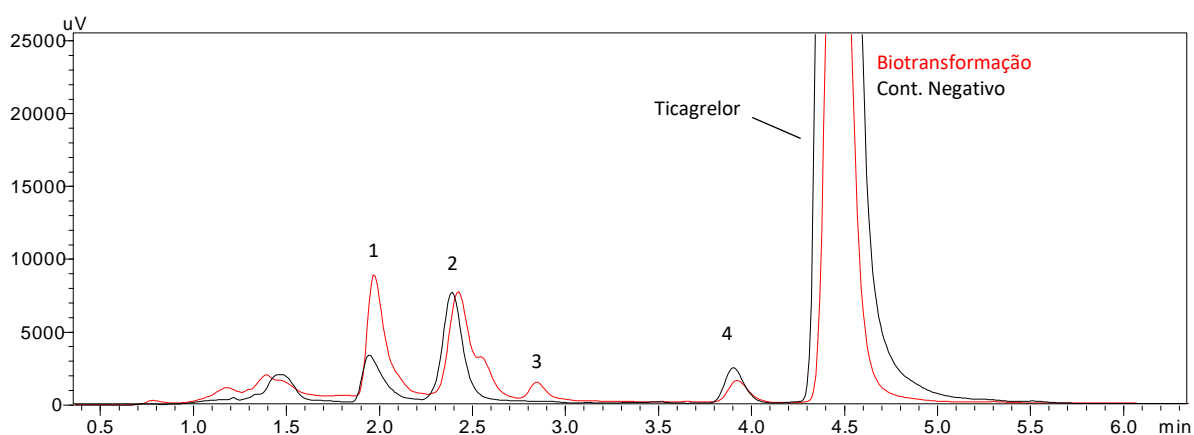


Figura II - 6 Cromatogramas sobrepostos de controle negativo e biotransformação com 240 horas de incubação. Condições cromatográficas: fase móvel TEA 0,3 % (pH 7,0) : ACN (70 : 30, v/v), coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 20 µL, vazão: 1 mL.min⁻¹ e temperatura de forno a 25°C.

Conforme a Figura II - 7, é possível visualizar a redução de área do pico do fármaco em relação ao controle negativo submetido ao mesmo processo de extração (mesmo dia e analista), representando, dessa maneira, o consumo de ticagrelor através da *C. elegans*. Tanto o cromatograma do controle positivo quanto do meio de cultivo, indicam que a presença do fungo e/ ou do meio Czapek não interferem nas análises por CLAE.

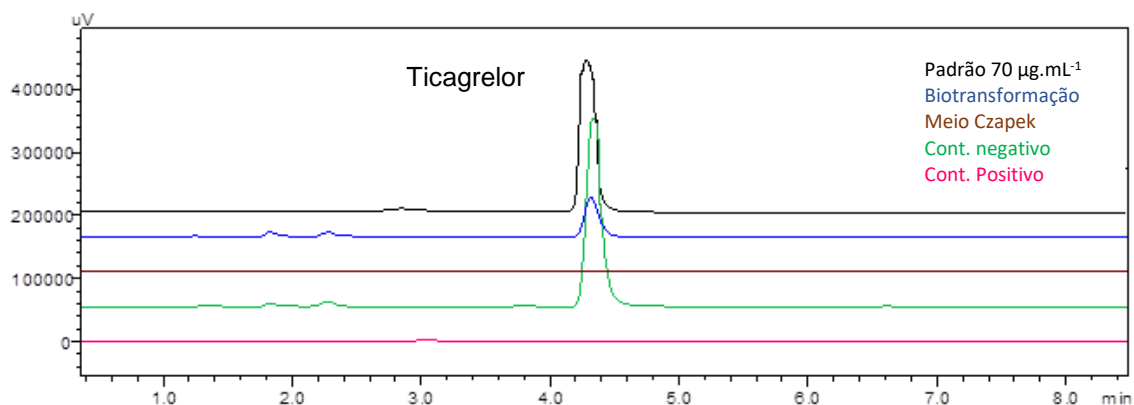


Figura II - 7 Cromatogramas representativos do ensaio de biotransformação de amostras de 5 dias de incubação em meio Czapek. Condições cromatográficas: fase móvel TEA 0,3% (pH 7,0): ACN (70 : 30, v/v), coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), volume de injeção de 20 µL, vazão d: 1 mL. min⁻¹ e temperatura de forno a 25°C.

Diante dos resultados apresentados para o ticagrelor, denota-se necessidade de análises por CLAE-EM para identificação e melhor confirmação da possibilidade de formação de metabólitos e processo de degradação química do ticagrelor no meio de biotransformação.

3.2 Rivaroxabana

3.2.1 Otimização das condições cromatográficas

O estudo apresentado por Wingert e colaboradores (2015), apresenta o desenvolvimento de um método de validação analítica na avaliação da robustez do método para a rivaroxabana. Nesse estudo a fase móvel utilizada foi ACN : TEA 0,5 % pH 7,0 (57 : 43, v/v) com vazão de 0,7 mLmin⁻¹ . O pico do fármaco apresentou eluição em 9,7 minutos de análise.

Foram realizadas variações de vazão e de proporção de solvente orgânico da fase móvel para análise do fármaco. Como resultado, a modificação apenas na vazão da fase móvel foi suficiente para a obtenção de tempo de retenção considerado satisfatório. Sendo assim, as condições ideais de análise foram fase móvel TEA 0,5 % pH 7,0 : ACN na proporção 57:43 e vazão a 1 mL/min⁻¹. O tempo de retenção obtido para a rivaroxabana foi de 6,1 minutos (Figura II - 8).

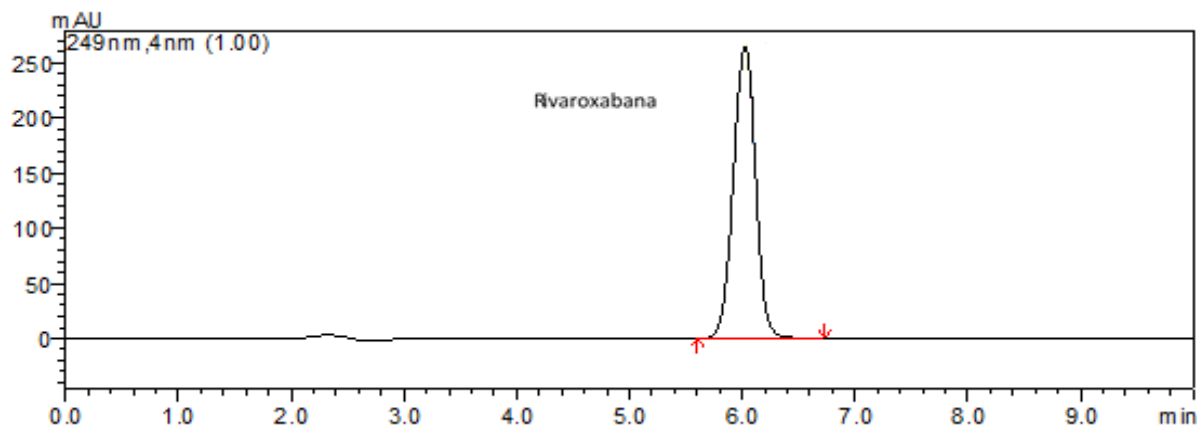


Figura II - 8 Cromatograma do padrão de rivaroxabana ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) eluído e fase móvel TEA 0,5 % : ACN, 43:57 (v/v). Condições de análise: coluna C18 (250 x 4,6 mm, $5\mu\text{m}$), vazão a $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e leitura em comprimento de onda em 249 nm.

Etapa de extração do fármaco

Entre os solventes orgânicos avaliados na determinação da recuperação da rivaroxabana no processo de extração, o diclorometano foi o que apresentou melhor desempenho frente aos demais solventes orgânicos. A recuperação com diclorometano foi superior a 90 % (Figura II - 9) enquanto que a recuperação do fármaco com acetato de etila foi de 78 %.

Ainda que o diclorometano apresente toxicidade ao ambiente, este foi o solvente extrator de escolha por oferecer menor ponto de ebulição frente aos outros solventes avaliados, e, com isso, oferece melhor tempo de evaporação. Toda etapa de extração foi realizada em capela de exaustão e com o uso de EPI's adequados para a manipulação.

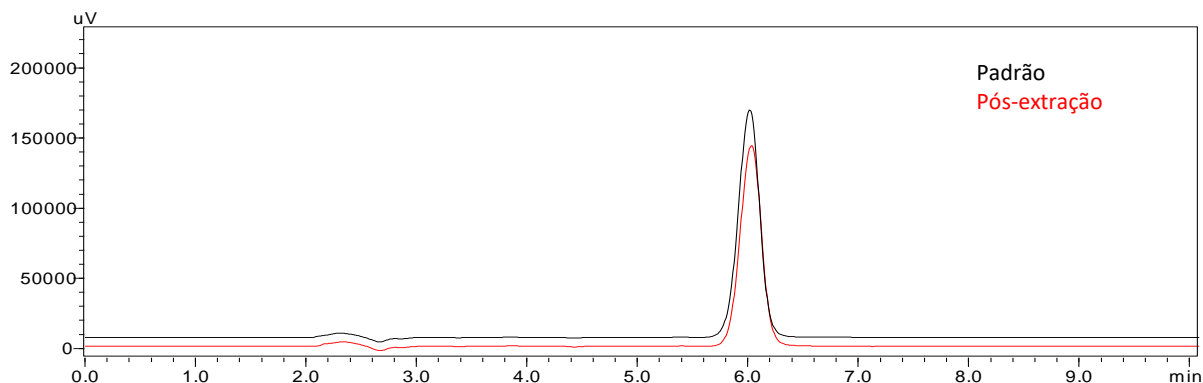


Figura II - 9 Cromatogramas resultantes da análise por CLAE de amostras após etapa de extração da rivaroxabana ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por diclorometano (vermelho) em meio Czapek e padrão do fármaco ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Condições de análise: fase móvel TEA 0,5 % : ACN, 43:57 (v/v), coluna C18 (250 x 4,6 mm, $5\mu\text{m}$), vazão a 1 mL.min^{-1} e temperatura a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2 Biotransformação

O ensaio de biotransformação revelou um consumo de rivaroxabana por *C. elegans* durante os primeiros quatro dias de experimento, conforme apresentado na Figura II - 10. Análises por cromatografia, demonstraram a presença de picos (Figura II - 11) indicativo de formação de possíveis metabólitos apenas no sistema de biotransformação. A partir dessa informação, a amostra foi conduzida a cromatografia acoplada a massas para a identificação dos possíveis metabólitos.

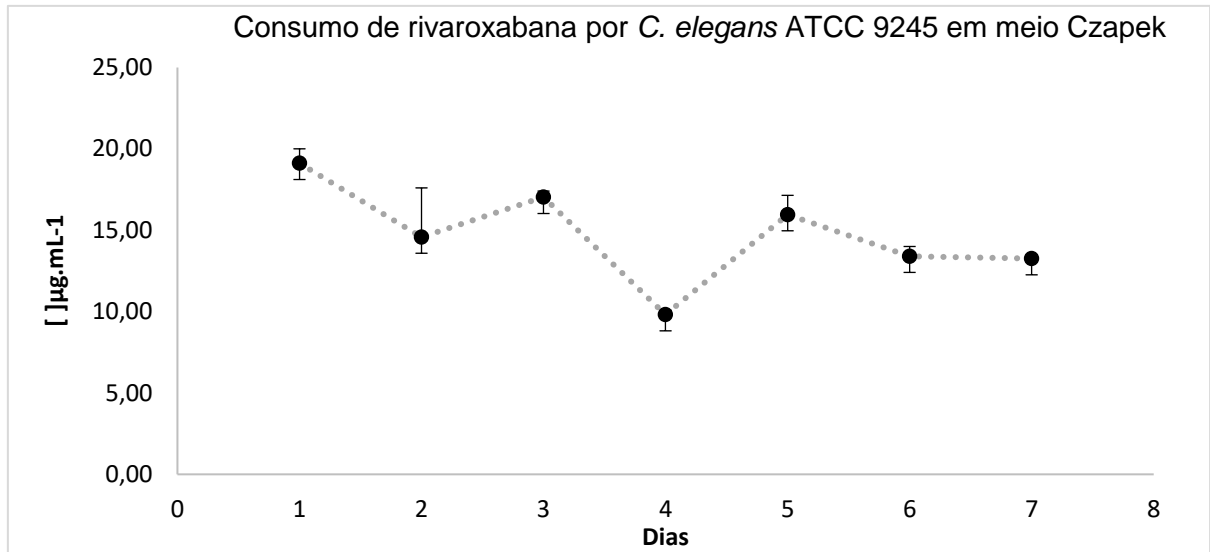


Figura II - 10 Gráfico demonstrativo do perfil de consumo de rivaroxabana por *C. elegans* ATCC 9245 em meio Czapek 50 %. As barras verticais expressam o desvio padrão relativo das replicatas ($n = 3$).

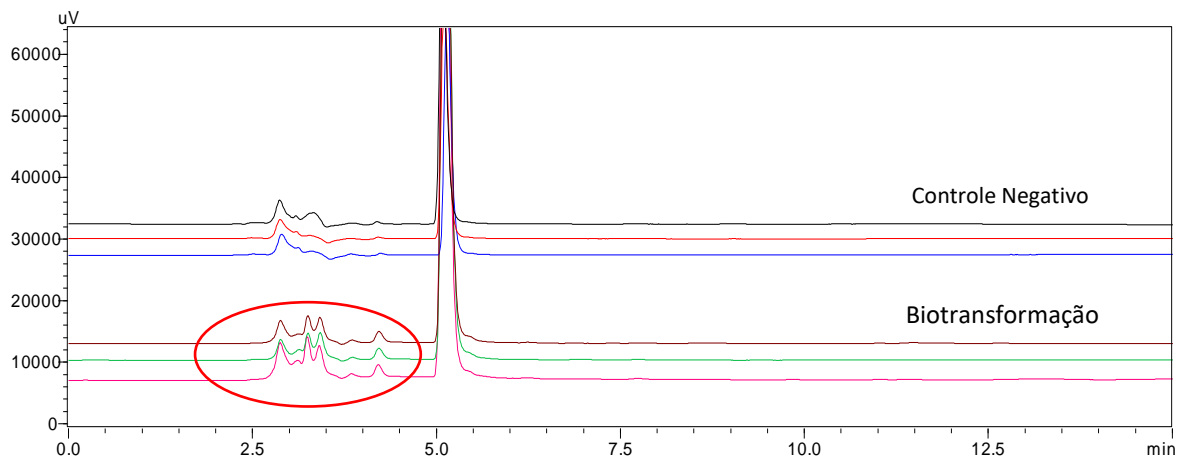


Figura II - 11 Cromatogramas comparativos entre controle negativo ($n = 3$) e biotransformação de 96 horas ($n = 3$). Os picos indicativos de possíveis metabólitos estão indicados no círculo vermelho. Condição de análise: fase móvel composta por TEA 0,5 % : ACN, 43:57 (v/v), coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5µm), vazão a 1 mL.min⁻¹ e temperatura a 25 °C.

Através da análise em UHPLC-QTOF-MS, foi possível visualizar apenas os fragmentos referentes à rivaroxabana (Figura II - 12 B).

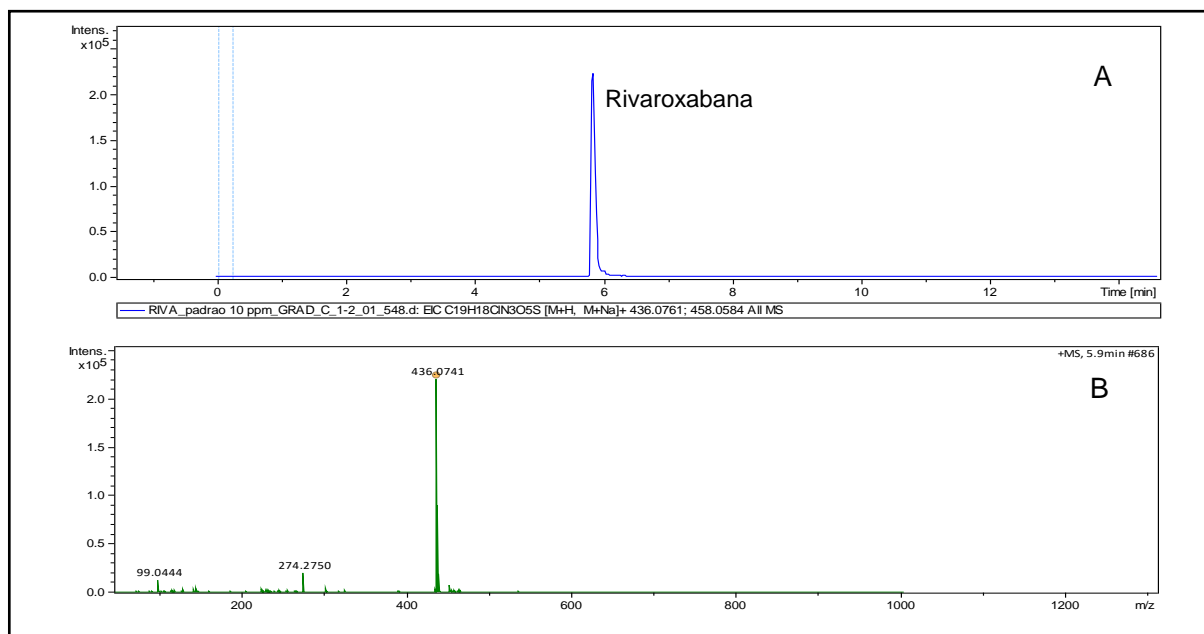


Figura II - 12 Cromatograma representativo do padrão de rivaroxabana. (B) espectro de massas do padrão de rivaroxabana. Análises efetuadas por UHPLC-QTOF-MS, modo de ionização positivo.

O UHPLC acoplado ao detector de massas é um equipamento que apresenta maior sensibilidade nas análises frente ao detector PDA. Em função desta característica e, levando em consideração a curva de decaimento da concentração do fármaco em meio reacional, a análise global do ensaio sugere que não ocorre biotransformação da rivaroxabana.

Amostras do meio Czapek, controle positivo e controle negativo foram, da mesma maneira, encaminhadas para análise por UHPLC-QTOF-MS. O cromatograma resultante do controle positivo indica a presença de um pico (Figura II - 13). Este mesmo sinal é apresentado nos cromatogramas representativos de controle negativo e biotransformação, sugerindo que este pico tem origem do meio de cultivo Czapek.

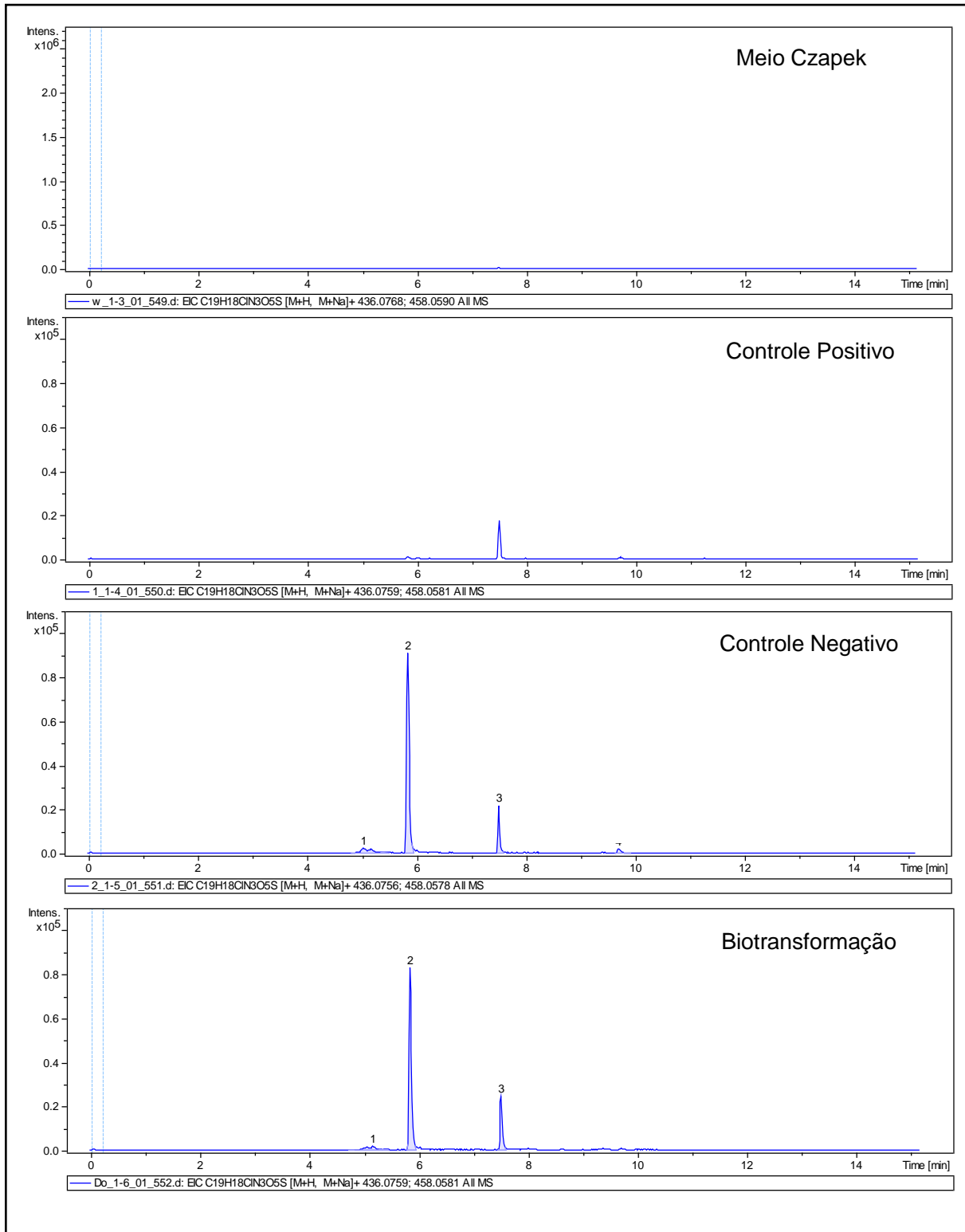


Figura II - 13 Cromatogramas resultantes das análises de (A) meio Czapek; (B) Controle positivo (meio + fungo) (C) Controle negativo (meio + fármaco); (D) Biotransformação (meio + fungo + fármaco). 1) e 3) possíveis picos de degradação da rivaroxabana e 2) pico do padrão de rivaroxabana. Todas as análises foram efetuadas em equipamento UHPLC-QTOF-MS.

Os perfis cromatográficos da amostra de biotransformação e de controle negativo apresentam-se extremamente semelhantes (Figura II - 14), indicativo de que a *C. elegans* ATCC 9245 não promoveu a metabolização do fármaco.

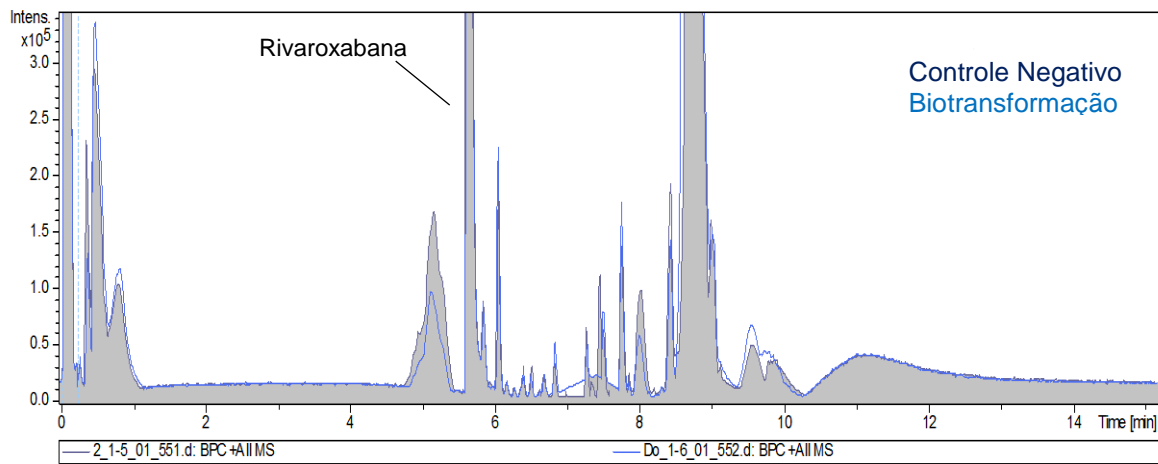


Figura II - 14 Cromatogramas resultantes da análise por UHPLC das amostras de biotransformação (linha azul claro) e controle negativo (área cinza).

4 Conclusões

- As otimizações cromatográficas foram ajustadas satisfatoriamente para as análises de ticagrelor e de rivaroxabana.
- O processo de extração para os fármacos utilizando diclorometano em 4 ciclos de 3 mL apresentou boa recuperação dos fármacos em matriz biológica.
- A análise por CLAE-UV de biotransformação do ticagrelor apresentou picos cromatográficos com característica de metabólitos.
- Cromatograma do controle negativo de ticagrelor sugere possível processo de degradação do ticagrelor.
- A formação de metabólitos da biotransformação da rivaroxabana não foi observada por UHPLC-QTOF-MS.
- O uso de meio Czapek diluído a 50 % não interferiu no desenvolvimento de *C. elegans* ATCC 9245 bem como nas análises por cromatografia.

CAPÍTULO III

Biotransformação de metronidazol e validação analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

1 Introdução

O metronidazol (Figura III - 1) é um antimicrobiano nitroimidazólico amplamente difundido na clínica médica para o tratamento de infecções causadas por microorganismos anaeróbios, amebíases, giardíase, tricomoníase e infecções por *Helicobacter pylori* e *Gardnerella vaginalis*. O fármaco é completa e rapidamente absorvido após administração oral. Apresenta boa distribuição nos tecidos e líquidos dos organismos. Em pacientes com comprometimento hepático, o uso de metronidazol pode levar à toxicidade do organismo (PANAVELLI *et al*, 2016).

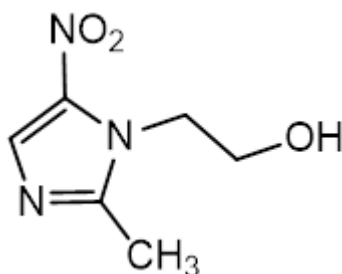


Figura III - 1 Estrutura química do metronidazol (2-(2-metil-5-nitro-1-imidazol-1-il)).

A biotransformação do metronidazol é dependente da oxidação hepática de sua cadeia lateral pelas oxidases de função mista, seguida de glicuronização em mamíferos, permitindo sua excreção na urina. Em humanos, são produzidos três metabólitos derivados do metronidazol (Figura III - 2). O principal metabólito é o alcoólico (2-hidroximetronidazol), que possui atividade bactericida sobre microorganismos anaeróbios de aproximadamente 30 %, quando comparado ao metronidazol, e uma meia-vida de eliminação de 11 horas. O metabólito ácido tem uma atividade bactericida de 5 % (SZULTKA-MLYNSKA; BUSZEWSKI, 2016).

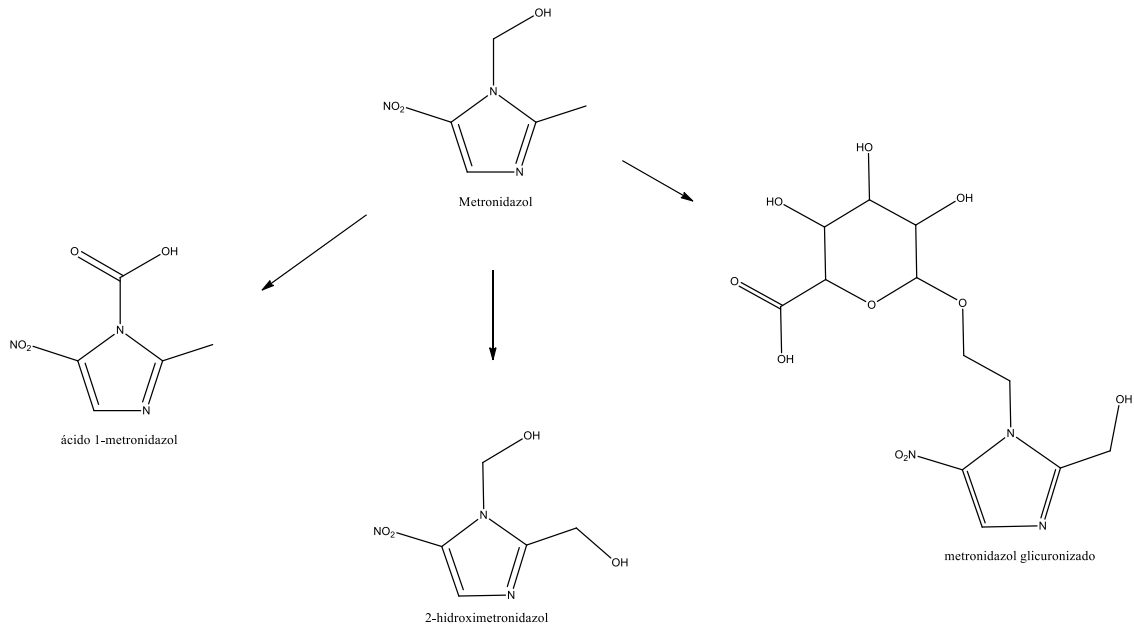


Figura III - 2 Metabólitos derivados do metronidazol em humanos

O objetivo deste capítulo foi avaliar a biotransformação do metronidazol empregando o fungo endófito *C. elegans* ATCC 9245. Para viabilizar a análise do fármaco e dos possíveis metabólitos formados em meio de cultivo Czapek, foi necessário desenvolver metodologia analítica e validar conforme orientações dispostas nas guias de referência de validação bioanalítica.

2 Materiais e métodos

2.1 Processo de extração

Materiais

Foi utilizado o meio de cultivo Czapek (Tabela I- 1) diluído a 50 % para preparo das soluções-padrão submetidas à recuperação do fármaco. Para o preparo da fase móvel, utilizou-se metanol grau cromatográfico obtido da Vetec (Duque de Caxias/RJ, Brasil), água ultrapura obtida através de sistema Millipore® Direct-Q3UV (Darmstadt, Alemanha) e o ácido fosfórico (85%, grau P.A.) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O fármaco metronidazol (matéria-prima, log P: - 0,46) apresentou teor de 99,9 %.

Os solventes orgânicos utilizados nessa etapa foram o diclorometano adquirido da Dinâmica (Diadema/SP, Brasil) e acetato de etila da Synth (Diadema/SP, Brasil). Para a solubilização do fármaco, usou-se DMSO, grau cromatográfico, adquirido da Vetec (Duque de Caxias/RJ, Brasil).

Uma autoclave vertical da marca Webecco (Alemanha) foi utilizada para esterilizar materiais e meios de cultivo. O fármaco e o meio de cultivo foram pesados em balança eletrônica analítica da marca AND, modelo HM-202.

A evaporação dos solventes orgânicos, na etapa de otimização da extração do metronidazol, ocorreu em capela de exaustão. Para a filtração das amostras, usou-se filtros para seringa de membrana de nylon e porosidade 0,45 μm (Whatman®). A coluna cromatográfica utilizada para o metronidazol foi Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm). O sistema cromatográfico utilizado foi um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo 20-A equipado com sistema controlador CBM-20A, bombas de fluxo LC-20AT, injetor automático SIL-20A/C, forno e detector PDA. Para controle de aquisição de dados utilizou-se o software LCSolution versão 1.25.

Método

Preparou-se uma solução-estoque de 0,5 mg.mL⁻¹ de metronidazol solubilizando o fármaco em solução de DMSO e água destilada (1:1, v/v). A partir da

solução-estoque, foi preparada uma solução-padrão diluindo-se em meio de cultivo Czapek 50 % obtendo-se uma concentração final de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir da solução estoque de metronidazol solubilizada em DMSO a 50 %, foi preparado uma solução de análise a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio caldo Czapek. Tubos de ensaio foram utilizados como sistema de extração, contendo 2 mL da solução de análise. Foi adicionado a cada sistema, separadamente, 4 mL de cada solvente, agitados vigorosamente por 1 minuto. Após a separação de fases, as porções orgânicas para cada amostra foram reunidas em frascos Becker.

O processo foi repetido por outras duas vezes. As porções orgânicas de cada solvente foram reunidas e submetidas à evaporação dos solventes sob fluxo de ar contínuo em capela de exaustão. Ao final, os resíduos depositados foram solubilizados com fase móvel (metanol: água ultrapura com 0,1 % de ácido fosfórico, 20:80, v/v), filtrados em membrana de nylon e submetidos à análise. Em paralelo, avaliou-se a recuperação do fármaco em meio de cultivo diluído apenas filtrando em membrana de mesma porosidade um volume de 2 mL.

Análise por cromatografia líquida

As amostras foram analisadas por CLAE. A fase móvel utilizada foi metanol : água acrescida de 0,1 % de ácido fosfórico, na proporção 20:80 (v/v), respectivamente. As condições de operação do cromatógrafo foi modo isocrático, temperatura de forno a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo de 1 mL.min^{-1} , volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e detecção em comprimento de onda em 313 nm.

2.2 Ensaio de Biotransformação do metronidazol

Materiais

O ágar Sabouraud (Tabela I- 2) foi adquirido da HiMedia (Índia) e o meio de cultivo caldo Czapek diluído a 50% para o sistema de biotransformação. Para o preparo da fase móvel, utilizou-se metanol grau cromatográfico obtido da Vetec (Brasil), água ultrapura obtida através de sistema Millipore® Direct-Q3UV (França) e

o ácido fosfórico (85 %, grau P.A.), adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O fármaco metronidazol (matéria-prima) apresentou teor de 99,9% base seca. Para a solubilização do fármaco, usou-se DMSO obtido da Dinâmica (Diadema/SP, Brasil).

Método

Os repiques foram incubados em estufa bacteriológica sob temperatura constante de 27°C por 48 horas. O inóculo fúngico foi padronizado por fotocolorímetro à concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ em solução salina 0,9 %. Após o preparo do inóculo padronizado de *C. elegans* ATCC 9245, um volume de 2 mL do inóculo foi adicionado a 150 mL de meio Czapek a 50 % estéril. Os frascos foram incubados a 27 °C sobre plataforma de agitação orbital a 120 rpm durante o período de 48 horas.

O metronidazol foi pesado e diluído em solução DMSO: água ultrapura (1:1, v/v). Adicionou-se, de forma asséptica, uma alíquota da solução ao frasco contendo de meio de cultivo Czapek estéril diluído a 50 % e ao frasco com o inóculo com crescimento de 48 horas, obtendo-se concentração final de 70µg. mL⁻¹. A composição dos demais frascos controles aplicados no ensaio de biotransformação segue conforme exposto na Tabela I- 3. Os frascos permaneceram incubados sob as mesmas condições.

Após 24 horas da adição do metronidazol aos frascos, foram realizadas coletas diárias das amostras (2 mL) de todos os frascos. As coletas foram realizadas em triplicata e armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o momento de tratamento das amostras para análise em cromatógrafo líquido.

2.3 Validação do método cromatográfico para a determinação de metronidazol em meio de cultivo Czapek

Materiais

Soluções-padrão utilizadas na validação do método

As soluções-padrão de metronidazol foram preparadas nas concentrações 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio de cultivo caldo Czapek a 50 % a partir de uma solução estoque de 1 mg.mL^{-1} solubilizados com DMSO e água ultrapura (1:1).

Métodos

Os métodos analíticos foram validados conforme recomendações de guias oficiais (BRASIL., 2003; FDA, 2013). Os parâmetros avaliados neste estudo foram: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez, seletividade e estabilidade (ciclo de congelamento e descongelamento e bancada por 12 horas), precisão e exatidão.

Seletividade

Para a determinação da seletividade do método, analisou-se o meio de cultivo Czapek estéril enriquecido com solução-padrão de metronidazol e meio de cultivo estéril incubado com *C. elegans* ATCC 9245.

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de três curvas analíticas obtidas pela fortificação do meio de cultivo Czapek a 50 % com soluções-padrão de metronidazol na faixa de concentração de 10 a 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Limite de detecção (LD) e Limite inferior de Quantificação (LIQ)

Para a determinação do LD e LIQ, utilizou-se os valores das áreas dos picos cromatográficos na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata. Os cálculos foram realizados através de tratamento matemático oferecido pelo software LC Solutions.

Precisão e exatidão

Os parâmetros de precisão e exatidão foram determinados por meio da avaliação precisão e exatidão intradia ($n = 9$) e interdia ($n = 3$). Foram utilizadas amostras do meio de cultivo Czapek a 50 % fortificadas com soluções-padrão de metronidazol nas concentrações 10, 40 e $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Estabilidade

Ciclo de congelamento e descongelamento

A estabilidade das amostras sob ciclos de congelamento e descongelamento foi avaliada através da análise de três alíquotas ($n=3$) de amostras preparadas em meio Czapek na concentração de $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de metronidazol.

Essas foram armazenadas sob refrigeração a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas, descongeladas e mantidas à temperatura ambiente. Após 24 horas em temperatura ambiente, as amostras foram congeladas novamente a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas. O ciclo de congelamento e descongelamento foi reproduzido outras duas vezes. Ao final do terceiro ciclo, as amostras foram analisadas. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados das análises de amostras preparadas no mesmo dia da análise. Consideraram-se estáveis as amostras que apresentaram desvio (E%) em relação às amostras preparadas no dia das análises, valores inferiores a 15%.

Bancada por 12 horas

Durante um período de 12 horas, três alíquotas ($n=3$) de amostras preparadas com meio Czapek na concentração de $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram mantidas à temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Após esse período, as amostras foram analisadas e os

resultados obtidos, comparados aos resultados de amostras preparadas no dia das análises na mesma concentração. As amostras foram consideradas estáveis quando o desvio (E%) apresentou valor inferior a 15 % em relação às amostras preparadas no dia das análises.

Robustez

A robustez do método foi avaliada através de delineamento experimental. Foi selecionado fatorial completo de dois níveis e foi realizado pela seleção de 3 fatores: temperatura de análise, % fase orgânica e vazão da fase móvel. As respostas avaliadas foram número de pratos teóricos, fator cauda e área do pico cromatográfico. As respostas obtidas foram processadas pelo programa estatístico Minitab Release versão 17 (State College, PA, EUA) para avaliação dos efeitos.

3 Resultados e discussão

3.1 Etapa de extração do fármaco

A recuperação do metronidazol para cada tratamento com solvente orgânico foi calculada a partir das áreas dos picos cromatográficos comparados com a área do sinal de uma solução padrão do fármaco. Obteve-se melhor rendimento para o tratamento com acetato de etila (79 %). Entretanto, a filtração direta sem tratamento com solvente determinou uma recuperação maior que 90 %. Baseado nestes resultados, o método da filtração direta foi aplicado para as amostras do estudo de biotransformação.

3.2 Biotransformação

Observou-se que amostras submetidas à biotransformação e não processadas na etapa de extração, apresentaram sinais cromatográficos com característica de polaridade mais elevada que o padrão do fármaco (Figura III - 3).

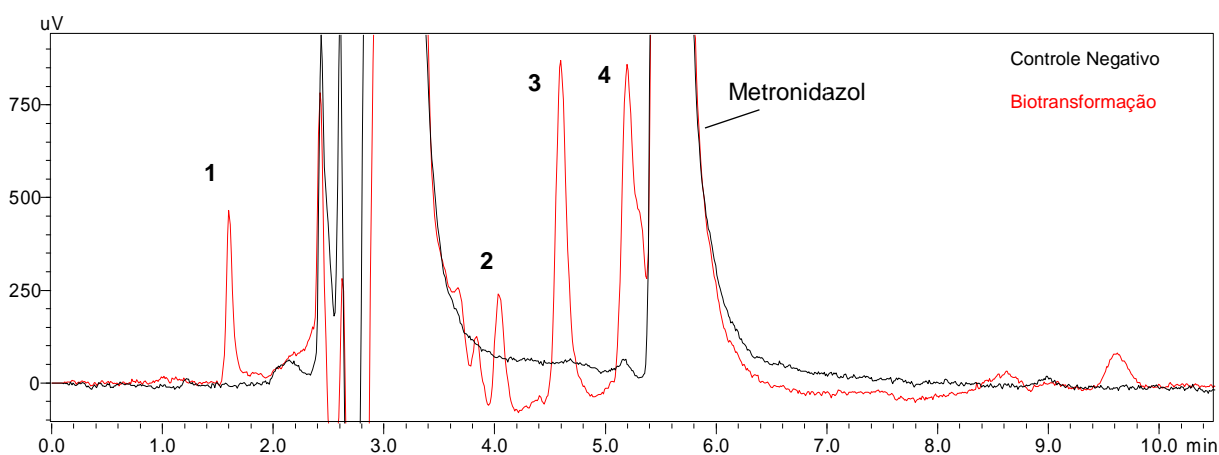


Figura III - 3 Cromatogramas comparativos de amostra do controle negativo e de amostra submetida à biotransformação com *C. elegans* ATCC 9245 após 96 horas de incubação. As condições cromatográficas foram: coluna Luna C18, fase móvel composta por metanol : água + 0,1 % de ácido fosfórico, vazão de 1 mL.min⁻¹ e detecção em 313 nm. (1, 2, 3 e 4) picos não identificados característicos de amostra de meio reacional, possíveis metabólitos produzidos.

A Figura III - 4 apresenta o perfil de consumo do metronidazol em meio reacional. Observa-se uma tendência de redução na concentração do fármaco. Este resultado corrobora para que os picos cromatográficos apresentados na Figura III - 3 sejam atribuídos a metabólitos do metronidazol.

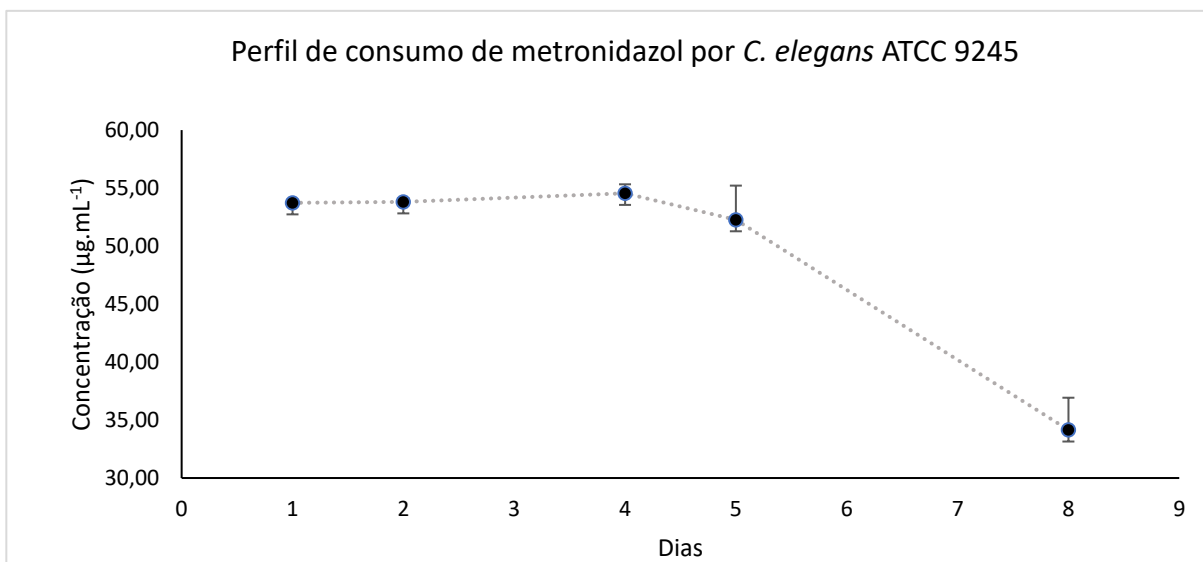


Figura III - 4 Gráfico do perfil de consumo de metronidazol em sistema de biotransformação por *C. elegans* ATCC 9245 em meio Czapek. As barras verticais representam o desvio padrão relativo das amostras ($n = 3$).

3.3 Validação bioanalítica

Seletividade

A seletividade do método foi confirmada através da análise cromatográfica em 313 nm, de amostras de meio de cultivo Czapek enriquecido com metronidazol e o meio com crescimento de *C. elegans* ATCC 9245 (Figura III - 5). Foi observado que não existem picos interferentes nos mesmos tempos de retenção do analito.

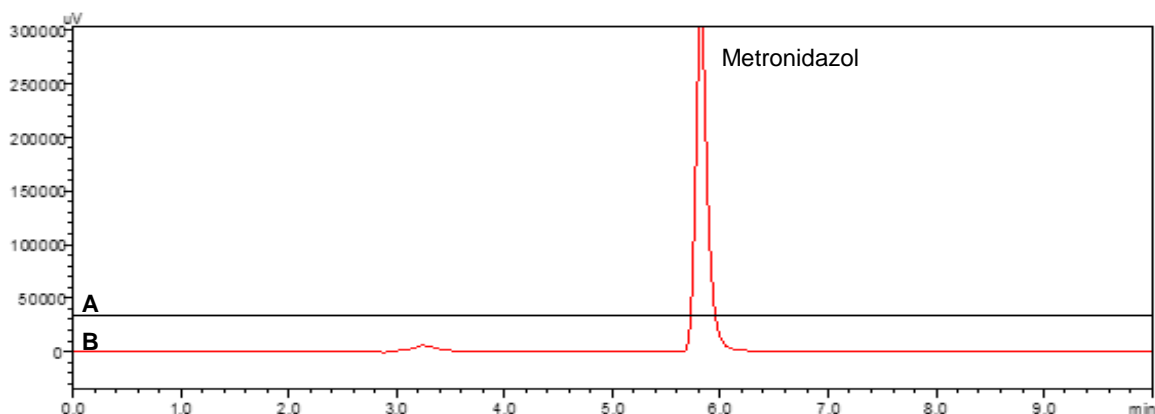


Figura III - 5 Cromatograma representativo de seletividade do método bioanalítico para metronidazol. (A) cromatograma resultante da análise do controle positivo (meio Czapek + *C. elegans* ATCC 9245) e (B) cromatograma do sistema de biotransformação do metronidazol ($70 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Linearidade

A Tabela III - 10 apresenta os resultados de linearidade do método para o metronidazol. Os valores de coeficiente de correlação foram superiores a 0,99999, ou seja, próximo a unidade. Existe correlação linear entre os valores, pois o valor de p foi maior que 0,05, conforme os resultados da ANOVA.

Tabela III - 10 Linearidade do método para determinação de metronidazol em meio de cultivo Czapek.

| Intervalo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Equação linear | Coeficiente de correlação | ANOVA | |
|--|-----------------------|------------------------------|--------------|--------------|
| | | | Valor de F | Valor de p |
| 10 - 70 | $y = 33129x - 3597,4$ | 0,999953 | 105741,3269 | 0,466 |

Limite de Detecção (LD) e Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O LD é definido como a menor concentração de analito que o cromatógrafo líquido consegue diferenciar com exatidão do ruído da linha de base (BRASIL., 2003; FDA, 2013). O LIQ informa a menor quantidade do analito que pode ser determinada

com exatidão e precisão inferiores a 20 %. Os limites de detecção e de quantificação são úteis para demonstrar a sensibilidade de um método analítico. Foi levado em consideração o sinal de ruído da linha de base nos cálculos a fim de que o LD fosse 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

Os limites foram calculados através do programa LCSolutions, utilizando o valor do ruído da linha de base do cromatograma dos pontos da curva padrão (triplicata). O valor obtido para LD foi de 1,80 ng.mL⁻¹ (DPR: 7,59 %) e LIQ foi de 5,053 ng.mL⁻¹ (DPR: 7,56 %).

Precisão e Exatidão

A Tabela III - 11 apresenta os valores de precisão expressos como Desvio Padrão Relativo (DPR %) e exatidão expresso como erro relativo (E %) intra e interdias para a análise do metronidazol, demonstrando que o método é preciso e exato conforme recomendações dos guias oficiais.

Tabela III - 11 Precisão e exatidão do método de validação para análise de metronidazol em meio de cultivo Czapek.

| Concentração nominal (µg.mL ⁻¹) | Metronidazol | | |
|---|--------------|-------|-------|
| | 10 | 40 | 70 |
| Intradia (n=3) | | | |
| Concentração (µg.mL ⁻¹) | 9,91 | 40,22 | 69,69 |
| Precisão (DPR %) ^a | 0,06 | 0,13 | 0,08 |
| Exatidão (E %) ^b | -0,87 | -0,54 | -0,45 |
| Interdias (n=3) | | | |
| Concentração (µg.mL ⁻¹) | 9,72 | 39,42 | 69,67 |
| Precisão (DPR %) ^a | 1,71 | 2,99 | 0,10 |
| Exatidão (E %) ^b | -2,8 | -1,5 | -0,5 |

n = número de determinações: (intradia) e (interdia). ^aExpresso como desvio padrão relativo percentual (DPR %) e ^bexpresso como erro relativo (E %).

Estabilidade

Os resultados da estabilidade por ciclos de congelamento/ descongelamento e de bancada por 12 horas podem ser visualizados na Tabela III - 12. Através da análise dos cromatogramas obtidos, não foi observada a presença de picos de produtos de degradação do metronidazol

Tabela III - 12 Estabilidade do metronidazol em meio de cultivo Czapek nos ciclos de congelamento/ descongelamento e bancada por 12 horas

| Concentração nominal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 70 |
|--|-----------|
| Congelamento e descongelamento ($n = 3$) | |
| Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 72,37 |
| Precisão (DPR %) ^a | 0,31 |
| Exatidão (E %) ^b | 3,38 |
| Bancada por 12 horas ($n = 3$) | |
| Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 66,71 |
| Precisão (DPR %) ^a | 0,24 |
| Exatidão (E %) ^b | 4,70 |

n = número de determinações: (intradia) e (interdia). ^aExpresso como desvio padrão relativo percentual (DPR %) e ^bexpresso como erro relativo (E %).

Robustez

Na determinação da robustez do método a significância dos efeitos é representada pelos gráficos de Pareto (Figura III - 6). Os códigos A, B e C correspondem aos fatores temperatura, percentual de fase orgânica e vazão da fase móvel, respectivamente. A combinação dos dois códigos indica a interação entre efeito de dois fatores. A linha vertical representa o valor crítico de t para $\alpha=0,05$, para as respostas selecionadas.



Figura III - 6 Gráfico de Pareto representando os efeitos dos fatores e da interação entre os fatores para as respostas (1) Fator Cauda (F.C.), (2) Área do pico cromatográfico e (3) Número de pratos teóricos (N).

Conforme o gráfico de resposta para área do pico cromatográfico (A), apenas o fator vazão da fase móvel, quando modificado isoladamente, conduz a modificações

significativas na área do pico cromatográfico. Por consequência, o número de pratos teóricos (N) é afetado, conforme representado no gráfico de Pareto 3. O fator cauda (F.C.) não sofre influências significativas com as modificações dos parâmetros isolados ou combinados.

4 Conclusões

- O método da filtração direta das amostras biotransformadas permitiu a visualização de quatro picos cromatográficos passíveis de metabólitos de metronidazol. Quando as amostras são processadas em etapa de extração com acetato de etila, este pico não é reproduzido.
- Necessidade de avaliar outras técnicas extrativas para a análise de amostras biotransformadas.
- A validação do método analítico desenvolvido por CLAE-UV mostrou-se específico, linear, sensível, preciso e exato para as análises de metronidazol em meio de cultivo Czapek.
- Na robustez, alterações na vazão da fase móvel influenciam significativamente na resposta da área e, conseqüentemente, na resposta do número de pratos teóricos (N).
- O metronidazol apresentou metabolização por *C. elegans* ATCC 9245.
- Necessidade de identificação estrutural, através de espectrometria de massas, dos metabólitos formados

DISCUSSÃO GERAL e CONCLUSÕES

Estudos de biotransformação

A biotransformação através de micro-organismos é considerada uma tecnologia economicamente e ecologicamente viável, sendo muito utilizada para realizar modificações estruturais de substâncias bioativas, investigar o metabolismo de fármacos como forma de mimetizar o metabolismo humano, eliminar e reduzir a toxicidade de compostos. O emprego de espécies do fungo *Cunninghamella* nos estudos de biotransformação tem recebido destaque em função desses apresentarem capacidade de metabolização de fármacos por processo semelhante à via de metabolização de fármacos em humanos (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; MURPHY, 2015; POLLARD; WOODLEY, 2007; QIN *et al.*, 2010).

Estudos envolvendo biotransformação de fármacos das classes de hipoglicemiantes, antitrombóticos, antiplaquetários e antiparasitários são pouco explorados. A capacidade de fungos filamentosos em metabolizar esses fármacos abre um campo de investigação científica inovadora que pode contribuir na avaliação de mecanismos biossintéticos e metabólitos ou, eventualmente, novas estruturas químicas com potencial farmacológico. Diante da possibilidade de estudos de biotransformação de fármacos, o desenvolvimento de metodologias analíticas para monitorar a formação de metabólitos é fundamental. Com isso, a biotransformação dos fármacos linagliptina, vildagliptina, rivaroxabana, ticagrelor e metronidazol, não relatados na literatura, determinaram objeto de estudo deste trabalho.

Nos estudos de biotransformação de fármacos, há um consenso no uso de meios de cultivo líquidos para crescimento de diferentes espécies de fungos. Os meios caldo batata (infusão de batata; glicose; pH: 5,1) e caldo Czapek (Tabela I- 1) são os mais aplicados nos estudos de biotransformação. Um ambiente de estresse microbiológico dado pela reduzida disponibilidade de fonte de carbono para o desenvolvimento fúngico, propicia o consumo de substâncias exógenas ao meio. Com isso, o consumo e metabolização de fármacos pelos fungos se torna favorável. No estudo apresentado, ensaios pilotos de biotransformação foram realizados com o objetivo de avaliar o comportamento fúngico frente a diferentes composições do meio de cultivo. O critério para escolha do meio de cultivo líquido foi proporcionar um meio enfraquecido em fonte de carbono, e assim, viabilizar a metabolização dos fármacos pela *C. elegans*. Inicialmente, utilizou-se caldo batata dextrose e caldo batata dextrose

diluído a 50 %. O cultivo de *C. elegans* ATCC 9245 nas duas formulações apresentou um perfil de desenvolvimento semelhante. Observou-se que o aspecto dos meios incubados, sob agitação constante de 120 rpm, permaneceu o mesmo entre os frascos assim como o crescimento e desenvolvimento do inóculo foram semelhantes (ASHA; VIDYAVATHII, 2009; SRISILAM; VEERESHAM, 2003; TORTORA, 2012).

Posteriormente, utilizou-se o meio de cultivo caldo Czapek. Este meio de cultivo é amplamente utilizado nos estudos de biotransformação. Diferentemente do caldo batata, o Czapek apresenta em sua formulação macro e micronutrientes (sódio, potássio, magnésio e ferro) importantes para o metabolismo fúngico e, assim, proporcionando um desenvolvimento adequado do fungo. Numa segunda etapa, o caldo Czapek foi diluído a 50 %. Da mesma maneira que o caldo batata, o Czapek a 50 % apresentou semelhante desenvolvimento fúngico. O uso de caldo Czapek diluído a 50 % foi escolhido para a execução dos ensaios de biotransformação por ser economicamente viável, além de oferecer melhor qualidade de sua composição frente ao meio batata (BARTH *et al.*, 2012; BORGES; PUPO; BONATO, 2009; HILÁRIO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016).

Entre os fatores reacionais que podem influenciar no crescimento e desempenho de biotransformação de fármacos são destacados: a composição do meio de cultivo, o diluente do fármaco adicionado ao meio, a temperatura e a agitação do meio reacional. Em particular, a incubação da cepa sob agitação constante do sistema de biotransformação determina o desenvolvimento fúngico em formato de *pellets*, resultando em maior superfície de contato do fungo com o meio. Desta forma, é possível propiciar maior exposição do fungo ao fármaco, além de proporcionar melhor aporte de oxigênio no meio reacional (BARTH, 2012; SRISILAM; VEERESHAM, 2003).

Após estabelecimento das condições de cultivo, foi padronizado o momento de adição do fármaco ao meio reacional. Petersen (2006), em seu estudo, acompanhou o crescimento celular de *C. elegans* ATCC 9245 e o consumo de glicose do meio de cultivo Sabouraud (40 % de glicose) no sistema de biotransformação. O autor estabeleceu que o substrato deveria ser adicionado ao terceiro dia. Na fase exponencial de crescimento, o fungo apresenta uma elevada taxa de metabolismo celular e, conseqüentemente, ocorre significativo consumo de fonte de carbono no

meio de cultivo. Desta forma, é possível garantir a fase exponencial de crescimento, aumento da taxa de metabolismo celular e consequente redução da quantidade de fonte de carbono no meio de cultivo.

No presente estudo, com a padronização do meio de cultivo Czapek diluído a 50 % (oferta de 15 % de glicose), houve a necessidade de adaptação do momento de adição do fármaco ao meio. No segundo dia de incubação em meio Czapek diluído, a oferta de glicose já estaria em declínio. Por essa razão, para fins de otimização do estudo de biotransformação foi adotada a adição do fármaco entre 36 e 48 horas após a incubação do inóculo de *C. elegans* em meio de cultivo Czapek 50 %. Assim, a oferta de um substrato exógeno ao meio reacional proporcionaria um novo substrato disponível para ser metabolizado pela *C. elegans*.

Em levantamento bibliográfico realizado, não foram encontrados relatos a respeito da padronização do inóculo de micro-organismos utilizados em ensaios de biotransformação. No intuito de melhor acompanhar a metabolização de substratos, formação de metabólitos e permitir uma perspectiva de ensaios em maior escala, considerou-se necessário que a quantidade de células incubadas fosse padronizada. Nesse sentido, a análise espectrofotométrica para quantificação de fungos filamentosos é amplamente difundida, principalmente em ensaios de microdiluição seriada para ensaios de compostos com atividade antifúngica. O preparo de inóculo padronizado é um diferencial abordado neste estudo que proporciona um controle sobre a biotransformação dos fármacos (CLSI, 2002; GHADAI; KAMILLIA; ABDEL RAHIM, 2016; GURRAM et al., 2009; LEE et al., 2014; LUSTOSA et al., 2012; WATANABE et al., 2016; ZI et al., 2011).

Fármacos e controles de ensaio

O desenvolvimento microbiológico requer um ambiente com condições adequadas, como temperatura e meio de cultivo. Os ensaios de biotransformação são configurados de maneira que atendam às necessidades de desenvolvimento fúngico, bem como reacional. Desta forma, os fármacos em estudo estão expostos a condições que podem ocasionar a degradação dos mesmos, implicando em resultados equivocados de biotransformação. Diante do exposto, constatou-se em levantamento

bibliográfico, que são poucos estudos que realizam controles de degradação dos fármacos nos ensaios de biotransformação. No presente estudo, introduziu-se o controle negativo, representado pelo fármaco em meio Czapek incubado sob as mesmas condições de cultivo da *C. elegans*. O controle negativo permitiu que, em caso de degradação do fármaco durante o ensaio, as novas estruturas formadas no meio reacional não fossem atribuídas à metabolização do fármaco (AMADIO; GORDON; MURPHY, 2010; GURRAM *et al.*, 2009).

O controle positivo, formado por meio Czapek e inóculo, teve como função demonstrar o crescimento fúngico sem a presença do fármaco em estudo. Ou seja, observar de forma macroscópica que o substrato não apresenta atividade antifúngica (ou fungistática) que inviabilize ou dificulte o desenvolvimento no inóculo. Importante destacar que em todos ensaios realizados foram utilizados os controles com o inóculo padronizado, garantindo assim, que o desenvolvimento fúngico ocorresse de maneira uniforme entre os frascos controle positivo e de biotransformação.

Ensaio de biotransformação

Nos ensaios de biotransformação com a linagliptina, o perfil de consumo do fármaco em meio reacional pode ser explicado pela captação do fármaco durante a fase log de crescimento fúngico, pois se trata de uma fase onde há intensa atividade metabólica e, por consequência, um consumo energético acentuado. De acordo com o decréscimo das concentrações do fármaco no meio de biotransformação e os resultados obtidos através da análise do cromatograma de biotransformação da linagliptina (Figura I - 9), conclui-se que existe uma tendência de redução das concentrações do fármaco, porém, sem a visualização da formação de possíveis metabólitos. Tais metabólitos da linagliptina podem estar sendo formados no meio reacional, entretanto, existe a possibilidade de serem metabólitos sem a presença de grupamentos cromóforos capazes de serem detectáveis por UV. Além disso, o aumento da concentração do fármaco em meio após 14 dias de incubação pode ser esclarecido em função de que, ao atingir a fase de declínio de crescimento celular ocorra lise celular com consequente extravasamento do fármaco para o meio reacional. Ainda que neste estudo não se tenham detectados os metabólitos da linagliptina por biotransformação, o metabolismo enzimático representado pelas

isoformas de CYP450 em micro-organismos representa potencial possibilidade de uso de outras espécies fúngicas na obtenção de estruturas derivadas do fármaco (TORTORA, 2012).

Os ensaios de biotransformação com a vildagliptina apresentaram como desafio a etapa de extração do fármaco e, por consequência, dos possíveis metabólitos. Devido à característica altamente polar da vildagliptina, a extração líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos não foi capaz de recuperar os analitos da solução aquosa. Além disso, a reduzida absorvidade molar do fármaco também não contribuiu para adequada análise. Valores de absorção próximos a 200 nm resultam em análises pouco seletivas, pois grande variedade de grupamentos funcionais, incluindo diluentes dos fármacos, apresentam absorção em valores próximos a 200 nm, prejudicando a análise cromatográfica com detecção no UV. Uma das estratégias para avaliar a biotransformação da vildagliptina por *C. elegans* e monitorar seus possíveis metabólitos seria realizar extrações em fase sólida e análise por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. Outra estratégia seria acompanhar o perfil de consumo do fármaco pelo fungo. Ainda que os metabólitos não fossem recuperados na etapa extrativa, o perfil de decaimento das concentrações do fármaco em meio reacional seria um indicativo de metabolização (SKOOG, 2007).

No desenvolvimento dos estudos de biotransformação através da *C. elegans* ATCC 9245, os fármacos antitrombóticos ticagrelor e rivaroxabana foram avaliados. Devido à reduzida solubilidade destes fármacos em meio aquoso, utilizou-se DMSO como diluente. Porém, foi necessária a adição de agente emulsificante. A adição de Tween 80 permitiu a solubilização dos fármacos no meio reacional. A adição dos mesmos ao meio Czapek na ausência do emulsificante, ocasionou na precipitação dos fármacos em tempo inferior a 24 horas. No trabalho apresentado por Srisilam e colaboradores (2003) a recomendação para solubilizar fármacos com baixa solubilidade em meio aquoso é a utilização de agentes emulsificantes neutros, como 0,1 % de Tween 80. No presente estudo, a quantidade de Tween 80 utilizado foi de 0,001 %, para reduzir a tensão superficial das amostras, evitando a formação de espuma durante a etapa extrativa dos analitos. A presença do Tween 80 no meio reacional matriz foi avaliada, bem como o acompanhamento dos controles do experimento por CLAE-UV. Como resultado, as amostras contendo Tween 80 não

apresentaram interferências nos perfis cromatográficos, bem como o percentual de recuperação dos fármacos foi mantido (ticagrelor – 69 % e rivaroxabana – 90%).

Os resultados dos ensaios de biotransformação de ticagrelor apresentaram perfis cromatográficos semelhantes entre o controle negativo e biotransformação (Figura II - 6). Há formação de picos atribuídos à degradação do fármaco em meio Czapek, bem como a formação de picos cromatográficos indicativos de processo metabólico. Estes resultados reforçam a necessidade de avaliação aprofundada do estudo com o uso de padrões de metabólitos, que permitem comprovar um possível processo metabólico.

A biotransformação da rivaroxabana indicou a formação de novos compostos por CLAE-UV, presentes apenas no meio reacional. Análises por CLAE-EM se tornam essenciais para a elucidação estrutural desses compostos. Embora os cromatogramas obtidos das análises por CLAE-UV apresentem picos iniciais sugerindo a presença de metabólitos, os resultados das análises por CLAE-EM para a rivaroxabana não revelaram a presença destes. Novos ensaios de biotransformação da rivaroxabana com posterior análise por CLAE-EM ou análises por CLAE-UV com os padrões dos metabólitos são necessários e serão úteis para comprovar um possível processo de metabolização.

Ainda no intuito de avaliar a biotransformação de diferentes classes terapêutica, estudou-se a biotransformação do metronidazol. Conforme pesquisa bibliográfica realizada, ensaios de biotransformação de fármacos pertencentes à classe dos antiparasitários por fungos filamentosos são pouco explorados. Diferentes derivados azólicos, como albendazol (benzimidazol), apresentam biotransformação por *C. elegans* (GURRAM *et al.*, 2009). Não há relatos na literatura de biotransformação de nitroimidazóis, como o metronidazol.

Por fim, os resultados apresentados no estudo de biotransformação do antiparasitário, indicam que o metronidazol foi metabolizado pela *C. elegans* ATCC 9245. Foram detectados sinais indicativos de biotransformação, conforme exposto na Figura III - 3. Análises do controle positivo não apresentaram estes picos, excluindo-se a hipótese de terem origem de produtos endógenos do fungo.

Além disso, os resultados analíticos do controle negativo excluem possível degradação do fármaco em meio aquoso. Ainda que estes picos tenham sido detectados após a exclusão do uso de solvente orgânico na etapa de extração, outras técnicas extrativas devem ser avaliadas a fim de evitar possível comprometimento do sistema cromatográfico. A validação do método bioanalítico para o metronidazol assegurou a confiabilidade e credibilidade do método bioanalítico desenvolvido neste estudo, conforme guias normativas de validação bioanalítica (BRASIL., 2003; FDA, 2013).

Os resultados apresentados nesse estudo contribuem para ampliar o conhecimento de biotransformação por *C. elegans* de fármacos de diferentes classes, pouco exploradas. O desenvolvimento de metodologias analíticas apresentou-se como desafio do estudo, devido à necessidade de adaptação dos métodos cromatográficos para a análise dos fármacos em meio reacional.

REFERÊNCIAS

AMADIO, J.; GORDON, K.; MURPHY, C. D. Biotransformation of Flurbiprofen by *Cunninghamella* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6299–6303, 15 set. 2010.

ASHA, S.; VIDYAVATHII, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16–29, jan. 2009.

BADUGU, L. R. A Validated RP-HPLC Method for the Determination of Linagliptin. **American Journal of Pharmtech research**, v. 2, n. May 2011, 2012.

BARDEN, A. T. **Vildagliptina e associação com metformina: desenvolvimento de metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo da estabilidade**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

BARDEN, A. T.; SALAMON, B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; STEPPE, M. Stability-indicating RP-LC method for the determination of vildagliptin and mass spectrometry detection for a main degradation product. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 5, p. 426–432, 2012.

BARTH, T. **Análise estereosseletiva de bufuralol , donepezila , midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2012.

BARTH, T.; CONTI, R.; PUPO, M. T.; OKANO, L. T.; BONATO, P. S. Chiral HPLC analysis of donepezil, 5-O-desmethyl donepezil and 6-O-desmethyl donepezil in culture medium: Application to fungal biotransformation studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 1, p. 257–266, 2012.

BAYDOUN, E.; SMITH, C.; WAHAB, A.-; KHAN, M. S. A.; AHMAD, M. S.; FARRAN, D.; IQBAL CHOUDHARY, M. Microbial transformation of oxandrolone with *Macrophomina phaseolina* and *Cunninghamella blakesleeana*. **Steroids**, v. 102, n. June, p. 39–45, 2015.

BLECH, S.; EBNER, T.; LUDWING-SCHWELLINGER, E.; STANGIER, J.; ROTH, W. The Metabolism and Disposition of the Oral Direct Thrombin Inhibitor , Dabigatran , in Humans ABSTRACT : **Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 386–399, 2008.

BORGES, K. B.; BORGES, W. D. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Endophytic

fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 3, p. 669–674, 2007.

BORGES, K. B.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of propranolol and 4-hydroxypropranolol by CE with application to biotransformation studies employing endophytic fungi. **Electrophoresis**, v. 30, n. 22, p. 3910–3917, 2009.

BORGES, W. D. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1137–1163, 2009.

BRASIL. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.** Brasília, 2003. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2017

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. v. 22, n. 16, p. 1–50, 2002.

DRUCKER, D. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition and the Treatment of Type 2 Diabetes. **Diabetes care**, v. 30, n. 6, p. 1335–1343, 2007.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696–1705, 2006.

EL-BAGARY, R. I.; ELKADY, E. F.; AYOUB, B. M. Liquid chromatographic determination of alogliptin in bulk and in its pharmaceutical preparation. **International Journal of Biomedical Science**, v. 8, n. 3, p. 215–218, 2012.

ENGEL, R. E. DE A. **Desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade para controle de qualidade químico e biofarmacêutico da linagliptina.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

ERNY, G. L.; CIFUENTES, A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 3, p. 509–515, 2006.

FDA. **Guidance for Industry: Bioanalytical method validation.** U.S. Department of Health and Human Services Rockville, MD, 2013.

GHADAI, A. A.; KAMILLIA, A. A. E. S.; ABDEL RAHIM, S. I. Biotransformation of coumarins by *Cunninghamella elegans*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 18, p. 411–418, 2016.

GOBETTI, C.; PEREIRA, R. L.; MENDEZ, A. S. L.; GARCIA, C. V. Determination of the New Antiplatelet Agent Ticagrelor in Tablets by Stability-Indicating HPLC Method. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 279–283, 2015.

GURRAM, S. P.; KOLLU, N. R.; SIVADEVUNI, G.; SOLIPURAM, M. R. Biotransformation of albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*: Influence of incubation time, media, vitamins and solvents. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 205–215, 2009.

HE, H.; TRAN, P.; YIN, H.; SMITH, H.; BATARD, Y.; WANG, L.; EINOLF, H.; GU, H.; MANGOLD, J. B.; FISCHER, V.; HOWARD, D. Absorption, Metabolism, and Excretion of [¹⁴C] Vildagliptin, a Novel Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor, in Humans. v. 37, n. 3, p. 536–544, 2009.

HILÁRIO, V. C.; CARRÃO, D. B.; BARTH, T.; BORGES, K. B.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 100–107, 2012.

HOLST, J. J.; GROMADA, J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 287, n. 2, p. E199–E206, 2004.

ISIN, E. M.; GUENGERICH, F. P. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 3, p. 314–29, 2007.

JESUS, R. S. **Avaliação da formação de biofilme de fungos emergentes e sua susceptibilidade a antifúngicos na forma livre e nanocapsulada.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists.**

Hoboken, New Jersey: [s.n.].

KUCHARSKA, M.; GRABKA, J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. **Talanta**, v. 80, n. 3, p. 1045–1051, 2010.

KUMAR, S. Engineering cytochrome P450 biocatalysis for biotechnology, medicine and bioremediation. **Expert Opinions in Drug Metabolism and Toxicology**, v. 6, n. 2, p. 115–131, 2011.

LANG, D.; FREUDENBERGER, C.; WEINZ, C. In Vitro Metabolism of Rivaroxaban , an Oral , Direct Factor Xa Inhibitor , in Liver Microsomes and Hepatocytes of Rats , Dogs , and Humans ABSTRACT : **Pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 1046–1055, 2009.

LEE, J. H.; OH, E. T.; CHUN, S. C.; KEUM, Y. S. Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger* and *Cunninghamella elegans*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 523–527, 2014.

LI, Y.; LANDQVIST, C.; GRIMM, S. W. Disposition and metabolism of ticagrelor, a novel P2Y₁₂ receptor antagonist, in mice, rats, and marmosets. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 9, p. 1555–1567, 2011.

LUSTOSA, K. R. M. D.; MENEGATTI, R.; BRAGA, R. C.; LIÃO, L. M.; DE OLIVEIRA, V. Microbial β -glycosylation of entacapone by *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 611–613, 2012.

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

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações . **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 29–45, 2012.

MEI, J.; WANG, L.; WANG, S.; ZHAN, J. Synthesis of two new hydroxylated derivatives of spironolactone by microbial transformation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 14, p. 3023–3025, 2014.

MENTLEIN, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. **Regulatory Peptides**, v. 85, n. 1, p. 9–24, 1999.

MURPHY, C. D. Drug metabolism in microorganisms. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 1, p. 19–28, jan. 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 66–73, 2007.

QIN, Y. J.; FENG, B.; SONG, X. B.; ZHOU, W. BIN; YU, H. S.; ZHAO, L. L.; YU, L. Y.; MA, B. P. Biotransformation of Glycyrrhetic Acid by *Cunninghamella blakesleeana*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8, n. 5, p. 373–381, 2010.

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.

QUINN, L.; DEMPSEY, R.; CASEY, E.; KANE, A.; MURPHY, C. D. Production of drug metabolites by immobilised *Cunninghamella elegans*: from screening to scale up. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 799–806, 2015.

ROHDE, G. Determination of rivaroxaban - a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor - in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 872, n. 1–2, p. 43–50, 2008.

SAKAKI, T.; SHINKYO, R.; TAKITA, T.; OHTA, M.; INOUE, K. Biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by recombinant yeast expressing rat CYP1A subfamily. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 401, n. 1, p. 91–98, 2002.

SBC, S. B. DE C. **Brazilian Guidelines on Antiplatelet and**

Anticoagulant *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2013.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. Pt 6, p. 661–686, 2005.

SHERAFATMAND, M.; NG, H. Y. Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Bioresource Technology**, 2015.

SILVA, E. O.; RUANO-GONZÁLEZ; SANTOS, R. A. DOS; SÁNCHEZ-MAESTRE, R.; FURTADO, NIEGE, A. J. C.; COLLADO, I. G. .; ALEU, J. Antifungal and Cytotoxic Assessment of Lapachol Derivatives Produced by Fungal Biotransformation. **Natural Product Communications**, v. 11, n. March, p. 95–98, 2016.

SKOOG, D. A. **Principles of instrumental analysis**. 6ª ed. Belmont: [s.n.].

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 161, n. 2, p. 551–558, 1974.

SPRINGTHORPE, B.; BAILEY, A.; BARTON, P.; BIRKINSHAW, T. N.; BONNERT, R. V.; BROWN, R. C.; CHAPMAN, D.; DIXON, J.; GUILLE, S. D.; HUMPHRIES, R. G.; HUNT, S. F.; INCE, F.; INGALL, A. H.; KIRK, I. P.; LEESON, P. D.; LEFF, P.; LEWIS, R. J.; MARTIN, B. P.; MCGINNITY, D. F.; MORTIMORE, M. P.; PAINE, S. W.; PAIRAUDEAU, G.; PATEL, A.; RIGBY, A. J.; RILEY, R. J.; TEOBALD, B. J.; TOMLINSON, W.; WEBBORN, P. J. H.; WILLIS, P. A. From ATP to AZD6140: The discovery of an orally active reversible P2Y₁₂ receptor antagonist for the prevention of thrombosis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 21, p. 6013–6018, 2007.

SRISAILAM, K.; RAJ KUMAR, V.; VEERESHAM, C. Predicting drug interaction of Clopidogrel on microbial metabolism of Diclofenac. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1508–1516, 2010.

SRISILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 1, p. 3–39, 2003.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214–216, 9 abr. 1993.

STRECK, E. L.; COSTA, T. D. Isoformas do Citocromo P450 e outros fatores que alteram a biotransformação de fármacos. **Infarma**, v. 11, n. 11/12, p. 36–41, 1999.

SUJATH, K.; SESHAGIRI RAO, J. V. L. N. A NEW RP-HPLC METHOD FOR THE ESTIMATION OF LINAGLIPTIN IN TABLET. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 10, 2013.

SUN, L.; HUANG, H.-H.; LIU, L.; ZHONG, D.-F. Transformation of Verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2722–2727, 1 maio 2004.

SZULTKA-MLYNSKA, M.; BUSZEWSKI, B. Study of in-vitro metabolism of selected antibiotic drugs in human liver microsomes by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 29, p. 8273–8287, 2016.

TEIXEIRA, A. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 10 ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRACY, T. S.; MARRA, C.; WRIGHTON, S. A.; GONZALEZ, F. J.; KORZEKWA, K. R. Studies of Flurbiprofen 4'-Hydroxylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, n. 8, p. 1305–1309, 1996.

TRACY, T. S.; ROSENBLUTH, B. W.; WRIGHTON, S. A.; GONZALEZ, F. J.; KORZEKWA, K. R. Role of cytochrome P450 2C9 and an allelic variant in the 4'-hydroxylation of (R)- and (S)-flurbiprofen. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 9, p. 1269–1275, 1995.

VAN GIEZEN, J. J. J.; NILSSON, L.; BERNTSSON, P.; WISSING, B. M.; GIORDANETTO, F.; TOMLINSON, W.; GREASLEY, P. J. Ticagrelor binds to human P2Y₁₂ independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signaling and platelet aggregation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 9, p. 1556–1565, 2009.

VEERESHAM, C.; VEMULA, P.; DODDA, D.; BALEKARI, U.; PANGA, S. Simultaneous determination of linagliptin and metformin by reverse phase-high performance liquid chromatography method: An application in quantitative analysis of pharmaceutical dosage forms. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 6, n. 1, p. 25, 2015.

WATANABE, S.; KUZHIUMPARAMBIL, U.; WINIARSKI, Z.; FU, S. Data on individual metabolites of synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073 and AM2201 by *Cunninghamella elegans*. **Data in Brief**, v. 7, p. 332–340, 2016.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2005.

WEINZ, C.; SCHWARZ, T.; KUBITZA, D.; MUECK, W.; LANG, D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and Humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 5, p. 1056–1064, 2009.

WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R. Protein family review Cytochromes P450 : a success story. p. 1–9, 2000.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KIND, H. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **World Health**, v. 27, n. 5, p. 1047–1053, 2004.

WILLIAMS, A. J.; DECK, J.; FREEMAN, J. P.; PAUL CHIARELLI, M.; ADJEI, M. D.; HEINZE, T. M.; SUTHERLAND, J. B. Biotransformation of flumequine by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Chemosphere**, v. 67, n. 2, p. 240–243, 2007.

WINGERT, N. R.; NUNES, M. A. G.; BARDEN, A. T.; GOMES, P.; MÜLLER, E. I. Ultra-performance LC-ESI / Q-TOF MS for the Rapid Analysis of Rivaroxaban : Method Validation Using Experimental Design for Robustness Evaluation. p. 124–129, 2015.

YOSHIDA, T.; KITO, M.; TSUJII, M.; NAGASAWA, T. Microbial synthesis of a proton pump inhibitor by enantioselective oxidation of a sulfide into its corresponding sulfoxide by *Cunninghamella echinulata* MK40. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 15, p. 1217–1222, 2001.

ZHONG, W.; WANG, X.; TANG, L.; MAI, L.; CHEN, X.-P.; HE, G.; ZHENG, Z.; ZHONG, S. Simultaneous Determination of Ticagrelor and Its Metabolites in Human Plasma and Urine Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 40, n. 6, p. 445–453, 2016.

ZHOU, D.; ANDERSSON, T. B.; GRIMM, S. W. In vitro evaluation of potential drug-drug interactions with ticagrelor: Cytochrome P450 reaction phenotyping, inhibition, induction, and differential kinetics. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 4, p. 703–710, 2011.

ZI, J.; VALIENTE, J.; ZENG, J.; ZHAN, J. Metabolism of quercetin by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 360–362, 2011.