

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Investigação *in vitro* do Efeito da Restrição Proteica no  
Metabolismo do Albendazol em Ratos e Estudos de Inibição do  
Crescimento de Células Tumorais Humanas pelos Enantiômeros  
do Albendazol Sulfóxido”**

**Kátia Roberta Anacleto Belaz\***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Química

**Orientadora: Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira**

**\* Bolsista FAPESP**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B426iv

Belaz, Kátia Roberta Anacleto.

Investigação in vitro do efeito da restrição proteica no metabolismo do albendazol em ratos e estudos de inibição do crescimento de células tumorais humanas pelos enantiômeros do albendazol sulfóxido / Kátia Roberta Anacleto Belaz. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

179 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Análise cromatográfica. 2. Desnutrição. 3. Cromatografia quiral. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Planejamento fatorial. 6. Injeção direta. I. Título.

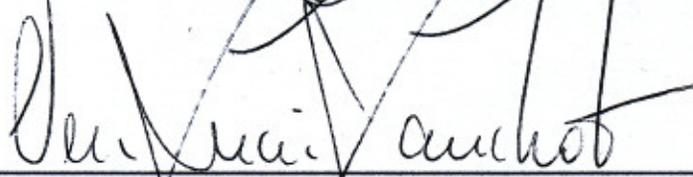
CDD: 543.089 (20<sup>a</sup>)

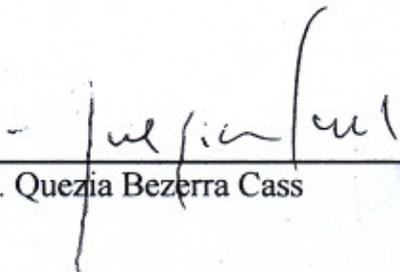
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

---

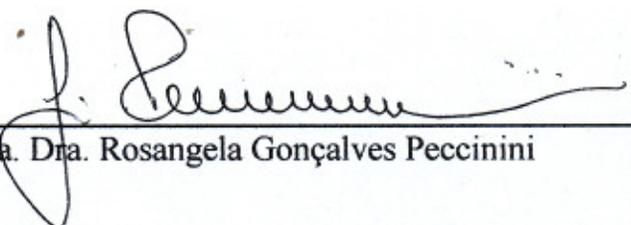
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Katia Roberta Anacleto Belaz**, realizada em 02 de dezembro de 2011:*

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rosangela Gonçalves Peccinini



## AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos os meus familiares, meu querido Pai (José), minha Mãe (Juraci), meus irmãos (Rodrigo e Bruna) e meu lindo sobrinho (João Manoel). Obrigada por compreender todos os momentos de ausência e por todo o apoio que sempre me deram. Obrigada especial a tia Rosana e a minha cunhada Fernanda, por sempre acreditar e me fazer acreditar que sou capaz e nos momentos de tristeza era em seus braços que desabava. **VOCÊS SÃO MUITO ESPECIAIS!**

Agradeço ao querido e amado **Absolon**, o qual infelizmente só fui conhecê-lo no último ano de doutorado, mas me ajudou e incentivou como se nos conhecessemos a anos, inclusive fazendo lindos desenhos e esquemas para este trabalho.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina V. Oliveira**, pela orientação, aprendizado e amizade.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Quezia Bezerra Cass**, pelos ensinamentos e por ter aberto as portas de seu laboratório ainda no meu primeiro ano de graduação a pedido do Prof. Dr. Nerilso.

Ao **Prof. Dr. Nerilso** por não ter me deixado desistir da Química.

Em especial ao **Prof. Edenir Rodrigues Pereira Filho** por sempre estar disposto e de portas abertas para me ensinar estatística.

Ao **Prof. Carlos Alberto da Silva** (Unimep, Piracicaba) pela colaboração em nos fornecer os animais desnutridos para a realização deste trabalho.

A **todo corpo técnico e administrativo** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar

A **todos os professores** do Departamento de Química da UFSCar.

Aos meus amigos do grupo de Síntese Orgânica e CLAE dos mais velhinhos aos mais novinhos e também aqueles que por lá passaram: **Alessandra, Aline, Angela, Airton, Bia, Bibi, Carmen, Cecília, Fernando (Bomba), Fernando (24), Flávio, Juliana, Kenia, Lúcia, Marcela, Mariana, Malu, Manuela, Marina (Marinão), Marina (Garça), Mirian, Neila, Patrícia, Pedro (Peninha), Regina, Ricardo Gomes, Ricardo, Taciane, Thaís, Tiago, Túlio, Vanessa e Virgínia**. Agradeço a todos pela amizade, incentivo, colaboração e momentos descontraídos durante todos esses anos de convívio.

Agradeço em especial a minhas grandes amigas **Marina (Marinão)** e **Kenia** pela grande amizade que construímos no decorrer desses anos juntas. Obrigada Marina por desde o primeiro momento me ajudar com os fígados e as extrações microssomais, onde não tínhamos homogeneizador, nem gelo picado, muito menos um freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e uma ultracentrífuga (foi um sufoco!!!) e Kenia obrigada pelas noitadas laboratoriais, pelas caronas e pelos bate-papos.

Agradeço também a grande **Manu** que tanto me auxiliou neste trabalho.

A todos os amigos dos Laboratórios vizinhos.

Ao **Alexandre Augusto Cruz**, por sua infinita disponibilidade de ajudar com os equipamentos e pela amizade.

DE TODOS VOCÊS SENTIREI MUITA SAUDADES!!!!

A Fapesp, pela bolsa fornecida.

A todos que puderam contribuir para que este trabalho fosse realizado.

## LISTA DE FIGURAS

### 1. INTRODUÇÃO

**FIGURA 1.1:** Ciclo do citocromo P450 nas oxidações de fármacos. RH=fármaco original; ROH= metabólito oxidado<sup>3,8</sup> ..... 6

**FIGURA 1.2:** Mapa da prevalência de cisticercose no mundo<sup>22,23</sup> ..... 12

**FIGURA 1.3:** Estruturas químicas do albendazol e seus metabólitos ..... 15

**FIGURA 1.4:** Gráfico que ilustra os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, exceto pele não melanoma<sup>56</sup> ..... 19

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

**FIGURA 4.1:** Procedimento de extração realizado na obtenção das frações microsomais por ultracentrifugação e por agregação de cálcio. .... 68

**FIGURA 4.2:** Curva analítica obtida com BSA para a determinação de proteínas totais em diferentes frações microsomais (n=18). .... 69

**FIGURA 4.3:** Estrutura química da 7-etoxiresorufina e da resorufina..... 71

**FIGURA 4.4:** Cromatogramas da separação da resorufina (1) e da 7-etoxiresorufina (2). Coluna C18 Nucleosil (5µm, 15 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: (A) MeOH/Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mmol/L; pH 2,5) (50:50); (B) MeOH/Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mmol/L; pH 5,5) (50:50) Vazão: 1,0 mL/min e λ: 254 nm. .... 72

**FIGURA 4.5:** Cromatogramas da separação da resorufina (1) e da 7-etoxiresorufina (2) com avaliação de diferentes temperaturas. Coluna C18 Luna (10µm, 15 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: MeOH/Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mmol/L; pH 2,5) (50:50). Vazão: 1,0 mL/min e λ: 254 nm. .... 73

**FIGURA 4.6:** Cromatograma da separação da resorufina (1) e da 7-etoxiresorufina (2). Coluna C18 Luna (10µm, 15 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: MeOH/Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mmol/L; pH 2,5) (50:50). Vazão: 1,0 mL/min e λ: 254 nm. Temperatura de 35°C. .... 74

**FIGURA 4.7:** Cromatogramas da separação da resorufina 5µmol/L (1) e da 7-etoxiresorufina 5µmol/L (2) em diferentes detectores. (A) UV-vis: 254 nm e (B)

$\lambda_{exc}$ : 530 e  $\lambda_{em}$ : 582 nm. Volume de Injeção: 100  $\mu$ L. Coluna C18 Luna (10 $\mu$ m, 10 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Tampão  $KH_2PO_4$  (10 mmol/L; pH 2,5) (50:50). Vazão: 1,0 mL/min. Temperatura de 35°C. .... 75

**FIGURA 4.8:** Cromatograma obtido do microsossoma branco fortificado com 100  $\mu$ mol/L da 7-etoxiresorufina (2) (A) e do microsossoma fortificado com 0,64  $\mu$ mol/L de resorufina (1) e 100  $\mu$ mol/L da 7-etoxiresorufina (2) (B). Coluna C18 Luna (10 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: tampão  $KH_2PO_4$  (10 mmol/L; pH 2,5):MeOH (50:50). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 50  $\mu$ L;  $\lambda_{exc}$ : 530 e  $\lambda_{em}$ : 582 nm. Temperatura de 35°C. .... 76

**FIGURA 4.9:** Curva analítica para a quantificação de resorufina (n=24)..... 77

**FIGURA 4.10:** Cromatograma obtido do microsossoma branco fortificado com 100  $\mu$ mol/L de 7-etoxiresorufina (2) (A); da incubação *in vitro* da etoxiresorufina para a produção da resorufina (1), com 100  $\mu$ g de proteína (B). Coluna C18 Luna (10 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: tampão  $KH_2PO_4$  (10 mmol/L; pH 2,5):MeOH (50:50). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 50  $\mu$ L;  $\lambda_{exc}$ : 530 e  $\lambda_{em}$ : 582 nm. Temperatura de 35°C. .... 81

**FIGURA 4.11:** Cromatogramas da resorufina (1) e 7-etoxiresorufina (2) obtido de frações microsossomais obtida de duas formas: ultracentrifugação e por adição de cloreto de cálcio e ensaio *in vitro* com 10,0 mg/mL de concentração proteica. Coluna C18 Luna (10 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: tampão  $KH_2PO_4$  (10 mmol/L; pH 2,5):MeOH (50:50). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 50  $\mu$ L;  $\lambda_{exc}$ : 530 e  $\lambda_{em}$ : 582 nm. Temperatura de 35°C. .... 83

**FIGURA 4.12:** Gráfico da estabilidade das frações microsossomais extraídas por ultracentrifugação e por agregação com cloreto de cálcio no decorrer de 90 dias. .... 84

**FIGURA 4.13:** Fases hidrofóbicas recobertas com albumina sérica bovina (RAM-BSA). .... 90

**FIGURA 4.14:** Etapas de preparação das colunas RAM-BSA..... 90

**FIGURA 4.15:** Sequência de reações para a estabilização da BSA imobilizada: (1) formação das bases de Schiff entre BSA e glutaraldeído; (2a) e (2b) redução das bases de Schiff e dos grupos aldeídos residuais. .... 92

**FIGURA 4.16:** Espectros obtidos da reação do corante CBB com proteínas microsossomais eluídas da coluna extratora RAM-C18-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) (100 Å, 10  $\mu$ m). Espectros do Corante CBB com água e CBB complexado com proteínas de 50  $\mu$ L; 100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L de fração microsossomal..... 93

**FIGURA 4.17:** Espectros obtidos da amostra referência e da fração coletada da coluna extratora RAM-C18-BSA (5 x 0,46 cm d.i.) (100 Å, 10 µm). Espectros do Corante CBB com água; CBB complexado com proteínas de 200 µL da solução referência e CBB complexado com proteínas de 200 µL da 1º fração eluída da coluna (0-5 min). ..... **94**

**FIGURA 4.18:** Comparação entre os espectros do corante-proteína da segunda fração de microsomas eluído pela coluna extratora RAM-C<sub>18</sub>-BSA (100 Å, 10 µm) (5-10 min) e do corante CBB com água. Volume de injeção: 200 µL ..... **95**

**FIGURA 4.19:** Porcentagens de proteínas microsomais excluídas das colunas RAM-BSA utilizando água como fase móvel, na primeira fração eluída de (0-5 min). ..... **95**

**FIGURA 4.20:** Cromatogramas dos perfis de eluição da fração microsomal nas colunas RAM-BSA. Fase Móvel: água; vazão: 1,0 mL/min; λ=280 nm; volume de injeção: 200µL..... **97**

**FIGURA 4.21:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3). Coluna C18 Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm). Fase Móvel: (A) MeOH/Água (40:60); (B) MeOH/Água (60:40) + 0,5% HAc, Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm. .... **98**

**FIGURA 4.22:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna C18 Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm). Fase Móvel: (A) MeOH/Água (60:40) + 1%HAc; (B) MeOH/Água (60:40) + 1% TEA. Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm. .... **99**

**FIGURA 4.23:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2), ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna C18 Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm). Fase Móvel: (A) MeOH/Água (60:40) + 1% HAc + 1% TEA. Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm. .... **100**

**FIGURA 4.24:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). (A) Coluna Ciano Nucleosil (10µm, 15 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: MeOH/Água (50:50) + 4% HAc + 0,01% TEA e em (B) Coluna Hexilfenil Luna (10µm, 15 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Água (50:50) + 2% HAc. Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm..... **100**

**FIGURA 4.25:** Cromatograma da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna Fenil Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Água (50:50) + 2% HAc. Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm. .... **101**

**FIGURA 4.26:** Cromatograma da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna Fenil Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Água (50:50) +2% HAc. Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm. .... **102**

**FIGURA 4.27:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2), ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna Fenil Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm d.i.). 1,0 mL/min e λ: 290 nm ..... **103**

**FIGURA 4.28:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2), ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna Fenil Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Água/HAc (50:49,05:0,5). 1,0 mL/min e λ: 290 nm. .... **103**

**FIGURA 4.29:** Diagrama esquemático do sistema utilizado para determinar as condições cromatográficas de exclusão das macromoléculas e extração dos compostos de interesse das frações microssomais. .... **106**

**FIGURA 4.30:** Cromatogramas do tempo de acoplamento para a extração dos analitos das colunas RAM-BSA (5,0 x 0,46 cm). (A) Coluna RAM-C8-BSA e (B) RAM-Fenil-BSA. .... **107**

**FIGURA 4.31:** Cromatograma do tempo de acoplamento para a extração dos analitos das colunas RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm) ..... **109**

**FIGURA 4.32:** Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o acoplamento das colunas RAM-BSA e analítica. Posição 1: colunas não acopladas; Posição 2: colunas acopladas. .... **110**

**FIGURA 4.33:** Cromatograma da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4), com acoplamento das colunas RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm d.i.) e Fenil Hypersil (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) Água; (B) MeOH/Água (50:50) e (C): MeOH/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 100 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm. .... **111**

**FIGURA 4.34:** Cromatograma obtido do microssoma branco, com acoplamento das colunas RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm d. i.) e Fenil Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) Água; (B) MeOH/Água (50:50) e (C): MeOH/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 100 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm. .... **113**

**FIGURA 4.35:** Cromatograma obtido da fração microssomal fortificada com 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (1), 5 µg/mL do (+)-ABZ-SO (2), 5 µg/mL do (-)-ABZ-SO (3), 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub> (4) e 5,0 µg/mL do ABZ com acoplamento

das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm..... **114**

**FIGURA 4.36:** Cromatograma obtido para a análise dos metabólitos do ABZ em fração microsossomal. (A) matriz microsossomal fortificada com analitos e análise na coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) para verificação do tempo de acoplamento e (B) fração microsossomal fortificada com 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (1), 5 µg/mL do (+)-ABZ-SO (2), 5 µg/mL do (-)-ABZ-SO (3), 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub> (4) e análise total após acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm..... **115**

**FIGURA 4.37:** Cromatograma obtido do microsossoma branco e do microsossoma fortificado com 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (1), 5 µg/mL do (+)-ABZ-SO (2), 5 µg/mL do (-)-ABZ-SO (3), 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub> (4) , com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm..... **116**

**FIGURA 4.38:** Curvas analíticas para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> (n=21 para cada curva analítica) ..... **117**

**FIGURA 4.39:** Cromatogramas do planejamento experimental realizado com três diferentes experimentos. Acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm..... **125**

**FIGURA 4.40:** Cromatogramas com as condições de metabolismo otimizadas pelo planejamento, realizado com 2 lotes em dias diferentes. Dia 1 (Experimento 1, 2, 3) e Dia 2 (experimento 1A, 2A e 3A). Acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x

0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm..... 129

**FIGURA 4.41:** Fotos dos animais controle e desnutridos em diferentes fases: (A) no dia em que chegaram ao biotério; (B) 15 dias após dieta diferenciada; (C) 36 dias, início da queda dos pêlos; (D): 45 dias após dieta diferenciada. .... 133

**FIGURA 4.42:** Esquema representativo da biotransformação *in vitro* realizada com as frações microsossomais obtidas de ratos controle e de ratos com restrição proteica ..... 136

**FIGURA 4.43:** Cromatogramas com as condições de metabolismo otimizadas pelo planejamento, utilizando frações microsossomais de ratos controle e de ratos com restrição proteica. 1: (+)-ABZ-SO; 2: (-)-ABZ-SO e 3: ABZ-SO<sub>2</sub> Acoplamento das colunas RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm. .... 137

**FIGURA 4.44:** Estruturas Químicas da Amilose e da Celulose ..... 145

**FIGURA 4.45:** Esquema da síntese do *tris*(arilcarbamato) de amilose..... 148

**FIGURA 4.46:** Espectro no infravermelho da amilose não derivada..... 149

**FIGURA 4.47:** Espectro no infravermelho do FEQ-1 sintetizada..... 149

**FIGURA 4.48:** Cromatogramas da separação dos enantiômeros do ABZ-SO. Coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (FEQ-1). Fase Móvel: (A) Hexano/EtOH (80:20) e em (B) Hexano/2-propanol (80:20), Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm. .... 153

**FIGURA 4.49:** Cromatogramas da separação dos enantiômeros do ABZ-SO. Coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (FEQ-1). Fase Móvel: (A) Etanol e em (B) Metanol, Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm. .... 154

**FIGURA 4.50:** Cromatogramas da separação dos enantiômeros do ABZ-SO. Fase Móvel: Água/EtOH (50:50), Vazão: 0,5 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm, em (A) Coluna *tris*(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose e (B) Coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. .... 155

**FIGURA 4.51:** Cromatograma da separação em escala semipreparativa dos enantiômeros do ABZ-SO. Coluna semipreparativa: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20,0 x 0,7 cm d.i.). Fase móvel: Metanol. Vazão: 2,5 mL/min; V.injeção: 500 µL e λ:290nm. .... **157**

**FIGURA 4.52:** Cromatograma para determinação da pureza enantiomérica do ABZ-SO. Coluna analítica: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46cm d.i.). Fase móvel: metanol. Vazão: 1,0 mL/min; Vinj: 20 µL e λ:290nm. (A) (±)-ABZ-SO (B) 1º enantiômero: (+)-ABZ-SO (C) 2º enantiômero: (-)-ABZ-SO ..... **158**

**FIGURA 4.53:** Cromatograma para determinação de (+) e (-) ABZ-SO no dicroísmo circular. Coluna analítica: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46cm d.i.). Fase móvel: metanol. Vazão: 1,0 mL/min; V<sub>inj</sub>: 20 µL e λ:290nm. (A) (±)-ABZ-SO (B) 1º enantiômero: (+)-ABZ-SO (C) 2º enantiômero: (-)-ABZ-SO ..... **158**

**FIGURA 4.54:** Células utilizadas para o ensaio (A): MCF-7 e B: NCI-H460 **160**

**FIGURA 4.55:** Esquema ilustrativo do estudo de inibição *in vitro* com células tumorais humanas..... **160**

**FIGURA 4.56:** Gráfico ilustrando os valores de GI50 obtido para os compostos avaliados na diferentes linhagens celulares. .... **162**

**LISTA DE TABELAS****4.RESULTADOS E DISCUSSÕES**

**TABELA 4.1:** Exatidão (%) e precisão (CV%) obtidas para as diferentes concentrações da curva de calibração para BSA (n=3). ..... **70**

**TABELA 4.2:** Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdia, para a análise da resorufina em frações microssomais (n=5) ..... **78**

**TABELA 4.3:** Precisão e exatidão obtidas no teste cego da resorufina em frações microssomais (n=3). ..... **78**

**TABELA 4.4:** Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade da resorufina (n=5) ..... **79**

**TABELA 4.5:** Limites de quantificação e detecção para resorufina em frações microssomais (n=3). ..... **80**

**TABELA 4.6:** Atividade enzimática das frações microssomais obtidas a partir de fígados de ratos Wistar, com emprego da ultracentrifugação ..... **80**

**TABELA 4.7:** Atividade enzimática para as diferentes frações microssomais obtidas, por agregação de cálcio e ultracentrifugação, avaliada em diferentes concentrações proteicas e utilizando 7-etoxiresorufina como substrato. .... **82**

**TABELA 4.8:** Porcentagens de proteínas microssomais excluídas das colunas RAM-BSA, utilizando água como fase móvel, na primeira fração eluída (0-5 min) e respectivos coeficientes de variação das injeções. .... **96**

**TABELA 4.9:** Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão proteica e eluição dos analitos das colunas RAM-BSA selecionadas para o estudo. .... **107**

**TABELA 4.10:** Tempos de acoplamento para as diferentes RAM-BSA avaliadas ..... **108**

**TABELA 4.11:** Condições cromatográficas utilizadas, no sistema multidimensional, para a exclusão proteica e eluição dos analitos da coluna RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm d.i.) e para a análise do albendazol e seus metabólitos na coluna Fenil Hypersil (15,0 x 0,46 cm d.i.). Temperatura de 37°C. .... **112**

<b>TABELA 4.12:</b> Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdias, para a análise de ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> (n=5) em microssomas .....	<b>119</b>
<b>TABELA 4.13:</b> Precisão e exatidão obtidas no teste cego de ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO em amostras de microssoma (n=3). .....	<b>120</b>
<b>TABELA 4.14:</b> Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade do ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , (+)-ABZ-SO e(-)-ABZ-SO (n=5).....	<b>121</b>
<b>TABELA 4.15:</b> ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> em frações microssomais (n=3). .....	<b>122</b>
<b>TABELA 4.16:</b> Variáveis estudadas no planejamento fatorial 2 <sup>8-4</sup> .....	<b>123</b>
<b>TABELA 4.17:</b> Planejamento fatorial fracionário 2 <sup>8-4</sup> realizado.....	<b>124</b>
<b>TABELA 4.18:</b> Condições experimentais para a realização dos experimentos .....	<b>125</b>
<b>TABELA 4.19:</b> Contrastes calculados utilizando planejamento fatorial 2 <sup>8-4</sup> .	<b>127</b>
<b>TABELA 4.20:</b> Conclusões obtidas com o planejamento experimental realizado. ....	<b>128</b>
<b>TABELA 4.21:</b> Valores de Precisão (CV%) obtidos entre incubações.....	<b>128</b>
<b>TABELA 4.22:</b> Composição das dietas administradas para os animais controle e para os animais com restrição proteica (g/Kg).....	<b>130</b>
<b>TABELA 4.23:</b> Evolução dos pesos (g) dos animais controles e animais tratados com dieta com restrição proteica.....	<b>132</b>
<b>TABELA 4.24:</b> Peso (g) dos fígados retirados dos animais do grupo controle e do grupo com restrição proteica.....	<b>134</b>
<b>TABELA 4.25:</b> Valores das concentrações proteicas determinadas para as frações microssomais extraídas dos fígados de ratos do grupo controle e do grupo desnutrido.....	<b>135</b>
<b>TABELA 4.26:</b> Valores de concentração de (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO produzidos a partir da metabolização <i>in vitro</i> do ABZ e suas respectivas atividades enzimáticas. ....	<b>138</b>

- TABELA 4.27:** Valores calculados de *t Student* para (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO, comparando a atividade enzimática do grupo controle com o grupo com restrição proteica, para avaliar a influência da restrição proteica no metabolismo do ABZ, com 95% de confiança, 7 graus de liberdade..... **139**
- TABELA 4. 28:** Valores de *t Student* calculado para comparar concentrações de (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO produzidas a partir do metabolismo *in vitro* do albendazol, para verificar a enantiosseletividade nos dois grupos, com 95% de confiança, 7 graus de liberdade ..... **140**
- TABELA 4.29:** Dados referentes às colunas empregadas neste trabalho..... **147**
- TABELA 4.30:** Resultados da análise elementar para as FEQ sintetizada..... **150**
- TABELA 4.31:** Valores dos parâmetros cromatográficos obtidos para albendazol-sulfóxido no modo normal e polar orgânico ..... **152**
- TABELA 4.32:** Dados obtidos da separação semipreparativa dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido ..... **159**
- TABELA 4.33:** Efeito das substâncias ABZ, ABZ-SO, (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO na inibição do crescimento *in vitro* em três linhagens de células tumorais humanas..... **161**
- TABELA 4.34:** Dados obtidos no estudo de apoptose para a linha celular MCF-7 com o (+)-ABZ-SO ..... **163**

## RESUMO

### **“Investigação *in vitro* do Efeito da Restrição Proteica no Metabolismo do Albendazol em Ratos e Estudos de Inibição do Crescimento de Células Tumerais Humanas pelos Enantiômeros do Albendazol Sulfóxido”**

Este trabalho apresenta estudos sobre influência da restrição proteica no metabolismo *in vitro* do albendazol (ABZ). O estudo foi realizado com emprego de frações microssomais de fígados de ratos Wistar, através de um método por Cromatografia Líquida Multidimensional de Alta Eficiência, desenvolvido e validado para a determinação dos metabólitos do ABZ: o albendazol-sulfóxido (ABZ-SO), albendazol-sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>) e o albendazol-2-amino-sulfona (ABZ-NH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>). Os compostos foram extraídos da matriz biológica através do emprego de uma coluna C8-RAM-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e analisados em uma coluna cromatográfica quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.), em um tempo total de 35 min. Os dados de biotransformação demonstraram que a restrição proteica influenciou o metabolismo oxidativo do ABZ, onde a produção do (+) e (-)-ABZ-SO foi maior nos animais controles. Adicionalmente, a obtenção dos enantiômeros do ABZ-SO foi enantiosseletiva, onde o (-)-ABZ-SO foi produzido em maior quantidade do que o (+)-ABZ-SO em animais controle, porém, essa enantiosseletividade não foi observada quando da análise do metabolismo do ABZ em frações microssomais obtidas de fígados de ratos submetidos a restrição proteica. Ainda neste trabalho, foi realizada a avaliação de quatro fases quirais de polissacarídeos, no modo normal e polar orgânico, para a separação dos enantiômeros do ABZ-SO. Dentre as condições avaliadas, a fase quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e fase móvel composta por MeOH 100% foram empregadas para realizar a separação em escala semipreparativa do (±)-ABZ-SO. Os enantiômeros puros obtidos foram utilizados em ensaios *in vitro* de inibição do crescimento de células tumorais humanas. Os resultados destes testes mostraram que a inibição do crescimento celular foi aproximadamente 4 vezes maior com o (+)-ABZ-SO do que com o (-)-ABZ-SO, principalmente nas células MCF-7.



## ABSTRACT

### **“Investigation *in vitro* of Effect of Protein Restrict in the Metabolism of Albendazole in Rats and Growth Inhibition Studies in Human Tumor Cells by Enantiomers of Albendazole Sulphoxide”**

This work presents an *in vitro* investigation of protein restriction in the metabolism of albendazole (ABZ). The study was conducted with microsomal fractions obtained from Wistar rats using a High Performance Multidimensional Liquid Chromatography method which was developed and fully validated for the determination of the ABZ metabolites albendazole sulphoxide (ABZ-SO), albendazole sulphone (ABZ-SO<sub>2</sub>) and albendazole 2-aminesulphone (ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>). The compounds were extracted from the biological matrix using a C8-RAM-BSA column (5.0 x 0.46 cm i.d.) and analyzed on a chromatographic chiral column containing amylose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) (15.0 x 0.46 cm i.d.) with a runtime of 35 min. The results of the biotransformation experiments showed that the protein restriction influenced the oxidative metabolism of ABZ. The production of (+) and (-)-ABZ-SO was higher in the control animals. Additionally, the production of ABZ-SO enantiomers was enantioselective, where the (-)-ABZ-SO was formed in greater amounts than the (+)-ABZ-SO in control animals. However, this enantioselectivity was not observed when the ABZ biotransformation was conducted with microsomal fractions obtained from protein restriction animals. Four chiral polysaccharide phases were also evaluated for the enantioseparation of ABZ-SO in normal and polar organic elution modes. Among the tested conditions, the *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) of amylose and MeOH 100% as mobile phase was selected to perform a semipreparative HPLC separation of (±)-ABZ-SO. The pure enantiomers obtained were used in *in vitro* assays to evaluate the growth inhibitory effects on human tumor cells. Inhibition of cell growth was observed to be more pronounced with the (+)-ABZ-SO compared to (-)-ABZ-SO, particularly in MCF-7 cells where the inhibition was about four times more efficient.



# SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
1.1. Metabolismo de Fármacos .....	3
1.1.1. Fatores que Influenciam o Metabolismo de Fármacos .....	6
1.1.1.1.Fatores genéticos .....	6
1.1.1.2.Idade e Sexo.....	7
1.1.1.3.Dieta.....	7
1.1.1.4.Interação Medicamentosa .....	8
1.1.1.5.Doenças.....	8
1.1.2. O Metabolismo <i>In Vitro</i> de Fármacos .....	9
1.2. Má Nutrição por Restrição de Proteína e Caloria.....	10
1.3. Neurocistercose: Visão Geral .....	12
1.4. Albendazol .....	13
1.5. Câncer: Visão Geral.....	18
1.6. O Albendazol e suas Aplicações no Tratamento do Câncer.....	21
1.7. Ensaio Biológico.....	22
1.8. Resolução de Enantiômeros.....	23
1.8.1.Fases Estacionárias Quirais.....	24
1.8.1.1.Fases Estacionárias Quirais de Polissacarídeos.....	24
1.9. Cromatografia Multidimensional.....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
2.1.Objetivos Gerais.....	31
2.2.Objetivos Específicos.....	31
<b>3.PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>35</b>
3.1.Generalidades .....	35
3.2.Preparo das Colunas RAM-BSA .....	38
3.2.1.Sílicas Utilizadas.....	38

3.2.2. Empacotamento das Colunas .....	39
3.2.3. Imobilização das Fases Hidrofóbicas com BSA <sup>94,95</sup> .....	39
3.3. Avaliação da Eficiência e Exclusão das Proteínas Microssomais Pelas Colunas RAM-BSA .....	39
3.3.1. Determinação de Proteínas Totais em Frações Microssomais .....	39
3.3.1.1. Preparo do Reagente de Bradford.....	39
3.3.1.2. Preparo das Amostras .....	40
3.3.1.3. Medidas Espectrofotométricas das Amostras.....	40
3.4. Estudo de Metabolismo.....	41
3.4.1. Solução de PMSF (Fluoreto de Fenilmetanosulfonil) .....	41
3.4.2. Preparo do Tampão Fosfato com Sacarose e PMSF .....	41
3.4.3. Preparo do Tampão Fosfato Monobásico .....	41
3.4.4. Preparo do Tampão <i>tris</i> -HCl .....	41
3.4.5. Preparo do Tampão Hepes com Cloreto de Magnésio .....	41
3.4.6. Preparo das Soluções de Cloreto de Cálcio .....	42
3.4.7. Preparo das Soluções de NADPH.....	42
3.4.8. Animais .....	42
3.4.9. Extração das Frações Microssomais por Ultracentrifugação .. .....	43
3.4.10. Extração das Frações Microssomais por Agregação .....	43
3.4.11. Preparo da Solução Padrão de BSA .....	44
3.4.12. Preparo das Soluções de BSA <sup>96</sup> .....	44
3.4.13. Preparo do Reagente de Bradford.....	44
3.4.14. Medidas Espectrofotométricas das Amostras.....	44
3.5. Desenvolvimento do Método Analítico para Resorufina na Presença e 7-Etoxiresorufina .....	45
3.5.1. Inativação das Frações Microssomais .....	45
3.5.2. Preparo das Soluções Padrão da Resorufina e 7- Etoxiresorufina .....	45

3.5.3.Preparo das Amostras de Calibração e Controle de Qualidade .....	46
3.5.4.Obtenção das Curvas Analíticas .....	47
3.6.Parâmetros Analíticos para Validação em Biofluidos <sup>98,99</sup> .....	47
3.6.1.Seletividade.....	47
3.6.2.Recuperação.....	48
3.6.3.Precisão e Exatidão.....	48
3.6.4.Limite de Quantificação (LQ) e Detecção (LD).....	48
3.7.Medida de Atividade das Frações Microssomais Extraídas por Ultracentrifugação e por Agregação de Cálcio .....	49
3.7.1.Incubação <i>In Vitro</i> .....	49
3.7.2.Cálculo da Atividade Enzimática .....	49
3.8.Desenvolvimento do Método Analítico para Metabólitos do Albendazol.....	50
3.8.1.Inativação Das Frações Microssomais.....	50
3.8.2.Preparo das Soluções Padrão do ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , ABZ-SO <sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO .....	50
3.8.3.Preparo das Amostras de Calibração e Controle e Qualidade. ....	51
3.8.4.Obtenção das Curvas Analíticas .....	51
3.9.Planejamento Fatorial Fracionário .....	53
3.9.1.Incubação <i>In Vitro</i> Realizada no Planejamento.....	53
3.10.Aplicação do Método Desenvolvido para Análises do Metabolismo <i>In Vitro</i> de Ratos Controle e Ratos com Restrição Proteica .....	54
3.10.1.Animais.....	54
3.10.2.Dieta.....	54
3.10.3.Metabolismo <i>In Vitro</i> .....	54
3.10.4.Tratamento dos Dados .....	55
3.11.Preparo das Fases Estacionárias Quirais.....	55

3.11.1.Síntese da Fase Estacionária Quiral <i>tris</i> (3,5-dimetilfenilcarbamato) de Amilose <sup>73,76</sup> .....	55
3.11.2.Derivatização do Suporte 3-Aminopropilsílica (APS) .....	56
3.11.3.Cobertura do Carbamato ao Suporte APS-Nucleosil .....	57
3.11.4.Empacotamento das Fases Estacionárias .....	57
3.11.4.1.Coluna Analítica .....	57
3.11.4.2.Coluna Semipreparativa .....	58
3.12.Separação Enantiomérica do Albendazol Sulfóxido em Escala Semipreparativa.....	58
3.13.Avaliação Da Inibição Do Crescimento Celular .....	59
3.13.1.Condições de Cultura.....	59
3.13.2.Linhas Celulares .....	59
3.13.3.A Tripsinização das Linhas Celulares .....	59
3.13.4.Solução Sulforrodamina B (SRB) .....	59
3.13.5.Solução Azul de Tripiano .....	60
3.13.6.Tampão Fosfato Salino (PBS) .....	60
3.13.7.Solução de Ácido Acético 1% (V/V) .....	60
3.13.8.Solução <i>tris</i> -Base .....	60
3.13.9.Solução de Ácido Tricloroacético (TCA).....	60
3.13.10.Preparo das Soluções .....	61
3.13.11.Ensaio de Inibição com Sulforrodamina B (SRB) .....	61
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>67</b>
4.1.Extração das Frações Microssomais .....	67
4.2.Determinação Proteica das Frações Microssomais.....	68
4.2.1.Precisão e Exatidão .....	69
4.3.Desenvolvimento do Método Analítico para Resorufina na Presença de seu Substrato - 7-Etoxiresorufina .....	70

4.4. Validação do Método Analítico para a Determinação de Resorufina na Presença de Seu Substrato, a 7-Etoxiresorufina.....	75
4.4.1. Seletividade.....	75
4.4.2. Linearidade .....	76
4.4.3. Precisão e Exatidão .....	77
4.4.4. Recuperação.....	79
4.4.5. Limites e Quantificação e Detecção .....	79
4.5. Aplicação do Método: Atividade Enzimática para Frações Microsossomais Extraídas de Fígados de Ratos Wistar .....	80
4.5.1. Otimização da Concentração Proteica para Acompanhamento da Estabilidade das Frações Microsossomais .....	81
4.5.2. Estabilidade das Frações Microsossomais .....	83
4.6. Desenvolvimento do Método Analítico para a Determinação dos Metabólitos do Albendazol por Cromatografia Líquida Multidimensional .....	89
4.6.1. Colunas RAM-BSA .....	89
4.6.2. Preparo das Colunas AM-BSA.....	90
4.6.3. Exclusão das Proteínas Microsossomais pelas Colunas RAM-BSA .....	92
4.7. Desenvolvimento do Método Analítico para a Determinação dos Metabólitos do ABZ.....	97
4.8..... Desenvolvimento do Método Analítico Por Clae Multidimensional Para a Determinação dos Metabólitos do ABZ em Frações Microsossomais.....	104
4.9. Validação do Método .....	115
4.9.1. Seletividade.....	116
4.9.2. Linearidade .....	116
4.9.3. Precisão e Exatidão .....	118
4.9.4. Recuperação.....	120
4.9.5. Limites de Quantificação e Detecção .....	122
4.10. Planejamento Fatorial de Experimentos .....	122

4.11. Análise da Influência da Restrição Proteica no Metabolismo de ABZ – Modelos com Ratos Wistar .....	129
4.12. Separação dos Enantiômeros Do Albendazol Sulfóxido: Analítico E Semipreparativo .....	145
4.12.1. Síntese, Caracterização e Avaliação da Fase <i>tris</i> (3,5-dimetilfenilcarbamato) de Amilose.....	147
4.12.2.... Avaliação da Enantiorresolução do Albendazol Sulfóxido em Colunas Quirais de Polissacarídeos.....	150
4.12.3. Separação Semipreparativa dos Enantiômeros do Albendazol Sulfóxido.....	155
4.13. Estudos <i>In Vitro</i> de Inibição no Crescimento de Células Tumorais Humanas .....	159
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>167</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>171</b>

# *INTRODUÇÃO*



# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. METABOLISMO DE FÁRMACOS**

O sucesso terapêutico no tratamento de doenças em seres humanos depende de bases farmacológicas que permitam a escolha do medicamento correto, de forma científica e racional. Mais do que escolher o fármaco adequado visando reverter, atenuar ou prevenir um determinado processo patológico; o clínico precisa levar em consideração características fisiológicas (idade, sexo, peso corporal, raça), hábitos do paciente (tabagismo, ingestão de álcool) e possíveis doenças (insuficiência renal e hepática), uma vez que estas características fisiológicas e patológicas influenciam na biodisponibilidade dos fármacos.<sup>1</sup>

Para que haja a ação desejada de um fármaco quando este é administrado em animais ou humanos, é necessário ocorrer diversos processos, desde o momento em que se administra a dose até o aparecimento do efeito terapêutico. Esses processos são divididos em três fases: a fase farmacêutica, a farmacodinâmica e a farmacocinética.

A fase farmacêutica consiste na desintegração do medicamento da forma de dosagem, seguida da dissolução da substância ativa, deixando o fármaco disponível para ser absorvido.<sup>2</sup>

A fase farmacodinâmica estuda a ação do fármaco no seu sítio receptor, ou seja, as alterações moleculares e celulares que ali ocorrem e que culminam no efeito terapêutico desejado.<sup>2,3</sup>

A farmacocinética estuda a velocidade com que os fármacos atingem o seu sítio de ação e são então eliminados do organismo, bem como os fatores que influenciam na quantidade de fármaco a atingir esse sítio. Estuda basicamente quatro processos, sendo estes: a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME).<sup>1,3,4</sup>

O metabolismo de fármacos compreende o conjunto de reações enzimáticas que biotransformam os fármacos e outros compostos estranhos (xenobióticos) em metabólitos, muitas vezes de maior polaridade, para que possam ser excretados pela urina, fezes ou bile.<sup>2,4</sup> O metabolismo desempenha um importante papel na eliminação de fármacos, evitando que estes permaneçam no organismo por tempo indefinido.<sup>3</sup>

As reações de biotransformação são mediadas por dois tipos de reações: as de fase I e as de fase II.<sup>2-5</sup>

Reações de Fase I, também chamadas de reações funcionalizadas, compreendem alterações diretas da molécula por mediação enzimática, tais como: oxidação, redução e hidrólise. Essas transformações levam à modificação da polaridade das moléculas e, conseqüentemente, suas interações com os componentes celulares. O sistema citocromo P450 desempenha um importante papel nessas reações de fase I.<sup>2-5</sup>

Reações de Fase II são constituídas por reações de conjugação, onde o fármaco, se quimicamente adequado, ou um metabólito da fase I, é ligado covalentemente com outra molécula polar, como por exemplo, um açúcar, sulfato ou aminoácidos.<sup>4,5</sup>

Os fármacos que possuem grupos -OH, -NH<sub>2</sub> ou -COOH podem entrar diretamente na Fase II e serem conjugados, sem uma reação de Fase I prévia. Como também existem fármacos que podem sofrer reações de Fase II antes da reação de Fase I.<sup>4</sup>

O fígado é o principal órgão de biotransformação de fármacos, por isso é normalmente selecionado em estudos *in vitro*, embora o metabolismo possa também ocorrer em outros tecidos como rins, pulmões e trato gastrointestinal.<sup>4</sup>

Várias enzimas metabolizadoras de fármacos estão localizadas nas membranas lipofílicas dos retículos endoplasmáticos hepáticos ou de outros tecidos. Quando essas membranas são isoladas pela homogeneização e

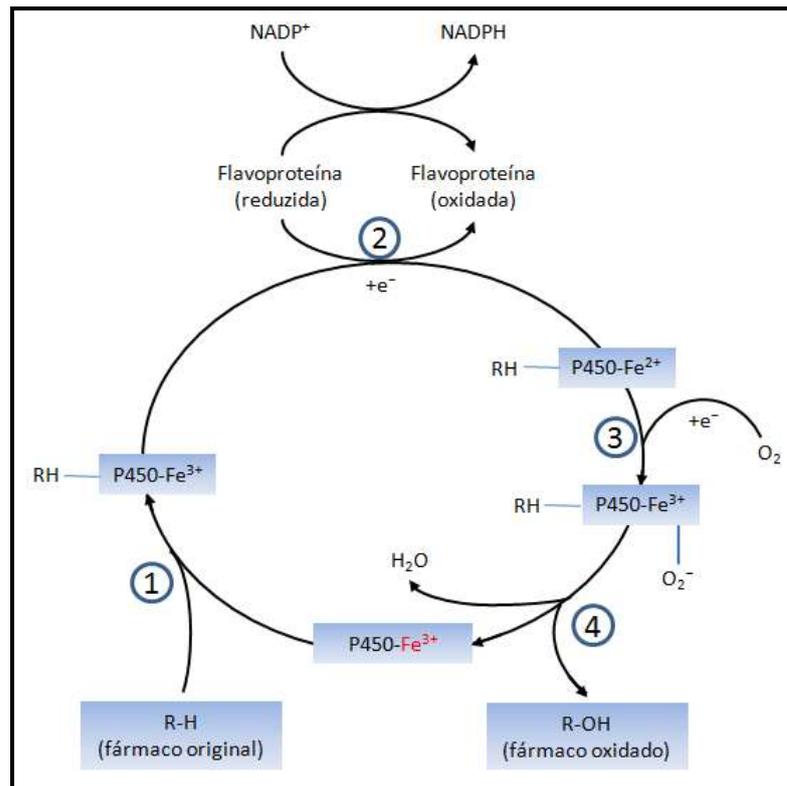
fracionamento celular, elas se reúnem sob forma de vesículas denominadas microssomas.<sup>1,3</sup> Os microssomas permitem estudar reações de biotransformação das Fases I e II.<sup>6</sup>

No processo de oxidação-redução, duas enzimas microssomais exercem uma função fundamental. A primeira delas é a flavoproteína, onde 1 mol dessa proteína fornece 1 mol de flavina mononucleotídeo (FMN) e 1 mol de flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD). A segunda enzima microssomal é a da superfamília do citocromo P450, a qual funciona como oxidase terminal.<sup>3</sup>

Citocromo P450 foi denominado assim por OMURA & SATO, porque o complexo formado com o monóxido de carbono apresentava uma banda de absorção espectrofotométrica em 450 nm. Essas enzimas apresentam um núcleo pirrólico com o átomo de ferro semelhante à hemoglobina, sendo consideradas hemoproteínas.<sup>7</sup>

O metabolismo hepático de fármacos necessita do citocromo P450, do citocromo P450 redutase, do NADPH e do oxigênio molecular. A Figura 1.1 mostra um esquema simplificado do ciclo oxidativo de fármacos.

O citocromo P450-(Fe<sup>3+</sup>) combina-se com o fármaco (RH) para formar um complexo binário, RH-P450-(Fe<sup>3+</sup>) (etapa 1). O NADPH doa um elétron à flavoproteína-redutase, que por sua vez reduz o complexo RH-P450-(Fe<sup>3+</sup>), formando o complexo RH-P450-(Fe<sup>2+</sup>) (etapa 2). Um segundo elétron é introduzido pelo NADPH através da mesma flavoproteína-redutase, que serve para reduzir o oxigênio molecular e formar um complexo ativado (etapa 3). Este complexo ativado transfere o oxigênio ativado para o fármaco (RH) para formar o fármaco oxidado (ROH) (etapa 4).<sup>3,8</sup>



**FIGURA 1.1:** Ciclo do citocromo P450 nas oxidações de fármacos. RH=fármaco original; ROH= metabólito oxidado<sup>3,8</sup>

### 1.1.1. Fatores que Influenciam o Metabolismo de Fármacos

A dose e a frequência de administração, necessários para alcançar níveis sanguíneos e teciduais terapêuticos eficazes, variam nos pacientes devido às diferenças individuais na distribuição dos fármacos e em suas taxas metabólicas. Os fatores mais importantes são os fatores genéticos, idade, sexo, doenças, interação com outros medicamentos e dieta.<sup>3,8</sup>

#### 1.1.1.1. Fatores Genéticos

Os efeitos da variabilidade genética sobre o metabolismo dos fármacos devem ser considerados nas dosagens dos medicamentos, uma vez que certas populações exibem polimorfismos ou mutações enzimáticas em uma ou mais enzimas, o que modifica a velocidade de algumas reações e elimina outras por completo.<sup>3</sup>

Por exemplo, a isoniazida, um fármaco utilizado para tratamento da tuberculose, é inativada por acetilação (conjugação) pela enzima *N*-acetiltransferase. O fenótipo designado como metabolizador lento é encontrado em 45% dos indivíduos brancos e negros dos Estados Unidos e, mais frequentemente, em europeus habitantes em elevadas latitudes e muito menos comum em asiáticos e esquimós. Os níveis sanguíneos de isoniazida são mais elevados (4 a 6 vezes) em metabolizadores lentos do que em metabolizadores rápidos. Além disso, como o fármaco livre atua como inibidor de CYP450, os metabolizadores lentos estão mais vulneráveis a interações medicamentosas adversas.<sup>3,8</sup>

#### **1.1.1.2. Idade e Sexo**

O metabolismo de fármacos é influenciado pela idade e pelo sexo. A velocidade nas reações de biotransformação é diminuída em crianças e idosos. Os recém-nascidos, por exemplo, não realizam todas as reações oxidativas, uma vez que a maioria do seu sistema enzimático amadurece gradualmente durante toda a infância.<sup>3</sup>

Em idosos observa-se uma diminuição da capacidade metabólica, atribuída a idade da massa do fígado, na atividade das enzimas hepáticas e a um menor fluxo sanguíneo hepático.<sup>8</sup>

Com relação ao sexo, relatou-se a diminuição na oxidação de etanol, estrogênios e benzodiazepínicos nas mulheres em comparação com os homens, que deve estar relacionada aos níveis de hormônios androgênicos.<sup>8</sup>

#### **1.1.1.3. Dieta**

Como muitas substâncias endógenas utilizadas para as reações de conjugação derivam da dieta e também necessitam de energia para a produção dos cofatores apropriados, a nutrição pode afetar o metabolismo.

Uma revisão realizada por LAZZERINI & TICKELL<sup>9</sup> mostrou a segurança, eficácia e farmacocinética no uso de antibióticos em crianças gravemente desnutridas. Dados farmacocinéticos sugerem que doses normais de penicilina, cotrimoxazol e gentamicina são seguras em crianças desnutridas, porém doses de clorofenicol requerem ajustes.

#### **1.1.1.4. Interação Medicamentosa**

Quando fármacos são co-administrados, estes podem afetar a biodisponibilidade, a ligação com proteínas plasmáticas, o metabolismo hepático e a excreção renal. Dentre estes, o metabolismo terá atenção especial. Um exemplo que pode-se citar é a indução enzimática causada pela rifampicina, o que faz com que a contracepção hormonal seja ineficaz em doses convencionais, uma vez que esse fármaco induz a CYP3A4, que é a enzima responsável pelo metabolismo do 17- $\alpha$ -etilestradiol. Neste caso é necessário recomendar outro método contraceptivo durante o tratamento com rifampicina.<sup>3</sup>

#### **1.1.1.5. Doenças**

O fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação dos fármacos, assim, muitas doenças hepáticas comprometem significativamente o metabolismo destes. Dentre elas, pode-se citar: estenose hepática, hepatite, hemocromatose, cirrose e câncer.<sup>3,8</sup>

O hipertireoidismo pode aumentar a intensidade do metabolismo, assim como o hipotireoidismo pode ter o efeito contrário.<sup>3,8</sup>

### 1.1.2. O Metabolismo *in vitro* de Fármacos

O principal objetivo de estudos de metabolismo de fármacos *in vitro* é completar a caracterização farmacocinética humana de um composto químico, assim como determinar seus efeitos benéficos e tóxicos.<sup>5</sup>

Em alguns casos o processo metabólico é muito complexo, podendo levar a formação de 15 a 20 produtos, sendo sua recuperação, em excretas ou fluidos, frequentemente incompleta. Um quadro completo da biotransformação pode ser gerado com o uso de materiais radiomarcados, mas o uso desses materiais é limitado à dose-única em humanos. Sendo então a quantidade de metabólitos gerada insuficiente para o isolamento e elucidação estrutural. Assim, fontes alternativas para a geração de metabólitos devem ser utilizadas. Uma fonte principal para a obtenção e estudo de produtos de biotransformação é a utilização de modelos animais ou testes *in vitro*.<sup>5</sup>

Uma das principais vantagens de sistemas *in vitro* é atribuída à rápida obtenção de resultados; à redução do uso de animais quando comparado com os ensaios *in vivo* e a habilidade para investigar aspectos específicos como: as isoformas envolvidas nas rotas metabólicas, as interações fármaco-fármaco e a disposição metabólica de um determinado composto.<sup>10</sup>

Além disso, métodos desenvolvidos *in vitro* são úteis para estudar a estabilidade de metabólitos; a geração em larga escala de metabólitos, para posterior utilização em ensaios bioanalíticos; comparação do perfil metabólico e constatação de diferentes espécies envolvidas na biotransformação, além de oferecer apoio para o desenvolvimento de um fármaco em estudos farmacocinéticos.<sup>6</sup>

Como exemplo, pode-se citar um estudo conduzido para verificar o envolvimento da CYP3A4/5 e da CYP2D6 no metabolismo da aconitina, um alcalóide com função antirreumática, em microsomas de fígado humano e enzimas recombinantes. Os compostos maleato de fluvoxamina, gemfibrozil, cloridrato de amiodarona, omeprazol, quinidina, ácido dietilditiocarbâmico e

cetoconazol foram utilizados como inibidores para CYP1A1, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4/5, respectivamente, em microsomas de fígado humano. Deste trabalho, concluiu-se que a aconitina pode ser biotransformada *in vitro* em seus metabólitos e que as isoformas mais importantes nesse processo foram a CYP3A4/5 e CYP2D6, as quais mediaram a metilação, a N-dietilação e a desidrogenação da aconitina.<sup>11</sup>

Um estudo recente foi também realizado por KINOSHITA *et al*<sup>12</sup> onde foram comparados os efeitos do omeprazol e rabeprazol no metabolismo *in vitro* da triclopidina, fármaco usado conjuntamente com aspirina após implante coronariano. O omeprazol e rabeprazol são inibidores da bomba de próton (PPI) e são necessários para a prevenção ou tratamento de hemorragia digestiva alta. Examinou-se os efeitos destes dois PPIs através do emprego de microsomas de fígados humanos. Os resultados sugeriram que o efeito inibitório do omeprazol é mais potente que o do rabeprazol, sendo preferível administrar rabeprazol em combinação com triclopidina e aspirina.

## **1.2. MÁ NUTRIÇÃO POR RESTRIÇÃO DE PROTEÍNA E CALORIA**

Como anteriormente apresentado, muitos fatores podem alterar o metabolismo hepático e intestinal de um fármaco, o que acarreta em diferenças nas concentrações do fármaco e seus metabólitos em plasma ou tecidos, fazendo com que estes apresentem sua eficácia aumentada ou diminuída, dependendo de cada caso. Portanto, estudos durante o desenvolvimento de um novo fármaco ou durante o aprimoramento de fármacos já em uso devem considerar essas diferenças existentes, sendo a má nutrição por carência de proteína e caloria (PCM) (do inglês: *malnutrition protein-calorie*) um estudo a ser considerado.

A PCM é considerada um sério problema global que ocorre tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento e atinge principalmente crianças e idosos. A má nutrição pode ser desenvolvida a partir

de uma alimentação inadequada, devido a problemas socioeconômicos e também como consequências de doenças graves como o câncer<sup>13</sup>, malária<sup>14</sup>, anorexia nervosa<sup>15</sup> e a AIDS<sup>16</sup>. Por exemplo, pacientes com câncer frequentemente apresentam diagnóstico de má nutrição, decorrentes de perda de peso e uma inadequada absorção de nutrientes. A prevalência da má nutrição pode atingir 8-84% dos pacientes com câncer e aproximadamente 20% das mortes desses pacientes está associada à má nutrição e não a doença propriamente dita.<sup>13</sup>

No caso de pacientes com AIDS, aproximadamente 50% deles tornam-se mal nutridos no decorrer do tratamento, o que acarreta uma intolerância ao tratamento clínico e prejuízos na resposta imunológica.

Estudos realizados em crianças desnutridas na África mostra uma estreita relação entre a desnutrição e o HIV e a interligação destes em um círculo vicioso. Enquanto a infecção pelo HIV aumenta a vulnerabilidade à desnutrição, a desnutrição degrada o sistema imunológico e aumenta a vulnerabilidade dos efeitos do HIV e a progressão da doença.<sup>17</sup>

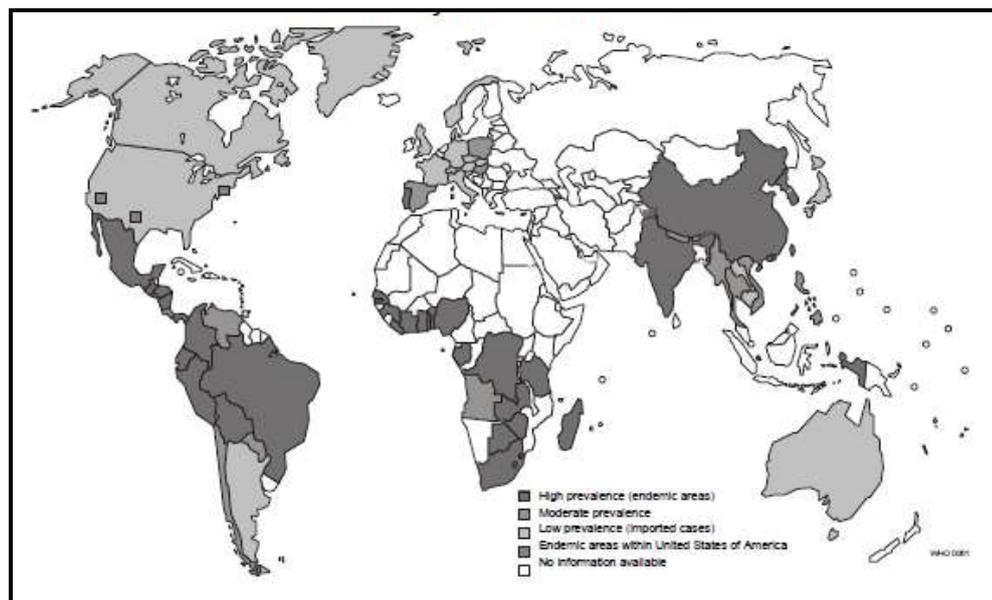
Outro estudo realizado na África Ocidental investigou a prevalência geográfica de possíveis riscos de anemia, utilizando a contribuição da desnutrição, malária e contaminação por helmintos em crianças com idade de 1-4 anos. Dos países avaliados, Gana, Mali e Burquina Faso, o índice de anemia foi na média de 88%, sendo este índice considerado grave na África Ocidental. Sinergismos biológicos entre *S.haematobium* e as infecções por parasitas foram significativamente associados ao risco de anemia. Portanto a anemia pode ser evitada pelo tratamento da desnutrição, malária e infecções por parasitas.<sup>18</sup>

Desta forma, diferentes estudos<sup>13,17,18</sup> revelam a estreita relação entre a má nutrição e algumas doenças, porém, poucos são os estudos endereçados a avaliar o impacto da má nutrição no metabolismo de fármacos utilizados para tratamento de doenças importantes e persistentes em países em desenvolvimento, como é o caso da tuberculose e da neurocisticercose.

### 1.3. NEUROCISTERCIRCOSE: VISÃO GERAL

A neurocisticercose é considerada a mais importante infecção do sistema nervoso central (SNC), causada pelo *Cysticercus cellulosae*, estágio larval (cisticerco) da *Taenia solium*<sup>19</sup>, desencadeando reações inflamatórias tanto ao redor do parasita como a distância do mesmo e é um grave e negligenciado problema de Saúde Pública em várias regiões da Ásia, África e América Latina.<sup>20-22</sup>

A cisticercose está associada com áreas de pobreza onde a população se alimenta de porcos e a agricultura tradicional é praticada, sendo endêmica em áreas como a América do Sul, América Central e México; na China, no subcontinente Indiano e sudeste da Ásia; e na África sub-Saariana (Figura 1.2).<sup>22,23</sup>



**FIGURA 1.2:** Mapa da prevalência de cisticercose no mundo<sup>22,23</sup>

A neurocisticercose é a mais importante doença neurológica causada por parasita em humanos e apresenta-se como a principal causa de epilepsia nas regiões endêmicas.<sup>22,23</sup> No Brasil essa manifestação clínica é reportada na faixa de 11 – 92% dos casos de neurocisticercose.<sup>20</sup>

Outras manifestações clínicas são: cefaléia, hipertensão intracraniana, meningite/meningoencefalite, distúrbios psiquiátricos, acidente vascular cerebral e compressão medular.<sup>20,22</sup>

Os fatores que contribuem para a natureza endêmica do complexo teníase/cisticerco são complexos e mostram estreita relação com a condição socioeconômica, higiene pessoal e familiar dos pacientes.<sup>10</sup> Devido a estes fatores, a maioria das pessoas com quadros clínicos de neurocisticercose apresentam também problemas de desnutrição. Desta forma, a investigação do efeito da restrição proteica no metabolismo de fármacos utilizados na terapia antiparasita da neurocisticercose<sup>21,24</sup> pode propiciar uma adequação da dosagem empregada para o medicamento.

#### 1.4. ALBENDAZOL

Albendazol (ABZ) (Figura 1.3) é um dos fármacos mais recomendados para o controle de doenças helmínticas e também da neurocisticercose, devido ao seu amplo espectro de atividade, baixo custo, alta eficácia e a facilidade da sua administração sendo rotineiramente empregado em humanos e na medicina veterinária.<sup>25</sup>

O albendazol (ABZ), bem como outros fármacos da classe dos benzimidazóis, produzem nos parasitas suscetíveis, alterações bioquímicas, incluindo a inibição da fumarato redutase mitocondrial, a redução do transporte de glicose e o desacoplamento da fosforilação oxidativa, mas provavelmente a sua principal ação é inibir a polimerização dos microtúbulos, unindo-se à  $\beta$ -tubulina.<sup>26</sup>

Estudos *in vitro* realizados com linfócitos humanos demonstraram que essas células quando expostas ao ABZ e ABZ-SO (albendazol sulfóxido) induziram a formação de aneuploidia, devido a formação de microtúbulos impróprios, causado pela inibição da polimerização da tubulina. Uma maior

frequência de eventos de não disjunção foi causada no uso de ABZ do que ABZ-SO.<sup>27</sup>

O ABZ é mal absorvido no trato gastrointestinal devido a sua baixa solubilidade em água, propriedade que influencia na absorção e comportamento no organismo.<sup>28</sup>

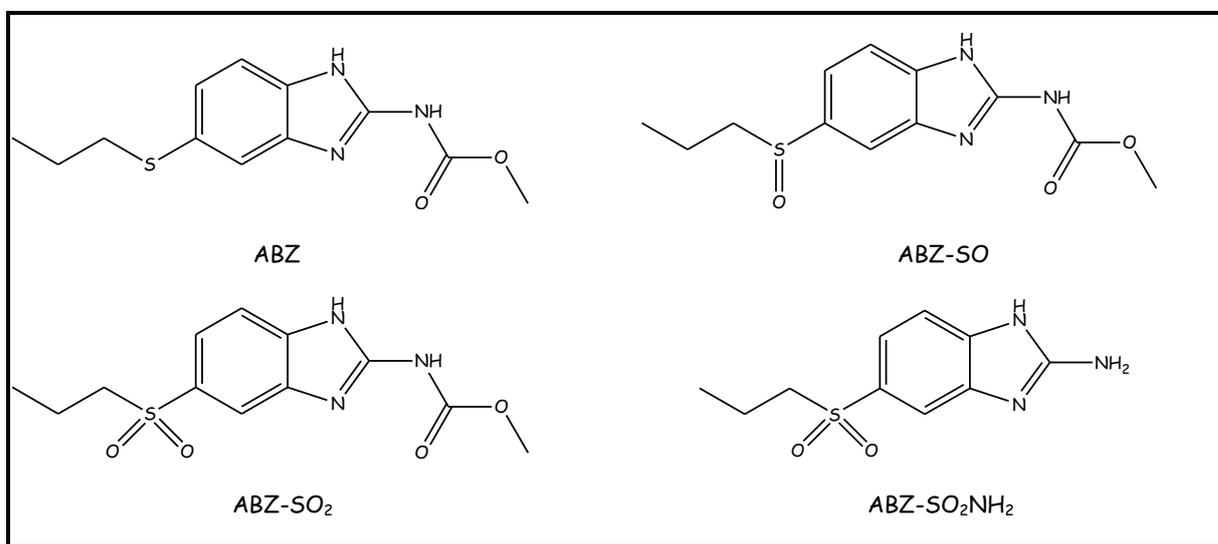
A absorção oral de ABZ em camundongos e ratos é aproximadamente de 20-30% e em gado alcança valores de 50%, comparado com aproximadamente 1-5% em humanos.<sup>29</sup> A absorção em humanos é intensificada pela presença de alimentos gordurosos, podendo ser aumentada em até cinco vezes.<sup>30</sup>

Apesar de ser muito empregado, o tratamento prolongado com ABZ, como no caso da neurocisticercose, pode vir a causar efeitos colaterais indesejáveis, como dor gastrointestinal, cefaléias graves, febre, fadiga, perda dos cabelos, leucopenia e trombocitopenia. O fármaco não é administrado em pacientes com cirrose e, durante um tratamento prolongado, devem ser monitorados testes da função hepática. O albendazol também é teratogênico e embriotóxico em animais e não deve ser administrado em gestantes.<sup>31</sup>

O albendazol é considerado um pró-fármaco, o qual requer sua ativação no fígado pelo citocromo P450 (CYP450) e por enzimas flavinas monooxigenase (FMO), tanto em animais como em humanos.<sup>29</sup> Após sua administração oral, a metabolização do ABZ é rápida, não sendo detectado em plasma de carneiros<sup>32</sup> e de humanos.<sup>33</sup>

A farmacocinética do albendazol foi analisada em diferentes espécies animais, onde estudos envolvendo carneiros<sup>34</sup>, bezerros<sup>35</sup> e humanos<sup>35,36</sup> demonstraram que este é rapidamente metabolizado para a forma albendazol sulfóxido. Outros dois metabólitos são formados durante a metabolização do ABZ: albendazol sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>) e albendazol-2-amino-sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) (Figura 1.3).

O albendazol sulfóxido (ABZ-SO) apresenta um centro assimétrico no átomo de enxofre, por isso apresenta-se na forma de dois enantiômeros, o (+)-ABZ-SO e o (-)-ABZ-SO.<sup>36</sup>



**FIGURA 1.3:** Estruturas químicas do albendazol e seus metabólitos

O albendazol sulfóxido, metabólito ativo, é considerado diretamente ou indiretamente responsável pela eficácia e toxicidade do albendazol, sendo este oxidado e convertido em albendazol sulfona. O grupo carbamato também é rapidamente removido por hidrólise, levando à formação do albendazol-2-amino-sulfona. Este último é o metabólito minoritário e, assim como o albendazol sulfona, não apresenta atividade farmacológica.<sup>29,37,38</sup>

Em humanos, a metabolização do albendazol sulfóxido, quiral, é enantiosseletiva, onde citocromos P450 são os responsáveis pela formação de (-)-ABZ-SO, enquanto que a formação do (+)-ABZ-SO é proveniente da metabolização por enzimas flavinas monooxigenases (FMO). A oxidação subsequente para formação de albendazol-sulfona é dependente de isoenzimas da CYP450.<sup>29</sup>

A biotransformação do albendazol em humanos<sup>27,28</sup> ou em diferentes espécies animais<sup>34,33,39</sup> ocorre predominantemente no fígado, embora atividade metabólica possa também ocorrer em tecidos extra-hepáticos, como

pulmão e trato gastrointestinal. Estão envolvidas na biotransformação do albendazol, enzimas flavinas monooxigenases (FMO), CYP1A1 e CYP3A4, onde o metabolismo de ABZ para ABZ-SO é mediado por FMO e CYP, enquanto o metabolismo do ABZ-SO para ABZ-SO<sub>2</sub> é somente mediado por CYP.<sup>29,40</sup> Estudos tem também demonstrado que o ABZ é um potencial indutor da CYP1A1/2.<sup>41,42</sup>

Estudos recentes, realizados com larvas de *Trichinella spiralis*, demonstraram uma maior atividade anti-helmíntica do (+)-ABZ-SO em relação ao (-)-ABZ-SO.<sup>43,44</sup> A redução da viabilidade larval foi de 84,4% para o (+)-ABZ-SO enquanto que o (-)-ABZ-SO não apresentou significativa redução na viabilidade larval (30,1%) quando comparado com os controles. Já a mistura racêmica apresentou redução de 69,3%.<sup>43</sup> Concentrações maiores de albendazol sulfóxido no meio levou a maiores concentrações dentro das larvas e indicou um processo de difusão simples, durante o tempo necessário para efeito anti-helmíntico (18 horas). Além disso, as concentrações encontradas dentro das larvas foram maiores para o (+)-ABZ-SO quando comparados com o (-)-ABZ-SO.<sup>44</sup>

LANCHOTE *et al.*<sup>35</sup> desenvolveram um método para quantificação dos enantiômeros do albendazol sulfóxido e albendazol sulfona em plasma humano. Este estudo relata que somente o (+)-enantiômero foi encontrado na corrente sanguínea depois de 12 horas da administração oral de 5 mg/kg de ABZ, na concentração de 30 ng/mL, mostrando que o (+)-ABZ-SO é acumulado. Neste mesmo período, o albendazol sulfona também foi detectado na concentração de 2,0 ng/mL,

Em trabalho realizado por GARCIA *et al.*<sup>45</sup> utilizando-se plasma de camundongos, a concentração em plasma do (+)-ABZ-SO foi cerca de 25 ng/mL, enquanto que o do (-)-ABZ-SO foi de 75 ng/mL, depois de 24 horas da administração oral de 12 mg/kg do ABZ.

Estudos realizados por PAIAS *et al.*<sup>46</sup> revelaram em pacientes com neurocisticercose tratados com ABZ uma diferença na disposição cinética dos enantiômeros do ABZ-SO. A concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) encontrada foi de 900 e 185 ng/mL para o (+) e o (-)-ABZ-SO, respectivamente.

CAPECE *et al.*<sup>47</sup> estudaram em ratos a diferença na farmacocinética após a administração de ABZ-SO racêmico e de seus enantiômeros separadamente. Os valores encontrados para  $C_{max}$  foi de 2,50 e 3,60 µg/mL para o (+) e o (-)-ABZ-SO, respectivamente e de 0,70 µg/mL para ABZ-SO<sub>2</sub> quando administrado na forma racêmica. Porém, quando os enantiômeros foram administrados separadamente os valores encontrados de  $C_{max}$  foram de 1,60 µg/mL para o (+)-ABZ-SO e de 0,20 µg/mL para ABZ-SO<sub>2</sub>, e já para (-)-ABZ-SO o valor encontrado foi de 3,00 µg/mL e para ABZ-SO<sub>2</sub> de 0,30 µg/mL. O tempo de permanência média obtido para ambos os enantiômeros em ambas as administrações não mostraram grandes variações, com valores na faixa de 3,6-4,1 horas.

Portanto, o (+)-ABZ-SO é predominante em plasma humano, de carneiros, cachorros e cabras, enquanto que o (-)-ABZ-SO é predominante em ratos e camundongos.<sup>45-47</sup>

Albendazol vem sendo estudado em associação com outros fármacos antiparasitários, como mebendazol no tratamento de *Trichuris trichiura*<sup>48</sup> e praziquantel (PZQ),<sup>49,50</sup> no tratamento da neurocisticercose, onde os tratamentos combinados se mostrou mais eficaz do que quando o albendazol é administrado sozinho.

A interação farmacocinética entre ABZ e PZQ em voluntários saudáveis foi demonstrada pela observação do aumento das concentrações plasmáticas dos dois enantiômeros do ABZ-SO e do ABZ-SO<sub>2</sub>, e também do aumento do (-)-enantiômero do praziquantel<sup>49</sup>. Clinicamente a combinação de ABZ e PZQ pode melhorar a eficácia terapêutica devido ao aumento da concentração plasmática de ambos os fármacos ativos.

Diante destas observações farmacológicas encontradas para os enantiômeros do albendazol sulfóxido e uma vez que esses enantiômeros podem apresentar propriedades farmacológicas diferentes entre si, faz-se necessária um estudo de metabolismo tanto para o albendazol, como também um estudo de metabolismo enantiosseletivo para os enantiômeros do albendazol sulfóxido.

Embora o albendazol seja classificado como um “fármaco antigo”, desenvolvido há vários anos, desde 1979, dados sobre toxicidade, atividade, cinética enantiosseletiva, mecanismo de ação, adequação de doses são carentes de estudos para aplicações clínicas atuais.<sup>29,51</sup>

Um fator adicional de interesse no estudo de metabolismo do albendazol dá-se também em função deste fármaco ser promissor no tratamento do câncer.<sup>52-55</sup>

### **1.5. CÂNCER: VISÃO GERAL**

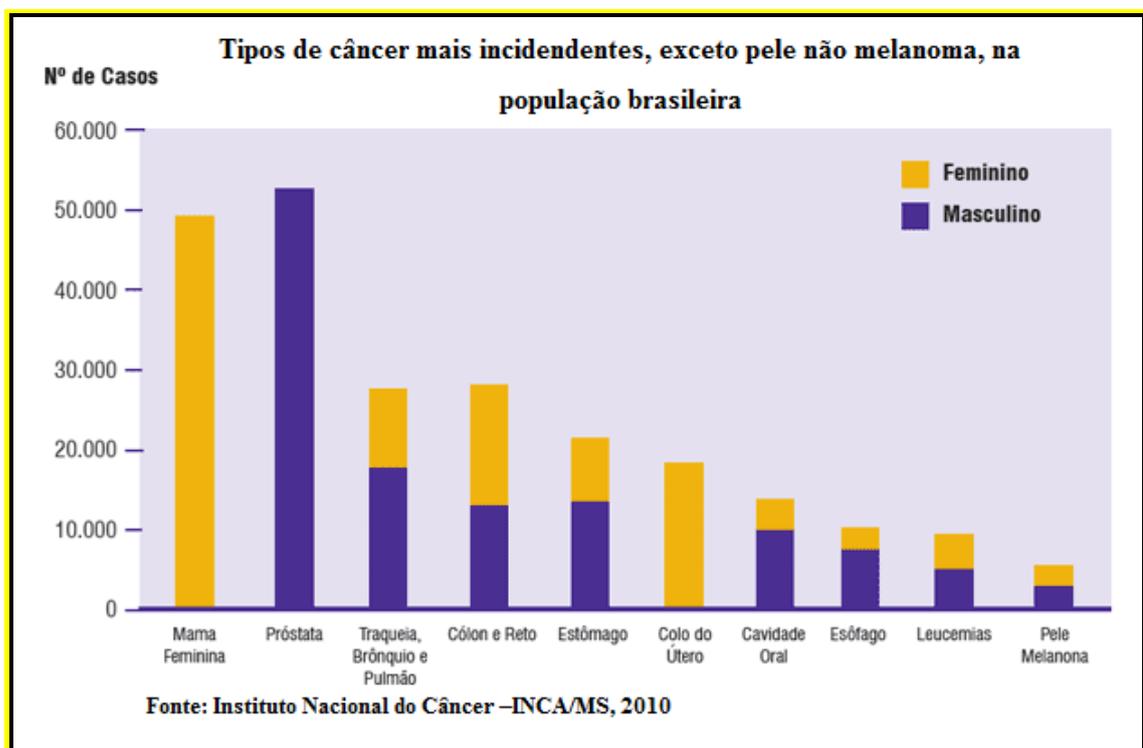
De acordo com o Instituto Nacional do Câncer - INCA, câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, as quais invadem tecidos e órgãos e podem espalhar-se para outras regiões do corpo, causando a metástase. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas, determinando a formação de tumores, que se trata do acúmulo de células cancerosas, ou neoplasias malignas. Por outro lado, as células podem se multiplicar vagarosamente e se assemelhar ao tecido que lhe deu origem, causando um tumor benigno, o qual raramente constitui um risco de vida aos pacientes.<sup>56</sup>

As causas do câncer estão relacionados a múltiplos fatores, incluindo idade, sexo, raça, predisposição genética e fatores ambientais, sendo o último um dos mais importantes. As causas ambientais estão relacionadas aos hábitos ou costumes próprios, como exposição a agentes carcinogênicos, como aqueles presentes no tabaco, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.<sup>3,56</sup>

Em 2008, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC/WHO) estimou que existiam 12,4 milhões de casos de câncer e 7,6 milhões de mortes por câncer no ano.<sup>57</sup>

De acordo com as tendências atuais, em 2030, o número de casos de câncer estimados em todo o mundo será de aproximadamente 25 milhões. Desta forma, o câncer é a segunda causa de morte na população, representando cerca de 17% dos óbitos de causa conhecida.<sup>57</sup>

A incidência de câncer na população brasileira, em 2010, mostrou uma estimativa de 236.240 casos para o sexo masculino e de 253.030 para o feminino. O câncer de pele do tipo não melanoma foi que apresentou o maior número de casos, 114.000, seguido pelos tumores de próstata (52.000) e de mama feminina (49.000), (Figura 1.4)<sup>56</sup>



**FIGURA 1.4:** Gráfico que ilustra os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, exceto pele não melanoma<sup>56</sup>

No Brasil, para biênio 2010/2011, a estimativa é de 489.270 novos casos de câncer, sendo que os mais incidentes serão os de próstata e pulmão nos homens e de mama e cólo de útero nas mulheres.<sup>56</sup>

Os pilares terapêuticos do câncer são a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia, destacando-se o último.<sup>57</sup>

A quimioterapia do câncer se esforça para causar um evento citotóxico na célula cancerosa para que o tumor possa ser inibido. O ataque normalmente é direcionado contra um passo metabólico essencial da multiplicação celular.<sup>3</sup> Um exemplo, é o caso dos quimioterápicos anti-mitóticos que, após a célula duplicar seu DNA durante o ciclo celular e entrar na etapa da mitose, onde os cromossomos precisam ser divididos para células-filha e onde existe um complexo celular, designado fuso mitótico, o qual requer a cooperação de algumas proteínas, principalmente a tubulina, para poder separar e alinhar esses recém-sintetizados cromossomos. Vários agentes anticancerígenos interferem nesse processo, como é o caso do taxol, vimblastina, vincristina, vinorelbina.<sup>3,57</sup>

Os agentes quimioterápicos deveriam interferir somente nos processos celulares que são próprios das células malignas, mas a maioria dos fármacos anticancerígenos não reconhecem as células neoplásicas e afetam todas as células proliferantes, normais ou anormais, causando uma série de efeitos colaterais, como: supressão da médula óssea levando a anemia; neutropenia e trombocitopenia; alopecia, devido a danos celulares no folículo piloso e a apoptose (morte programada das células), de células da cripta gastrointestinal, causando diarréias e ulcerações orais.<sup>3,57</sup>

De acordo com NEIDLE & THURSTON,<sup>58</sup> do Instituto Nacional do Câncer (NCI-EUA), este instituto conduz pesquisas, diagnósticos e tratamento do câncer; coletando, analisando e disseminando os resultados das investigações realizadas nos Estados Unidos e outros países. Na década de 50, uma das maneiras que o NCI encontrou para ter disponíveis compostos para serem

testados foi estabelecer uma série de programas, onde foram convidados químicos de todo o mundo para apresentarem seus novos compostos para a seleção de ensaios *in vitro* com células tumorais.

O trabalho realizado por MONKS *et al.*<sup>59</sup> descreve a implementação *in vitro*, em escala piloto, para o estudo de inibição do crescimento celular em mais de sessenta linhagens celulares humanas, citando: melanoma, leucemia, cânceres de pulmão, cólon, rim e ovário. Após os estudos de rastreio-piloto, uma taxa de 400 compostos por semana estava sendo avaliados.

## 1.6. O ALBENDAZOL E SUAS APLICAÇÕES NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Recentemente, estudos realizados com células humanas de câncer do colorretal<sup>60</sup>, de tumores peritoneal de câncer de ovário (OVCAR-3)<sup>53</sup>, carcinoma hepatocelular<sup>55</sup> e células T leucêmicas<sup>61</sup>, tem fornecido evidências para a atividade antitumoral do ABZ.

O objetivo do estudo realizado por POURGHOLAMI *et al.*<sup>53</sup> em camundongos fêmeas portadoras de tumores peritoneal de câncer de ovário (OVCAR-3) foi avaliar a capacidade do albendazol em suprimir a formação de ascite causada pela carcinomatose peritoneal. Os animais foram tratados com albendazol por quatro semanas e os resultados mostraram a inibição da produção de ascite. Desta forma, sete dos dez animais do grupo controle tiveram que ser sacrificados devido ao longo período de análise.

A atividade antitumoral *in vitro* do ABZ para um modelo de carcinomatose peritoneal de câncer retal humano (HT-29) apresentou valores de GI50 para ABZ de 0,12  $\mu\text{mol/L}$  e para o ABZ-SO de 2,35  $\mu\text{mol/L}$ . Realizou-se também estudos de investigação do mecanismo de ação do ABZ, que revelou induzir a apoptose.<sup>60</sup>

Estudos clínicos de fase I foram realizados para determinar a dose máxima tolerada de albendazol, administrado oralmente em pacientes com

neoplasias graves. Trinta e seis pacientes, com as mais diversas neoplasias foram tratados com ABZ, que apresentou como dose máxima tolerada 2400 mg/dia, devido a mielossupressão causada.<sup>54</sup>

Portanto, tendo em vista os efeitos colaterais do ABZ e que este é um pró-fármaco, sendo o seu metabólito principal o albendazol-sulfóxido, um composto quiral, a avaliação do efeito de inibição de células tumorais humanas pelos enantiômeros do ABZ-SO foi considerada.

### 1.7. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Atualmente, tem sido realizado ensaios biológicos *in vitro*, que medem a sobrevivência ou proliferação das células. Estes estudos baseiam-se no *screening*, estratégia que permite a análise de um grande número de produtos sintéticos ou naturais simultaneamente em diversas linhagens, o que torna o método mais simples comparativamente aos ensaios *in vivo*.<sup>58</sup>

Os métodos mais utilizados para quantificar a proliferação celular é o colorimétrico, destacando-se o com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e o com a sulforrodamina B (SRB).

O princípio do ensaio colorimétrico com MTT é a mudança de coloração por redução de um substrato amarelo, o sal MTT, produzindo um produto de coloração roxo-azulado, essa reação ocorre por enzimas mitocondriais, portanto somente em células vivas.<sup>62</sup>

O ensaio com a sulforrodamina B (SRB) é utilizado para medida da densidade celular e baseia-se na capacidade do SRB em se ligar à proteínas que foram fixadas com TCA (ácido tricloroacético). O SRB é uma aminoxantona, de coloração rosa brilhante, ligada a dois grupos sulfônicos, que se ligam aos resíduos de aminoácidos em condições moderadamente ácidas e se dissociam sob condições básicas. Como a ligação é estequiométrica, a quantidade de células coradas é proporcional a massa celular.<sup>62,63</sup>

## **1.8. RESOLUÇÃO DE ENANTIÔMEROS**

O desenvolvimento de técnicas analíticas seletivas, sensíveis e que possam discriminar estereoisômeros é essencial para a investigação de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de fármacos quirais, bem como para a determinação da pureza enantiomérica em preparações farmacêuticas,<sup>64,65</sup> uma vez que vários medicamentos aprovados em todo o mundo são quirais e grande parte deles são comercializados como racematos.<sup>66</sup>

De acordo com FELIX e BERTHOD<sup>66</sup>, depois da virada do século, o número de novos fármacos na forma racêmica comercializados caíram para 6% (2000-2002), devido as novas diretrizes para o desenvolvimento de medicamentos quirais nos Estados Unidos (1992) e na União Européia (1994), onde exige-se identificar a presença de quiralidade; separar os estereoisômeros e avaliar a contribuição dos vários estereoisômeros na atividade de interesse de forma racional.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido uma das técnicas mais utilizadas para a separação de enantiômeros e apresenta-se como uma técnica útil e prática para análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos, onde se torna possível à determinação de purezas enantioméricas em preparações farmacêuticas<sup>64</sup> e também no controle de qualidade de medicamentos.<sup>67</sup>

O uso de colunas com fases estacionárias quirais apresentam várias vantagens para a separação de enantiômeros, dentre elas: não é necessária a derivação preliminar da mistura racêmica; há uma grande variedade de colunas quirais disponíveis comercialmente; as análises cromatográficas são rápidas e os enantiômeros puros podem ser recuperados com relativa facilidade. Embora essas fases estacionárias apresentem um elevado custo e o mecanismo de separação quiral ainda não seja completamente elucidado para todas as fases quirais, este é o método de separação de enantiômeros que tem conseguido maior destaque e aplicabilidade na separação de enantiômeros.<sup>68</sup>

### 1.8.1. Fases Estacionárias Quirais

Nas últimas décadas, inúmeros seletores quirais foram desenvolvidos para verificar suas habilidades na resolução quiral, sendo estes empregados em centenas de novas fases estacionárias quirais.<sup>64,69,70</sup> Essas fases estão sendo empregadas nas mais diversas áreas, entre elas: farmacêutica, ambiental e de análises clínicas.<sup>71</sup>

A separação de enantiômeros através de fases estacionárias quirais está baseada na formação de um complexo diastereoisomérico transitório, entre os enantiômeros e o seletor quiral da fase estacionária.<sup>72</sup>

Dentre as fases estacionárias quirais, merecido destaque é dado às fases de polissacarídeos, em função da versatilidade que essas fases apresentam e por demonstrarem excelente discriminação quiral para um extensa gama de compostos.<sup>73-76</sup>

#### 1.8.1.1. Fases Estacionárias Quirais de Polissacarídeos

Os polissacarídeos de maior aplicabilidade como fases estacionárias quirais são a amilose e a celulose, os quais são polímeros que apresentam atividades ópticas e são encontrados abundantemente na natureza, mas *in natura* apresentam limitada capacidade de resolução quiral, propriedades mecânicas fracas, além de serem altamente polares.<sup>64,68,72</sup>

Entretanto, são facilmente convertidos a uma variedade de derivados como *tris*(benzoatos) e *tris*(fenilcarbamatos), criando novos sítios para reconhecimento quiral, melhorando assim as suas propriedades enantiosseletivas.<sup>73,69,70</sup>

Estudos realizados para investigação do mecanismo de discriminação quiral em fases estacionárias de polissacarídeos sugerem que derivados de celulose e amilose apresentam estruturas helicoidais com os grupos carbamatos e benzoatos, localizados no seu interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente. A resolução das misturas racêmicas

está vinculada ao ajuste dos enantiômeros nas cavidades do polissacarídeo e da interação com os grupos carbamatos e benzoatos.<sup>64,73,77,69,70</sup>

As fases de polissacarídeos, apesar de terem sido originalmente desenvolvidas para serem usadas no modo normal, também possuem poder de resolução no modo reverso de eluição. No entanto, nem sempre esses dois modos de eluição são eficazes para obter a separação desejada tendo como alternativa o modo polar orgânico. O modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis contendo 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, 2-propanol ou a misturas desses solventes.<sup>64,78-80</sup>

Embora a DAICEL, uma das fabricantes de colunas baseadas em derivados de polissacarídeos, recomende colunas específicas para cada modo de eluição, CASS *et al.*<sup>81</sup> demonstraram que uma mesma coluna quiral, *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, a qual foi avaliada em eluição multimodal, ou seja, nos três modos de eluição, normal, reverso e polar orgânico, não perdeu performance de separação em nenhum dos modos avaliados.

Essa versatilidade quanto ao modo de eluição vem suprir a restrição quanto ao uso de solventes, uma vez que as fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos são recobertas em sílica por meio de adsorção física e esses derivados são solúveis em solventes como acetato de etila, tetraidrofurano e organo clorados, os quais não são recomendados como fases móveis para estas fases quirais.

Porém, alguns autores desenvolveram fases quirais de polissacarídeos mais estáveis, através da imobilização química do seletor quiral. Segundo uma revisão de ALI *et al.*<sup>82</sup>, o desenvolvimento de fases estacionárias quirais imobilizadas quimicamente, possibilitam o uso de uma variedade de solventes, sendo esta a principal vantagem destas fases.

Os dois tipos de fases quirais preparadas por adsorção e modificadas quimicamente são complementares umas das outras e alguns

racematos podem ser somente resolvidos nas FEQs adsorvidas enquanto outros são melhores resolvidos nas fases imobilizadas.<sup>82</sup>

Portanto, as FEQs baseadas em polissacarídeos apresentam grande versatilidade e aplicabilidade, com alto poder de discriminação quiral e reprodutibilidade, tanto em escala analítica<sup>67</sup> quanto preparativa.<sup>80</sup> Estas fases também são muito populares, pois podem enantiorresolver aproximadamente 95% dos racematos com sucesso,<sup>83</sup> sendo, desta forma, selecionadas para a realização deste trabalho

### **1.9. CROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONAL**

Cada vez mais há a exigência de se analisar fármacos, protótipos a fármacos e seus metabólitos, em amostras biológicas, devido a necessidade de se entender e avaliar os efeitos terapêuticos e tóxicos destes compostos, assim como, suas interações em co-administrações e sua farmacocinética.<sup>84</sup>

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) apresenta destaque por permitir o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e seletivos, com as mais variadas matrizes biológicas.

No entanto, apesar dos avanços no desenvolvimento e aprimoramento da técnica cromatográfica, através da maior eficiência nas análises, decorrente das novas tecnologias em colunas analíticas e com o aprimoramento da seletividade dos métodos, através do acoplamento do sistema cromatográfico a sistemas de espectrometria de massas, o pré-tratamento de amostras ainda é necessário, para a extração do analito de interesse à partir da matriz biológica, com altos níveis de recuperação e, principalmente, para produzir amostras livres de potenciais interferentes.

Os procedimentos mais usuais e rotineiramente empregados de preparo das amostras biológicas são as técnicas de precipitação de proteínas, as extrações líquido-líquido e extrações em fase sólida.<sup>72,85</sup> No entanto, a etapa de

pré-tratamento de amostras biológicas é, sem dúvida, a etapa mais crítica e trabalhosa durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos de análise.

Com isso, numerosos esforços têm sido realizados com o intuito de diminuir o tempo gasto com o pré-tratamento das amostras e isso tem favorecido o desenvolvimento de sistemas automatizados, os quais envolvem a injeção direta de amostras biológicas no sistema de CLAE.<sup>85-90</sup> Como exemplo, pode-se citar o emprego de sistemas automatizado de extração em fase sólida (SPE) *on line*.<sup>91,92</sup>

Dentro deste contexto, têm se destacado o uso de colunas contendo fases de acesso restrito (RAM-BSA) (do inglês: *restricted access media bovine serum albumin*), ou seja, fases que permitem injeções diretas e repetitivas de biofluidos no sistema de CLAE.<sup>72</sup>

O princípio fundamental das fases de acesso restrito é a presença de uma superfície hidrofílica que possibilita excluir as macromoléculas no volume morto da coluna, sem acumulação destrutiva, e a interação das micromoléculas aos sítios hidrofóbicos sendo retidas e separadas. Essas colunas, portanto, combinam os princípios da cromatografia de exclusão e de fase reversa, para produzir uma Cromatografia de Superfície Discriminante.<sup>85</sup>

O emprego das colunas RAM-BSA acopladas *on line* às colunas analíticas em um sistema cromatográfico define a terminologia: cromatografia líquida multidimensional de alta eficiência, onde a primeira coluna atua como coluna extratora e após a eluição das macromoléculas da matriz, os analitos de interesse são transferidos para a segunda coluna, analítica, através de uma válvula, sendo os compostos separados e analisados.<sup>85</sup>

Assim, no presente trabalho, o uso da cromatografia líquida multidimensional, com emprego de colunas de acesso restrito (RAM-BSA) acopladas a colunas cromatográficas quiral ou aquiral, foi explorada para conduzir o estudo *in vitro* do metabolismo do albendazol em frações

microsomais, obtidas a partir de ratos controles e ratos submetidos a uma alimentação com restrição proteica.

Os Resultados e Discussões deste trabalho estão divididos em três capítulos, para melhor detalhamento e discussão dos resultados.

# ***OBJETIVOS***



## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Avaliação da influência da restrição proteica no metabolismo do albendazol através do emprego de frações microssomais e análise por Cromatografia Líquida Multidimensional de Alta Eficiência;
- Estudos de inibição do crescimento de células tumorais humanas com emprego dos enantiômeros puros do albendazol sulfóxido;

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições de extração e preparo de frações microssomais a partir de fígados de ratos Wistar;
- Determinar a concentração proteica das frações microssomais obtidas empregando método espectrofotométrico;
- Avaliar a estabilidade das frações microssomais através da medida da atividade enzimática;
- Estabelecer e otimizar as condições ótimas de incubação para a metabolização *in vitro* do albendazol utilizando planejamento fatorial; para análise dos metabólitos do albendazol em frações microssomais;
- Desenvolver e validar um método cromatográfico multidimensional para a análise dos metabólitos do albendazol em frações microssomais;
- Aplicação do método cromatográfico desenvolvido para a investigação do efeito da restrição proteica no metabolismo do albendazol,

utilizando ensaios *in vitro* com frações microssomais obtidas a partir de fígados de ratos controles e de ratos submetidos a uma alimentação com restrição de proteína;

- Preparar colunas quirais de polissacarídeos;
- Avaliar as melhores condições cromatográficas para separação dos enantiômeros do albendazol sulfóxido;
- Separação em escala semipreparativa dos enantiômeros do albendazol sulfóxido;
- Ensaio *in vitro* da inibição do crescimento de células tumorais humanas: melanoma, câncer de pulmão e câncer de mama.

*PARTE*  
*EXPERIMENTAL*



### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. GENERALIDADES**

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, composto por duas bombas LC 10-ATvp, válvula seletora de solvente FCV-10ALvp, degaseificador de membrana SHIMADZU DGU-14A, detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SPD-10Avp, detector de fluorescência RF10Ax1, auto-injetor SIL10-ADvp, forno CTO10Svp e válvula de três caminhos VALCO NITRONIC 7000 para o acoplamento das colunas. O equipamento apresentava-se acoplado a uma interface SCL-10Avp e os cromatogramas foram registrados através de um software CLASS-VP.

A separação semipreparativa foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, composto de uma bomba modelo LC-6AD acoplada a um detector de ultravioleta, de comprimento de onda variável, SPD-10AV, injetor manual RHEODYNE 7725i com alça dosadora de 500 µL. O equipamento apresentava-se ligado a uma interface CBM SCL-10A e os cromatogramas foram registrados através de um *software* CLASS LC-10.

Uma empacotadora SHANDON foi empregada para empacotar as fases estacionárias.

As medidas de absorção molecular, na região do UV-visível, foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro HP 8452 e um JASCO V-630, com uma cela de vidro ou quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Os fígados foram homogeneizados com um homogeneizador IKA, modelo ULTRA-TURRAX T10.

As etapas de centrifugação foram realizadas em uma centrífuga JOUAN B4i/BR4i e uma ultracentrífuga BECKMAN Optima™ modelo LE-

80K. A etapa de ultracentrifugação foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, do Instituto de Química, da Universidade de Estadual Paulista (UNESP), Campus Araraquara.

As incubações foram realizadas em um banho-maria com agitação NOVA ÉTICA, modelo DUBNOFF 304-DE.

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram todos grau HPLC (MALLINCKRODT, J. T. BAKER, TEDIA). Os solventes e soluções tampão utilizados no preparo das fases móveis foram filtrados, a vácuo, em um sistema MILLIPORE, utilizando-se membranas de nylon MILLIPORE de 0,45  $\mu\text{m}$  e, posteriormente, degaseificados em ultrassom BRANSONIC modelo 1510R.

Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada balança analítica AND, modelo HR200, com precisão de  $\pm 0,1$  mg.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, QUALXTRON, modelo 8010, com precisão de  $\pm 0,01$  unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampão pH 4,00 e 7,00 (CHEMIS).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON ou EPPENDORF.

Para a avaliação das colunas quirais empregadas neste trabalho foram utilizados os padrões racêmicos: base de Tröger, óxido de *trans*-estilbeno e 1-(9-antril)-2,2,2-trifluor – etanol, todos ALDRICH

Os tempos mortos das colunas ( $t_0$ ) foram determinados com 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (ACROS) quando a eluição foi no modo normal e acetonitrila no modo reverso de eluição.

Os parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar a enantiosseletividade foram:

$$k_1=(t_1-t_0)/t_0; k_2=(t_2-t_0)/t_0; \alpha=k_2/k_1; R_s=1,18(t_2-t_1)/(w_{1/2}^1+w_{1/2}^2)$$

Onde:  $t_0$  é o tempo morto da coluna,  $t_1$  e  $t_2$  representam os tempos de retenção,  $k_1$  e  $k_2$  são os fatores de retenção,  $w_{1/2}^1$  e  $w_{1/2}^2$  são as larguras da primeira e segunda banda cromatográfica medidas a meia altura,  $\alpha$  é o fator de separação e  $R_s$  é o fator de resolução.

O sinal de rotação óptica dos enantiômeros do albendazol sulfóxido foi determinado através de um polarímetro PERKIN ELMER 241

As análises elementares foram realizadas no DQ-UFSCar, utilizando-se um equipamento FISIONS EA 1108.

Os espectros no infravermelho foram realizados em um espectrofotômetro BOMEN-MICHELSON FT-IR, modelo Power Male 1 – Ultrasync.

A peneira usada para a uniformização e homogeneização das fases estacionárias quirais sintetizadas foi ENDECOTT SBS 410/1986 (995308) com orifícios de 38  $\mu\text{m}$ .

As leituras das placas de 96 poços foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas da BIOTEK'S, modelo Power Wave XS.

As colunas analíticas utilizadas foram:

- C18 Nucleosil (120Å, 5 $\mu\text{m}$ ), 15 x 0,46 cm d.i.
- C18 Luna (120Å, 10  $\mu\text{m}$ ), 10 x 0,46 cm d.i
- CIANO Nucleosil (10 $\mu\text{m}$ ), 15 x 0,46 cm d.i.
- HEXILFENIL Luna (10 $\mu\text{m}$ ), 15 x 0,46 cm d.i.
- FENIL Hypersil (5 $\mu\text{m}$ ), 15 x 0,46 cm d.i.

Os demais reagentes químicos utilizados foram de diferentes marcas:

- Albumina sérica bovina (fraction V powder minimun 98%), 7-etoxiresorufina, resorufina, fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF),  $\beta$ -

nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzido (NADPH) e ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES), ácido tricloroacético, sulforrodamina B, *tris*(hidroximetil)aminometano, doxorrubicina, RPMI 1640, azul de tripano e amilose Tipo III foram comerciais da SIGMA;

- Fosfato de potássio monobásico e dibásico, ácido fosfórico 85% e *tris*(hidroximetil) aminometano da J.T. BAKER
- Sacarose, cloreto de magnésio, corante Comassie Brilliant Blue da MALLINCKRODT;
- Albendazol sulfóxido e albendazol sulfona foram obtidos no laboratório a partir de síntese<sup>93</sup>;
- Albendazol-2-amino-sulfona 98%, LAN AESER
- 3,5-dimetilfenil isocianato e 3-aminopropiltriétoxissilano foram comerciais ACROS;
- Sílica Nucleosil MACHEREY-NAGEL (500Å, 7µm);
- Ácido acético glacial foi comercial Riedel-de Haën
- Tampão fosfato salino (PBS), utilizado nos ensaios de inibição do crescimento celular, foi comercial FLUKA

## **3.2. PREPARO DAS COLUNAS RAM-BSA**

### **3.2.1. Sílicas Utilizadas**

As sílicas utilizadas no empacotamento das colunas foram: octilsílica LUNA (100 Å, 10 µm), octadecilsílica LUNA (100 Å, 10 µm), fenil sílica HYPERSIL (120 Å, 5 µm) e ciano sílica NUCLEOSIL (100 Å, 10 µm).

### **3.2.2. Empacotamento das Colunas**

A sílica de fase hidrofóbica (1,3 g) foi suspensa em 50 mL de metanol, homogeneizada no ultrassom durante 3 minutos e empacotada em uma coluna de aço inoxidável (5,0 x 0,46 cm d.i.). As colunas foram condicionadas em metanol durante aproximadamente 12 horas a uma vazão de 1,0 mL/min.

### **3.2.3. Imobilização das Fases Hidrofóbicas com BSA<sup>94,95</sup>**

Após o empacotamento das fases hidrofóbicas e condicionamento das colunas, estas foram eluídas, a uma vazão de 1,0 mL/min, com solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 mol/L; pH 6,0) durante 20 minutos, solução de albumina sérica bovina 1,0 mg/mL preparada em solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 mol/L; pH 6,0), durante 30 minutos, água por 20 minutos e em seguida eluiu-se três frações de 7 mL de glutaraldeído a 25% (v/v). Após um repouso de 12 horas, uma solução de boroidreto de sódio 1,0 g/mL foi eluída pela coluna até obtenção de um eluente com valor de pH 10. Após mais 2 horas em repouso, a fase estacionária foi lavada com água durante 30 minutos e guardada em geladeira.

## **3.3. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXCLUSÃO DAS PROTEÍNAS MICROSSOMAS PELAS COLUNAS RAM-BSA**

### **3.3.1. Determinação de Proteínas Totais em Frações Microssomais – Método de Bradford<sup>96</sup>**

#### **3.3.1.1. Preparo do Reagente de Bradford**

A solução do corante azul brilhante, *Coomassie Brilliant Blue*, foi preparada na concentração de 100 mg/mL, segundo o procedimento descrito por Bradford<sup>96</sup>. Em um béquer, dissolveu-se 50,0 mg do corante azul brilhante em 25 mL de etanol e a seguir acrescentou-se 50 mL de ácido fosfórico (85 % P.A.). Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o

volume com água. A solução do corante foi estocada em um frasco de vidro âmbar.

### **3.3.1.2. Preparo das Amostras**

Após o condicionamento da coluna RAM com água a 1,0 mL/min durante 30 minutos, injetou-se 50  $\mu$ L de microsossoma, concentração proteica de 3,8 mg/mL, elui-se com água e coletou-se a primeira e a segunda fração de 5 minutos separadamente, em dois balões volumétricos. Em seguida, a coluna foi eluída com ACN/ÁGUA/ISO (75/15/10) por 5 minutos a 1,0 mL/min, para a limpeza da coluna e, posteriormente, condicionada com água por 10 minutos.

Este procedimento foi repetido para os volumes de 100 e 200  $\mu$ L, em triplicata para todos os volumes de injeção. As frações coletadas foram transferidas para frascos de vidro âmbar e submetidas a medidas espectrofotométricas.

As soluções de referência foram preparadas adicionando-se volumes de 50, 100 e 200  $\mu$ L de microsossomas, em balão volumétrico de 5,00 mL e completando-se o volume com água. As soluções de referência não foram eluídas pelas colunas RAM-BSA e representaram 100% das proteínas presentes nos microsossomas.

### **3.3.1.3. Medidas Espectrofotométricas das Amostras**

Pipetou-se 500  $\mu$ L da fração eluída da coluna, adicionou-se 5,0 mL da solução do reagente de Bradford, e com constante agitação, deixou reagir por 3 minutos. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para uma cubeta de vidro e registrou-se o espectro na região de 190 a 820 nm. Atenção foi dada ao comprimento de onda 595 nm, relativo à máxima absorbância do complexo proteína–corante. As absorbâncias foram medidas contra um branco de água.

O mesmo procedimento foi repetido para todas as frações coletadas, bem como para as soluções de referência.

### **3.4. ESTUDO DE METABOLISMO**

#### **3.4.1. Solução de PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil)**

A solução foi preparada pesando-se 23,3 mg do composto PMSF (334,4 mmol/L) e diluindo-se em 400  $\mu$ L de etanol.

#### **3.4.2. Preparo do Tampão Fosfato com Sacarose e PMSF**

O tampão foi preparado pesando-se 1,36 g do sal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mmol/L), 1,74 g do sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10 mmol/L), 85,6 g de sacarose (250 mmol/L) e 400  $\mu$ L da solução de PMSF preparada na seção 3.4.1 (0,134 mmol/L) e solubilizando-o em um volume de 1 L de água deionizada.

#### **3.4.3. Preparo do Tampão Fosfato Monobásico**

O tampão foi preparado pesando-se 1,36 g do sal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 mmol/L) e solubilizando-o em um volume de 100 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 6,6 e 8,2 com uma solução de KOH 3,0 mol/L.

#### **3.4.4. Preparo do Tampão *Tris*-HCl**

A solução do tampão *tris*-HCl foi preparada pesando-se 0,303 g (100 mmol/L) do sal *tris* e solubilizando-se em um volume total de 25 mL de água deionizada. A solução tampão preparada foi ajustada para o valor de pH 6,6 e 8,2 com adição de HCl 10%.

#### **3.4.5. Preparo do Tampão HEPES com Cloreto de Magnésio**

O tampão foi preparado pesando-se 1,19 g do sal HEPES (100 mmol/L) e 50,8 mg do sal  $\text{MgCl}_2$  solubilizando-os em um volume de 50 mL de

água deionizada. O pH foi ajustado para 7,8 com uma solução de NaOH 1,0 mol/L.

#### **3.4.6. Preparo das Soluções de Cloreto de Cálcio**

A solução de cloreto de cálcio foi preparada pesando-se 2,95 g do sal (40 mmol/L) e solubilizando-o em um volume de 500 mL de água deionizada.

Para o preparo da solução de 10 mmol/L foi primeiramente preparada uma solução de 100 mmol/L pesando-se 2,03 g do sal e solubilizando-o em um volume de 100 mL de água deionizada. Posteriormente uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi diluída em balão volumétrico de 10,0 mL com água deionizada.

#### **3.4.7. Preparo das Soluções de NADPH ( $\beta$ -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzido)**

A solução foi preparada pesando-se 2,1 mg do composto NADPH (5 mmol/L) e solubilizando em 500  $\mu$ L de tampão HEPES (100 mmol/L; pH 7,8 com 5mmol  $MgCl_2$ ). A solução de 15 mmol/L foi preparada solubilizando 12,8 mg de NADPH em 1000  $\mu$ L do tampão  $KH_2PO_4$  com sacarose e PMSF.

#### **3.4.8. Animais**

Os animais utilizados foram ratos Wistar, de 6-8 semanas. Os animais foram mantidos em sala apropriada, livre de patógenos, ar limpo, suplemento de água (*ad libitum*), temperatura controlada de 20-23°C, umidade relativa de aproximadamente 50% e ciclos de luz e escuridão de 12h. Estes animais foram mantidos no Laboratório de Neuroendocrinologia, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de São Carlos, laboratório o qual também realizou a extração do órgão (fígado).

### **3.4.9. Extração das Frações Microssomais por Ultracentrifugação**

Os fígados foram degelados e submetidos à extração microssomal onde, primeiramente, foram picados e homogeneizados através do emprego de um homogeneizador mecânico, em meio à solução tampão gelada, na proporção 1g de fígado/5 mL tampão fosfato com sacarose e PMSF. As frações microssomais foram obtidas por centrifugação diferenciada, onde o homogeneizado do tecido foi centrifugado por 5 min a 600g. Os sobrenadantes obtidos foram centrifugados novamente por mais 10 min a 6.500g. O novo sobrenadante foi novamente centrifugado por mais 20 min a 12.000g e este último sobrenadante foi ultracentrifugado por 60 min a 120.000g. O precipitado foi ressuspensão no tampão fosfato com sacarose e PMSF. A concentração proteica das frações microssomais foi determinada segundo método de Bradford<sup>96</sup>.

### **3.4.10. Extração das Frações Microssomais por Agregação com Cálcio**

Os fígados foram degelados e submetidos à extração microssomal onde, primeiramente, estes foram picados e homogeneizados através do emprego de um homogeneizador mecânico, em meio à solução tampão gelada, na proporção 1g de fígado/5 mL de tampão fosfato com sacarose e PMSF. O homogeneizado do tecido foi centrifugado por 5 min a 600g. O sobrenadante foi coletado e centrifugado por 10 min a 6.500g. Coletou-se o sobrenadante e centrifugou-se por 20 min a 12.000g e ao novo sobrenadante obtido foi adicionado 4 volumes de solução de cloreto de cálcio 40 mmol/L. A mistura resultante foi deixada em repouso em banho de gelo por 10 min. Após esse período, a mistura foi centrifugada por 15 min a 12.000 g, isolando-se as frações microssomais. O precipitado foi ressuspensão no tampão fosfato com sacarose e PMSF.

A concentração proteica das frações microssomais obtidas foram determinadas segundo método de Bradford.<sup>96</sup>

#### **3.4.11. Preparo da Solução Padrão de BSA**

Preparou-se uma solução padrão de BSA em água na concentração de 1,0 mg/mL. Em seguida, transferiu-se uma alíquota desta solução para uma cubeta de quartzo e fez-se a leitura em 280 nm, relativo à máxima absorbância da BSA e, então, ajustou a absorbância da solução para 0,66.<sup>97</sup>

#### **3.4.12. Preparo das Soluções de BSA<sup>96</sup>**

Soluções de calibração nas concentrações de 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0 e 1000 µg/mL foram preparadas através de alíquotas de 10-100 µL da solução padrão de BSA, que foram pipetadas em tubos de ensaio e diluídas com água para um volume final de 100 µL, com exceção da última alíquota que não precisou ser diluída.

#### **3.4.13. Preparo do Reagente de Bradford**

O preparo do reagente de Bradford, utilizado para as medidas de determinação da concentração proteica das frações microssomais, foi o mesmo já descrito na seção 3.3.1.1, p.39 para uso no estudo de exclusão proteica das fases de acesso restrito.

#### **3.4.14. Medidas Espectrofotométricas das Amostras**

Adicionou-se 5,0 mL da solução do reagente de Bradford às soluções BSA acima preparadas (100 µL), agitou-se as soluções em um vórtex por 5s e deixou reagir por 7 minutos. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para uma cubeta de vidro e registrou-se o espectro na região de 190 a 820 nm. Atenção foi dada ao comprimento de onda 595 nm, relativo à máxima

absorbância do complexo proteína–corante. As absorbâncias foram medidas contra um branco de corante.

O mesmo procedimento foi repetido para todas as amostras padrão em triplicata, bem como para as amostras de concentração desconhecida.

As amostras de concentração desconhecidas foram submetidas a uma diluição prévia para que pudessem ser quantificadas na curva de calibração preparada, de modo geral, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um balão de 5,0 mL e o volume completado com água.

### **3.5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA RESORUFINA NA PRESENÇA DE 7-ETOXIRESORUFINA**

#### **3.5.1. Inativação das Frações Microssomais**

Para a validação do método foram utilizados microssomas inativos. Estes foram inativados em um banho termostaticado a 55°C por 5 minutos antes de ser utilizado no método.

#### **3.5.2. Preparo das Soluções Padrão da Resorufina e 7-Etoxiresorufina**

Foi preparada uma solução estoque da resorufina em metanol na concentração de 1,0 mmol/L, através da dissolução de 2,3 mg em balão volumétrico de 10,0 mL.

A partir desta solução, foram obtidas, por diluição, duas soluções estoque de concentrações: (1) 5,0 µmol/L e (2) 100 µmol/L. As soluções padrão de calibração e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas por diluição das soluções estoque (1) e (2). Onde a solução estoque (1) foi utilizada para preparar as soluções padrão de calibração e de controle de qualidade nas concentrações mais baixas e a solução estoque (2) foi utilizada para preparar as

soluções padrão de calibração e de controle de qualidade nas concentrações mais altas.

Solução padrão de calibração: 0,200; 0,400; 0,800; 1,60; 3,20; 6,40 12,8 e 25,6  $\mu\text{mol/L}$  para a resorufina.

Solução padrão de controle de qualidade: 0,2400; 10,24 e 20,48  $\mu\text{mol/L}$  para a resorufina.

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados da seguinte forma:

1- O controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação ao ponto de menor concentração da curva de calibração.

2- O controle de qualidade de concentração média em torno de 40-60%, em relação ao ponto de maior concentração da curva de calibração.

3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação ao ponto de mais alta concentração da curva de calibração.

### **3.5.3. Preparo das Amostras de Calibração e Controle de Qualidade**

Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  da solução padrão apropriada de resorufina foram pipetadas em tubos para centrifugação (10,0 mL), juntamente com 350  $\mu\text{L}$  de tampão HEPES (100 mM; pH 7,8 com 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ), 25  $\mu\text{L}$  da solução de etoxiresorufina (0,1 mmol/L), 25  $\mu\text{L}$  da solução de NADPH (5,0 mmol/L) e 50  $\mu\text{L}$  de microsomas inativo (2,0 mg/mL de concentração proteica) e homogeneizada. Em seguida as amostras foram precipitadas com 400  $\mu\text{L}$  de metanol gelado e permaneceram em um banho de gelo por 15 min. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 minutos, a 4°C.

Alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidas para os *vials* do autoinjeter, tendo sido injetado um volume de 50  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico.

Na sequência, injetaram-se amostras livre da presença da resorufina, o que caracterizava o branco do método, cujo preparo foi similar ao anteriormente descrito.

#### **3.5.4. Obtenção das Curvas Analíticas**

As amostras de calibração foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 0,0200; 0,0400; 0,0800; 0,160; 0,320; 0,640; 1,28; 2,56  $\mu\text{mol/L}$  para a resorufina e concentração fixa de etoxiresorufina 0,1  $\text{mmol/L}$ .

As curvas de calibração foram obtidas através de regressão linear, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração dos compostos. Foi considerado um mínimo de seis diferentes concentrações para a curva de calibração. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação linear.

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas para obtenção da curva analítica:

Coluna: C18 Luna (10 x 0,46 cm)

Fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10  $\text{mmol/L}$ ; pH 2,5)/MeOH (50:50)

Temperatura: 35°C

Vazão: 1,0  $\text{mL/min}$ ;

Excitação: 530 nm e Emissão: 582 nm

### **3.6. PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO EM BIOFLUIDOS<sup>98,99</sup>**

#### **3.6.1. Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada através de amostras de frações microssomais isenta do analito de interesse. Estas foram preparadas da mesma maneira como descritas no item 3.5.3, p.46 exceto que se fez a

substituição da solução padrão de resorufina por igual volume de tampão HEPES (100 mmol/L; pH 7,8 com 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>).

### **3.6.2. Recuperação**

A eficiência de extração dos analitos da matriz biológica foi avaliada utilizando-se as soluções de controle de qualidade, em replicatas (n=5).

Calcularam-se o percentual de recuperação por comparação dos resultados obtidos das análises das amostras controle, preparadas em frações microssomais, com os resultados provenientes da fortificação do sobrenadante obtido da extração de frações microssomais brancas.

### **3.6.3. Precisão e Exatidão**

A precisão intradia e interdia e a exatidão foram avaliadas em três dias não consecutivos, utilizando-se as amostras controle de qualidade do método, as quais foram preparadas em replicata (n=5) em frações microssomais. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e foi expressa em porcentagem.

A exatidão do método foi também avaliada através do teste cego, onde foram preparadas, em triplicata, e analisadas, uma amostra de concentração desconhecida ao analista.

Os critérios de aceitação para precisão e exatidão são valores de desvios menores que 15%.

### **3.6.4. Limite de Quantificação (LQ) e Detecção (LD)**

O LQ foi estabelecido como a menor concentração, cuja precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV), não excedeu o valor de 20 % (n = 5)

e a exatidão (%) apresentou desvios não superiores a 20% do valor nominal da concentração.

O LD foi estabelecido como a menor concentração que apresentou um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

### **3.7. MEDIDA DE ATIVIDADE DAS FRAÇÕES MICROSSOMAS EXTRAÍDAS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO E POR AGREGAÇÃO DE CÁLCIO**

#### **3.7.1. Incubação *in vitro***

Os ensaios *in vitro* para medida da atividade enzimática das diferentes frações microssomais obtidas foram realizados em tubos de centrifugação de 2,0 mL onde adicionou-se 400 µL da solução de tampão HEPES (100 mmol/L; pH 7,8; contendo 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>). Na sequência, adicionou-se 50 µL da fração microssomal (10 mg/mL) e posteriormente 25µL da solução de 7-etoxiresorufina (0,1 mmol/L). A mistura foi pré-incubada por 1 min a 37°C. Passados esse tempo, adicionou-se 25 µL da solução de NADPH (5,0 mmol/L) e deixou a mistura em constante agitação à temperatura de 37°C por 5 min. Cessou-se a reação com adição de 400 µL de metanol gelado. Deixou-se em repouso em um banho de gelo por 15 min e posteriormente realizou-se a centrifugação a 10.000 g por 15 min. Injetou-se 50 µL do sobrenadante no sistema cromatográfico.

A medida de atividade enzimática foi acompanhada para as frações microssomais obtidas pelos dois métodos por um período de 90 dias.

#### **3.7.2. Cálculo da Atividade Enzimática**

A atividade enzimática foi calculada dividindo-se a concentração encontrada para o analito pelo tempo de incubação e posteriormente pela quantidade de proteína utilizada.

### **3.8. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA METABÓLITOS DO ALBENDAZOL**

#### **3.8.1. Inativação das Frações Microssomais**

Procedimento descrito na Seção 3.5.1, p.45

#### **3.8.2. Preparo das Soluções Padrão do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, ABZ-SO<sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO**

Foram preparadas, individualmente, três soluções estoque em metanol na concentração de 12,5 mmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 6,73 mmol/L para ABZ-SO<sub>2</sub> e de 5,00 mmol/L para o (±)-ABZ-SO, através da dissolução de 3,0 mg; 2,0 mg e 1,4 mg, respectivamente, em balões volumétricos de 1,0 mL.

A partir destas três soluções, foram obtidas por diluição, duas soluções estoque com os compostos combinados nas concentrações: (1) 1,25 µmol/L para ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 0,625 µmol/L para ABZ-SO<sub>2</sub> e de 50,0 µmol/L para o (±)-ABZ-SO; (2) 8,00 µmol/L para ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 4,00 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub> e de 320 µg/mL para (±)-ABZ-SO. As soluções padrão de calibração e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas por diluição das soluções estoque (1) e (2). Onde a solução estoque (1) foi utilizada para preparar as soluções padrão de calibração e de controle de qualidade nas concentrações mais baixas e a solução estoque (2) foi utilizada para preparar as soluções padrão de calibração e de controle de qualidade nas concentrações mais altas.

Solução padrão de calibração: 50,00; 100,0; 150; 200,0; 300,0; 400,nmol/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0; 800,0; 1600 para o ABZ-SO<sub>2</sub> e de 2000; 4000; 6000; 8000; 12000 e 16000 nmol/mL para o (±)-ABZ-SO.

Solução padrão de controle de qualidade: 60,00; 180,0 e 360,0 nmol/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 120,00; 720,00 e 14400 nmol/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>; 2400,0; 7200,0 e 14400 nmol/mL para o (±)-ABZ-SO

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados da seguinte forma:

1- O controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação ao ponto de menor concentração da curva de calibração.

2- O controle de qualidade de concentração média em torno de 40-60%, em relação ao ponto de maior concentração da curva de calibração.

3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação ao ponto de mais alta concentração da curva de calibração.

### **3.8.3. Preparo das Amostras de Calibração e Controle de Qualidade**

Em tubos para centrifugação (2,0 mL) adicionou-se: 400 $\mu$ L do tampão fosfato com sacarose e PMSF, 50 $\mu$ L da fração microssomal (10,0 mg/mL) e 50  $\mu$ L da solução padrão apropriada e homogeneizou-se em vórtex por 5s. Em seguida, as amostras foram precipitadas com 400  $\mu$ L de acetonitrila gelada, para cessar a reação enzimática e agitadas em vórtex por 10 s. As amostras permaneceram em repouso em um banho de gelo por 15 min e posteriormente foram centrifugadas a 10.000g por 15 min, a 4°C.

Aliquotas de 400  $\mu$ L foram transferidas para os *vials* do autoinjeter, tendo sido injetado um volume de 350  $\mu$ L no sistema cromatográfico multidimensional.

Na sequência, injetaram-se amostras de frações microssomais, livres da presença dos compostos avaliados, o que caracterizava o branco das frações microssomais, cujo preparo foi similar ao anteriormente descrito.

### **3.8.4. Obtenção das Curvas Analíticas**

As amostras de calibração foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 5,000; 10,00; 15,00; 20,00; 30,00 e 40,00 nmol/L para

o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 10,00; 20,00; 30,00; 40,00; 80,00 e 160,0 nmol/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub> e de 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1200,0 e 1600,0 nmol/mL para o (±)-ABZ-SO.

As curvas de calibração foram obtidas através de regressão linear, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração dos compostos. Foi considerado um mínimo de seis diferentes concentrações em cada curva de calibração. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas para obtenção das curvas analíticas: Temperatura de 30°C

**Bomba 1:**

**0,00-5,00 min:** fase móvel: 100% tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5) [exclusão das proteínas pela coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.)]; vazão de 1,0 mL/min

**5,01-14,00 min:** fase móvel: tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) (extração e transferência dos compostos da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 0,5 mL/min

**8,00-14,00 min:** fase móvel: tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) [acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA e coluna analítica]; vazão de 0,5 mL/min

**14,01-25,00 min:** fase móvel: ACN: tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5) (75:25 v/v) (limpeza da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 1,0 mL/min

**25,01-35,00 min:** fase móvel: tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5) (condicionamento da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 1,0 mL/min

**Bomba 2: vazão de 0,5 mL/min;**

**0,00-8,00 min:** fase móvel: tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) [condicionamento da coluna analítica *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15 x 0,46 cm d.i.)];

**8,00-14,00 min:** fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) (acoplamento das colunas RAM- $\text{C}_8$ -BSA e coluna analítica);

**14,01-35,00 min:** fase móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40 v/v) (análise do ABZ- $\text{SO}_2$ - $\text{NH}_2$ , ABZ- $\text{SO}_2$  e ( $\pm$ )-ABZ-SO na coluna analítica), detecção por fluorescência, com excitação: 290 nm e emissão: 320 nm

### 3.9. PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

Para o planejamento fatorial foram realizados 16 experimentos, de forma aleatória, onde foram estudadas oito variáveis em dois níveis, sendo estas: [Proteica]: 2,0 e 10,0 mg/mL; [ $\text{MgCl}_2$ ]: 2,5 e 10 mmol/L; [ABZ]: 50 e 500  $\mu\text{mol/L}$ ; [NADPH]: 3,00 e 15,0 mg/mL; tempo de incubação: 30 e 180 min; tampão: fosfato e *tris*; [tampão]: 10 e 100 mmol/L e pH 6,6 e 8,2.

#### 3.9.1. Incubação *in vitro* Realizada no Planejamento

Os ensaios *in vitro* foram realizados em tubos de centrifugação de 2,0 mL onde se adicionou 375  $\mu\text{L}$  da solução de tampão e 25  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{MgCl}_2$ . Na sequência, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da fração microssomal e posteriormente 25  $\mu\text{L}$  da solução de albendazol. A mistura foi pré-incubada por 3 min a 37°C. Passado esse tempo, adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  da solução de NADPH e deixou-se a mistura em constante agitação à temperatura de 37°C pelo tempo referente a cada experimento. Cessou-se a reação com adição de 400  $\mu\text{L}$  de acetonitrila gelada. Após a precipitação, deixou-se a mistura em repouso em um banho de gelo por 15 minutos e posteriormente realizou-se uma centrifugação a 10.000 g por 15 min. Injetou-se 350  $\mu\text{L}$  do sobrenadante no sistema cromatográfico.

### **3.10. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA ANÁLISES DO METABOLISMO *IN VITRO* DE RATOS CONTROLE E RATOS COM RESTRIÇÃO PROTEICA**

#### **3.10.1. Animais**

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos, que foram divididos em 2 grupos: grupo controle (n=8) e grupo com restrição proteica (n=8). Os animais foram mantidos em sala apropriada, livre de patógenos, ar limpo e água (*ad libitum*), temperatura controlada de 20-23°C, umidade relativa de aproximadamente 50% e ciclos de luz e escuridão de 12h.

Esses 2 grupos de animais receberam dieta diferenciada por 45 dias, passado esse período foram sacrificados (guilhotinados) e seus respectivos fígados extraídos, pesados, lavados e armazenados a -80° C, individualmente.

Os animais foram tratados e mantidos no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Metodista de Piracicaba.

O trabalho proposto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos.

#### **3.10.2. Dieta**

Os ratos controles receberam uma dieta com 14% em proteína e os ratos com restrição proteica receberam uma dieta com 6% em proteína, segundo valores recomendados pela Associação Americana de Nutrição para roedores.

#### **3.10.3. Metabolismo *in vitro***

As frações microsossomais foram preparadas individualmente para cada rato totalizando n=16 frações microsossomais (8 controles e 8 com restrição proteica).

O procedimento realizado para extração das frações microsossomais foi o de ultracentrifugação e está descrito na seção 3.4.9, p. 43. Posteriormente

foi realizada a determinação proteica para cada fração microsomal (Seção 3.4.14, p. 44).

Os ensaios *in vitro* foram realizados em tubos de centrifugação de 2,0 mL onde se adicionou 375  $\mu$ L da solução de tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 mmol/L; pH 8,2), 25 $\mu$ L da solução de  $\text{MgCl}_2$  (10 mmol/L). Na sequência, adicionou-se 50  $\mu$ L da fração microsomal (10 mg/mL) e posteriormente 25 $\mu$ L da solução de albendazol (0,5 mmol/L). A mistura foi pré-incubada por 3 min a 37°C. Passados esse tempo adicionou-se 25  $\mu$ L da solução de NADPH (15,0 mmol/L) e deixou a mistura em constante agitação à temperatura de 37°C por 180 min. Cessou-se a reação com adição de 400  $\mu$ L de acetonitrila gelado e deixou-se a mistura em repouso em um banho de gelo por 15 min e posteriormente realizou-se a centrifugação a 10.000 g por 15 min. Injetou-se 350  $\mu$ L do sobrenadante no sistema cromatográfico.

#### **3.10.4. Tratamento dos Dados**

Os dados obtidos foram tratados com Teste *t* com múltiplas amostras.<sup>100</sup>

### **3.11. PREPARO DAS FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS**

#### **3.11.1. Síntese da Fase Estacionária Quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de Amilose<sup>73,76</sup>**

Piridina anidra (50 mL) foi adicionada a amilose (1,00 g; 6,17 mmol) previamente seca em estufa a vácuo a 60°C por 24 horas. A mistura reacional foi aquecida a 98°C, sob constante agitação. Depois de 24 horas, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e adicionou-se 3,5-dimetilfenil isocianato (21,6 mmol). A reação permaneceu sob aquecimento e agitação por mais 72 horas à mesma temperatura.

Após o resfriamento da reação à temperatura ambiente, o produto foi precipitado, sob agitação em metanol (300 mL). A mistura foi mantida em agitação durante 1 hora e, então, o produto branco foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com metanol, repetidas vezes, até que não se observasse mais resíduos de piridina.

O carbamato foi seco em dessecador com vácuo, por 72 horas, e caracterizado por análise elementar e infravermelho.

**(A) tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose:  $C_{33}H_{37}O_8N_3$**

**Análise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=65,66; %H=6,18; %N=6,96

Valores Experimentais: %C=65,35; %H=6,15; %N=6,84

**Infravermelho (KBr,  $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3313,5; 1749,3 e 1224,7**

**3.11.2. Derivatização do Suporte 3-Aminopropilsílica (APS)**

Sílica Nucleosil (500 Å, 7 $\mu\text{m}$ ) (20,0 g), previamente seca em estufa a vácuo a 60°C por 24 horas e, depois, mantida sob atmosfera de cloreto de lítio em dessecador por mais 24 horas, foi transferida para um balão, onde tolueno seco (360 mL) foi adicionado. A mistura foi mantida sob atmosfera de  $N_2$ , e adicionou-se 3-aminopropiltriétoxissilano (24 mL, 102 mmol). A mistura reacional permaneceu em agitação e aquecimento a uma temperatura de 120°C, durante 3 horas.

O produto branco formado foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com tolueno (300 mL) e depois com uma mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50 v/v) (250 mL). O produto foi seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72 horas e submetido à análise elementar.

**Análise Elementar:**

Sílica Nucleosil: %C = 0,13; %H = 0; %N = 0,18

Sílica APS-Nucleosil: %C = 1,39; %H = 0,56; %N = 0,61

### **3.11.3. Cobertura do Carbamato ao Suporte APS-Nucleosil**

Sílica (2,0 g) APS-Nucleosil foi transferida para um balão especial para revestimento, com reentrâncias, ao qual foi adicionado tetraidrofurano (50 mL). Refluxou-se a suspensão por meia hora, resfriou-se o sistema à temperatura ambiente e, então, adicionou-se, em pequenas porções, o carbamato (0,5 g) previamente dissolvido em uma mistura de tetraidrofurano:N,N-dimetilacetamida (7:3).

Os solventes foram evaporados muito lentamente em rota evaporador e a fase estacionária obtida foi totalmente seca em bomba a vácuo. Após a secagem, a fase estacionária foi cuidadosamente peneirada, utilizando-se uma peneira especial com orifício de 38  $\mu\text{m}$ , para a uniformização do tamanho das partículas.

### **3.11.4. Empacotamento das Fases Estacionárias**

#### **3.11.4.1. Coluna Analítica**

A fase estacionária quiral (2,2 g) foi empacotada em coluna de aço inoxidável (15,0 x 0,46 mm d.i.) sob pressão de 7500 psi, utilizando-se hexano:isopropanol (90:10 v/v) como solvente. A fase estacionária foi suspensa em 50,0 mL de hexano:isopropanol (50:50 v/v) e agitadas no ultra-som por um período de três minutos.

As colunas foram condicionadas em hexano:isopropanol (95:5 v/v) durante 12 horas, utilizando-se um vazão de 0,5 mL/min e posteriormente avaliadas com os padrões cromatográficos.

### **3.11.4.2. Coluna Semipreparativa**

A cobertura do suporte foi realizada como descrito anteriormente no item 3.11.3, p. 57, utilizando-se 2,0 g de carbamato e 8,0 g de sílica APS-Nucleosil (500Å, 7µm).

A fase estacionária quiral (9,0 g) foi empacotada em coluna de aço inoxidável (20,0 x 0,70 cm d.i.) sob pressão de 7500 psi, utilizando-se hexano:isopropanol (90:10 v/v) como solvente. A fase estacionária foi suspensa em 70,0 mL de hexano:isopropanol (50:50 v/v) e agitadas no ultra-som por um período de três minutos.

Após empacotamento a coluna foi condicionada em hexano:isopropanol (90:10 v/v) durante 12 horas, utilizando-se uma vazão de 1,0 mL/min.

### **3.12. SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO ALBENDAZOL SULFÓXIDO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA**

A coluna semipreparativa *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose adsorvida em APS Nucleosil (500Å, 7µm, 20% g/g) (20,0 x 0,70 cm) foi condicionada com a fase móvel metanol a uma vazão de 2,5 mL/min e detecção no UV em 290 nm.

Uma massa de 10,0 mg de (±)-albendazol sulfóxido foi pesada e solubilizada em 1,0 mL de metanol. A solução de (±)-albendazol sulfóxido foi injetada no sistema cromatográfico com alça dosadora de 500 µL. As frações de (+) e (-)-albendazol-sulfóxido foram coletadas nas áreas demarcadas para coleta. As frações obtidas foram rotaevaporadas e os sólidos obtidos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica para determinação da pureza enantiomérica.

### **3.13. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR**

#### **3.13.1. Condições de Cultura**

Todas as manipulações das linhas celulares foram realizadas em câmara de fluxo laminar com materiais estéreis. Utilizou-se uma estufa a temperatura de 37°C contendo atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>

#### **3.13.2. Linhas Celulares**

Três linhagens de tumores celulares humanas foram utilizadas: MCF-7 (câncer de mama), NCI-H460 (câncer de pulmão) e A375-C5 (melanoma). A linha celular MCF-7 e A375-C5 foram obtidas da European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Reino Unido) e NCI-H460 foi gentilmente doada pelo National Institute of Cancer (NCI, Bethesda, EUA).

#### **3.13.3. A Tripsinização das Linhas Celulares**

A tripsinização das células foi realizada pela adição de tripsina ao frasco de cultura e este colocado na estufa por 2 minutos. Posteriormente adicionou-se o meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino e centrifugou-se por 5 minutos a 1200 g.

#### **3.13.4. Solução Sulforrodamina B (SRB)**

A solução foi preparada pesando-se 4,0 g de SRB (6,9 mmol/L mmol/L) e diluindo-se em 1000 mL de uma solução de ácido acético 1% (v/v) e armazenada em geladeira.

### **3.13.5. Solução Azul de Tripano**

A solução foi preparada pesando-se 1g de corante azul de tripano em 100 mL de PBS estéril. Filtrou-se e armazenou-se na geladeira em frasco âmbar.

### **3.13.6. Tampão Fosfato Salino (PBS)**

A solução de PBS, adquirida comercialmente, foi preparada por diluição apropriada em 1000 mL de água destilada, para obter uma solução com concentração final de tampão fosfato 0,01 mol/L, 0,0027 mol/L KCl e 0,14 mol/L NaCl e pH 7,4.

### **3.13.7. Solução de Ácido Acético 1% (v/v)**

A solução foi preparada diluindo-se 10 mL de ácido acético glacial em 1000 mL de água destilada.

### **3.13.8. Solução *Tris*-Base**

A solução foi preparada pesando-se 605 mg de *tris*(hidroximetil)aminometano (10 mmol/L) e diluindo-se em 500 mL de água destilada.

### **3.13.9. Solução de Ácido Tricloroacético (TCA)**

A solução foi preparada pesando-se 50 g de TCA (3,06 mol/L) e diluindo-se em 100 mL de água destilada e armazenada em geladeira.

### 3.13.10. Preparo das Soluções

As soluções em estoque de ABZ, ( $\pm$ )-ABZ-SO, (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 60 mmol/L, pela dissolução de 15,9; 16,8; 16,8; e 16,8 mg de cada composto, respectivamente.

Aliquotou-se 10  $\mu$ L da solução em estoque (60mmol/L) e adicionou-se 2,0 mL de meio de cultura em tubo de ensaio estéril. Na sequência, aliquotou-se 1,0 mL dessa solução e diluiu-se com mais 1,0 mL de meio RPMI. Posteriormente, desta última solução, aliquotou-se 1,0 mL e diluiu-se com 1,0 mL de meio. E por fim, mais um 1,0 mL da última amostra foi diluída com 1,0 mL do meio RPMI.

As soluções finais obtidas foram de 300,0; 150,0; 75,00; 37,50 e 18,75  $\mu$ mol/L em cada tudo de ensaio, já os ensaios foram realizados com as concentrações de 150,0; 75,00; 37,50; 18,75 e 9,380  $\mu$ mol/L uma vez que nas placas as soluções foram diluídas pela adição do meio de cultura.

### 3.13.11. Ensaio de Inibição com Sulforrodamina B (SRB)

Os efeitos dos compostos ABZ, ( $\pm$ )-ABZ-SO, (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO sobre o crescimento *in vitro* de linhagens de células humanas tumorais foram avaliadas de acordo com o procedimento adotado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI, EUA), o qual utiliza o corante sulforrodamina B, que se liga às proteínas, para avaliar o crescimento celular.<sup>59,101</sup>

As células foram incubadas em meio RPMI completo a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram coradas com o corante azul de tripano 0,2% (v/v) e contadas em câmara de Neubauer. As densidades celulares foram ajustadas para 1,5 x10<sup>5</sup> células/mL para linhagem MCF-7 e 7,5 x10<sup>4</sup> para as células NCI-H460 e A375-C5. Da suspensão celular, 100  $\mu$ L foi adicionado aos orifícios de uma placa estéril de 96 poços juntamente com 100  $\mu$ L de meio RPMI completo e

incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para crescimento exponencial das células. Após este período, foram adicionados 100 µL das soluções a serem testadas, em diferentes concentrações, preparadas por diluição serial das respectivas soluções estoque, descongeladas imediatamente antes do uso, em meio RPMI completo. Uma placa controle (T<sub>0</sub>) foi fixada e lavada.

Após a adição dos compostos, as placas permaneceram na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após esse período, as placas foram fixadas com a adição de 50µL de TCA 50% em cada poço. Estas permaneceram na geladeira por um período de 1 h e posteriormente foram lavadas com água destilada por 5 vezes cada e deixadas secar a temperatura ambiente ou estufa a 37°C, para acelerar a secagem.

Com as placas bem secas, estas foram coradas pela adição de 50µL da solução de sulforrodamina B. Após a adição, deixou-se a reação por 30 min à temperatura ambiente. Terminado esse período, as placas foram lavadas com uma solução de ácido acético 1% (v/v) por 5 vezes ou até não se observar mais resíduos de corante. Secou as placas à temperatura ambiente ou na estufa para acelerar o processo de secagem.

As células aderidas a placa foram suspensas com a adição de 100 µL de *tris* 10 mmol/L em cada poço e deixou-se a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, foi realizada a leitura das placas na absorvância de 492 nm, em um leitor de placas. Para cada linha celular e cada composto avaliado, uma curva dose-resposta foi obtida e a inibição do crescimento de 50% (GI50), correspondendo à concentração dos compostos que inibiram 50% do crescimento das células foi calculado.<sup>59</sup> Doxorubicina foi usado como um controle positivo e testado da mesma forma.

# *RESULTADOS E DISCUSSÕES*



*Capítulo I*  
*Extração, Determinação da Concentração*  
*Proteica e Atividade Enzimática das*  
*Frações Microssomais*



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES MICROSSOMAS**

O método convencional para obtenção de frações microssomais a partir de fígados de ratos envolve a técnica de centrifugação diferencial. Nesta técnica o homogenato de fígado é centrifugado primeiramente com baixa rotação, para separação de células, mitocôndrias e ácidos nucléicos e, em uma segunda etapa, é realizada uma ultracentrifugação do sobrenadante para isolar os microssomas.<sup>3,102</sup>

A ultracentrifugação requer o emprego de centrífugas específicas que possuem capacidade de rotação de 90.000-120.000 g e que, por sua vez, possuem um custo de aquisição bastante elevado. Desta forma, métodos alternativos que possibilitem a extração de frações celulares são extremamente atrativos.

Uma alternativa para os procedimentos que utilizam a ultracentrifugação é um método que envolve o uso de cloreto de cálcio para a agregação dos microssomas, formando um complexo com alta densidade e conseqüentemente melhor sedimentação, podendo então ser isolados em centrífugas de baixa rotação convencionais em laboratórios de pesquisa.<sup>102,103</sup>

Com o objetivo de comparar os dois procedimentos de extração e obter microssomas sem o uso de uma ultracentrífuga, as frações microssomais foram extraídas por ultracentrifugação e também por agregação de cálcio, segundo procedimento ilustrado na Figura 4.1.

Para cada extração das frações microssomais foram realizadas as respectivas determinações das concentrações proteicas.

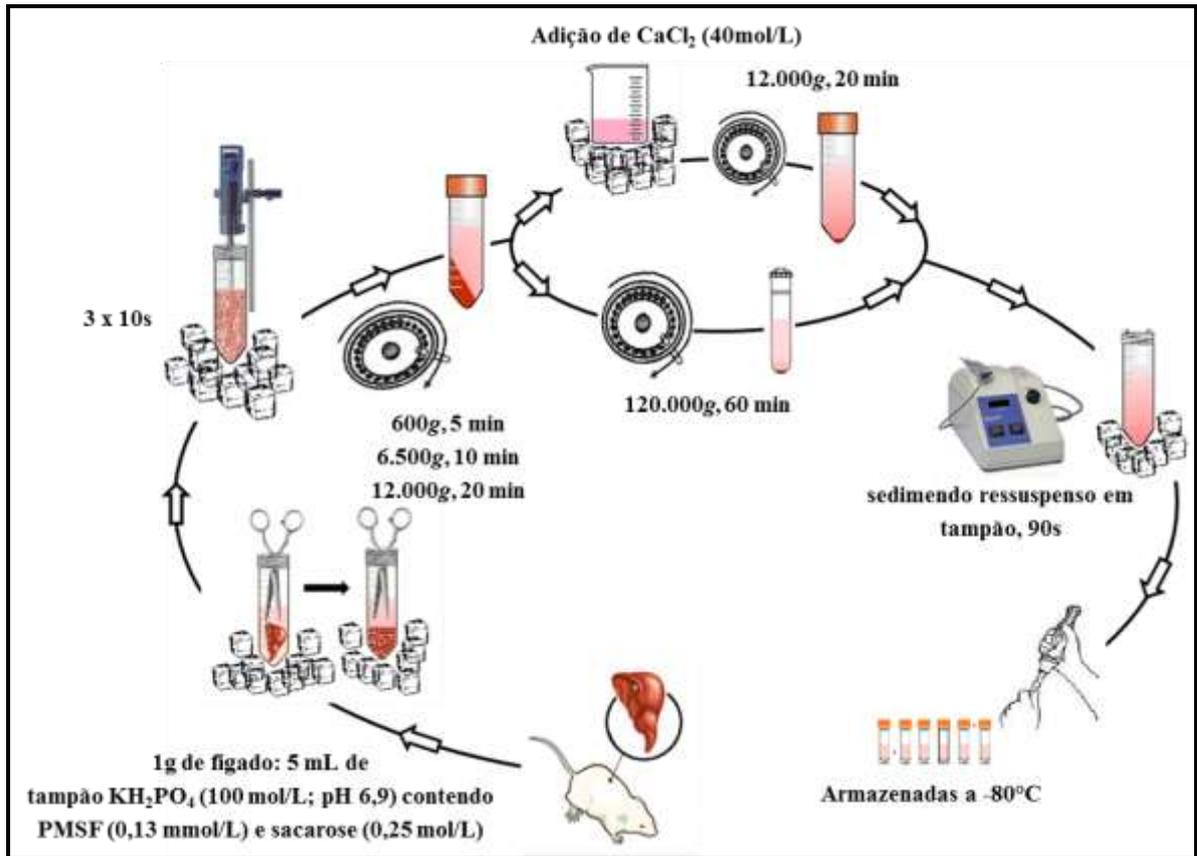
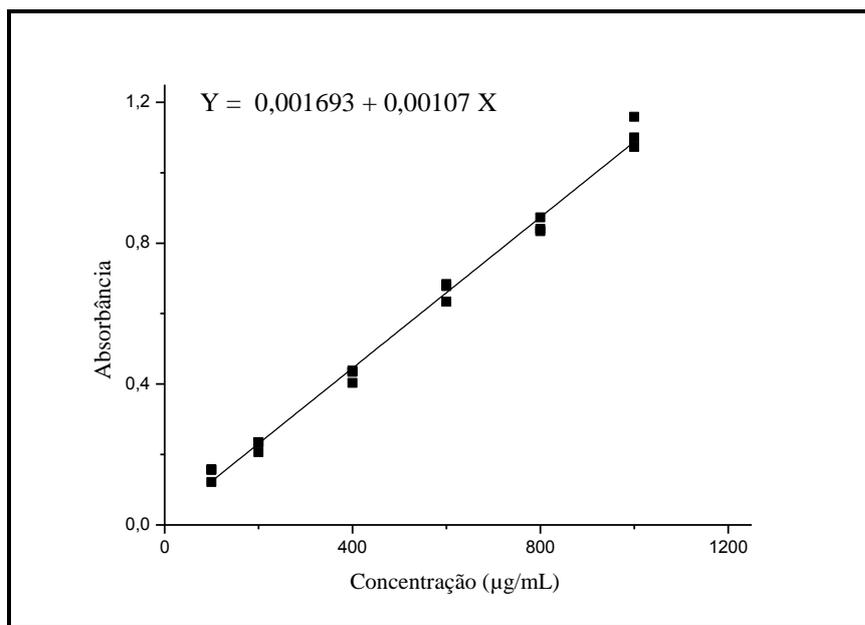


FIGURA 4.1: Procedimento de extração realizado na obtenção das frações microsossomais por ultracentrifugação e por agregação de cálcio.

## 4.2. DETERMINAÇÃO PROTEICA DAS FRAÇÕES MICROSSOMAIS

Para cada extração microsossomal realizada, uma curva de calibração com BSA foi obtida em função do máximo de absorbâncias em 596 nm, relativas às seguintes concentrações: 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ , tanto para o método por ultracentrifugação como por agregação com cloreto de cálcio. As amostras foram preparadas em água, em triplicata. As curvas analíticas foram obtidas através de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e está apresentada na Figura 4.2.



**FIGURA 4.2:** Curva analítica obtida com BSA para a determinação de proteínas totais em diferentes frações microsossomais (n=18).

#### 4.2.1. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão das curvas de calibração obtidas com BSA foram avaliadas (Tabela 4.1). A precisão das replicatas (n=3) de BSA apresentou coeficientes de variação entre 2,47 e 13,9. Os valores de exatidão variaram das concentrações nominais entre 93,8 e 120%. Portanto, todos estes valores foram considerados aceitáveis, com a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  sendo o limite inferior para quantificação de proteínas totais.

**TABELA 4.1:** Exatidão (%) e precisão (CV%) obtidas para as diferentes concentrações da curva de calibração para BSA (n=3).

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV) (%)	Exatidão (%)
100,0	13,9	120
200,0	7,05	97,3
400,0	5,24	93,8
600,0	4,45	101
800,0	2,47	97,2
1000	3,96	102

Através da apropriada diluição das amostras, a concentração proteica encontrada para a fração microssomal obtida por ultracentrifugação foi de 41,1 mg/mL e para fração microssomal obtida por agregação de cálcio foi de 26,6 mg/mL. Embora um maior rendimento proteico tenha sido obtido com o procedimento de ultracentrifugação, ambos valores de concentração proteica foram considerados satisfatórios, uma vez que as concentrações empregadas nos ensaios de biotransformação *in vitro* situam-se na faixa de 0,5 a 10,0 mg/mL.<sup>104-106</sup> Desta forma, pode-se concluir que o procedimento de ultracentrifugação e o de agregação de cálcio são adequados para a obtenção de frações microssomais e que ambos podem ser empregados, desde que a faixa de concentração desejada esteja contemplada nos limites alcançados.

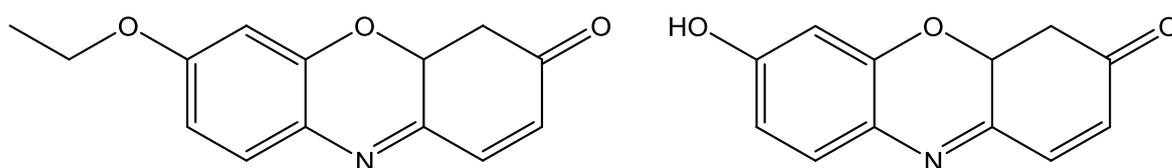
#### 4.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA RESORUFINA NA PRESENÇA DE SEU SUBSTRATO - 7-ETOXIRESORUFINA

Para avaliação dos métodos de extração das frações microssomais com relação à atividade e estabilidade das amostras extraídas, seja por

ultracentrifugação ou por precipitação com cloreto de cálcio, estabeleceu-se a realização de experimentos *in vitro* para monitorar a metabolização de um substrato específico, biotransformado pelas enzimas de interesse no processo em estudo. O marcador selecionado como substrato foi a 7-etoxiresorufina, sendo o produto da sua metabolização, a resorufina, um marcador para o citocromo P450, mas especificamente para os CYP's 1A1, 1A2 e 1B1.<sup>107</sup> Vale ressaltar que o CYP1A1 é uma das responsáveis pelo metabolismo do albendazol.<sup>29</sup>

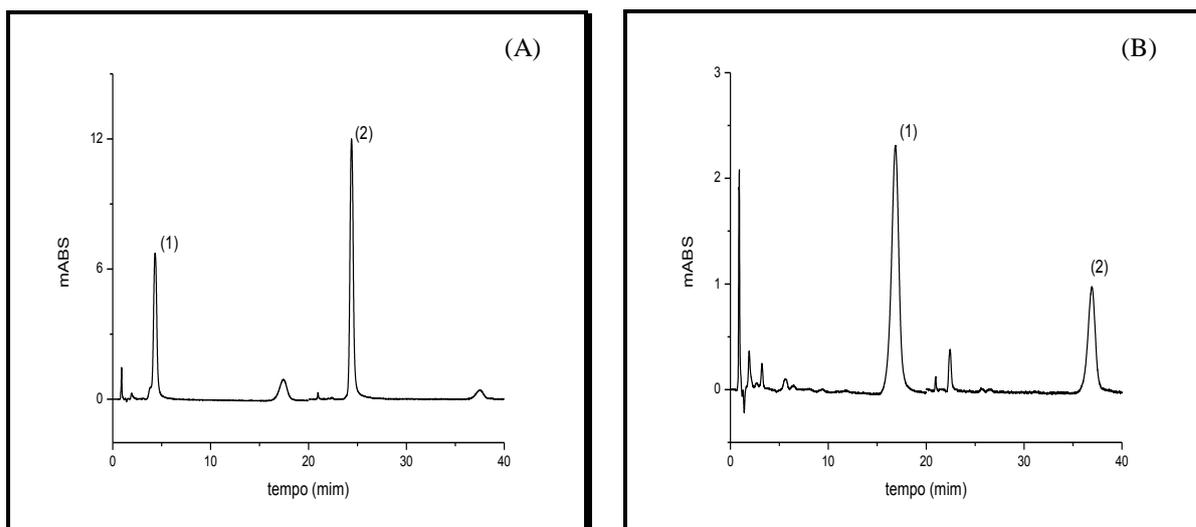
A atividade enzimática das frações microssomais obtidas foi avaliada por quantificação do produto da reação, sendo a quantidade obtida considerada como um valor padrão e utilizado para monitorar a reprodutibilidade da extração entre diferentes lotes de amostras microssomais. Adicionalmente, este mesmo teste foi também conduzido em diferentes dias para avaliar a estabilidade das amostras extraídas e armazenadas.

Para o desenvolvimento do método de análise avaliou-se diferentes fases estacionárias e diferentes fases móveis com intuito de se obter a seletividade desejada para os compostos de interesse: 7-etoxiresorufina (substrato) e da resorufina (produto) (Figura 4.3).



**FIGURA 4.3:** Estrutura química da 7-etoxiresorufina e da resorufina

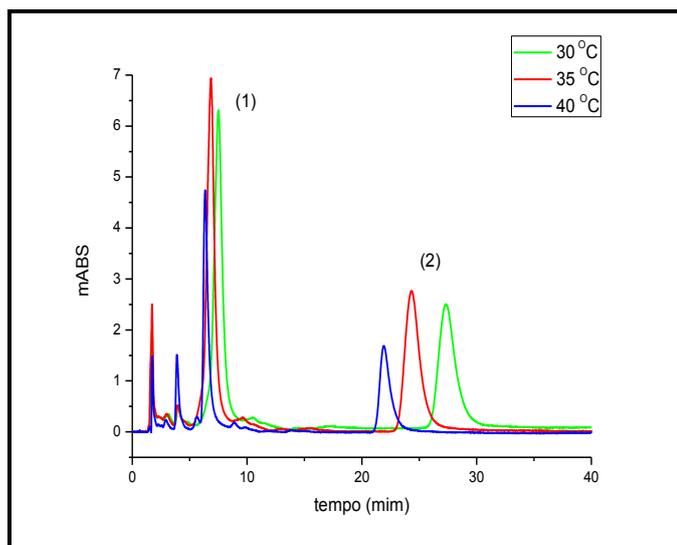
A primeira fase estacionária avaliada foi uma coluna C18 Nucleosil (5µm, 15 x 0,46 cm d.i.) utilizando-se MeOH/Água (50:50) como eluente. O resultado obtido mostrou-se inadequado, uma vez que a resorufina, composto hidrofílico, eluiu no tempo morto da coluna. Como alternativas, solução tampão fosfato em pH 5,5 e 2,5 foram testados, mantendo-se a mesma força de fase móvel. Os cromatogramas obtidos estão ilustrados na Figura 4.4.



**FIGURA 4.4:** Cromatogramas da separação da resorufina (1) e da 7-etoxiresorufina (2). Coluna C18 Nucleosil (5 $\mu$ m, 15 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: (A) MeOH/Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mmol/L; pH 2,5) (50:50); (B) MeOH/Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mmol/L; pH 5,5) (50:50) Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 254 nm.

Pode-se observar (Figura 4.4) que uma retenção satisfatória foi obtida para a resorufina em pH 2,5, porém o tempo de retenção para a 7-etoxiresorufina ainda estava elevado. Como alternativa, foi avaliada uma coluna C18 Luna que, apesar de ser a mesma fase hidrofóbica (C18), pode apresentar uma acidez diferente quando comparada com a sílica Nucleosil. No entanto, o resultado obtido para a análise de 7-etoxiresorufina e resorufina com a coluna Luna não apresentou diferença significativa em termos de fatores de retenção (k), mesmo assim, essa foi selecionada para os próximos passos do trabalho.

Avaliou-se a influência da temperatura na retenção dos compostos, uma vez que estes possuem grupos ionizáveis e a temperatura influencia na ionização e, conseqüentemente, na retenção cromatográfica dos mesmos. As temperaturas avaliadas foram 30, 35 e 40°C e os cromatogramas são apresentados na Figura 4.5.



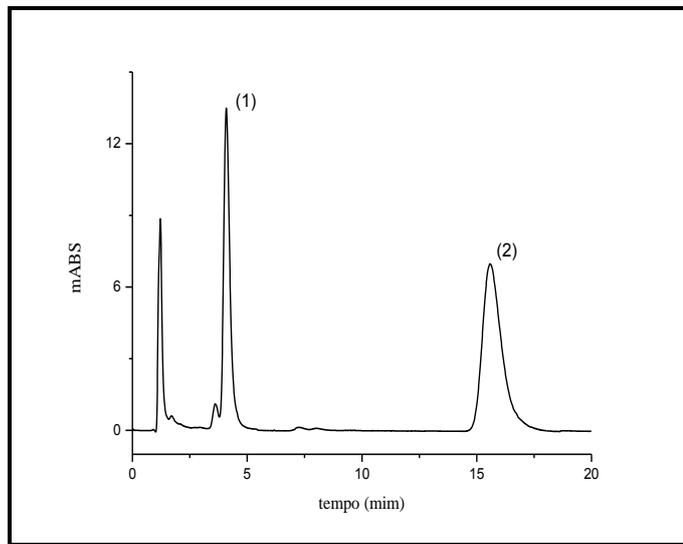
**FIGURA 4.5:** Cromatogramas da separação da resorufina (1) e da 7-etoxiresorufina (2) com avaliação de diferentes temperaturas. Coluna C18 Luna (10 $\mu$ m, 15 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: MeOH/Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mmol/L; pH 2,5) (50:50). Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 254 nm.

A temperatura intermediária de 35°C foi selecionada e fixada para todos os experimentos.

Ainda na fase de desenvolvimento foram avaliadas a adição de aditivos à fase móvel, com o intuito de obter um maior  $k$  para a resorufina. Nesta etapa testou-se o ácido trifluoracético, ácido acético, tetrabutilamônio e ácido acético com trietilamina, no entanto, nenhum deles apresentou um resultado satisfatório. Portanto, ajustar uma condição cromatográfica para obter fatores de retenção próximos para estes dois compostos, exigia o uso de eluição gradiente, porém, levando-se em consideração o tempo de condicionamento que é necessário estabelecer entre injeções neste tipo de eluição, o tempo total de análise continuaria inalterado.

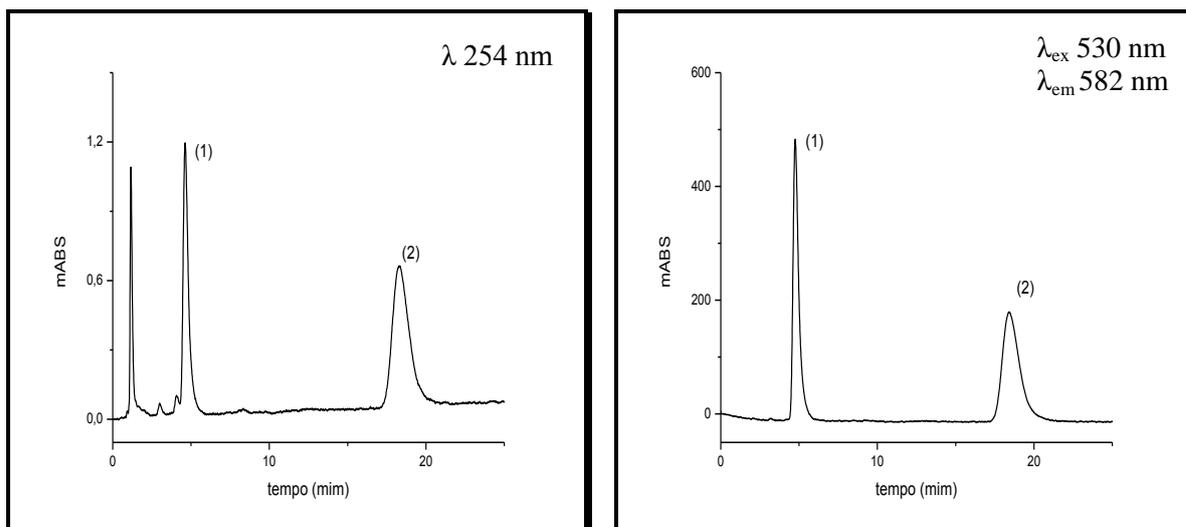
Uma coluna C18 Luna (10 $\mu$ m, 100Å) (10 x 0,46 cm) de menor dimensão foi investigada, no entanto, não foi observado melhora significativa no resultado das análises.

Das diferentes condições cromatográficas testadas, optou-se pela descrita no cromatograma apresentado na Figura 4.6.



**FIGURA 4.6:** Cromatograma da separação da resorufina (1) e da 7-etoxiresorufina (2). Coluna C18 Luna (10 $\mu$ m, 15 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: MeOH/Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mmol/L; pH 2,5) (50:50). Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 254 nm. Temperatura de 35°C.

Adicionalmente, avaliou-se dois sistemas de detecção para o emprego do método, o ultravioleta visível e o detector de fluorescência. Na Figura 4.7 estão apresentados os cromatogramas para uma amostra de 5 $\mu$ mol/L para cada analito de interesse, em ambos os detectores e pode-se observar a maior sensibilidade (~ 300 vezes) e seletividade do detector de fluorescência, sendo este o selecionado para a validação do método.



**FIGURA 4.7:** Cromatogramas da separação da resorufina 5  $\mu\text{mol/L}$  (1) e da 7-etoxiresorufina 5  $\mu\text{mol/L}$  (2) em diferentes detectores. (A) UV-vis: 254 nm e (B)  $\lambda_{\text{exc}}$ : 530 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 582 nm. Volume de Injeção: 100  $\mu\text{L}$ . Coluna C18 Luna (10 $\mu\text{m}$ , 10 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: MeOH/Tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mmol/L; pH 2,5) (50:50). Vazão: 1,0 mL/min. Temperatura de 35°C.

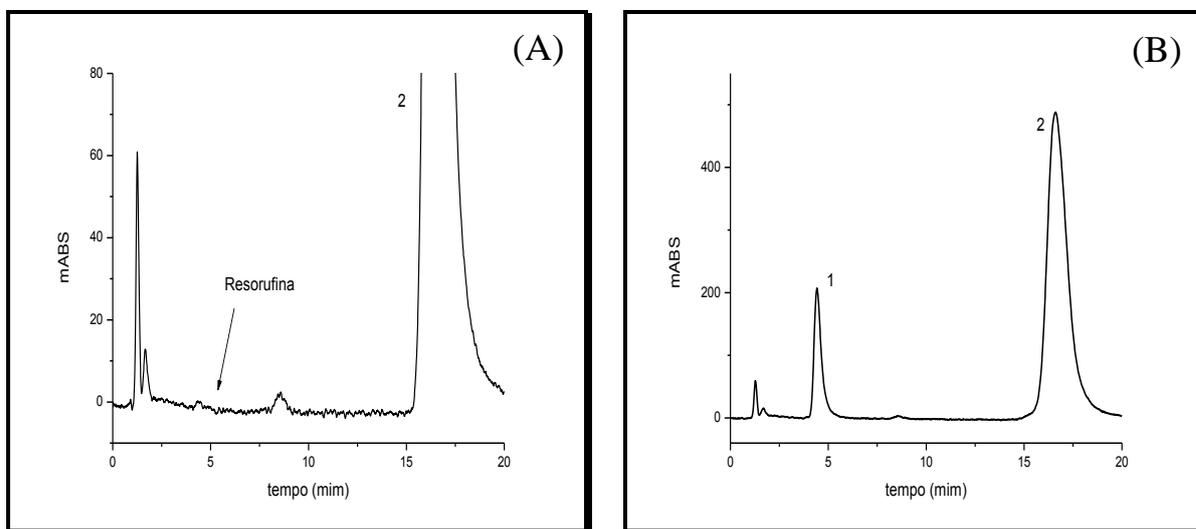
#### 4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE RESORUFINA NA PRESENÇA DE SEU SUBSTRATO, A 7-ETOXIRESORUFINA

Com as condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação da resorufina em frações microssomais, o método analítico foi validado de acordo com o protocolo proposto pelo FDA<sup>98</sup> e pela ANVISA<sup>99</sup> para métodos bioanalíticos. As figuras de mérito analítico avaliadas foram: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, recuperação, limites de quantificação e detecção.

##### 4.4.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de amostras de microssomas livre do analito (microssoma branco), com análises da matriz biológica fortificada com os analitos. Os cromatogramas estão

apresentados na Figura 4.8 e mostra a seletividade para o analito de interesse, não apresentando interferentes para o composto que se deseja quantificar.



**FIGURA 4.8:** Cromatograma obtido do microsossoma branco fortificado com 100  $\mu\text{mol/L}$  da 7-etoxiresorufina (2) (A) e do microsossoma fortificado com 0,64  $\mu\text{mol/L}$  de resorufina (1) e 100  $\mu\text{mol/L}$  da 7-etoxiresorufina (2) (B). Coluna C18 Luna (10 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mmol/L; pH 2,5):MeOH (50:50). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 50  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 530 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 582 nm. Temperatura de 35°C.

#### 4.4.2. Linearidade

Os intervalos de concentração utilizados na curva de calibração foram selecionados de acordo com a faixa de concentração reportada na literatura para a análise de resorufina.<sup>105,108</sup>

A curva de calibração foi obtida em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 0,0200; 0,0400; 0,0800; 0,160; 0,320; 0,640; 1,28 e 2,56  $\mu\text{mol/L}$ , em triplicata. As amostras foram preparadas em microsossomas inativos, na presença de substrato (7-etoxiresorufina) e NADPH e foram injetadas 50  $\mu\text{L}$ . A curva analítica foi obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e está apresentada na Figura 4.9.

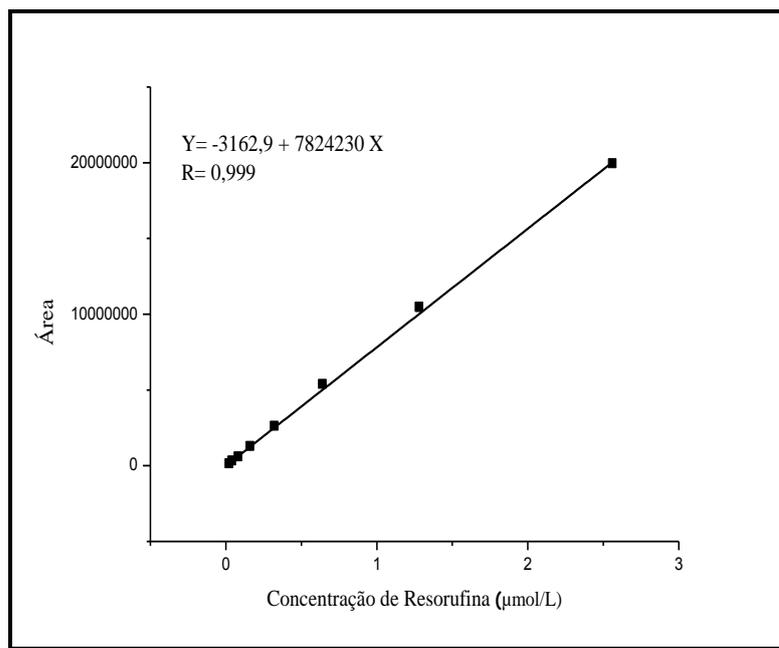


FIGURA 4.9: Curva analítica para a quantificação de resorufina (n=24)

A curva analítica foi linear na faixa de 0,0200-2,56 µmol/L para a resorufina. O coeficiente de correlação linear (r) obtido para a curva de calibração foi de 0,999, com precisão e exatidão menores que 15% para todas as medidas.

As figuras de mérito avaliadas foram realizadas com amostras controles de qualidade preparadas em replicata (n=5), em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações da curva de calibração para a resorufina:

- Concentração Baixa: 0,0240 µmol/L;
- Concentração Média: 1,024 µmol/L;
- Concentração Alta: 2,048 µmol/L;

#### 4.4.3. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão intradia e interdia do método foram avaliadas analisando-se replicatas (n=5) dos três controles de qualidade, em um mesmo dia e em dias não consecutivos.

A precisão das replicatas dos compostos apresentou coeficientes de variação entre 1,70 e 12,3. Os valores de exatidão variaram entre 92,6 e 113% das concentrações nominais. Portanto, todos os valores com variabilidades menores que 15%.<sup>98,99</sup>

**TABELA 4.2:** Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdia, para a análise da resorufina em frações microssomais (n=5)

Concentração ( $\mu$ M)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		3 dias (média (n=15))	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,0240	92,6	11,1	106	12,3	95,1	4,70	97,9	9,25
1,024	110	5,50	111	5,40	113	7,40	111	6,10
2,048	108	5,60	105	2,40	113	1,70	109	3,23

A precisão e exatidão do método foram também avaliadas, através do teste cego, onde foram analisadas amostras de concentrações de resorufina desconhecidas ao analista. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 4.3 e também estão de acordo com os critérios de aceitação para o método.

**TABELA 4.3:** Precisão e exatidão obtidas no teste cego da resorufina em frações microssomais (n=3).

Analito	Concentração ( $\mu$ mol/L)	Precisão (CV) (%)	Exatidão (%)
Amostra 1	0,40	2,31	113

#### 4.4.4. Recuperação

Os percentuais de extração para a resorufina, em cada concentração, foram calculados pela razão entre o valor médio das áreas encontradas nas amostras preparadas em microssoma (n=5) com os resultados das amostras preparadas com o sobrenadante da matriz fortificada (n=5). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

A recuperação mostrou ser precisa para a extração de resorufina nas três diferentes concentrações analisadas.

**TABELA 4.4:** Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade da resorufina (n=5)

Resorufina ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recuperação (%)
0,0240	98,0 $\pm$ 4,7
1,024	103 $\pm$ 1,5
2,048	100 $\pm$ 6,0

#### 4.4.5. Limites de Quantificação e Detecção

O limite de quantificação foi determinado por meio da análise de amostras contendo concentrações decrescentes do analito até que os valores de precisão e exatidão de amostras extraídas (n=3) estivessem no intervalo de 15 - 20% de variabilidade, enquanto que o limite de detecção foi calculado obtendo-se um sinal três vezes maior que o ruído do detector. A Tabela 4.5 mostra os limites de quantificação e detecção para o composto estudado.

**TABELA 4.5:** Limites de quantificação e detecção para resorufina em frações microsossomais (n=3).

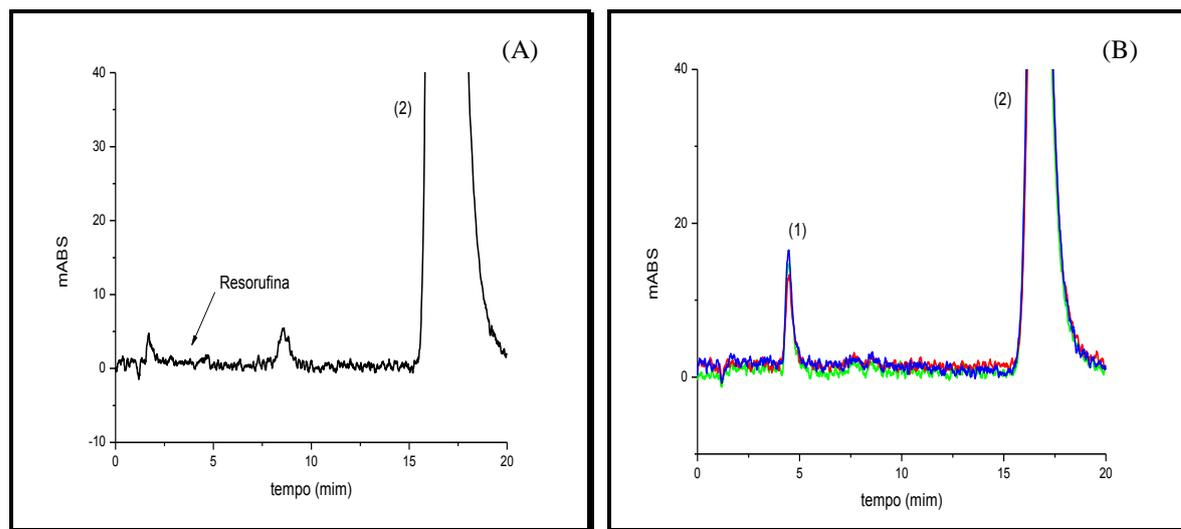
Analito	Limite de Quantificação ( $\mu\text{mol/L}$ )	Limite de Detecção ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>Resorufina</b>	0,020	0,010

#### 4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO: ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA FRAÇÕES MICROSSOMAS EXTRAÍDAS DE FÍGADOS DE RATOS WISTAR

O método desenvolvido e validado foi aplicado para verificar a atividade enzimática de frações microsossomais extraídas de fígados de ratos, através da concentração de resorufina produzida (Tabela 4.6) (Figura 4.10). A atividade enzimática obtida para 2 mg/mL de proteína foi de 4,00 pmol/min/mg.

**TABELA 4.6:** Atividade enzimática das frações microsossomais obtidas a partir de fígados de ratos Wistar, com emprego da ultracentrifugação

Concentração Proteica (mg/mL)	Precisão (CV) (%)	Concentração $\mu\text{mol/L}$	Atividade Enzimática (pmol/min/mg proteína)
2,0	14,4	0,04	4,00



**FIGURA 4.10:** Cromatograma obtido do microsossoma branco fortificado com 100  $\mu\text{mol/L}$  de 7-etoxiresorufina (2) (A); da incubação *in vitro* da etoxiresorufina para a produção da resorufina (1), com 100  $\mu\text{g}$  de proteína (B). Coluna C18 Luna (10 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mmol/L; pH 2,5):MeOH (50:50). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 50  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 530 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 582 nm. Temperatura de 35°C.

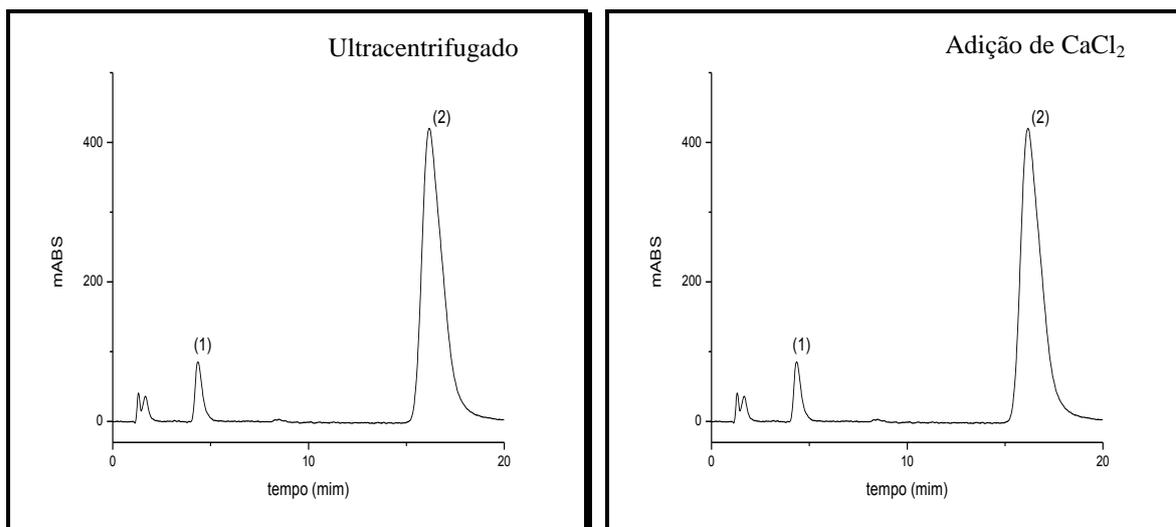
#### 4.5.1. Otimização da concentração proteica para acompanhamento da estabilidade das frações microsossomais

A incubação *in vitro* da 7-etoxiresorufina foi realizada conforme procedimento descrito em 3.7.1, p. 49 avaliando-se diferentes concentrações protéicas, para que se pudesse avaliar a concentração ótima a ser utilizada nos ensaios. As concentrações protéicas avaliadas foram 2,0; 4,0; 6,0 e 10 mg/mL para ambos os procedimentos de extração realizados. Os valores da concentração de resorufina produzida e a atividade enzimática para cada concentração estão na Tabela 4.7.

**TABELA 4.7:** Atividade enzimática para as diferentes frações microssomais obtidas, por agregação de cálcio e ultracentrifugação, avaliada em diferentes concentrações proteicas e utilizando 7-etoxiresorufina como substrato.

<b>Concentração Proteica (mg/mL)</b>	<b>Ultracentrifugação</b>		<b>Agregação com CaCl<sub>2</sub></b>	
	<b>Concentração Resorufina (μmol/L)</b>	<b>Atividade Enzimática (pmol/min/mg)</b>	<b>Concentração Resorufina (μmol/L)</b>	<b>Atividade Enzimática (pmol/min/mg)</b>
2,0	0,04	4,00	< LQ	-----
4,0	0,173	17,3	0,164	16,4
6,0	0,206	20,6	0,224	22,4
10,0	0,264	26,4	0,277	27,4

Pode-se observar que as frações microssomais, independente do modo de extração adotado, na sua maioria, mostraram atividades enzimáticas similares, com exceção para os resultados encontrados para a concentração proteica de 2 mg/mL, onde a matriz biológica obtida através de agregação com CaCl<sub>2</sub> não produziu quantidade suficiente de resorufina que pudesse ser quantificada. A Figura 4.11 mostra a produção de resorufina pelas frações microssomais extraídas por ultracentrifugação e por adição de cloreto de cálcio.

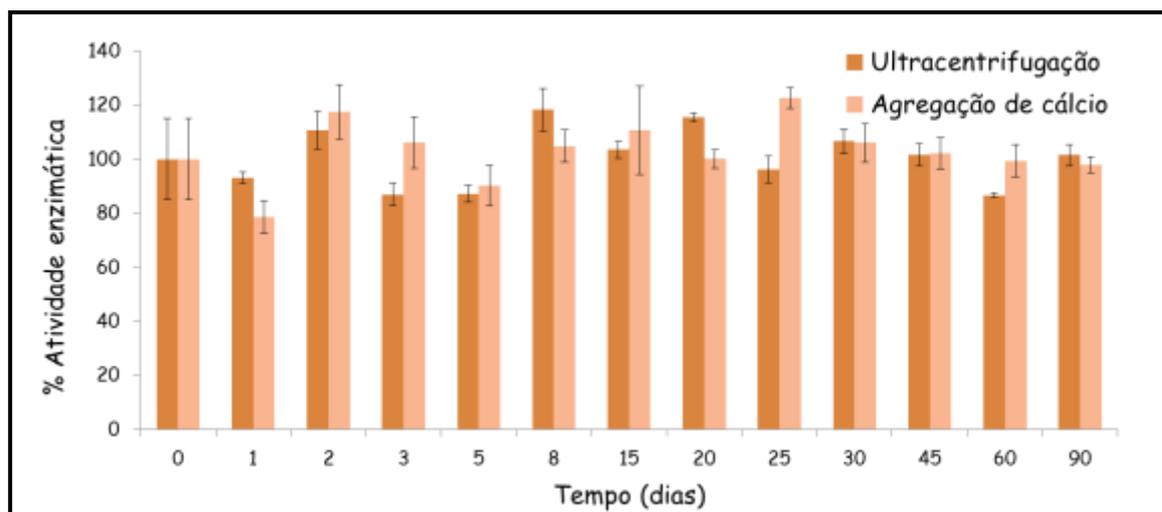


**FIGURA 4.11:** Cromatogramas da resorufina (1) e 7-etoxiresorufina (2) obtido de frações microssomais obtida de duas formas: ultracentrifugação e por adição de cloreto de cálcio e ensaio *in vitro* com 10,0 mg/mL de concentração proteica. Coluna C18 Luna (10 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mmol/L; pH 2,5):MeOH (50:50). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 50  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 530 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 582 nm. Temperatura de 35°C.

#### 4.5.2. Estabilidade das Frações Microssomais

A estabilidade de ambas as frações microssomais extraídas foram acompanhadas pelo metabolismo *in vitro* da 7-etoxiresorufina conforme descrito na seção 3.7.1 p. 49, com o intuito de averiguar a atividade enzimática destas matrizes biológicas armazenadas a -80°C e, adicionalmente, o tempo de estabilidade da matriz no tampão de armazenamento selecionado.

O gráfico da Figura 4.12 mostra a estabilidade das duas frações microssomais durante um período de 90 dias.



$t_{\text{tab}, 95\%, 17 \text{ gl}} = 2,10$ ;  $t_{\text{cal}} \text{ ultracentrifugação} = 0,16$ ;  $t_{\text{cal}} \text{ agregação de cálcio} = 1,08$

**FIGURA 4.12:** Gráfico da estabilidade das frações microssomais extraídas por ultracentrifugação e por agregação com cloreto de cálcio no decorrer de 90 dias.

Pelo gráfico da Figura 4.12, verifica-se que a produção de resorufina se manteve praticamente constante no decorrer dos dias, uma vez que não se observou diferença estatística pelo teste  $t$ , ao nível de confiança de 95%. Desta forma, a estabilidade de ambos os microssomas extraídos foi mantida durante 90 dias, quando armazenados a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para os microssomas obtidos por ultracentrifugação a média de atividade no decorrer de 90 dias foi 25,5 pmol/min/mg de proteína, enquanto que microssomas recém extraídos apresentaram uma atividade de 26,4 pmol/min/mg de proteína, assim, verificou-se que após 3 meses de armazenamento, as frações microssomais perderam apenas 4% da sua atividade enzimática. Para os microssomas obtidos por adição de cloreto de cálcio a média de atividade encontrada foi de 27,3 pmol/min/mg de proteína contra 27,4 pmol/min/mg de proteína encontrada para amostras recém preparadas, demonstrando que a atividade enzimática permaneceu inalterada.

Embora os microssomas extraídos com adição de cloreto de cálcio indicaram ter uma estabilidade maior quando armazenados a  $-80^\circ\text{C}$ , os microssomas obtidos por ultracentrifugação apresentam a vantagem de serem

obtidos em maior concentração proteica. Por essa razão, todos os estudos foram realizados com microsomas obtidos por ultracentrifugação.



*Capítulo II*  
*Desenvolvimento e Validação do Método*  
*Cromatográfico Multidimensional para*  
*Análise da Influência da Restrição Proteica*  
*no Metabolismo do Albendazol*



## **4.6. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ALBENDAZOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA MULTIDIMENSIONAL**

### **4.6.1. Colunas RAM-BSA**

A análise e quantificação de fármacos nos mais diversos fluidos biológicos é muito importante para a compreensão do comportamento farmacocinético e farmacodinâmico desses compostos. Dentro deste contexto, uma das maiores dificuldades no desenvolvimento dos métodos de análise reside no desafio de obter uma amostra em condições adequadas de ser analisada, a qual deve estar livre de compostos interferentes e endógenos, os quais além de prejudicarem as análises, também podem danificar as colunas cromatográficas.

Assim, uma das etapas mais importantes na análise de fármacos em fluidos biológicos é o seu pré-tratamento.

As colunas de acesso restrito recobertas com proteínas, em especial aquelas recobertas com albumina sérica bovina (RAM-BSA), mostraram excelentes resultados para a injeção direta de amostras biológicas, quando acopladas tanto com colunas analíticas aquirais<sup>86,89,109-111</sup> quanto com colunas analíticas quirais<sup>87,88,90,112-115</sup>, com os mais diversos analitos e matrizes.

No presente trabalho foram selecionadas para uso as colunas RAM-BSA, devido à fácil disponibilidade comercial da albumina sérica bovina, seu baixo custo e principalmente, devido às suas propriedades físico-químicas, as quais permitem a utilização dessas colunas em várias condições cromatográficas no modo reverso de eluição, o que é uma vantagem quando se trabalha com injeção direta de amostras biológicas.<sup>116</sup>

As fases hidrofóbicas selecionadas para o presente trabalho foram C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, Ciano e Fenil, uma vez que estas têm sido eficientemente empregadas em diversos trabalhos<sup>86-90,109-115</sup> (Figura 4.13).

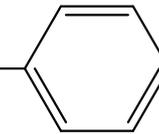
Estrutura Química Fase Hidrofóbica	Coluna
$\text{---}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	C8-BSA
$\text{---}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	C18-BSA
$\text{---}(\text{CH}_2)_3$ 	Fenil-BSA
$\text{---}(\text{CH}_2)_3\text{CN}$	Ciano-BSA

FIGURA 4.13: Fases hidrofóbicas recobertas com albumina sérica bovina (RAM-BSA).

#### 4.6.2. Preparo das colunas RAM-BSA

As colunas RAM, do tipo hidrofóbica imobilizada com albumina sérica bovina (RAM-BSA) foram preparadas em três etapas de acordo com protocolo descrito por MENEZES & FÉLIX<sup>94</sup> (Figura 4.14).

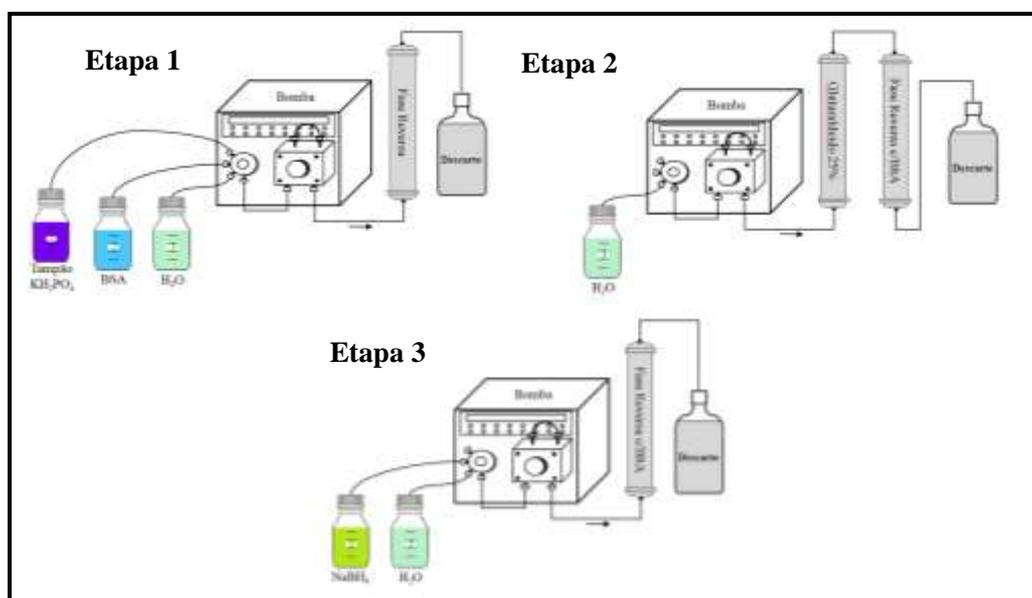


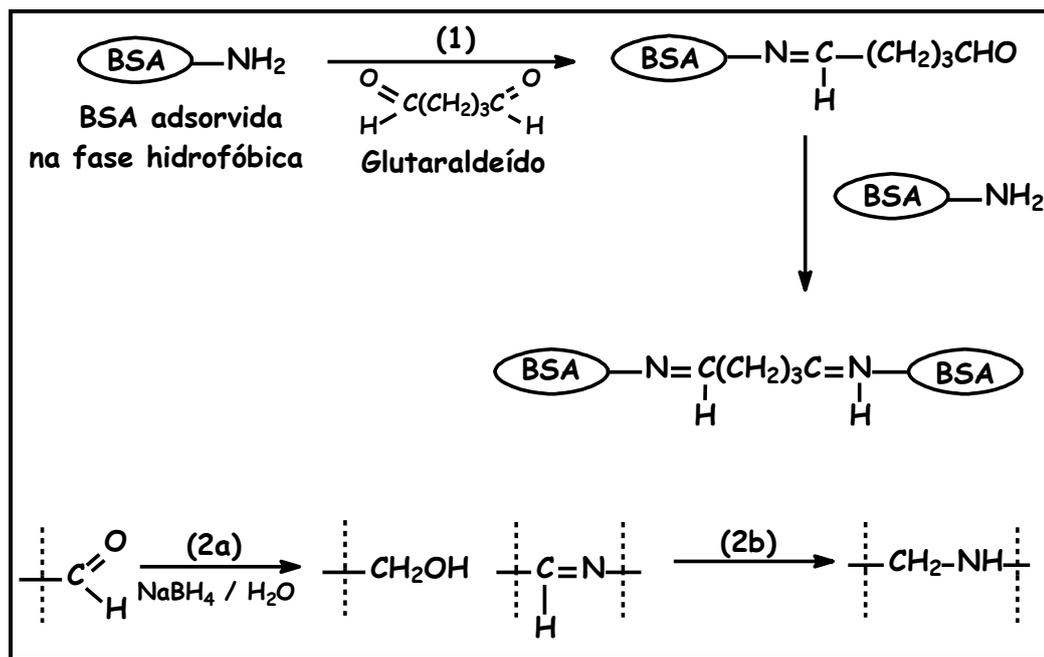
FIGURA 4.14: Etapas de preparação das colunas RAM-BSA.

Inicialmente a coluna foi condicionada com tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 mol/L; pH 6,0) e, na sequência, albumina sérica bovina (BSA) foi imobilizada *in situ* na fase hidrofóbica através de cromatografia frontal.

Após a imobilização da BSA, esta foi reagida com uma solução de glutaraldeído (25% v/v). A reação dos grupos aminas livres da albumina com o glutaraldeído resultaram na formação de iminas e, conseqüentemente, geraram ligações inter cruzadas entre albumina sérica bovina e o glutaraldeído.

Em seguida, para se evitar uma possível hidrólise da dupla ligação da base de Schiff e evitar que os grupos aldeídos residuais reajam posteriormente com compostos analisados na coluna, esses grupos foram reduzidos com uma solução de boroidreto de sódio. Após duas horas, as colunas foram eluídas com água durante 1 h e guardadas na geladeira até o momento do uso. A Figura 4.15 ilustra as reações envolvidas no preparo das colunas RAM-BSA.

A reação de inter cruzamento da proteína com glutaraldeído, seguida da reação de redução com boroidreto de sódio, é necessária uma vez que fornece às colunas maior estabilidade e durabilidade, isto porque o inter cruzamento evita a perda de proteína, que pode acontecer quando esta se encontra apenas imobilizada na superfície do suporte.



**FIGURA 4.15:** Sequência de reações para a estabilização da BSA imobilizada: (1) formação das bases de Schiff entre BSA e glutaraldeído; (2a) e (2b) redução das bases de Schiff e dos grupos aldeídos residuais.

#### 4.6.3. Exclusão das proteínas microssomais pelas colunas RAM-BSA

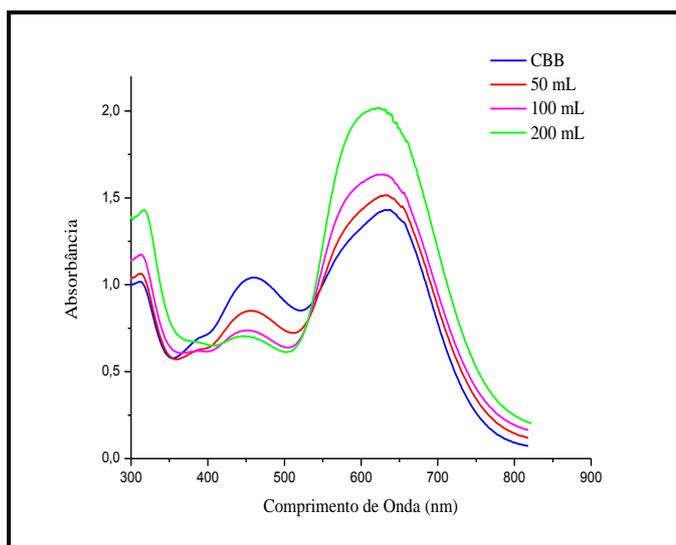
Baseado em trabalhos realizados no grupo para plasma humano<sup>87-89,113,114</sup>, plasma bovino<sup>115</sup>, leite bovino<sup>86,110</sup> e ovos de galinhas<sup>109</sup>, onde se investigou a eficiência de exclusão proteica pelas colunas RAM-BSA, o método de BRADFORD<sup>96</sup> foi também utilizado para avaliar a performance de exclusão de proteínas microssomais pelas colunas RAM-BSA do tipo C<sub>8</sub>-BSA, C<sub>18</sub>-BSA, ciano-BSA e fenil-BSA preparadas no presente trabalho.

A eficiência do poder de exclusão das proteínas microssomais (3,8 mg/mL) pelas colunas RAM-BSA preparadas, foi considerada em função da recuperação proteica.

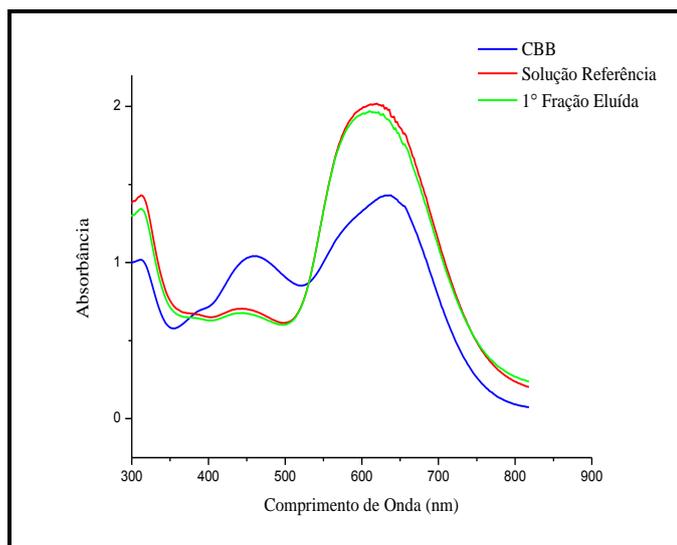
A recuperação proteica foi calculada através das absorvâncias (596 nm) do complexo corante-proteína das soluções referência de frações microssomais comparadas com as absorvâncias das frações de microssomas eluídas das colunas RAM-BSA. As soluções referência de microssomas

consistiram de alíquotas de microssomas (50, 100 e 200  $\mu\text{L}$ ) diluídas em 5,0 mL de água. Essas soluções referência forneceram a quantidade total de proteínas presentes nos microssomas (100%), tendo em vista que foram obtidas sem passar pelas colunas extratoras.

Na Figura 4.16, os espectros de ultravioleta ilustram a sensibilidade do método, para diferentes volumes de injeção de microssomas e, conseqüentemente, diferentes concentrações de proteínas, enquanto a Figura 4.17 ilustra os espectros de absorvância de duas frações de 200  $\mu\text{L}$ , uma coletada a partir da coluna RAM e a outra sendo a amostra de referência. O espectro do corante são mostrado em ambas figuras.



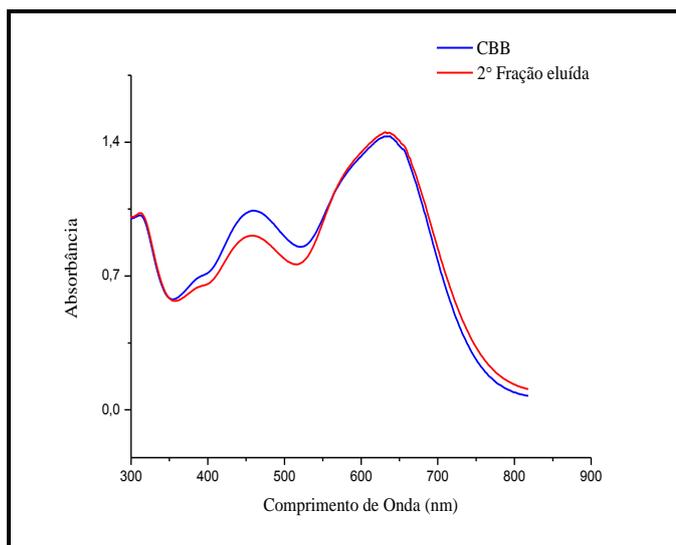
**FIGURA 4.16:** Espectros obtidos da reação do corante CBB com proteínas microssomais eluídas da coluna extratora RAM-C18-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) (100 Å, 10  $\mu\text{m}$ ). Espectros do Corante CBB com água e CBB complexado com proteínas de 50  $\mu\text{L}$ ; 100  $\mu\text{L}$  e 200  $\mu\text{L}$  de fração microssomal.



**FIGURA 4.17:** Espectros obtidos da amostra referência e da fração coletada da coluna extratora RAM-C18-BSA (5 x 0,46 cm d.i.) (100 Å, 10 µm). Espectros do Corante CBB com água; CBB complexado com proteínas de 200 µL da solução referência e CBB complexado com proteínas de 200 µL da 1ª fração eluída da coluna (0-5 min).

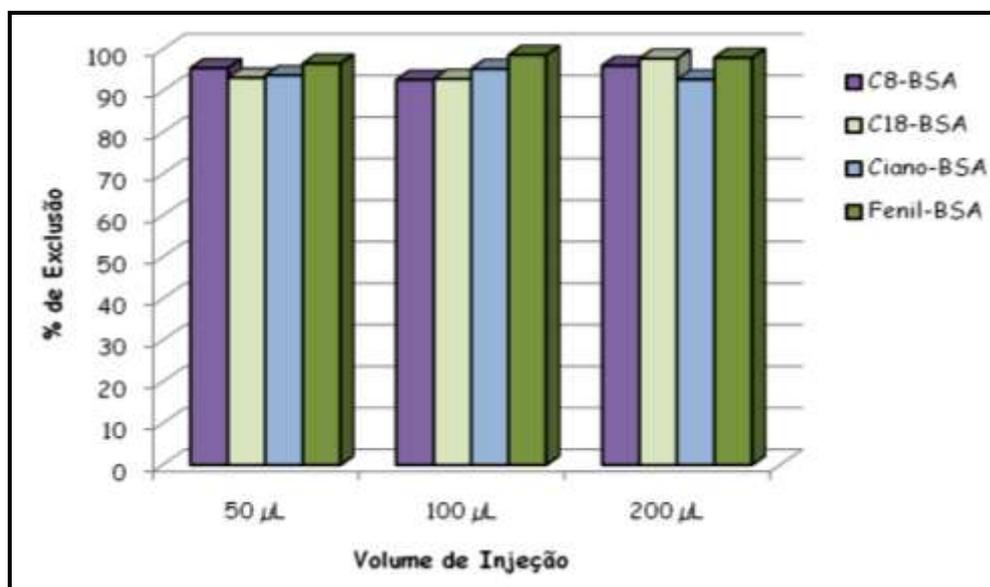
Os espectros do corante apresentados (Figura 4.16 e 4.17) permite visualizar que quando este se encontra na presença de proteínas microsossomais as bandas 470 e 650 nm do corante são deslocadas e há um aumento da absorvância na região de 596 nm.

Outro aspecto importante é que o espectro correspondente à amostra da segunda fração eluída da fração microsossomal (5-10 min) complexada com o corante é muito similar ao espectro do próprio corante (Figura 4.18). Isto sugere, qualitativamente, a ausência de proteínas nesta fração que foi coletada após 5 min de eluição e pode ser confirmada pelo cálculo das porcentagens de exclusão das proteínas pelas colunas extratoras (Tabela 4.8).



**FIGURA 4.18:** Comparação entre os espectros do corante-proteína da segunda fração de microsomas eluído pela coluna extratora RAM-C<sub>18</sub>-BSA (100 Å, 10 µm) (5-10 min) e do corante CBB com água. Volume de injeção: 200 µL

A Figura 4.19 e a Tabela 4.8 ilustram as porcentagens de exclusão, em função dos volumes de injeção, entre as colunas extratoras do tipo RAM-BSA.



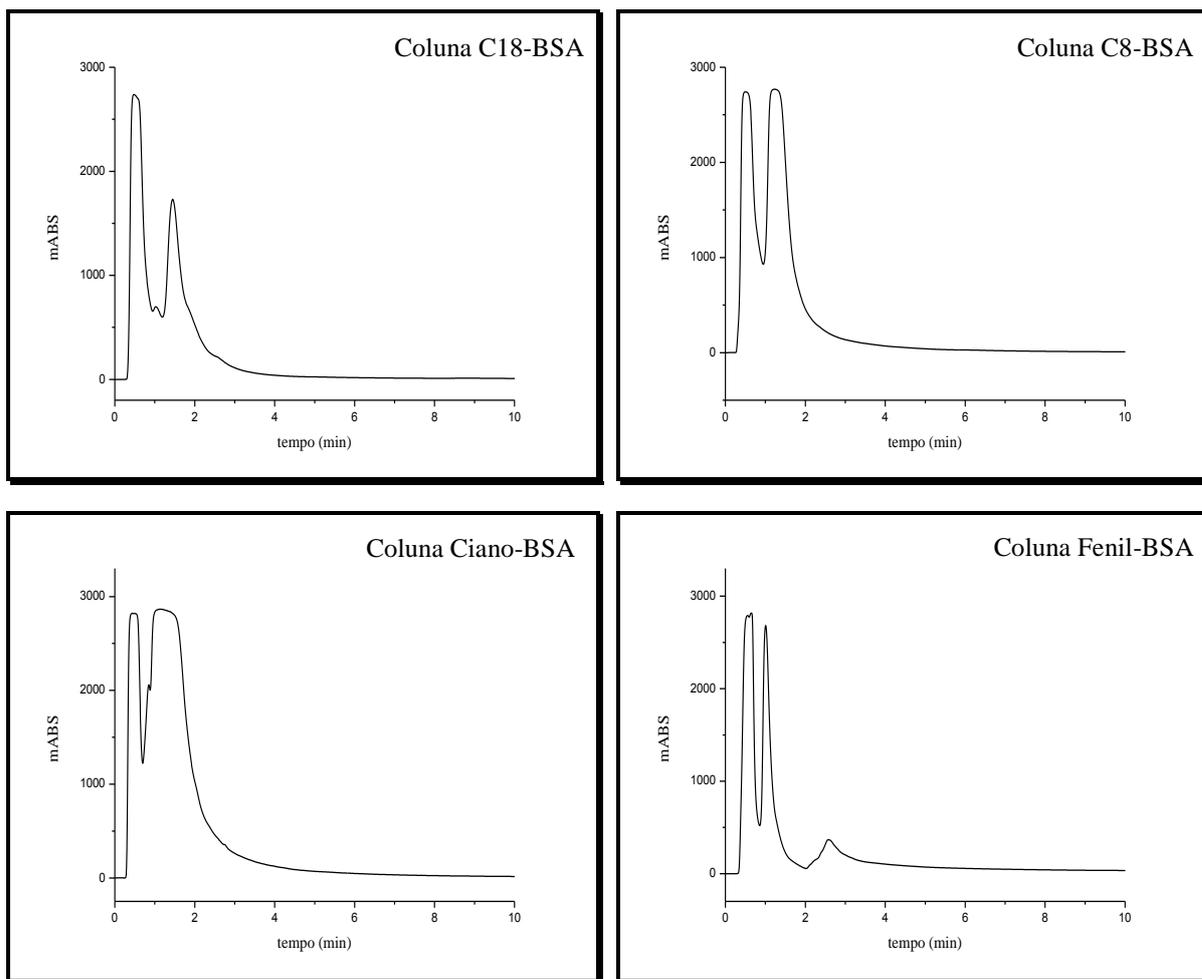
**FIGURA 4.19:** Porcentagens de proteínas microsossomais excluídas das colunas RAM-BSA utilizando água como fase móvel, na primeira fração eluída de (0-5 min).

**TABELA 4.8:** Porcentagens de proteínas microsossomais excluídas das colunas RAM-BSA, utilizando água como fase móvel, na primeira fração eluída (0-5 min) e respectivos coeficientes de variação das injeções.

Coluna	Volume de Fração Microsossomal Injetado na Coluna					
	50 $\mu$ L		100 $\mu$ L		200 $\mu$ L	
	Média	CV(%)	Média	CV(%)	Média	CV(%)
C <sub>8</sub> -BSA	95,5	1,16	92,7	1,20	96,1	0,670
C <sub>18</sub> -BSA	93,2	0,840	92,9	1,78	97,8	1,26
Ciano-BSA	93,8	0,700	95,3	0,590	92,8	0,770
Fenil-BSA	96,6	2,18	98,7	1,18	98,0	0,700

Os resultados percentuais obtidos para as quatro colunas RAM-BSA (Tabela 4.8) demonstraram que estas fases possibilitam a exclusão das proteínas presentes nas frações microsossomais, onde a média de exclusão obtida foi de 95%, nos cinco primeiros minutos de análise e as segundas frações coletadas (5-10 min) não indicaram a presença de proteínas.

A Figura 4.20 mostra os perfis cromatográficos das exclusões proteicas das frações microsossomais, usando as quatro colunas RAM-BSA preparadas e água como fase móvel, com vazão de 1,0 mL/min, medidos a 280 nm por ser o máximo de absorvância das proteínas microsossomais.



**FIGURA 4.20:** Cromatogramas dos perfis de eluição da fração microsomal nas colunas RAM-BSA. Fase Móvel: água; vazão: 1,0 mL/min;  $\lambda=280$  nm; volume de injeção: 200 $\mu$ L.

Com a exclusão proteica obtida para as fases imobilizadas com BSA, pode-se inferir que as colunas RAM-BSA mostraram ser satisfatórias no que diz respeito a sua utilização como colunas extratoras para o desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida com injeção direta de frações microsomais.

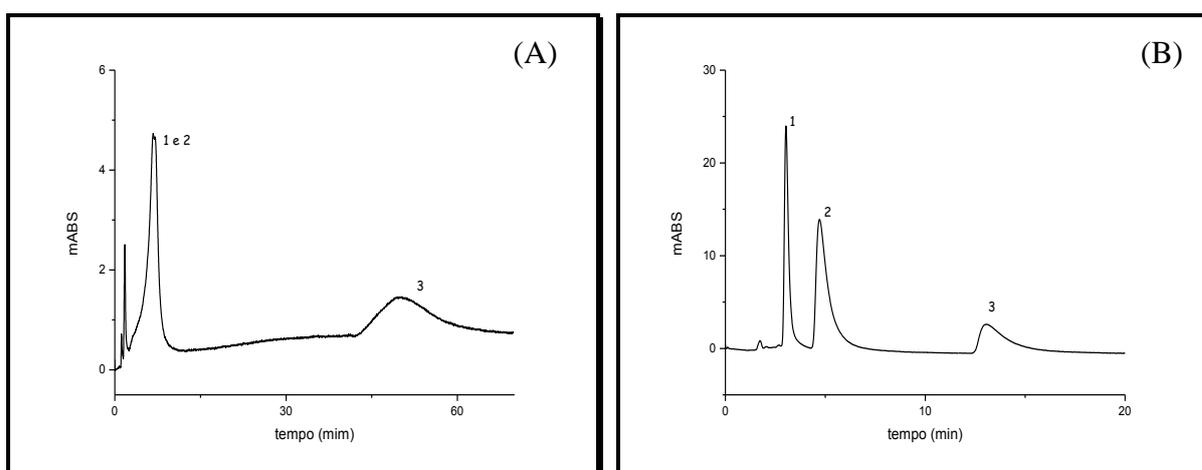
#### 4.7. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ABZ

Para o desenvolvimento do método, primeiramente avaliou-se diferentes fases estacionárias em diferentes fases móveis com intuito de se obter

a seletividade desejada para os compostos de interesse: albendazol (ABZ), albendazol sulfóxido (ABZ-SO), albendazol sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>) e albendazol 2-amino-sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

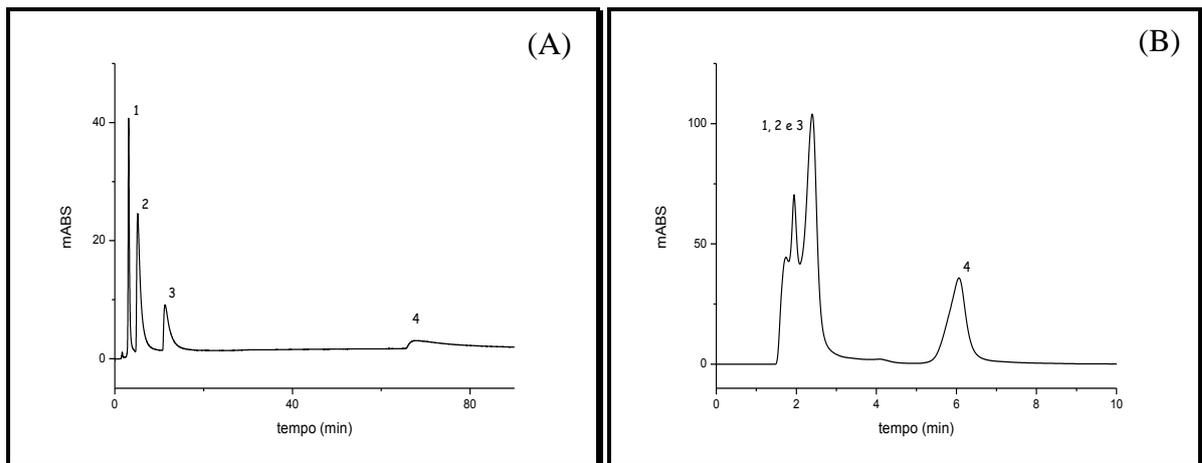
A primeira fase estacionária avaliada foi uma coluna C18 Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm) utilizando-se MeOH/Água (40:60) como eluente. O resultado obtido mostrou uma coeluição do ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, enquanto que o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> apresentou um tempo de retenção muito elevado e o ABZ não eluiu da coluna durante os 80 minutos de análise com essa fase móvel (Figura 4.21A). Como alternativas, aumentou-se a força da fase móvel para MeOH/Água (60:40) e adicionou-se 0,5% de ácido acético (HAc) à mesma<sup>117,118</sup>. Outros aditivos foram também testados como o uso de ácido trifluoracético e ácido fosfórico<sup>45</sup>, porém nenhum deles apresentaram resultados satisfatórios.

A seletividade entre ABZ-SO<sub>2</sub> e ABZ-SO melhorou significativamente com o emprego de um aditivo ácido, porém os tempos de retenção ainda não estavam adequados, uma vez que o ABZ apresentava um fator de retenção (k) muito elevado (Figura 4.21 B).



**FIGURA 4.21:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3). Coluna C18 Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm). Fase Móvel: (A) MeOH/Água (40:60); (B) MeOH/Água (60:40) + 0,5% HAc, Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm.

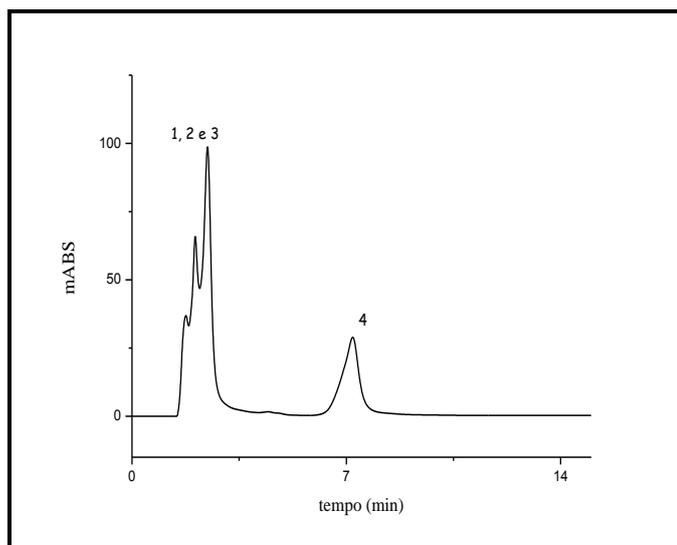
Observou-se que com o aumento da concentração de HAc ou com a adição de um aditivo básico, como a trietilamina (TEA), favorecia-se a diminuição da retenção do ABZ. A Figura 4.22 ilustra dois cromatogramas com emprego de MeOH/Água (60:40) com a adição 1% de HAc (A) e com a adição de 1% de trietilamina (TEA) (B).



**FIGURA 4.22:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna C18 Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm). Fase Móvel: (A) MeOH/Água (60:40) + 1% HAc; (B) MeOH/Água (60:40) + 1% TEA. Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm.

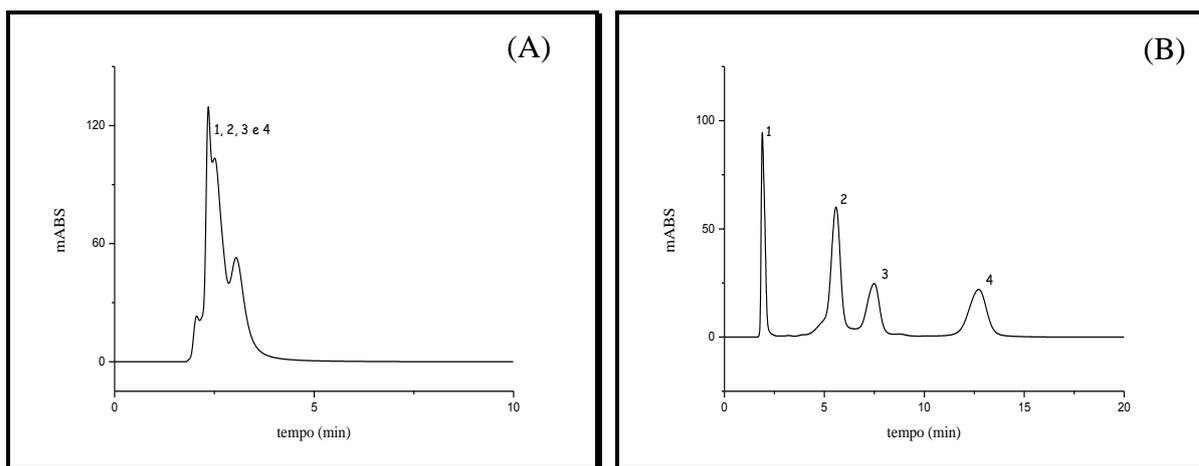
Pode-se observar (Figura 4.22 A-B) que a substituição do aditivo de HAc por TEA ocasionou uma significativa redução do tempo de retenção do ABZ, sendo que este passou de 70 para cerca 8 min. No entanto, houve também uma perda de seletividade para a determinação de ABZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub> e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (Figura 4.22 B)

Com esses resultados optou-se por também realizar uma mistura de diferentes proporções de HAc e TEA, a fim de se obter a seletividade e tempo de retenção adequados, porém nenhuma das possibilidades testadas mostrou-se eficiente para separação simultânea dos analitos de interesse. A Figura 4.23 mostra um cromatograma onde foi avaliado MeOH/Água (60:40) + 1% HAc + 1% TEA.



**FIGURA 4.23:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2), ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna C18 Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm). Fase Móvel: (A) MeOH/Água (60:40) + 1% HAc + 1% TEA. Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm.

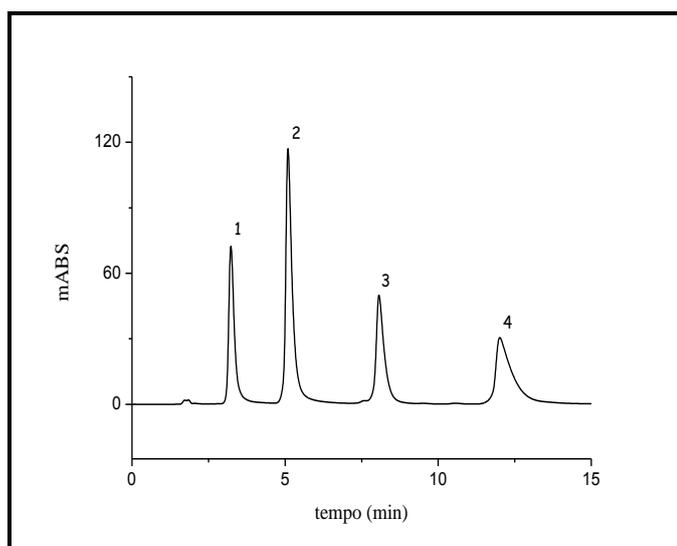
Outras duas fases estacionárias foram também avaliadas com adição de HAc e TEA e suas misturas: a coluna Ciano Nucleosil (10µm, 15 x 0,46, cm d.i) e a coluna Hexilfenil Luna (10µm, 15 x 0,46 cm d.i.). A Figura 4.24 mostra a melhor condição cromatográfica obtida em cada uma delas.



**FIGURA 4.24:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). (A) Coluna Ciano Nucleosil (10µm, 15 x 0,46 cm d.i). Fase Móvel: MeOH/Água (50:50) + 4% HAc + 0,01% TEA e em (B) Coluna Hexilfenil Luna (10µm, 15 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Água (50:50) + 2% HAc. Vazão: 1,0 mL/min e λ: 290 nm.

Pelos vários resultados negativos obtidos, concluiu-se que a coluna ciano não é uma boa escolha para a separação dos compostos de interesse, mesmo fazendo uso de diferentes porcentagens dos aditivos ácido e básico na fase móvel (Figura 4.24 A). Já a coluna hexilfenil (Figura 4.24 B) se mostrou bastante eficiente para a separação desejada, porém as bandas cromatográficas mostraram elevados fatores de assimetria (As) para a análise destes compostos.

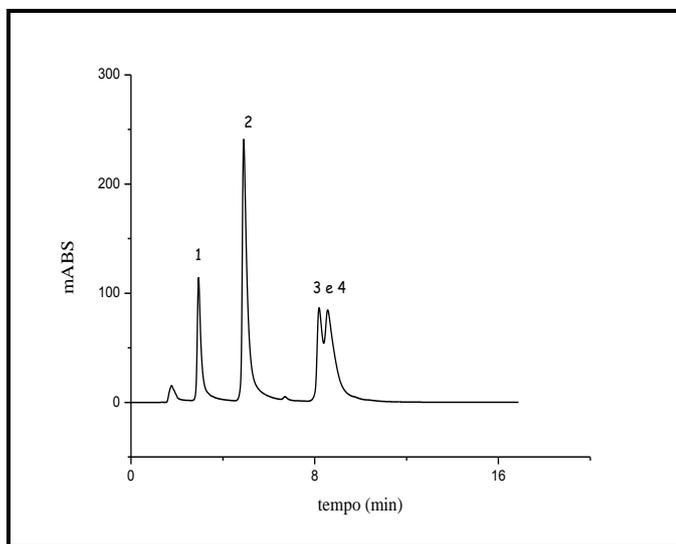
Com intuito de se obter a seletividade desejada, com tempos de retenção adequados e boa simetria das bandas, avaliou-se ainda uma coluna Fenil Hypersil (5 $\mu$ m, 15 x 0,46 cm d.i.), fazendo uso das melhores condições cromatográficas conseguidas para a coluna Hexilfenil. A separação cromatográfica obtida está apresentada na Figura 4.25.



**FIGURA 4.25:** Cromatograma da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna Fenil Hypersil (5 $\mu$ m, 15 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Água (50:50) + 2% HAc. Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm.

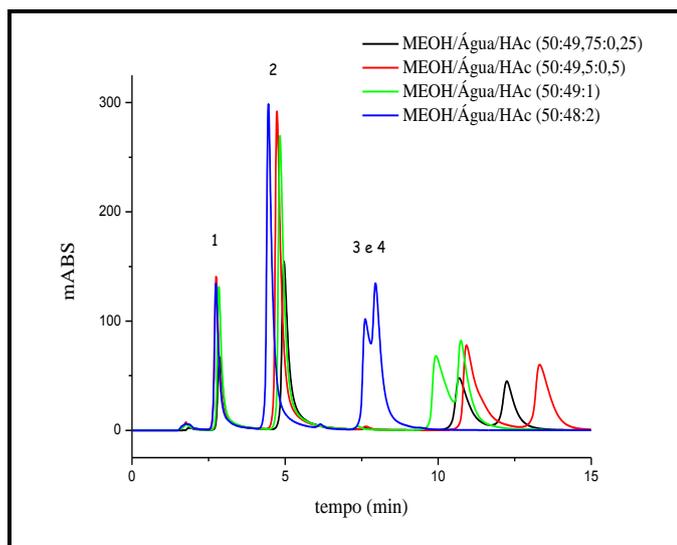
A Figura 4.25 ilustra a eficiência cromatográfica da coluna Fenil em separar o ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub> e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, porém entre dias, a seletividade e os fatores de retenção não eram reprodutíveis, o que apontou para a necessidade de também conduzir um estudo da influência da temperatura, paralelamente à concentração de ácido acético, tendo em vista que estes

compostos são ionizáveis e facilmente influenciados por estes dois fatores (Figura 4.26).

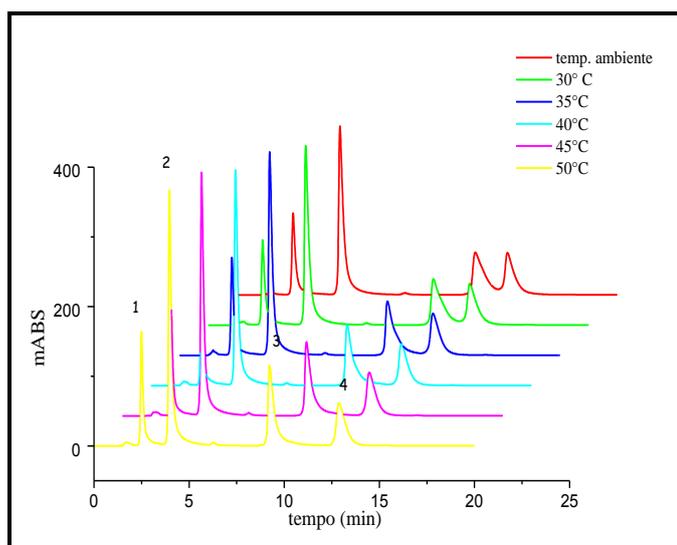


**FIGURA 4.26:** Cromatograma da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna Fenil Hypersil (5 $\mu$ m, 15 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Água (50:50) +2% HAc. Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm.

Avaliaram-se as porcentagens de 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 % de HAc nas temperaturas de aproximadamente 23° (temp. ambiente); 30; 35; 40; 45 e 50°C, conforme ilustrado nas Figuras 4.27 e 4.28.



**FIGURA 4.27:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2), ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna Fenil Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm d.i.). 1,0 mL/min e λ: 290 nm.°



**FIGURA 4.28:** Cromatogramas da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2), ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4). Coluna Fenil Hypersil (5µm, 15 x 0,46 cm d.i.). Fase Móvel: MeOH/Água/HAc (50:49,05:0,5). 1,0 mL/min e λ: 290 nm.

Os cromatogramas da Figura 4.27 mostram a influência da porcentagem de HAc na resolução entre as bandas cromatográficas do ABZ e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>. Pode-se observar que quanto maior a porcentagem do ácido, menor é a resolução das bandas cromatográficas.

Na análise da influência da temperatura (Figura 4.28), observa-se que este parâmetro também influencia significativamente na resolução do ABZ e

ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, ou seja, quanto maior a temperatura da coluna maior a resolução destes dois compostos. Já para a separação do ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> observa-se o comportamento contrário, onde, quanto maior a temperatura menor é a resolução destes dois metabólitos. Isso mostra que a ionização dos compostos e a diminuição da viscosidade com aumento da temperatura influenciam diferentemente os compostos analisados.

A partir dos resultados obtidos, optou-se por trabalhar com a condição cromatográfica de MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5) como eluente, na temperatura de 37°C e a coluna analítica passou a ser empregadas no modo multidimensional de análise.

#### 4.8. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE MULTIDIMENSIONAL PARA A DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ABZ EM FRAÇÕES MICROSSOMAS

Em CLAE, a Cromatografia Multidimensional é utilizada através do acoplamento de duas ou mais colunas, com mecanismos de separação diferentes. As colunas são escolhidas em função das propriedades dos compostos a serem analisados. Este tipo de cromatografia tem sido muito utilizado para a extração *on-line* de amostras em matrizes biológicas.<sup>119</sup>

Há três maneiras predefinidas para a utilização de Cromatografia Multidimensional:

- **On-line:** Consiste na utilização de duas ou mais colunas interligadas por válvulas;
- **In-line:** é a utilização de duas ou mais colunas sem ligações com válvulas, similar à utilização de uma ou mais pré-colunas no sistema;
- **Off-line:** é sempre a última escolha, quando não se consegue ajustar as condições para um sistema com colunas acopladas. Separam-se

inicialmente os compostos de interesse, coletam-se os mesmos, concentra-se e injeta-se em um segundo sistema para análise.

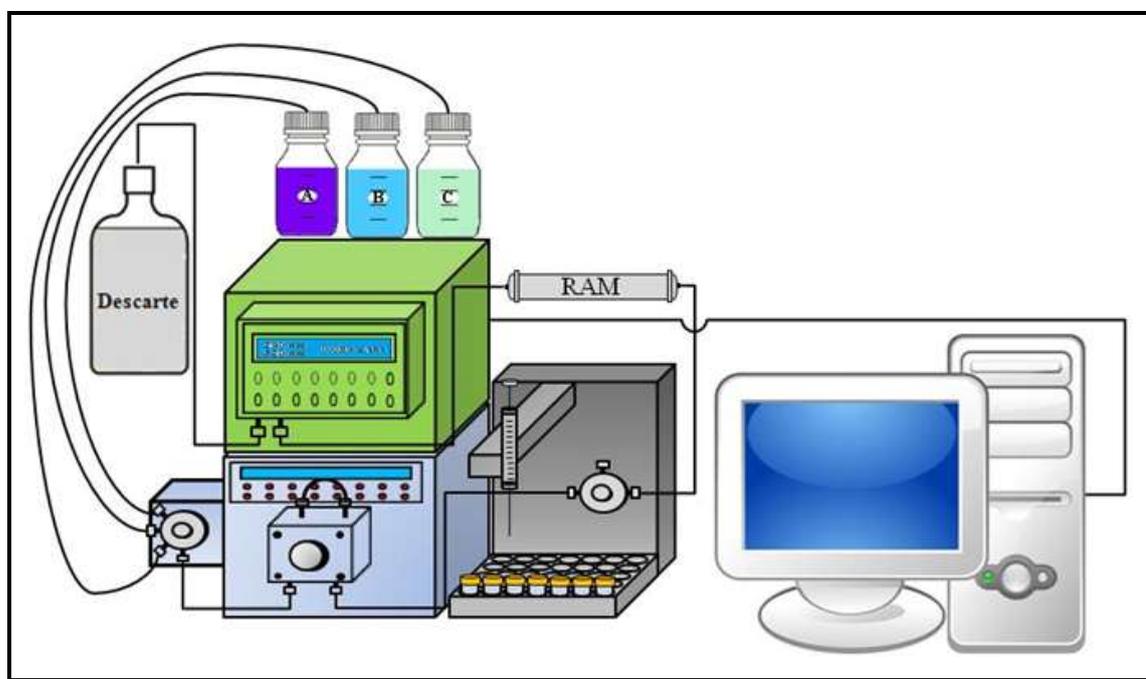
Um estudo conduzido por ANDRADE *et al*<sup>120</sup> em leite bovino para análise de sulfametoxazol e trimetoprima, utilizou-se do acoplamento *on-line* com o emprego de uma coluna RAM-C8-BSA para a exclusão das proteínas, na primeira dimensão, e a quantificação foi realizada com um detector amperométrico com eletrodo de diamnte dopado com boro, utilizando uma coluna C8 na segunda dimensão, como coluna analítica.

Outro exemplo do acoplamento *on-line* entre uma coluna extratora e uma coluna quiral, cita-se a análise dos enantiômeros do lansoprazol<sup>90</sup> através do acoplamento de uma coluna RAM-C8-BSA a uma coluna *tris*(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose, onde foi possível fazer a quantificação dos enantiômeros do lansoprazol em plasma humano. Neste trabalho o plasma foi injetado diretamente na fase de acesso restrito e as proteínas plasmáticas foram excluídas no volume morto da coluna. Após a exclusão proteica, os compostos foram transferidos para a coluna quiral e quantificados, sendo o acoplamento *on-line* escolhido para o desenvolvimento do método.

Para o desenvolvimento de métodos para a análise de fármacos e/ou metabólitos em fluidos biológicos através da cromatografia multidimensional *on-line*, faz-se necessário à investigação e ajuste de vários parâmetros. Inicialmente deve-se selecionar a fase móvel adequada para que se obtenha as melhores condições de exclusão proteica, assim como, a exclusão de compostos interferentes. Posteriormente, deve-se avaliar a fase móvel que será utilizada na extração das micromoléculas de interesse da coluna de acesso restrito, com um adequado tempo de retenção e finalmente, as condições de vazão e fase móvel relacionada à análise dos compostos de interesse na coluna analítica para, então, ser realizada a análise multidimensional.

Em análises envolvendo matrizes biológicas, no modo multidimensional, o ideal é que a transferência do analito de interesse para a coluna analítica ocorra em um menor tempo possível, evitando a interferência de compostos endógenos. Além disso, quando as colunas RAM-BSA e analíticas estão acopladas, ocorre uma mistura das fases móveis que, dependendo do tempo de acoplamento, pode influenciar a análise na coluna analítica.

Neste trabalho, primeiramente foram avaliadas a exclusão das proteínas das frações microssomais e a extração dos enantiômeros do ABZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub> e ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, nas colunas RAM-BSA preparadas (C8, C18, ciano e fenil). A configuração do sistema cromatográfico utilizado é a apresentada na Figura 4.29, e as condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 4.9.



**FIGURA 4.29:** Diagrama esquemático do sistema utilizado para determinar as condições cromatográficas de exclusão das macromoléculas e extração dos compostos de interesse das frações microssomais.

**TABELA 4.9:** Condições cromatográficas utilizadas para a exclusão proteica e eluição dos analitos das colunas RAM-BSA selecionadas para o estudo.

Linha da Bomba	Tempo (min)	Evento
A	0,00 - 5,00	Exclusão das proteínas pela coluna RAM selecionada
B	5,01 – 20,00	Eluição dos analitos retidos na coluna RAM-BSA
C	20,00 – 25,00	Limpeza da coluna RAM-BSA
A	25,00 – 30,00	Condicionamento da coluna RAM-BSA

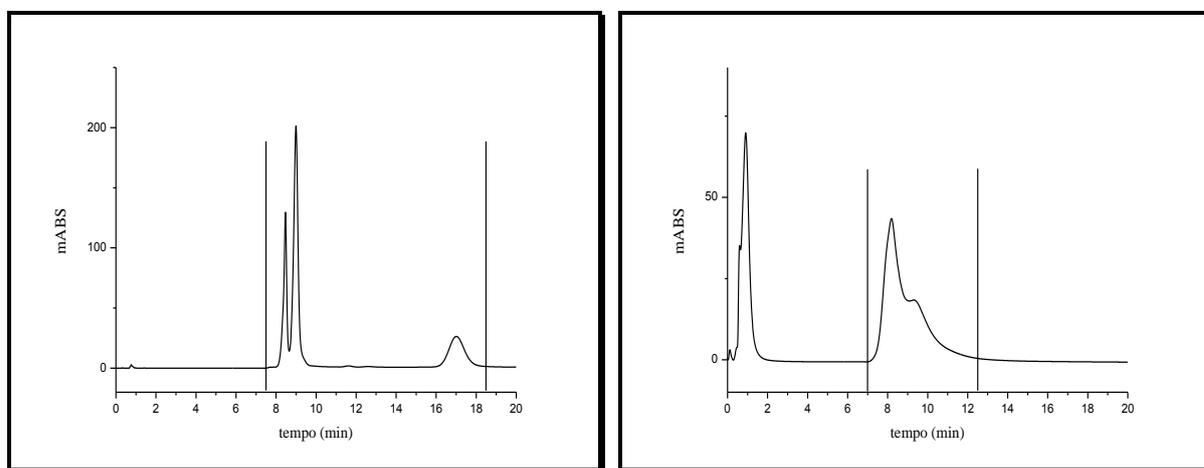
Linha A: Água 100%

Linha B: MeOH/Água (50:50)

Linha C: MeOH/Água/ISO (75:15:10)

Vazão de 1,0 mL/min

A Figura 4.30 ilustra dois cromatogramas em diferentes colunas RAM-BSA avaliadas para extração dos analitos.



**FIGURA 4.30:** Cromatogramas do tempo de acoplamento para a extração dos analitos das colunas RAM-BSA (5,0 x 0,46 cm). (A) Coluna RAM-C8-BSA e (B) RAM-Fenil-BSA

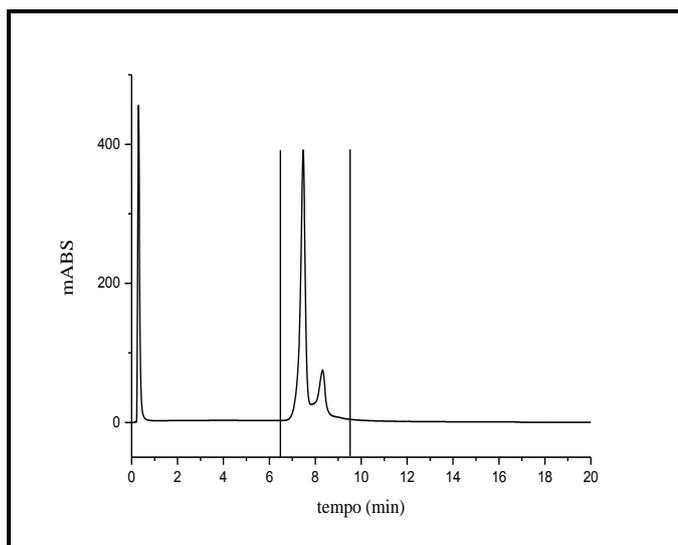
A Tabela 4.10 mostra os tempos de acoplamento de diferentes colunas extratoras, ou seja, o tempo necessário para transferir todos os analitos de interesse da coluna extratora, na primeira dimensão, e transferi-los para a coluna analítica.

**TABELA 4.10:** Tempos de acoplamento para as diferentes RAM-BSA avaliadas

<b>Colunas RAM-BSA</b>	<b>Tempo de Acoplamento (min)</b>
C8 (5,0 x 0,46 cm)	7,5 - 18,5
C18 (5,0 x 0,46 cm)	7,5 - 19,0
Ciano (5,0 x 0,46 cm)	6,5 - 12,5
Fenil (5,0x 0,46 cm)	7,0 - 12,5

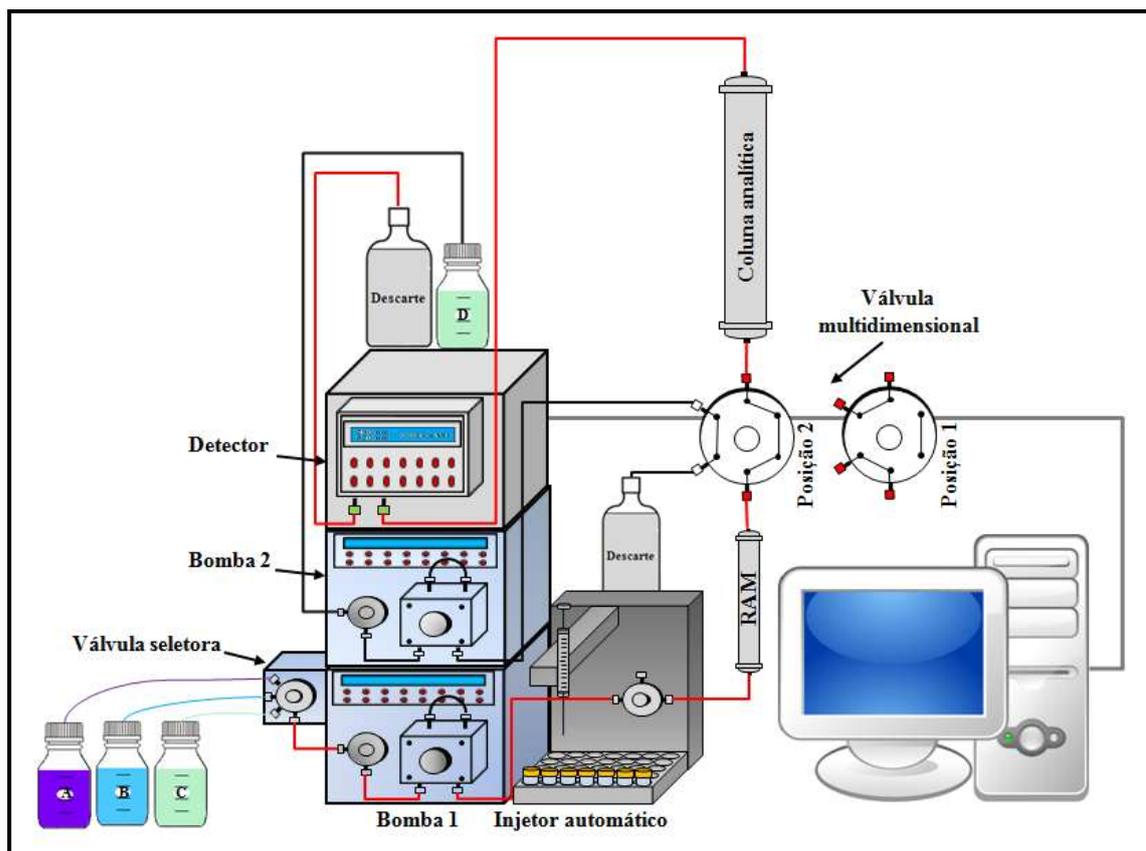
Pela Tabela 4.10, verifica-se que todos os tempos de acoplamento apresentam um amplo intervalo de tempo, o que pode prejudicar a separação analítica com um tempo total de análise longo, causar um alargamento das bandas cromatográficas e ainda transferir para a coluna analítica interferentes, que possam atrapalhar a quantificação dos compostos de interesse.

Como a coluna RAM-fenil-BSA foi uma das que mostrou o menor tempo de acoplamento, optou-se por diminuir o tamanho desta coluna de 5,0 para 1,0 cm, com o objetivo de também diminuir o tempo de acoplamento entre as colunas. Assim, observou-se que o tempo de acoplamento que era de 7,0-12,5 min para uma coluna de 5,0 cm diminuiu para 6,5-9,5 em uma coluna de 1,0 cm, como mostra a Figura 4.31.<sup>88</sup>



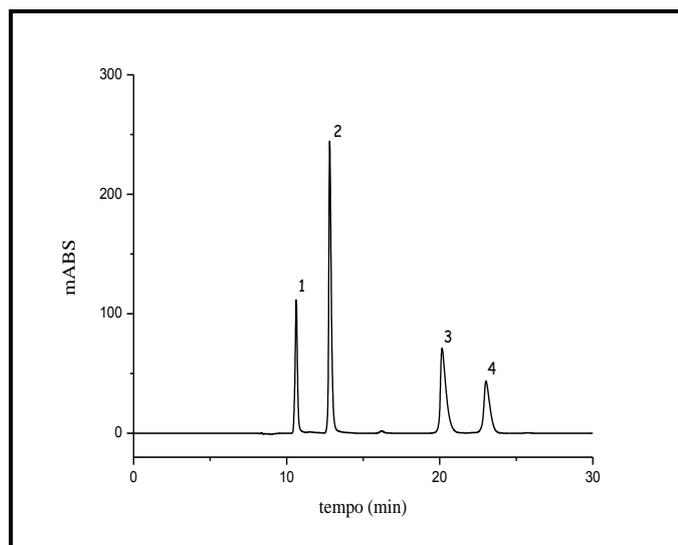
**FIGURA 4.31:** Cromatograma do tempo de acoplamento para a extração dos analitos das colunas RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm)

Utilizando-se um sistema cromatográfico multidimensional, composto por duas bombas (Figura 4.32), acoplou-se a coluna RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm d.i.) à coluna Fenil Hypersil (15,0 x 0,46 cm d.i.). A fase móvel utilizada na coluna analítica foi MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5).



**FIGURA 4.32:** Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o acoplamento das colunas RAM-BSA e analítica. Posição 1: colunas não acopladas; Posição 2: colunas acopladas.

O cromatograma obtido após o acoplamento das duas colunas (6,5–9,5 min) está ilustrado na Figura 4.33.



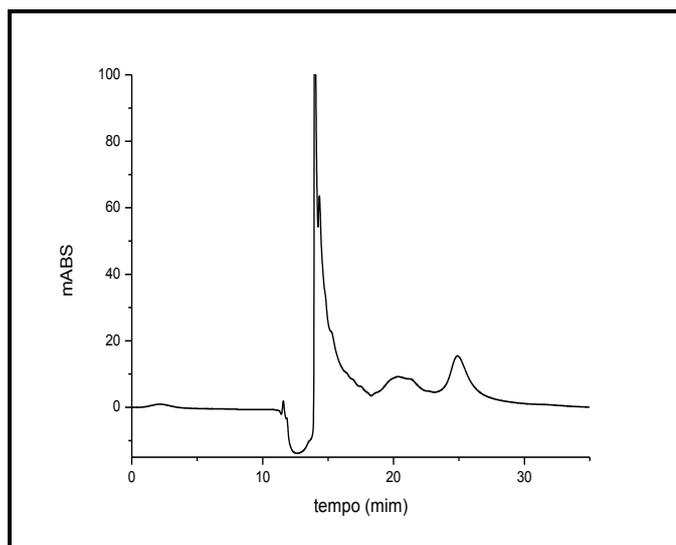
**FIGURA 4.33:** Cromatograma da separação do ABZ-SO<sub>2</sub> (1), ABZ-SO (2) e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (3) e ABZ (4), com acoplamento das colunas RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm d.i.) e Fenil Hypersil (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) Água; (B) MeOH/Água (50:50) e (C): MeOH/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 100 µL;  $\lambda_{exc}$ : 290 e  $\lambda_{em}$ : 320 nm.

Pequenas alterações foram necessárias quando se passou da análise das amostras preparadas em solvente para amostras preparadas em frações microssomais e as condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 4.11.

**TABELA 4.11:** Condições cromatográficas utilizadas, no sistema multidimensional, para a exclusão proteica e eluição dos analitos da coluna RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm d.i.) e para a análise do albendazol e seus metabólitos na coluna Fenil Hypersil (15,0 x 0,46 cm d.i.). Temperatura de 37°C.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Evento</b>
<b>BOMBA 1</b>	
0,00 - 5,00	FM: 100% Água [exclusão das proteínas pela coluna RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm d.i.)]; vazão de 1,0 mL/min
5,01–10,00	FM: MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5) (extração e transferência dos compostos da coluna RAM-Fenil-BSA); vazão de 1,0 mL/min
6,50–9,75	FM: MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5) [acopamento da coluna RAM-Fenil-BSA com a coluna analítica]; vazão de 1,0 mL/min
10,00–15,00	FM: MeOH/Água/ISO (75:15:10) (limpeza da coluna RAM-Fenil-BSA); vazão de 1,0 mL/min
15,00-25,00	FM: Água 100% (condicionamento da coluna RAM-Fenil-BSA); vazão de 1,0 mL/min
<b>BOMBA 2</b>	
0,00–8,00	FM: MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5) [condicionamento da coluna analítica Fenil Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.)];
8,00–25,00	FM: MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5) (análise do ABZ, ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , ABZ-SO <sub>2</sub> e ABZ-SO), detecção fluorescência excitação: 290 nm e emissão: 320 nm

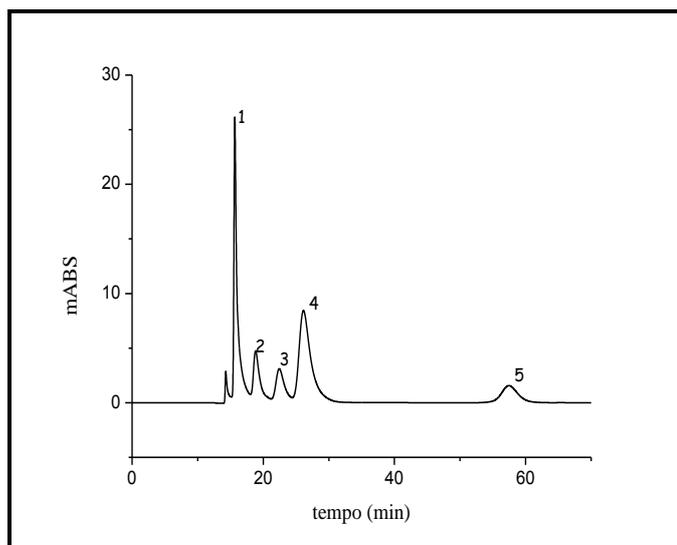
Com estas condições cromatográficas para a análise simultânea do ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub> e ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> avaliou-se a seletividade do método desenvolvido, afim de se verificar a ausência de interferentes coeluinto com os analitos de interesse (Figura 4.34).



**FIGURA 4.34:** Cromatograma obtido do microsossoma branco, com acoplamento das colunas RAM-Fenil-BSA (1,0 x 0,46 cm d. i.) e Fenil Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) Água; (B) MeOH/Água (50:50) e (C): MeOH/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): MeOH/Água/HAc (50:49,5:0,5). Vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 100  $\mu$ L;  $\lambda_{exc}$ : 290 e  $\lambda_{em}$ : 320 nm.

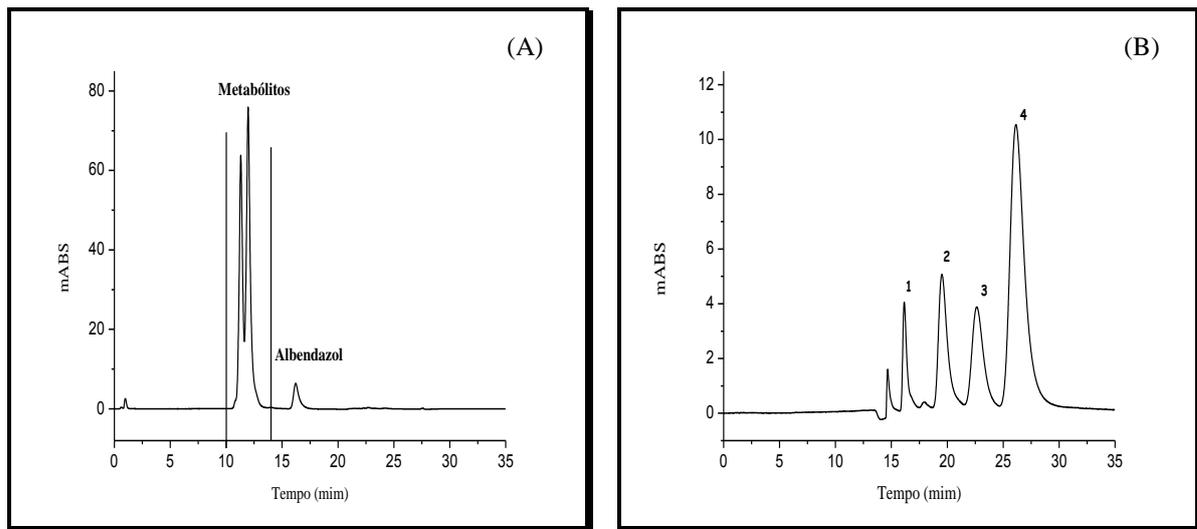
A Figura 4.34 mostra a falta de seletividade obtida com o método desenvolvido e que a coluna RAM-fenil-BSA (1,0 x 0,45 cm) transferiu conjuntamente alguns dos interferentes da fração microsossomal. Diferentes fases móveis e colunas extratoras e analíticas foram avaliadas neste tipo de acoplamento com o objetivo de melhorar a seletividade do método, porém não se obteve sucesso. Desta forma, considerando-se o fato de que um dos metabólitos do ABZ, o ABZ-SO é quiral, e que a investigação enantiosseletiva do efeito da restrição proteica no metabolismo *in vitro* seria importante, utilizou-se as mesmas condições de análise previamente estabelecidas por BELAZ *et al.*<sup>115</sup> para a determinação destes compostos em plasma bovino, através do emprego de uma coluna quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

O cromatograma da Figura 4.35 mostra a determinação do ABZ e seus metabólitos, onde a análise cromatográfica foi de 70 min, sendo o último analito o ABZ, mais retentivo devido às suas propriedades físico-químicas, sendo este apolar.



**FIGURA 4.35:** Cromatograma obtido da fração microsomal fortificada com 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (1), 5  $\mu\text{g/mL}$  do (+)-ABZ-SO (2), 5  $\mu\text{g/mL}$  do (-)-ABZ-SO (3), 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ABZ-SO<sub>2</sub> (4) e 5,0  $\mu\text{g/mL}$  do ABZ com acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm.

Para a diminuição do tempo total de análise de 70 para 35 minutos, o método foi desenvolvido e validado somente na presença dos metabólitos do ABZ, sendo este eliminado durante a etapa de transferência dos analitos (Figura 4.36 A). A separação cromatográfica multidimensional dos analitos está mostrado na Figura (4.36 B).



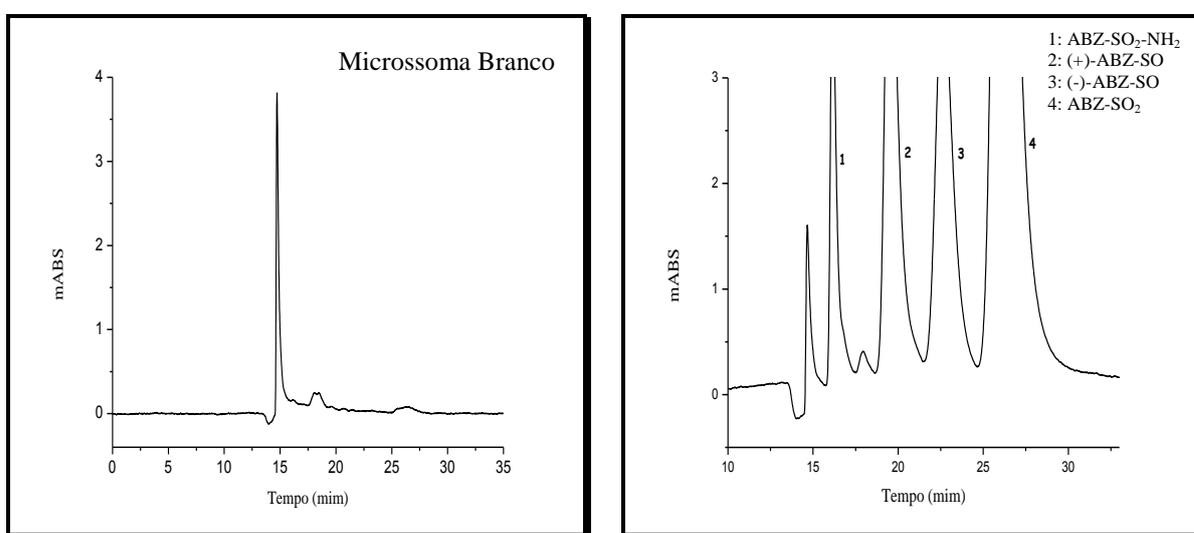
**FIGURA 4.36:** Cromatograma obtido para a análise dos metabólitos do ABZ em fração microsossomal. (A) matriz microsossomal fortificada com analitos e análise na coluna RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) para verificação do tempo de acoplamento e (B) fração microsossomal fortificada com 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (1), 5 µg/mL do (+)-ABZ-SO (2), 5 µg/mL do (-)-ABZ-SO (3), 5,0 µg/mL ABZ-SO<sub>2</sub> (4) e análise total após acoplamento das colunas RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm.

#### 4.9. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Com as condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação simultânea dos metabólitos do albendazol em frações microsossomais: ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, o método analítico foi validado de acordo com o protocolo proposto pelo FDA<sup>98</sup> e pela ANVISA<sup>99</sup> para métodos bioanalíticos. As figuras de mérito analítico avaliadas foram as mesmas utilizadas anteriormente, sendo estas: seletividade, linearidade, recuperação, precisão e exatidão, limites de quantificação e detecção.

### 4.9.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de amostras de frações microssomais, livre dos analitos, com análises da matriz biológica fortificada com os analitos. Os cromatogramas estão apresentados na Figura 4.37 e mostra ser seletivo para as quatro bandas cromatográficas, não apresentando interferentes para nenhum dos composto a ser quantificado.

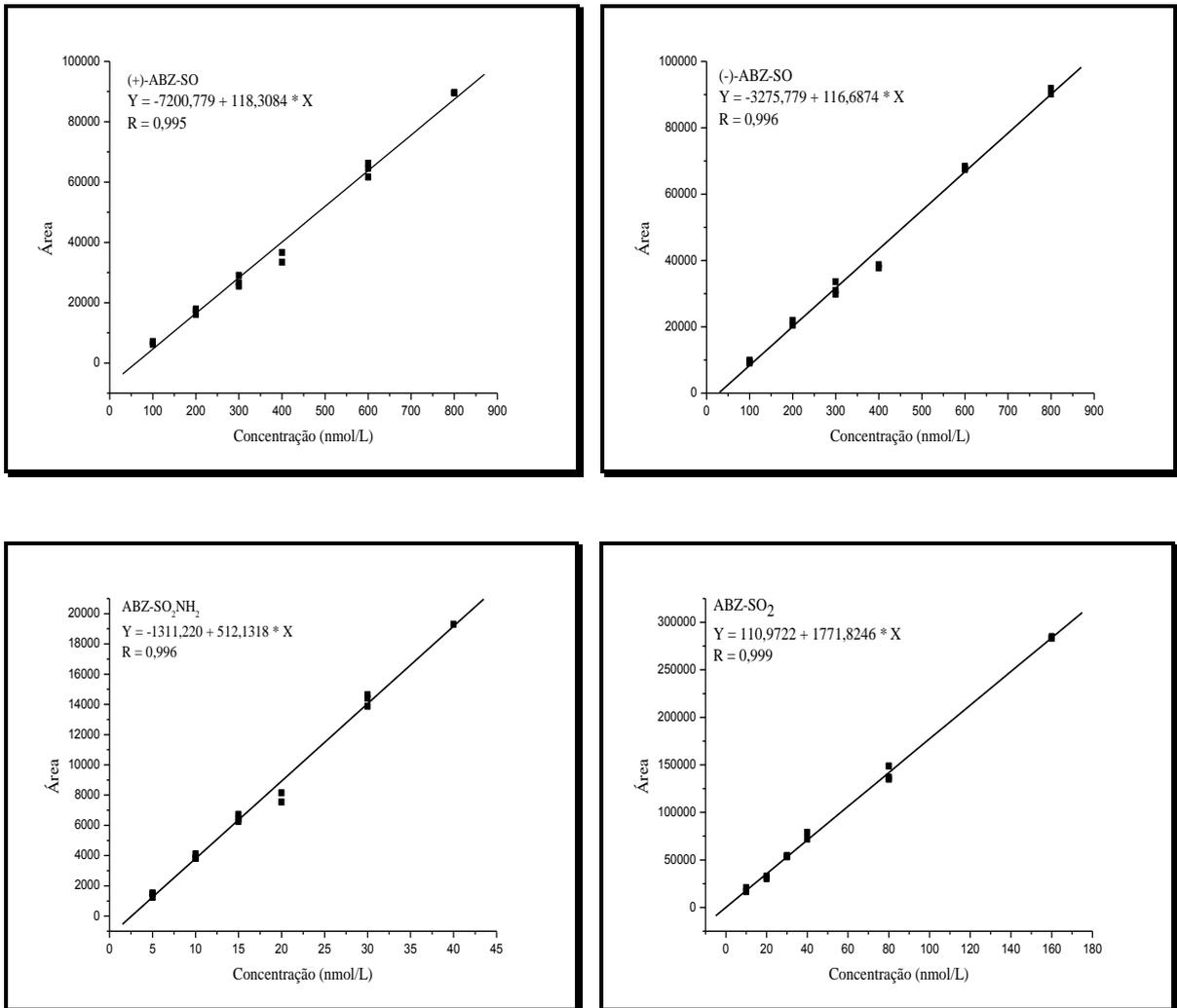


**FIGURA 4.37:** Cromatograma obtido do microssoma branco e do microssoma fortificado com 5,0  $\mu\text{g/mL}$   $\text{ABZ-SO}_2\text{-NH}_2$  (1), 5  $\mu\text{g/mL}$  do (+)- $\text{ABZ-SO}$  (2), 5  $\mu\text{g/mL}$  do (-)- $\text{ABZ-SO}$  (3), 5,0  $\mu\text{g/mL}$   $\text{ABZ-SO}_2$  (4), com acoplamento das colunas  $\text{RAM-C}_8\text{-BSA}$  (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5): $\text{ACN}$  (60:40) e (C):  $\text{ACN}/\text{Água}/\text{ISO}$  (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5): $\text{ACN}$  (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm.

### 4.9.2. Linearidade

As curvas de calibração para o  $\text{ABZ-SO}_2\text{-NH}_2$ , (+)- $\text{ABZ-SO}$ , (-)- $\text{ABZ-SO}$  e  $\text{ABZ-SO}_2$  foram obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 30,00 e 40,00 nmol/L para o  $\text{ABZ-SO}_2\text{-NH}_2$ ; 100,00; 200,00; 300,00; 400,00; 600,00 e 80,00; nmol/L para cada enantiômero do  $\text{ABZ-SO}$  e de 10,00; 20,00;

30,00; 40,00; 80,00 e 160,0 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>. As amostras foram preparadas em frações microsossomais, em triplicata, e foram injetados volumes de 350 µL no sistema cromatográfico. As curvas analíticas foram obtidas através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e estão apresentadas na Figura 4.38.



**FIGURA 4.38:** Curvas analíticas para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> (n=21 para cada curva analítica)

As curvas analíticas foram lineares nas faixas de 5,00 – 40,00 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, de 100,0 – 800,0 nmol/L para o (+)-ABZ-SO e para o (-)-ABZ-SO e de 10,00 – 160,0 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>.

Os coeficientes de correlação linear (r) obtidos das curvas de calibração foram acima de 0,98. A precisão expressa pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas foram inferiores a 15%, e a exatidão apresentou um desvio menor que 15% do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva, exceto para o limite de quantificação, onde o desvio encontrado foi de 15-20%.<sup>98,99</sup>

As figuras de mérito avaliadas foram realizadas com amostras controles de qualidade preparadas em quintuplicata, em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações da curva de calibração:

- Baixa: 6,000 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 120,0 nmol/L para o (+)-ABZ-SO, 120,0 nmol/L para o (-)-ABZ-SO e 12,00 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>
- Média: 18,00 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 360,0 nmol/L para o (+)-ABZ-SO, 360,0 nmol/L para o (-)-ABZ-SO e 72,00 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>
- Alta: 36,00 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 720,0 nmol/mL para o (+)-ABZ-SO, 720 nmol/L para o (-)-ABZ-SO e 144,0 nmol/L para o ABZ-SO<sub>2</sub>

#### **4.9.3. Precisão e Exatidão**

A precisão e a exatidão intradia e interdias do método foram avaliadas analisando-se quintuplicata dos três controles de qualidade, em um mesmo dia e em dias não consecutivos (Tabela 4.12).

A precisão das replicatas dos compostos apresentou coeficientes de variação entre 1,96 e 12,0 considerando-se os resultados obtidos para ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO. Os valores de exatidão variaram entre

89,7 e 115% das concentrações nominais. Portanto, todos os desvios foram menores que 15%.

**TABELA 4.12:** Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdias, para a análise de ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> (n=5) em microssomas

Concentração (nmol/L)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		3 dias (média (n=15))	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>								
6,00	115	13,8	114	2,92	111	10,7	113	9,14
18,0	115	1,96	112	7,37	113	1,50	113	3,61
36,0	114	11,3	102	6,03	103	5,54	106	7,62
<b>(+)-ABZ-SO</b>								
120	115	5,36	113	6,51	115	10,7	114	7,52
360	113	7,53	112	9,47	115	10,6	113	9,20
720	115	5,88	105	7,14	102	5,54	107	6,19
<b>(-)-ABZ-SO</b>								
120	101	12,0	92,6	5,60	89,7	4,48	94,4	7,36
360	105	8,48	94,8	9,45	99,7	9,60	99,8	9,18
720	106	6,84	93,3	7,33	92,7	5,04	97,3	6,40
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>								
12,00	104	24,9	82,0	24,1	74,8	8,86	86,9	19,3
72,00	53,8	5,91	46,3	11,5	52,3	21,2	50,9	12,9
144,0	50,8	3,91	43,4	4,60	43,4	1,45	45,9	3,32

Os valores das replicatas para ABZ-SO<sub>2</sub> apresentou coeficiente de variação entre 1,45 e 24,9 e os valores de exatidão entre 103 e 43,4 dos valores

nominais, sendo estes considerados inadequados para a aceitação de um método bioanalítico. Portanto, o método desenvolvido demonstrou ser preciso e exato para a análise o ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO e para o (-)-ABZ-SO e não para o ABZ-SO<sub>2</sub>.

A precisão e exatidão do método foram também avaliadas, através do teste cego para ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO e para o (-)-ABZ-SO onde foram analisadas amostras de concentrações desconhecidas ao analista. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.13, e todos estão de acordo com os critérios de aceitação para o método

**TABELA 4.13:** Precisão e exatidão obtidas no teste cego de ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO em amostras de microsossoma (n=3).

Analito	Concentração (nmol/L)	Precisão (CV) (%)	Exatidão (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>			
Amostra 1	22,4	8,13	114
Amostra 2	32	14,0	113
<b>(+)-ABZ-SO</b>			
Amostra 1	448	7,32	93,9
Amostra 2	640	4,71	113
<b>(-)-ABZ-SO</b>			
Amostra 1	448	4,53	85,3
Amostra 2	640	4,86	91,2

#### 4.9.4. Recuperação

Os percentuais de eficiência de extração para os quatro analitos, em cada concentração, foram calculados pela razão entre o valor médio das áreas encontradas nas amostras preparadas em microsossoma (n=5) com os resultados

das amostras preparadas no sobrenadante (n=5), onde se utilizou o sobrenadante do microssoma precipitado e depois fez-se a adição da amostra correspondente. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.14.

A eficiência de extração se mostrou precisa e exata para os compostos nas três diferentes concentrações analisadas, exceto para o ABZ-SO<sub>2</sub>, o qual não se calculou a eficiência de extração, uma vez que não se obteve exatidão e precisão no método. A precipitação de proteínas mostrou boas recuperações e a coluna RAM-C8-BSA foi eficiente na extração dos analitos das frações microssomais e na transferência destes para a coluna analítica.

**TABELA 4.14:** Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO (n=5)

Analito (nmol/L)	Recuperação(%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>	
6,00	66,5±4,3
18,0	72,7±4,0
36,0	72,5±7,4
<b>(+)-ABZ-SO</b>	
120	65,1±6,7
360	73,3±7,8
720	74,6±6,2
<b>(-)-ABZ-SO</b>	
120	82,0±4,4
360	81,1±2,2
720	74,5±3,3

#### 4.9.5. Limites de Quantificação e Detecção

O limite de quantificação foi determinado por meio da análise de amostras contendo concentrações decrescentes dos analitos até que os valores de precisão e exatidão de amostras extraídas ( $n=3$ ) fossem no intervalo de 15 - 20% de variabilidade, enquanto que o limite de detecção foi calculado, obtendo-se um sinal três vezes maior que o ruído do detector. A Tabela 4.15 mostra os limites de quantificação e detecção para os compostos estudados.

**TABELA 4.15:** ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> em frações microssomais ( $n=3$ ).

Analito	Limite de Quantificação (nmol/L)	Limite de Detecção (nmol/L)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>	5,000	2,500
<b>(+)-ABZ-SO</b>	100,0	50,00
<b>(-)-ABZ-SO</b>	100,0	50,00

#### 4.10. PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS

Uma das mais recentes subdivisões da Química é a Quimiometria, a qual consiste na aplicação de técnicas estatísticas a problemas químicos. A estatística não é apenas uma análise de dados coletados, mas se baseia principalmente no planejamento e na coleta desses dados. A essência de um bom planejamento está em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura.<sup>121</sup>

Em um experimento com duas variáveis quaisquer, o senso comum diz para fixar uma das variáveis e variar a outra até um valor máximo. Depois, mantendo uma delas no valor máximo encontrado, variar a outra até descobrir o ótimo para esta também. Mas existe uma maneira mais simples de se fazer isso, que seria variando todos os fatores ao mesmo tempo. A razão para isso é que as

variáveis podem influenciar mutuamente, e o valor ideal para cada uma delas pode depender do valor da outra, ou seja, existe uma interação entre as variáveis. Raras são as situações em que duas variáveis atuam de forma independente e quanto maior o número de variáveis maior será a possibilidade de interações entre elas.<sup>121</sup>

Em geral, os planejamentos fatoriais são do tipo  $2^k$  (k fatores com 2 níveis). Um dos aspectos mais favoráveis deste tipo de planejamento é a realização de poucos experimentos. Vale ressaltar, que com um número muito reduzido de níveis não é possível explorar de maneira completa uma grande região do espaço das variáveis. Entretanto, pode-se observar tendências importantes para a realização de investigações posteriores.<sup>121</sup>

Neste trabalho realizou-se um planejamento fatorial fracionário de dois níveis,  $2^{8-4}$  para verificar quais os fatores mais importantes no metabolismo *in vitro* do ABZ e como eles interagem entre si.

A Tabela 4.16 mostra as variáveis selecionadas e seus respectivos níveis estudados na realização deste planejamento, foram realizados 16 experimentos de forma aleatória, conforme apresentados na Tabela 4.14.

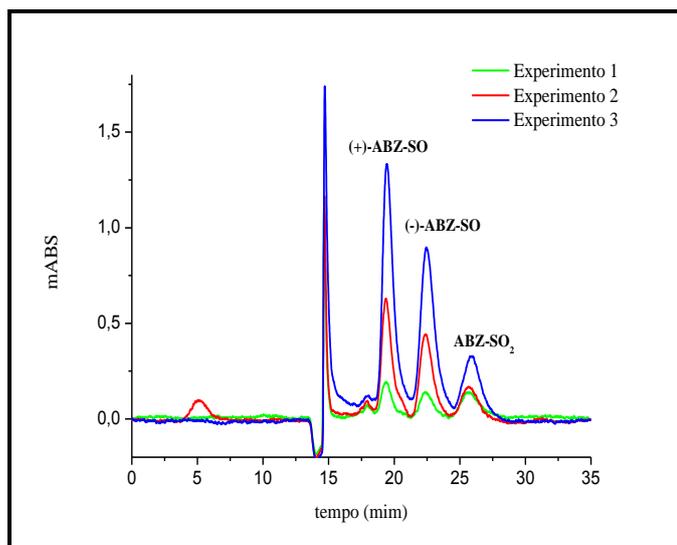
**TABELA 4.16:** Variáveis estudadas no planejamento fatorial  $2^{8-4}$

Variáveis	Níveis	
	(-)	(+)
<b>Tempo (min)</b>	30	180
<b>[Proteica] (mg/mL)</b>	2	10
<b>[NADPH] (mmol/L)</b>	3	15
<b>Tampão</b>	fosfato	<i>tris</i>
<b>[Tampão] (mmol)</b>	10	100
<b>pH</b>	6,6	8,2
<b>[MgCl<sub>2</sub>] (mmol/L)</b>	2,5	10
<b>[ABZ] (mmol/L)</b>	50	500

TABELA 4.17: Planejamento fatorial fracionário  $2^{8-4}$  realizado

Exp.	1	2	3	4	5	6	7	8
	1	2	3	4	123	124	234	1234
	Tempo	[Proteica]	[NADPH]	Tampão	[Tampão]	pH	[MgCl <sub>2</sub> ]	[ABZ]
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

A Figura 4.39 mostra três cromatogramas, os quais foram obtidos durante a realização do planejamento e ilustram as diferenças obtidas na produção dos metabólitos do albendazol. A condição experimental do experimento 3 mostrou uma maior produção dos metabólitos do que no experimento 1 e 2. Comparando-se as condições experimentais dos experimentos 1 e 3 as diferenças encontradas deve-se ao tampão utilizado, que no experimento 1 foi o tampão *tris* e no experimento 3 o tampão fosfato em uma concentração mais alta e também a concentração proteica que foi de 2,0 e 10,0 mg/mL, respectivamente (Tabela 4.18).



**FIGURA 4.39:** Cromatogramas do planejamento experimental realizado com três diferentes experimentos. Acoplamento das colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 μL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm.

**TABELA 4.18:** Condições experimentais para a realização dos experimentos

Variável	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
<b>Tempo (min)</b>	180	180	180
<b>[Proteica] (mg/mL)</b>	2,0	2,0	10,0
<b>[NADPH] (mmol/L)</b>	15	15	15
<b>Tampão</b>	<i>Tris</i>	Fosfato	Fosfato
<b>[Tampão] (mmol/L)</b>	10	10	100
<b>pH</b>	6,6	8,2	6,6
<b>[MgCl<sub>2</sub>] (mmol/L)</b>	2,5	10	2,5
<b>[ABZ] (μmol/L)</b>	50	500	50

Na Tabela 4.19 são mostrados os contrastes calculados e a interação entre eles. Nota-se que para se obter maior produção do (+)-ABZ-SO e do (-)-ABZ-SO as variáveis tempo e concentração proteica são os fatores que mais

influenciaram no metabolismo do ABZ e isso ocorreu de forma positiva, ou seja, para se aumentar a produção desses metabólitos seria necessário aumentar os níveis desses dois fatores.

Para o ABZ-SO<sub>2</sub> os fatores que mais influenciaram, para a sua maior produção, foram concentração proteica e a concentração do tampão, o que também ocorreu de forma positiva.

Um caso importante a ser considerado foi a concentração de cloreto de magnésio, o qual sua concentração influenciou negativamente para aumentar a produção do ABZ-SO<sub>2</sub>, tendo teoricamente sua concentração que ser fixada no nível -1. No entanto, quando observa-se a interação de duas variáveis, tempo/[MgCl<sub>2</sub>], essa interação é positiva, isso significa que o tempo e a concentração de cloreto de magnésio devem sempre estar no mesmo nível, ou seja, nível +1 ou -1 para os dois fatores, portanto a concentração de cloreto de magnésio foi fixada em +1, pelo fato da variável tempo ter sido fixada em +1, devido a sua forte influência na produção do (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO.

Os dados com as conclusões do planejamento estão na Tabela 4.20.

**TABELA 4.19:** Contrastes calculados utilizando planejamento fatorial  $2^{8-4}$ .

<b>CONTRASTES PRINCIPAIS</b>			
	<b>(+)-ABZ-SO</b>	<b>(-)-ABZ-SO</b>	<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>
<b>Tempo</b>	27	18	-6
<b>[Proteica]</b>	29	22	14
<b>[NADPH]</b>	1	1	-2
<b>Tampão</b>	-8	-3	9
<b>[Tampão]</b>	5	4	18
<b>pH</b>	-9	-7	-7
<b>[MgCl<sub>2</sub>]</b>	6	3	-12
<b>[ABZ]</b>	15	11	13
<b>INTERAÇÃO DE DUAS VARIÁVEIS</b>			
<b>Tempo/[Proteína]</b>	13	8	-3
<b>Tempo/[NADPH]</b>	7	6	10
<b>Tempo/Tampão</b>	13	-9	-14
<b>Tempo/[Tampão]</b>	-3	-1	-8
<b>Tempo/pH</b>	-5	-3	3
<b>Tempo/[MgCl<sub>2</sub>]</b>	15	11	13
<b>Tempo/[ABZ]</b>	6	3	-12

Valores dos contrastes entre -10 e 10 foram desconsiderados por estar dentro do erro experimental.

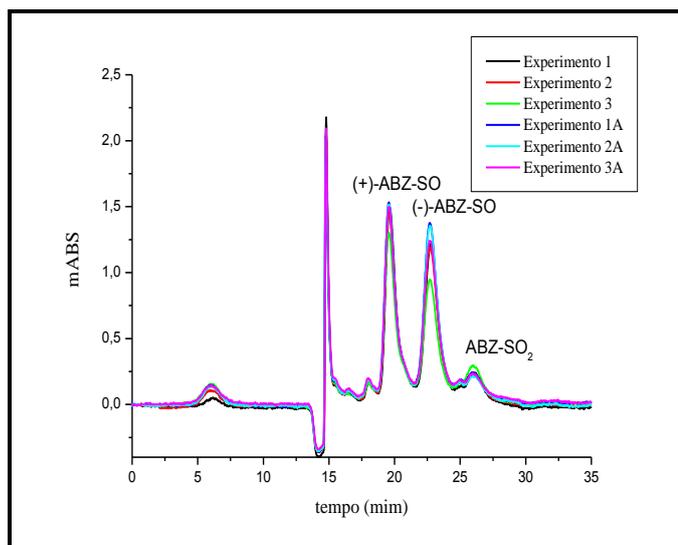
**TABELA 4.20:** Conclusões obtidas com o planejamento experimental realizado.

Variável	(+)-ABZ-SO	(-)-ABZ-SO	ABZSO <sub>2</sub>	Conclusão
<b>Tempo</b>	Aumentar	Aumentar	Indiferente	Fixar em 180 min +1
<b>[Proteica]</b>	Aumentar	Aumentar	Aumentar	Fixar em 10 +1 mg/mL
<b>[NADPH]</b>	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Fixar em 15 +1 mmol/L
<b>Tampão</b>	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Fixar em 100 +1 mmol/L
<b>[Tampão]</b>	Indiferente	Indiferente	Aumentar	Fixar em Fosfato +1
<b>Ph</b>	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Fixar em 8,2 +1
<b>[MgCl<sub>2</sub>]</b>	Indiferente	Indiferente	Diminuir	Fixar em 10 +1 mmol/L
<b>[ABZ]</b>	Aumentar	Aumentar	Aumentar	Fixar em 500 +1 μmol/L

Após a otimização do processo de metabolização *in vitro* do albendazol, através do planejamento fatorial fracionário, realizou-se réplicas no mesmo dia e em dias diferentes para verificação do coeficiente de variação dos ensaios de precisão. A Tabela 4.21 mostra que os coeficientes de variação ficaram na faixa de 2,45 a 14,6 e a Figura 4.40 ilustra os cromatogramas obtidos.

**TABELA 4.21:** Valores de Precisão (CV%) obtidos entre incubações

Analito	1° Dia (CV%)	2° Dia (CV%)
(+)-ABZ-SO	7,66	2,45
(-)-ABZ-SO	14,6	6,81
ABZ-SO <sub>2</sub>	7,78	10,9



**FIGURA 4.40:** Cromatogramas com as condições de metabolismo otimizadas pelo planejamento, realizado com 2 lotes em dias diferentes. Dia 1 (Experimento 1, 2, 3) e Dia 2 (experimento 1A, 2A e 3A). Acoplamento das colunas RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 e  $\lambda_{\text{em}}$ : 320 nm.

#### 4.11. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO PROTEICA NO METABOLISMO DE ABZ – MODELOS COM RATOS WISTAR

Vários estudos têm demonstrado que a má nutrição ocasiona alterações na disponibilidade de fármacos, decorrente de alterações na absorção, ligação com proteínas, metabolismo hepático e eliminação renal. Em trabalho conduzido por ZHANG *et al.*<sup>122</sup>, sobre a investigação da restrição protéica conduzida de forma sistemática em ratos, sugeriu-se que xenobióticos metabolizados pelos CYPs 1A2, 2E1, 2D6 e 3A4 são reduzidos em animais com má nutrição protéica, sendo necessária uma redução das dosagens para evitar toxicidade.

A má nutrição proteica pode ser desenvolvida em decorrência da má alimentação, ou ainda como consequência de doenças graves. No entanto, poucos ou nenhum estudo foi, até então, realizado para especificamente

endereçar o impacto da má nutrição no metabolismo de fármacos utilizados no tratamento de doenças negligenciadas, como a neurocisticercose, malária, tuberculose, chagas, dentre outras. Considerando-se a utilização de ABZ no tratamento da neurocisticercose, o impacto da má nutrição foi avaliado para este fármaco.

O método multidimensional desenvolvido e validado para a determinação dos metabólitos de ABZ em frações microsossomais foi utilizado para avaliar o efeito da restrição proteica no metabolismo do ABZ, utilizando-se como modelo ratos Wistar.

Os animais foram submetidos a uma dieta controle e uma dieta com restrição proteica (Tabela 4.22), por um período de 45 dias.

**TABELA 4.22:** Composição das dietas administradas para os animais controle e para os animais com restrição proteica (g/Kg)

INGREDIENTES	CONTROLE	RESTRICÇÃO
	Dieta AIN 93 M -14%	PROTEICA Dieta AIN-6% proteína
Amido de milho	465,7	508,0
Caseína	140,0	66,00
Amido dextrinizado	155,0	166,5
Sacarose	100,0	121,0
Óleo de soja	40,00	40,00
Fibra (Cel. Microcrist.)	50,00	50,00
L-cistina	1,800	1,000
Cloreto colina	2,500	2,500
Mix mineral G	35,00	35,00
Mix vitamínico	10,00	10,00
Total	1000	1000

No decorrer dos experimentos, os animais foram quinzenalmente pesados (Tabela 4.23) e avaliados quanto à perda de peso. Através da Tabela 4.23, pode-se observar que em média a diferença de peso entre os animais controle e dos desnutridos foi de aproximadamente 60% e que apenas com 15 dias de alimentação diferenciada já havia diferença estatística entre os grupos.

A Figura 4.41 mostra fotos dos animais controle e desnutridos no decorrer do experimento, dando destaque aos animais desnutridos, os quais com 36 dias de dieta com restrição proteica começam a perder os pelos.

**TABELA 4.23:** Evolução dos pesos (g) dos animais controles e animais tratados com dieta com restrição proteica

Início do Exp.		15 dias		30 dias		45 dias	
Grupo Controle	Grupo Restrição Proteica	Grupo Controle	Grupo Restrição Proteica	Grupo Controle	Grupo Restrição Proteica	Grupo Controle	Grupo Restrição Proteica
64,88	71,55	153,3	66,11	209,3	90,40	282,1	96,01
68,43	60,96	140,0	56,21	225,5	67,93	305,2	89,91
61,84	83,56	143,1	62,02	230,8	87,34	215,1	121,8
71,58	61,73	143,2	84,99	235,4	68,13	266,2	106,6
59,71	67,36	141,0	73,05	103,6	66,45	313,9	108,1
66,76	74,45	145,2	65,97	223,6	77,43	330,2	123,1
67,93	70,21	126,9	60,03	234,9	61,07	279,9	99,86
63,45	54,61	135,1	61,12	193,9	67,06	309,3	107,2
<b>66,45 ±3,9</b>	<b>67,54 ±7,6</b>	<b>136,6 ±10</b>	<b>66,74 ±8,0</b>	<b>206,2 ± 37</b>	<b>73,67 ±8,9</b>	<b>289,4 ±32</b>	<b>105,2 ±10</b>

$t_{\text{tab, 95\%, 7 gl}} = 2,36$ ;

$t_{\text{cal início do experimento}} = 0,63$ ;  $t_{\text{cal 15 dias}} = 2,62$ ;  $t_{\text{cal 30 dias}} = 2,53$ ;  $t_{\text{cal 45 dias}} = 2,59$



**FIGURA 4.41:** Fotos dos animais controle e desnutridos em diferentes fases: (A) no dia em que chegaram ao biotério; (B) 15 dias após dieta diferenciada; (C) 36 dias, início da queda dos pêlos; (D): 45 dias após dieta diferenciada.

Após 45 dias alimentados com suas respectivas dietas, ambos os grupos (controle e submetidos a restrição proteica) foram sacrificados por decapitação e os fígados foram extraídos, pesados, lavados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , individualmente.

A Tabela 4.24 contém o peso dos fígados dos dois grupos de animais.

**TABELA 4.24:** Peso (g) dos fígados retirados dos animais do grupo controle e do grupo com restrição proteica

<b>PESO DOS FÍGADOS (g)</b>	
<b>CONTROLE</b>	<b>RESTRIÇÃO PROTEICA</b>
12,464	4,195
14,285	4,010
16,619	5,052
15,295	4,468
18,407	4,694
12,401	3,748
16,733	5,080
15,402	4,386
<b>15,348 ± 1,96</b>	<b>4,427 ± 0,42</b>

$$t_{\text{tab}, 95\%, 7 \text{ gl}} = 2,36; t_{\text{calc}} = 2,62$$

A diferença entre o peso dos fígados obtidos é também outro fato relevante, onde se pode constatar uma diferença significativa entre o peso dos fígados dos diferentes grupos de animais, através do teste *t* Student. Posteriormente, realizou-se a medida de concentração proteica para cada órgão individualmente, conforme descrito na parte experimental nas seções 3.4.11; 3.4.12; 3.4.13 e 3.4.15, p. 44.

A Tabela 4.25 mostra os valores obtidos da concentração proteica para os dois grupos de animais.

**TABELA 4.25:** Valores das concentrações proteicas determinadas para as frações microssomais extraídas dos fígados de ratos do grupo controle e do grupo desnutrido

CONCENTRAÇÃO PROTEICA DAS FRAÇÕES MICROSSOMAIS (mg/mL)	
CONTROLE	RESTRIÇÃO PROTEICA
20,7	12,0
22,0	15,9
20,1	11,5
18,1	20,1
15,9	18,2
23,3	17,1
16,1	20,9
17,7	21,9
19,2 ± 2,5	17,2 ± 3,9

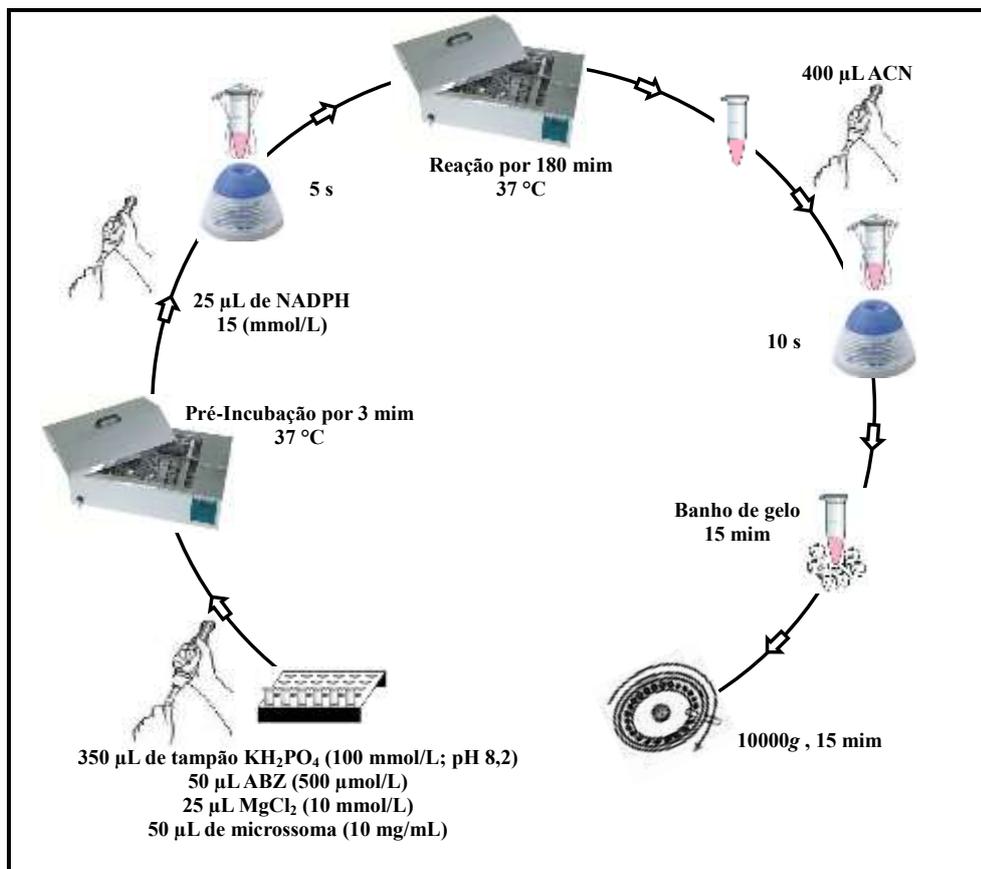
$$t_{\text{tab}, 95\%, 7 \text{ gl}} = 2,36; t_{\text{calc}} = 0,92$$

Embora tenha sido visualmente e numericamente constatada a diferença de peso entre os dois grupos de animais e também o peso dos órgãos coletados, a média das concentrações protéicas obtidas para os grupos não diferiu estatisticamente, mostrado pelo test *t* realizado, o que indica que a restrição proteica não afetou esse parâmetro significativamente.

Após a determinação da concentração proteica foi realizada a biotransformação *in vitro*, para cada fração microssomal obtida. Inicialmente realizou-se testes de biotransformação com o emprego de 7-etoxiresorufina como substrato e, na sequência, testes de biotransformação do ABZ, conforme esquema da Figura 4.42.

Os testes de metabolização com emprego da 7-etoxiresorufina como substrato mostrou a produção de resorufina média de 0,251  $\mu\text{mol/L}$  (n=8), ou

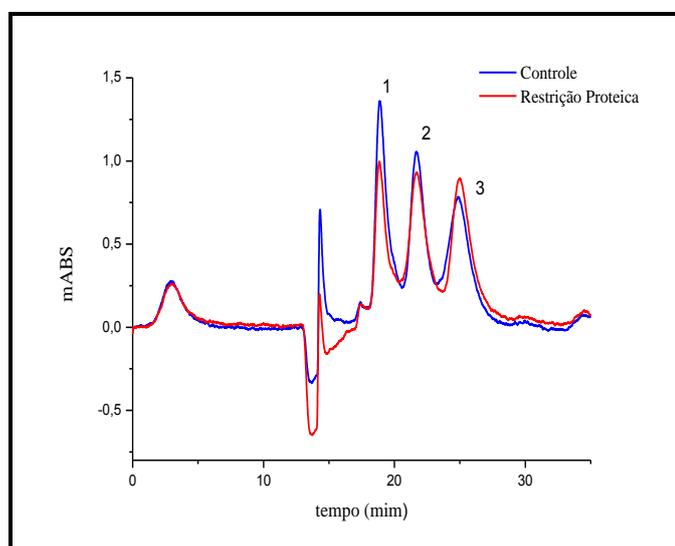
seja, uma atividade enzimática de 25,1 pmol/min/mg coerentes com os valores encontrados na Tabela 4.7, p.82, quando frações microssomais provenientes dos fígados dos animais controle foram ensaiados, no entanto, nos testes com os microssomas obtidos a partir dos fígados dos animais submetidos a uma alimentação com restrição proteica, as quantidades de resorufina obtidas não puderam ser quantificadas pois encontravam-se abaixo do limite de quantificação do método. Esse primeiro ensaio, forneceu duas importantes informações: 1- as frações microssomais estavam ativas e a extração das amostras ocorreu conforme esperado; 2- a restrição proteica ocasionou diferenças nas enzimas envolvidas no processo de biotransformação, acarretando uma menor taxa de metabolização do substrato em estudo.



**FIGURA 4.42:** Esquema representativo da biotransformação *in vitro* realizada com as frações microssomais obtidas de ratos controle e de ratos com restrição proteica

Para os ensaios realizados com ABZ, a Tabela 4.26 mostra os valores encontrados de concentração de (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO e da atividade enzimática para os dois grupos estudados.

As concentrações de ABZ-SO<sub>2</sub> não foram calculadas uma vez que o método não apresentou exatidão e nem precisão para a quantificação deste metabólito, embora tenha sido produzido e detectado nos dois grupos de animais em estudo, já o ABZ-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> não foi detectado. (Figura 4.43).



**FIGURA 4.43:** Cromatogramas com as condições de metabolismo otimizadas pelo planejamento, utilizando frações microsossomais de ratos controle e de ratos com restrição proteica. 1: (+)-ABZ-SO; 2: (-)-ABZ-SO e 3: ABZ-SO<sub>2</sub> Acoplamento das colunas RAM-C8-BSA (5,0 x 0,46 cm d. i.) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). Bomba 1 (A) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5); (B) tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40) e (C): ACN/Água/ISO (75:15:10). Bomba 2 (D): tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 mol/L; pH 7,5):ACN (60:40). Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 200 µL; λ<sub>exc</sub>: 290 e λ<sub>em</sub>: 320 nm.

**TABELA 4.26:** Valores de concentração de (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO produzidos a partir da metabolização *in vitro* do ABZ e suas respectivas atividades enzimáticas.

<b><u>(+)-ABZ-SO</u></b>				<b><u>(-)-ABZ-SO</u></b>			
<b><u>CONTROLE</u></b>		<b><u>RESTRICÇÃO PROTEICA</u></b>		<b><u>CONTROLE</u></b>		<b><u>RESTRICÇÃO PROTEICA</u></b>	
Concentração (nmol/L)	Atividade (pmol/min/mg)	Concentração (nmol/L)	Atividade (pmol/min/mg)	Concentração (nmol/L)	Atividade (pmol/min/mg)	Concentração (nmol/L)	Atividade (pmol/min/mg)
1539	8,549	395,6	2,198	1748	9,712	249,8	1,388
866,0	4,811	291,3	1,619	966,6	5,370	301,8	1,677
1283	7,128	964,8	5,360	1451	8,062	761,7	4,232
1124	6,245	1210	6,722	1267	7,036	1433	7,962
2726	15,15	1231	6,839	3127	17,37	1213	6,738
987,1	5,484	254,0	1,411	1107	6,152	227,3	1,263
1153	6,406	912,9	5,072	1300	7,223	1013	5,629
795,8	4,421	970,1	5,390	676,7	3,759	476,6	2,648
<b>1309±579</b>	<b>7,274±3,22</b>	<b>778,7±377</b>	<b>4,326±2,24</b>	<b>1456±698</b>	<b>8,086±3,88</b>	<b>709,5±438</b>	<b>3,942±2,43</b>

Os valores das atividades enzimáticas calculados foram avaliados estatisticamente pelo teste *t Student*, o qual é muito utilizado para verificar a diferença estatística entre grupos. Este método compara um método padrão com um método que foi realizado de uma forma diferente.

O valor estatístico de *t* é calculado e comparado com um valor tabelado, se o valor calculado exceder o valor tabelado, este possui diferença significativa e se o valor de *t* calculado for menor que o valor tabelado, os dados não possuem diferença estatística.

A Tabela 4.27 mostra os resultados obtidos para o teste *t*, onde para o (+)-ABZ-SO o valor de foi de 2,59 e para o (-)-ABZ-SO de 3,07. O valor tabelado, para um grau de liberdade igual a 7, foi de 2,36, portando os dados obtidos demonstram diferença significativa na obtenção destes metabólitos ao nível de 95% de confiança.

**TABELA 4.27:** Valores calculados de *t Student* para (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO, comparando a atividade enzimática do grupo controle com o grupo com restrição proteica, para avaliar a influência da restrição proteica no metabolismo do ABZ, com 95% de confiança, 7 graus de liberdade

(+)- ABZ-SO	(-)-ABZ-SO
2,59	3,07
$t_{\text{tab},95\%,7\text{g.l.}}=2,36$	

Desta forma, o metabolismo *in vitro* do ABZ e a produção dos seus metabólitos principais, o (+) e (-)-ABZ-SO, mostrou ser influenciado pela restrição proteica dos animais, uma vez que os dados obtidos mostraram possuir diferença significativa na atividade microssomal de ratos controle e de ratos submetidos a restrição proteica.

Estudos realizado por MAO *et al.*<sup>123</sup> com ratos jovens e adultos para avaliar a influência da restrição proteica demonstrou uma diminuição da

atividade das CYP's 2C11, 2A1 e 3A em animais malnutridos e que isso se mostrou mais severo em animais jovens.

Já estudos realizados em pacientes mal nutridos também sugeriram que a malnutrição diminui o metabolismo oxidativo de dois marcadores, antipirina<sup>124</sup> e acetanilida<sup>125</sup> como consequência do aumento do tempo de meia-vida e uma diminuição do *clearance*.

O teste *t* foi também calculado para comparar os dados quanto a enantioseletividade do metabolismo *in vitro* do ABZ (Tabela 4.28).

**TABELA 4. 28:** Valores de *t Student* calculado para comparar concentrações de (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO produzidas a partir do metabolismo *in vitro* do albendazol, para verificar a enantioseletividade nos dois grupos, com 95% de confiança, 7 graus de liberdade

Grupo Controle	Grupo Restrição Proteica
2,90	0,90

$t_{\text{tab},95\%,7\text{g.l.}}=2,36$

Através da Tabela 4.26 pode-se observar a produção de 1.309 e de 1.456 nmol/L do (+) e (-)-ABZSO, respectivamente, para o grupo controle, enquanto que para o grupo submetido a restrição proteica, a produção do (+)-ABZ-SO foi de 778,7 nmol/L e para o (-)-ABZ-SO foi de 709,5 nmol/L. Estes resultados foram também avaliados pelo teste *t Student* (Tabela 4.28) e comprova-se uma diferença significativa na produção dos dois enantiômeros no grupo controle e uma diferença não significativa no grupo submetido a restrição proteica, ou seja, a enantioseletividade é observada no grupo controle mas essa propriedade é perdida no animais com restrição proteica.

Com relação a enantioseletividade encontrada para o ABZ-SO em animais controle, os resultados estão de acordo com o trabalho de CAPECE

*et al*<sup>47</sup> em ratos, o qual também mostrou uma maior concentração plasmática do (-)-ABZ-SO em relação ao (+)-ABZ-SO.

Portanto, os dados obtidos neste trabalho, referentes a influência da restrição proteica no metabolismo *in vitro* do ABZ, demonstram a importância de futuros estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a influência da enantioseletividade na produção dos metabólitos principais, frente ao comportamento terapêutico do fármaco em estudo, o que pode acarretar em diferentes níveis de toxicidades, tolerância e eficácia no tratamento.



*Capítulo III*  
*Estudo de Inibição de Células Tumoriais*  
*Humanas com Albendazol Sulfóxido*



#### 4.12. SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO ALBENDAZOL SULFÓXIDO: ANALÍTICO E SEMIPREPARATIVO

Enantiômeros apresentam diferentes respostas frente a organismos vivos, onde são constatados diferentes sabores, odores, toxicidade e principalmente respostas biológicas diferenciadas para cada enantiômero<sup>126</sup>. No entanto, ainda assim, muitos fármacos são administrados aos pacientes na forma de racematos. Estes aspectos despertaram o interesse em realizar um estudo dos enantiômeros do albendazol sulfóxido para avaliar sua atividade anticancerígena *in vitro* em células tumorais humanas.

Para a obtenção de enantiômeros puros, as fases estacionárias quirais de polissacarídeos tem sido vastamente utilizadas, mostrando grande versatilidade e excelente poder de discriminação quiral para uma ampla classe de compostos.<sup>73</sup>

Os polissacarídeos mais utilizados são a amilose e celulose (Figura 4.44). Estes diferem entre si somente na sua estrutura química, na posição 1,4- $\beta$ -glicosídica, no entanto grandes diferenças de enantiosseletividade podem ser observadas com esses polissacarídeos.<sup>74</sup>

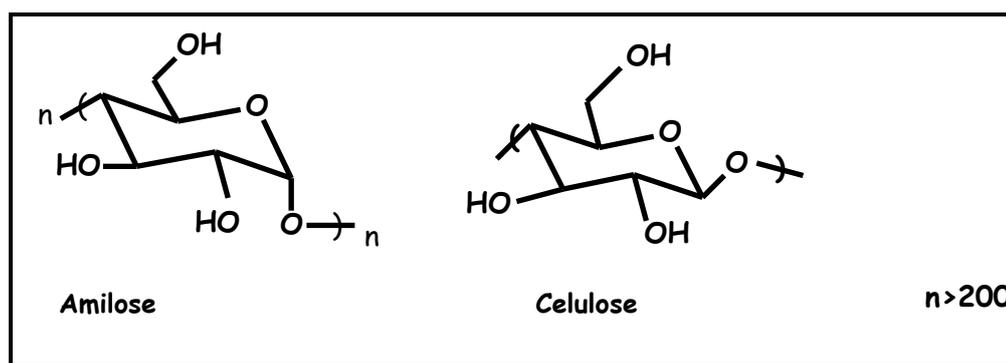


FIGURA 4.44: Estruturas Químicas da Amilose e da Celulose

CASS e BATIGALHIA<sup>127</sup> reportaram a enantiorresolução de uma série de vinte sulfóxidos quirais, os quais foram avaliados sistematicamente em eluição multimodal, utilizando fases estacionárias quirais de polissacarídeos.

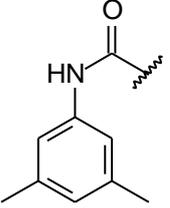
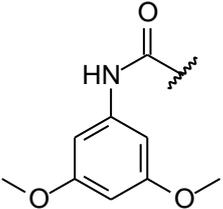
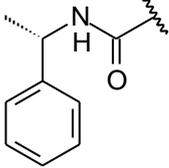
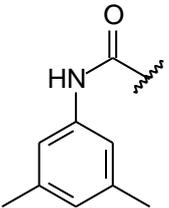
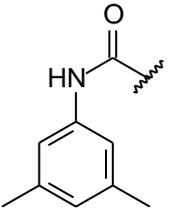
Dos 20 sulfóxidos analisados todos foram enantiorresolvidos em uma ou outra fase estacionária quiral utilizada.

MONTANARI *et al.*<sup>128</sup>, CLANKVETADZE *et al.*<sup>129</sup> e MATLIN *et al.*<sup>76</sup> também reportaram estudos de enantiosseletividade para sulfóxidos quirais utilizando colunas de polissacarídeos. Todos os trabalhos demonstram excelentes resultados, onde a grande maioria dos sulfóxidos estudados foram enantiorresolvidos nestas fases.

Desta forma, as fases estacionárias quirais dos polissacarídeos celulose e amilose foram também selecionadas neste trabalho para serem avaliadas quanto ao poder de discriminação quiral frente ao albendazol sulfóxido.

As fases estacionárias foram preparadas, em nosso grupo de pesquisa, segundo a literatura.<sup>76</sup> Das quatro colunas analíticas avaliadas (Tabela 4.29), três haviam sido previamente preparadas por BELAZ *et al.*<sup>93</sup> e estavam disponíveis no grupo, já a coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7µm) (20% g/g) analítica (FEQ-1) e a coluna semipreparativa (FEQ-5) foram preparadas e avaliadas neste trabalho. Vale ressaltar que dentre as colunas avaliadas, a FEQ-2 não é disponível comercialmente.

TABELA 4.29: Dados referentes às colunas empregadas neste trabalho

Estruturas	Fase Estacionária	Especificações	Código
	<i>Tris</i> (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (15 x 0,46 cm)	FEQ-1
	<i>Tris</i> (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (15 x 0,46 cm)	FEQ-2
	<i>Tris</i> [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (15 x 0,46 cm)	FEQ-3
	<i>Tris</i> (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (15 x 0,46 cm)	FEQ-4
	<i>Tris</i> (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (20 x 0,70 cm)	FEQ-5

#### 4.12.1. Síntese, caracterização e avaliação da fase *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose

O preparo da fase estacionária quiral envolveu a síntese do carbamato, derivatização e recobrimento do suporte, o empacotamento, condicionamento e posterior avaliação da coluna preparada.

A fase *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foi preparada pela reação da amilose com *tris*-3,5dimetilfenil isocianato. Na reação, ocorre um ataque nucleofílico dos grupos hidroxila do polissacarídeo a carbonila do isocianato, levando às substituições nos grupos hidroxila e a formação dos carbamatos desejados (Figura 4.45).

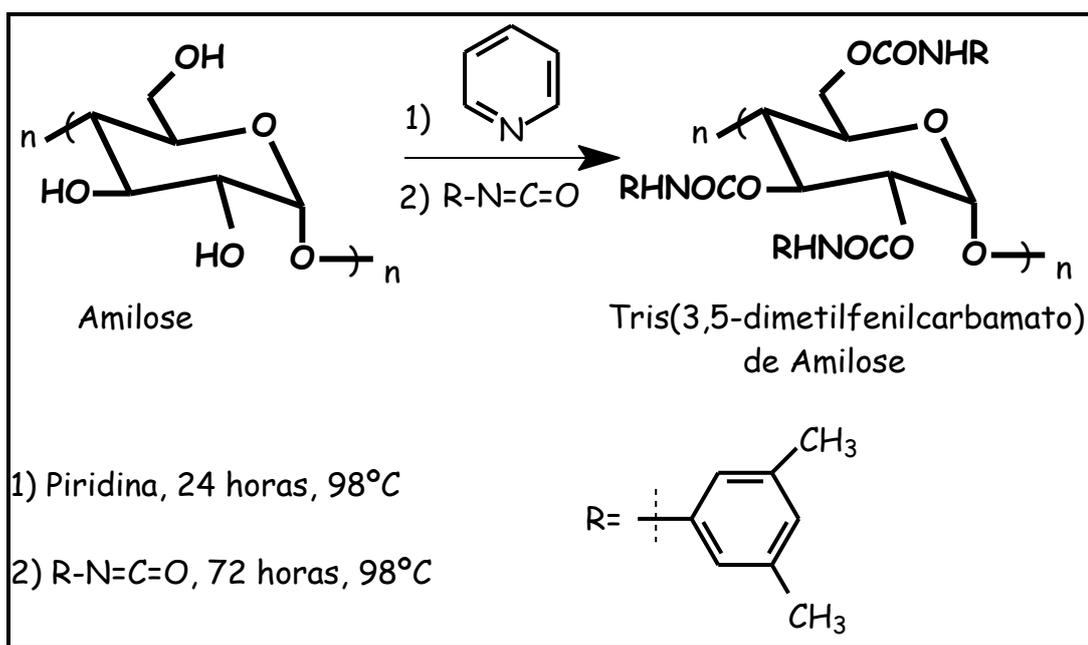


FIGURA 4.45: Esquema da síntese do *tris*(arilcarbamato) de amilose.

O carbamato sintetizado foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho e análise elementar.

O espectro no IV (Figura 4.46) da amilose não derivada mostra uma intensa e característica absorção em 3431,1  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde aos estiramentos dos grupos hidroxila (-OH).

Após a reação da amilose com o isocianato, pode-se observar que o espectro de infravermelho (Figura 4.47), mostrou uma absorção em 1730  $\text{cm}^{-1}$ , de intensidade forte, características de deformação axial das ligações C=O dos grupos carbamatos, em 1220  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação C-N e também em 3330  $\text{cm}^{-1}$  referente a deformações axiais do grupo N-H.

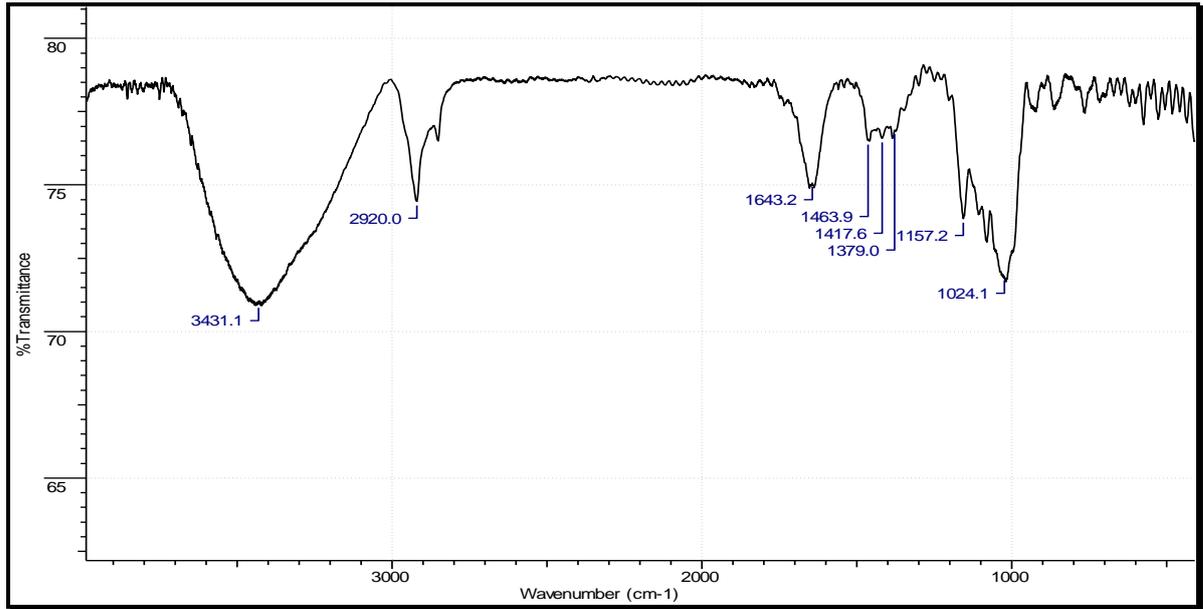


FIGURA 4.46: Espectro no infravermelho da amilose não derivada

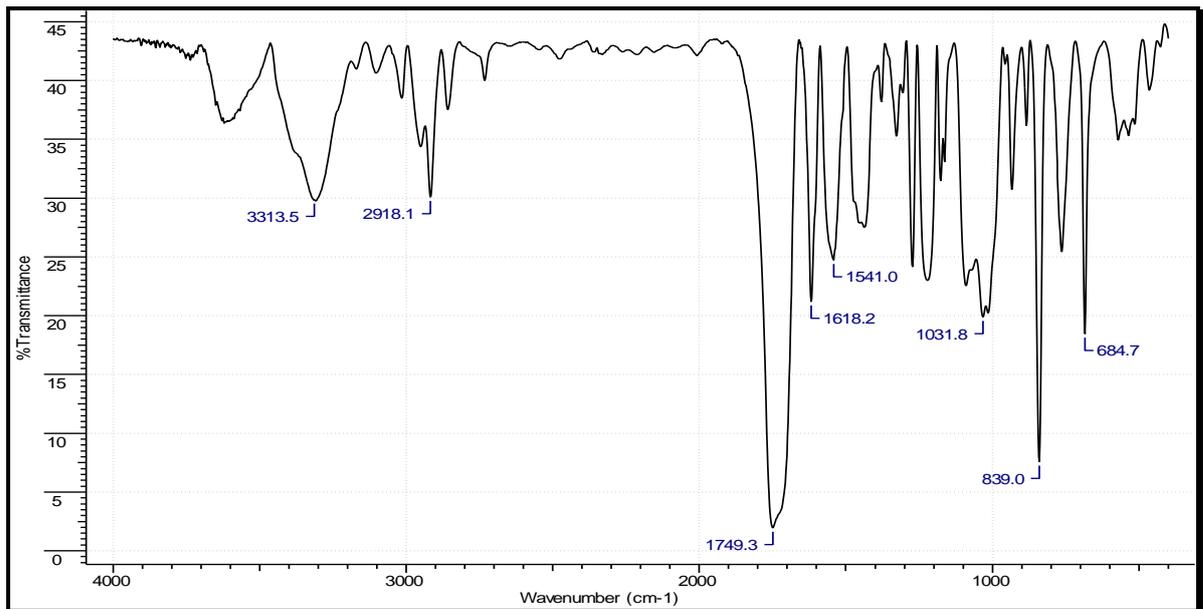


FIGURA 4.47: Espectro no infravermelho do FEQ-1 sintetizada

O resultado da análise elementar (Tabela 4.30) mostra derivação quase completa dos grupos hidroxilas.

TABELA 4.30: Resultados da análise elementar para as FEQ sintetizada

Substância	Massa Molar (g/mol)	Valores Teóricos (%)	Valores Experimentais (%)
FEQ -1 e 5 (C <sub>33</sub> H <sub>37</sub> O <sub>8</sub> N <sub>3</sub> )	602,9	C = 65,66 N = 6,96 H = 6,18	C = 65,35 N = 6,84 H = 6,15

A FEQ foi obtida com rendimento aproximado de 86% e um percentual de derivação em torno de 99%. Os percentuais de derivação foram calculados através dos resultados das análises elementares (Tabela 4.28) e são condizentes com os valores encontrados na literatura.<sup>130</sup>

O suporte APS-Nucleosil (500 Å, 7µm), preparado em nosso grupo, conforme consta na Parte Experimental (seção 3.11.2, p. 56), a partir de sílica Nucleosil (500 Å, 7µm), foi recoberto a 20% g/g com o carbamato sintetizado.

A fase estacionária quiral foi empacotada e avaliada com padrões racêmicos, sendo a sua eficiência cromatográfica avaliada considerando-se os padrões cromatográficos: fator de retenção (k), fator de separação (α) e resolução (Rs).

A coluna apresentou excelentes valores para os parâmetros cromatográficos e boa simetria das bandas cromatográficas. Com isso foi avaliada para a separação dos enantiômeros do albendazol sulfóxido.

#### 4.12.2. Avaliação da Enantiorresolução do Albendazol Sulfóxido em Colunas Quirais de Polissacarídeos

As colunas quirais *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (FEQ-1), *tris*(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (FEQ-2), *tris*[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (FEQ-3) e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (FEQ-4) foram sistematicamente avaliadas, no modo normal e no modo

polar orgânico, na enantioseparação dos enantiômeros do ABZ-SO, considerando-se os parâmetros cromatográficos: fator de retenção ( $k$ ), fator de separação ( $\alpha$ ) e resolução ( $R_s$ ). Vale ressaltar que em trabalho anterior<sup>93</sup>, o modo reverso também foi investigado para a separação dos enantiômeros do ABZ-SO, no entanto, como este modo não é recomendado para separações preparativas devido à presença de água na fase móvel, neste trabalho, este modo de eluição não foi considerado.

Para este estudo foram avaliados diferentes modificadores orgânicos: 2-propanol, metanol, etanol e acetonitrila em diferentes proporções. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.31.

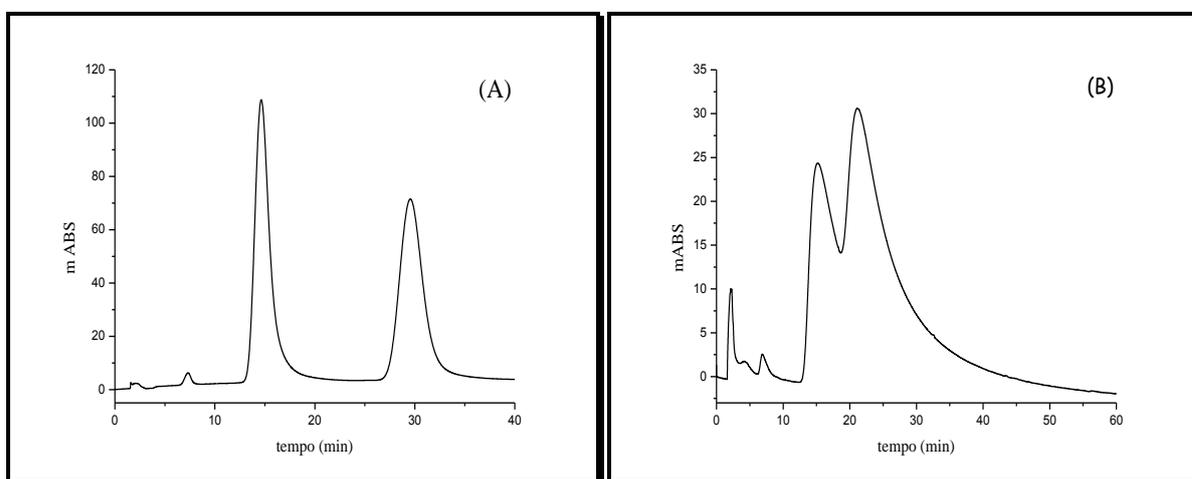
**TABELA 4.31:** Valores dos parâmetros cromatográficos obtidos para albendazol-sulfóxido no modo normal e polar orgânico

FEQ	FEQ-1			FEQ-2			FEQ-3			FEQ-4		
	$k_1$	$\alpha$	$R_s$									
Hexano/Etanol (80:20) <sup>a</sup>	6,34	2,16	4,97	9,07	1,45	1,83	3,57	1	-	1,10	1	-
Hexano/2-Propanol (80:20) <sup>a</sup>	6,57	1,45	<1	22,3	1,22	< 1,0	18,5	1	-	3,38	1	-
Etanol <sup>a</sup>	1,20	2,04	3,09	0,49	1,57	< 1,0	0,43	1	-	0,17	1	-
2-Propanol <sup>b</sup>	1,85	1,18	<1	2,15	1,16	< 1,0	2,29	1	-	0,52	1	-
Acetonitrila <sup>a</sup>	14,7	1,75	1,36	0,45	1	-	10,4	1	-	3,68	1	-
Metanol <sup>a</sup>	0,34	3,50	2,60	2,22	1	-	0,05	1	-	0,63	1	-

$\lambda = 290 \text{ nm}$ ; <sup>a</sup> Vazão 1,0 mL/min; <sup>b</sup> Vazão 0,5 mL/min

As fases estacionárias *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) (FEQ-1) e *tris*(3,5-dimetoxifenilcarbamato) (FEQ-2), ambas de amilose, foram as que apresentaram melhores resultados de discriminação quiral para o ( $\pm$ )-ABZ-SO, independente do modo de eluição utilizado. Já as colunas *tris*[(S)-feniletilcarbamato] de amilose (FEQ-3) e a *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (FEQ-4) não apresentaram discriminação quiral em nenhuma das fases móveis utilizadas.

A influência da fase móvel na discriminação quiral do albendazol sulfóxido é evidenciada quando a FEQ-1 mostra uma excelente resolução ( $R_s=4,97$ ) utilizando hexano:etanol (80:20) como fase móvel e esta resolução é perdida quando se faz a substituição do etanol por 2-propanol como modificador orgânico, na mesma proporção. Os cromatogramas da Figura 4.48 exemplificam a diferença de enantiorresolução obtida nessas duas condições cromatográficas. Vale ressaltar que a mistura hexano:2-propanol foi avaliada em diferentes proporções e em nenhuma melhora da enantiosseletividade foi observada.

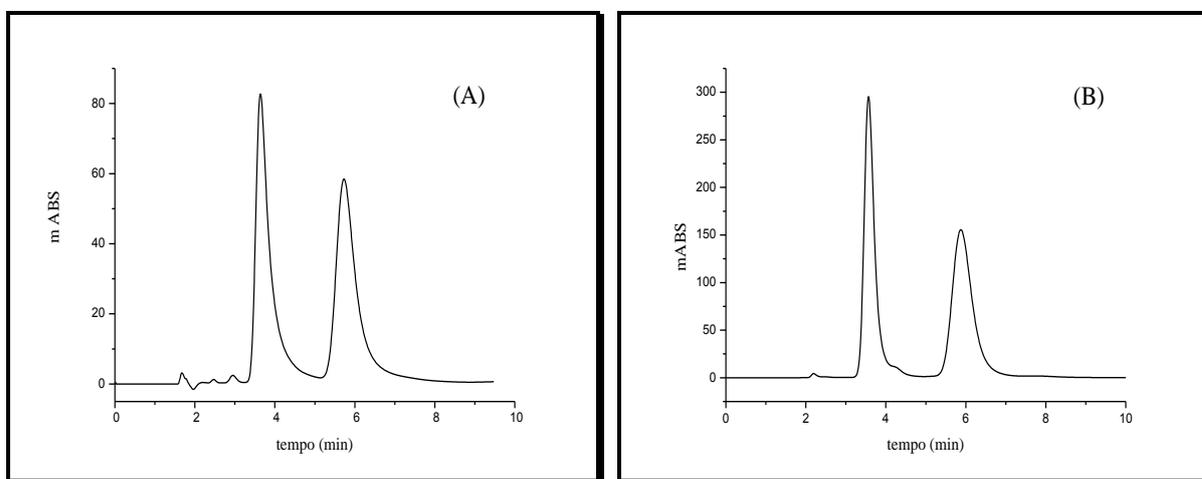


**FIGURA 4.48:** Cromatogramas da separação dos enantiômeros do ABZ-SO. Coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (FEQ-1). Fase Móvel: (A) Hexano/EtOH (80:20) e em (B) Hexano/2-propanol (80:20), Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm.

A FEQ-2 é uma fase não comercial e tem apresentado bons resultados na enantioseparação de sulfóxidos quando avaliada no modo reverso

de eluição<sup>127,131</sup>. No entanto, até o momento, nenhuma condição de análise ofereceu resolução e enantiosseletividade no modo normal de eluição como o resultado obtido neste trabalho, sendo estes de 1,83 e 1,45, respectivamente.

Também, excelentes fatores de separação ( $\alpha=2,04$  e  $\alpha=3,05$ ) e ótimas resoluções ( $R_s=3,09$  e  $R_s=2,60$ ) foram obtidos no modo polar orgânico, quando se fez uso de etanol ou metanol como eluente (Figura 4.49), mas apenas resoluções parciais foram observadas ( $R_s < 1$ ) com acetonitrila ou 2-propanol como fase móvel.

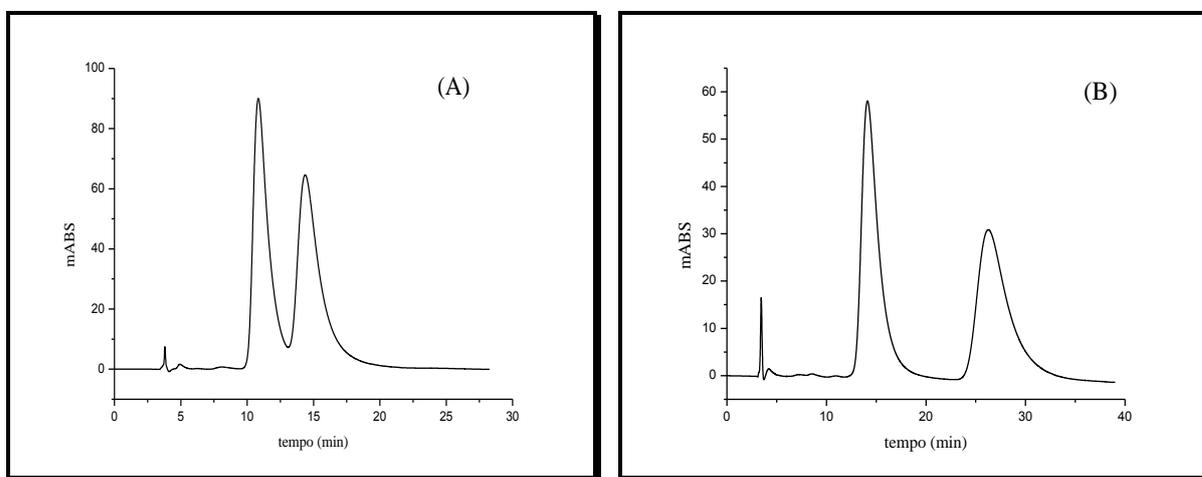


**FIGURA 4.49:** Cromatogramas da separação dos enantiômeros do ABZ-SO. Coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (FEQ-1). Fase Móvel: (A) Etanol e em (B) Metanol, Vazão: 1,0 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm.

Comparando-se as fases *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato)s de amilose (FEQ-1) e celulose (FEQ-4), é clara a influência do polissacarídeo na discriminação quiral, uma vez que tem-se o mesmo substituinte em ambas as fases. A FEQ-1 de amilose apresentou excelentes valores para a resolução, com  $R_s$  iguais a 4,97 e 3,09 entre outros (Tabela 4.31), enquanto que a correspondente de celulose (FEQ-4) não apresentou nenhuma enantiosseletividade. Esta discrepância de resolução pode ser explicada pela diferença existente entre a celulose e a amilose, no que diz respeito à posição da ligação glicosídica (Figura 4.44)

A influência dos substituintes no anel aromático dos carbamatos também é evidenciada nos resultados obtidos, onde a FEQ-1, que apresenta como substituintes grupamentos metílicos, mostrou uma melhor discriminação quiral para o albendazol sulfóxido do que a FEQ-2, que apresenta grupos metóxi como substituintes. Porém, a FEQ-2 apresenta melhor enantiosseletividade que a FEQ-3, a qual não apresenta nenhum substituinte no anel aromático.

A seguir (Figura 4.50) são apresentados dois cromatogramas das separações obtidas do albendazol sulfóxido nas colunas *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) e *tris*(3,5-dimetoxifenilcarbamato), ambas de amilose.



**FIGURA 4.50:** Cromatogramas da separação dos enantiômeros do ABZ-SO. Fase Móvel: Água/EtOH (50:50), Vazão: 0,5 mL/min e  $\lambda$ : 290 nm, em (A) Coluna *tris*(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose e (B) Coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

#### 4.12.3. Separação Semipreparativa dos Enantiômeros do Albendazol Sulfóxido

Para a realização de uma separação preparativa ou semipreparativa o primeiro passo é a otimização das condições de separação do analito em escala analítica, nesta etapa estão incluídas a escolha da fase estacionária e a composição da fase móvel. A otimização para um fator de retenção ( $k$ ) pequeno possibilita que a separação seja obtida em um menor tempo e com menor consumo de solventes. Já valores máximos para o fator de separação ( $\alpha$ ) e

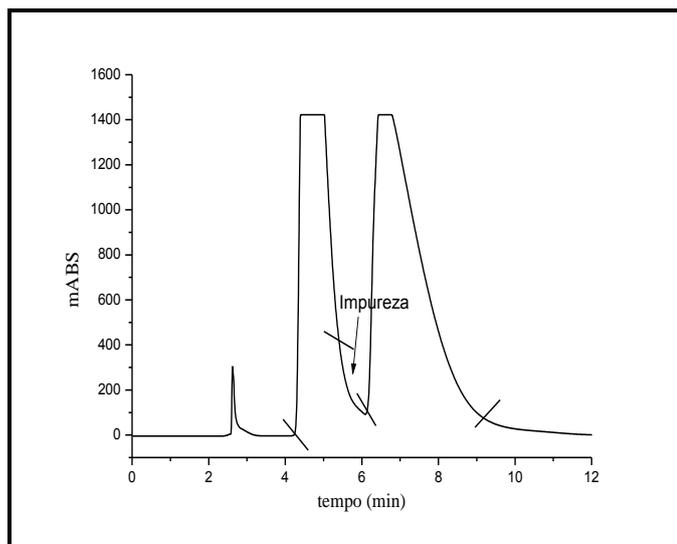
resolução ( $R_s$ ) permitem que maiores quantidades do composto seja injetado na coluna cromatográfica sem perda de resolução.<sup>132</sup>

O melhor sistema FEQ-solvente obtido nas separações analíticas para a resolução dos enantiômeros do ABZ-SO foi transferido para uma escala semipreparativa de separação.

A fase quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foi selecionada, não somente devido a melhor seletividade em diferentes fases móveis nos diferentes modos de eluição, mas também devido ao baixo fator de retenção e boa enantiorresolução quando avaliada no modo polar orgânico.

O modo polar orgânico apresenta algumas vantagens, das quais podemos citar: boa solubilidade para as amostras e também esses solventes são facilmente evaporados. O uso de solventes na ausência de misturas facilita a sua reciclagem, portanto, diminuindo os custos das separações preparativas.<sup>79,80</sup>

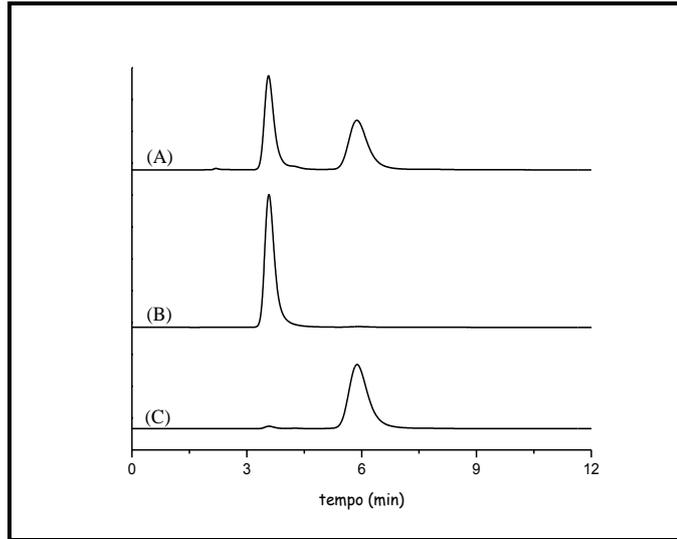
Para este trabalho uma solução de albendazol-sulfóxido de concentração de 10 mg/mL de ( $\pm$ )-ABZ-SO foi injetada na coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (FEQ-5), a separação foi realizada em uma vazão de 2,5 mL/min utilizando metanol como fase móvel. A separação foi monitorada em  $\lambda=290\text{nm}$ . O cromatograma semipreparativo está apresentado na Figura 4.51.



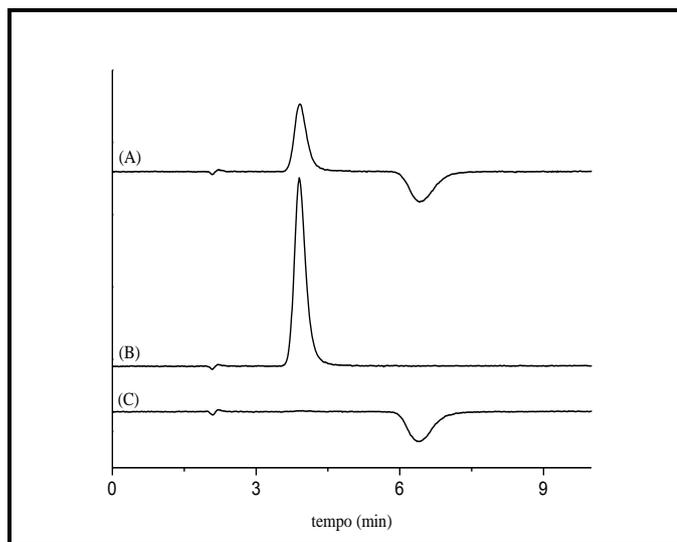
**FIGURA 4.51:** Cromatograma da separação em escala semipreparativa dos enantiômeros do ABZ-SO. Coluna semipreparativa: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20,0 x 0,7 cm d.i.). Fase móvel: Metanol. Vazão: 2,5 mL/min; V.injeção: 500 µL e λ:290nm.

A pureza enantiomérica foi determinada na coluna analítica *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (Figura 4.52) e durante a separação semipreparativa essa fração foi descartada. A Figura 4.53 mostra os cromatogramas obtidos para a determinação do (+) e (-)-ABZ-SO no dicroísmo circular.

A Tabela 4.32 apresenta os dados obtidos na separação em escala semipreparativa do albendazol-sulfóxido.



**FIGURA 4.52:** Cromatograma para determinação da pureza enantiomérica do ABZ-SO. Coluna analítica: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46cm d.i.). Fase móvel: metanol. Vazão: 1,0 mL/min;  $V_{inj}$ : 20 µL e  $\lambda$ :290nm. (A) ( $\pm$ )-ABZ-SO (B) 1º enantiômero: (+)-ABZ-SO (C) 2º enantiômero: (-)-ABZ-SO



**FIGURA 4.53:** Cromatograma para determinação de (+) e (-) ABZ-SO no dicroísmo circular. Coluna analítica: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46cm d.i.). Fase móvel: metanol. Vazão: 1,0 mL/min;  $V_{inj}$ : 20 µL e  $\lambda$ :290nm. (A) ( $\pm$ )-ABZ-SO (B) 1º enantiômero: (+)-ABZ-SO (C) 2º enantiômero: (-)-ABZ-SO

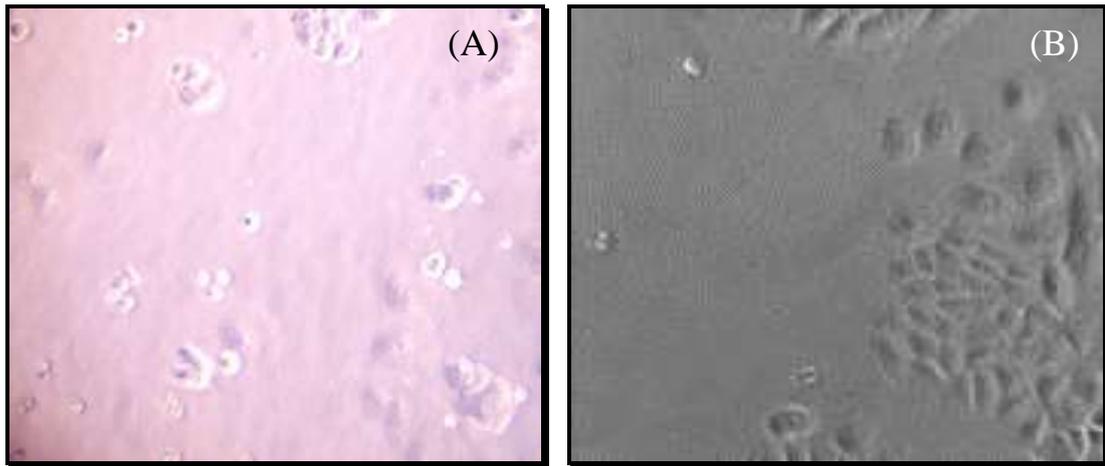
**TABELA 4.32:** Dados obtidos da separação semipreparativa dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido

	<b>1º enantiômero</b>	<b>2º enantiômero</b>
	<b>(+)-ABZ-SO</b>	<b>(-)-ABZ-SO</b>
Massa obtida (mg)	207,8	248,5
Pureza enantiomérica (%)	99,5	98,3
Rendimento (%)	83,1	99,4
$\alpha_D$ , metanol, 25°C	+112,8	-117,4
Produtividade (mg/h)	12,5	14,9

#### 4.13. ESTUDOS *IN VITRO* DE INIBIÇÃO NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

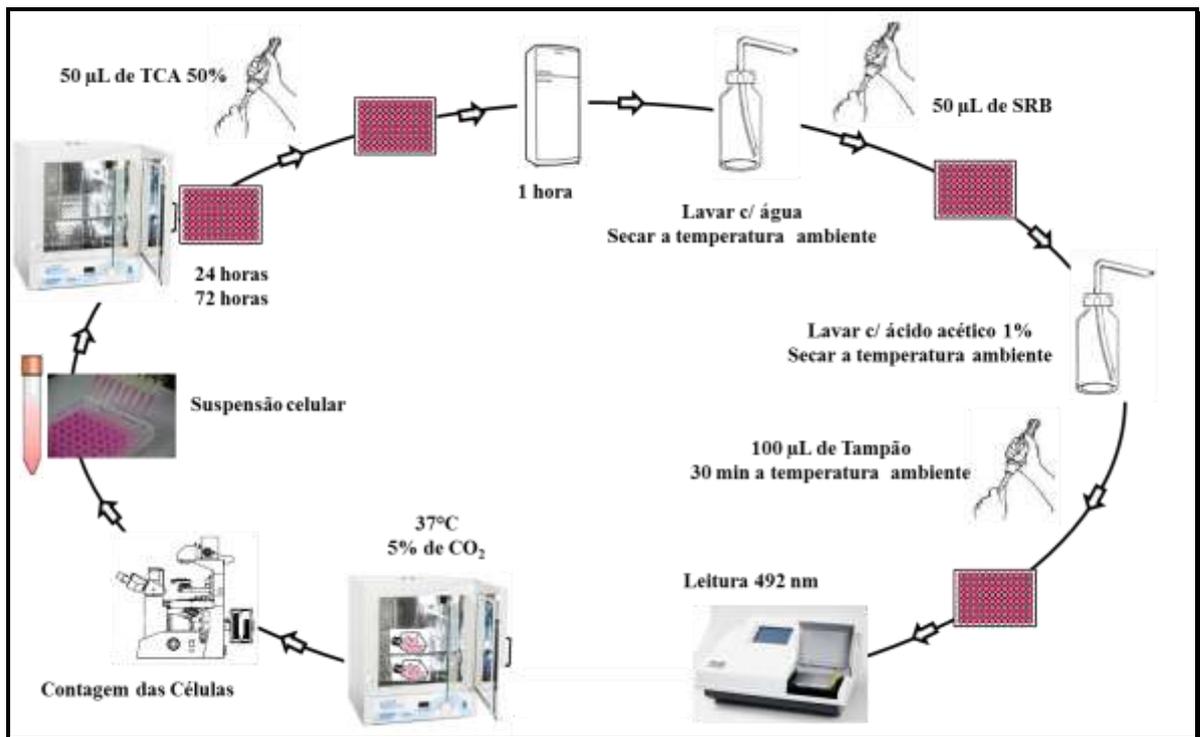
A citotoxicidade é considerada um parâmetro para a detecção da atividade antitumoral, que é realizado com linhagens celulares. A taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador através da formação do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes<sup>133</sup>.

O estudo de inibição *in vitro* com células tumorais humanas foi avaliado para quatro compostos, sendo eles: o ABZ, o (+)-ABZ-SO, (-)-ABZ-SO e ABZ-SO racêmico, utilizou-se para isso o método da sulforrodina B (SRB) em período de 48 horas de incubação em três linhagens celulares neoplásicas A375-C5 (melanoma), MCF-7 (câncer de mama) e NCI-H460 (câncer de pulmão) (Figura 4.54).



**FIGURA 4.54:** Células utilizadas para o ensaio (A): MCF-7 e B: NCI-H460

A Figura 4.55 mostra forma resumida as etapas realizadas para o estudo de inibição *in vitro* com células tumorais humanas.



**FIGURA 4.55:** Esquema ilustrativo do estudo de inibição *in vitro* com células tumorais humanas

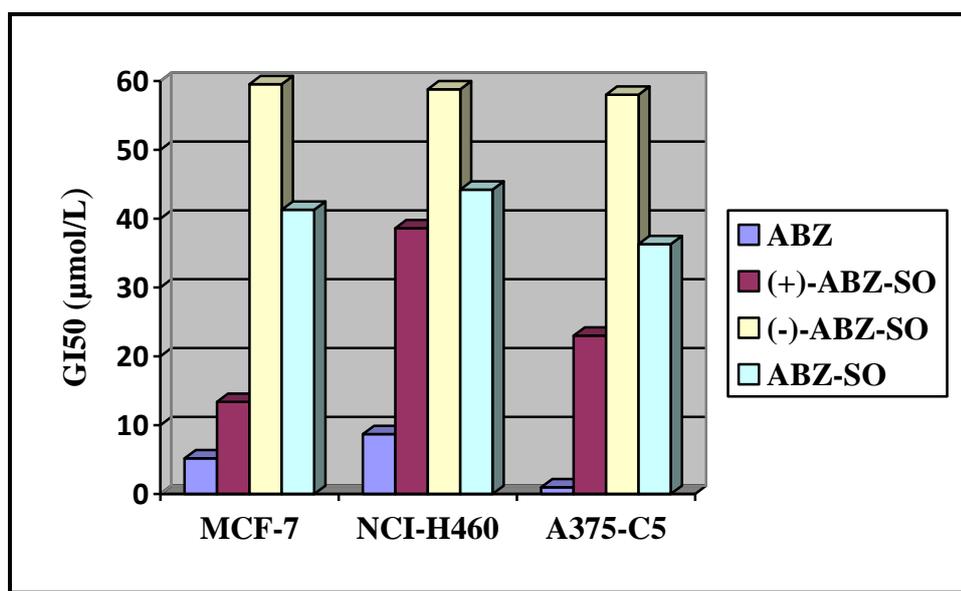
Os resultados são apresentados como a concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular (GI50) após tratamento com os compostos por 48 horas. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes, realizados em duplicata. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e os valores apresentados de GI50 foram de  $46,3 \pm 4,8$  nmol/L para linhagem MCF-7;  $96,3 \pm 7,3$  para NCI-H460 e de  $80,0$  nmol/L para A375-C5.

O albendazol foi o composto que apresentou os melhores resultados para as três linhagens avaliadas (Tabela 4.33), apresentando um excelente valor de inibição no crescimento de células tumorais humanas. Vale destacar que para a linhagem A375-C5 o valor do GI50 foi igual a  $1,0 \pm 0,2$ . Os enantiômeros do albendazol sulfóxido também se mostraram ativos, com destaque para a linhagem MCF-7, onde o (+)-ABZ-SO (GI50 =  $13,4 \pm 1,1$ ) mostrou ser cerca de quatro vezes mais ativo que o (-)-ABZ-SO, com GI50 =  $59,5 \pm 4,8$ . Estes resultados mostram uma enantiosseletividade muito importante, no que se diz respeito à inibição no crescimento de células tumorais humanas. Para as linhagens NCI-H460 e A375-C5, o (+)-ABZ-SO também se mostrou mais ativo, com uma atividade de aproximadamente 2,5 vezes maior do que o (-)-ABZ-SO. Todos os valores de GI50 estão apresentados na Tabela 4.33.

**TABELA 4.33:** Efeito das substâncias ABZ, ABZ-SO, (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO na inibição do crescimento *in vitro* em três linhagens de células tumorais humanas

	GI50 ( $\mu\text{mol/L}$ )		
	MCF-7	NCI-H460	A375-C5
ABZ	$5,2 \pm 2,0$	$8,7 \pm 1,2$	$1,0 \pm 0,2$
ABZ-SO	$41,3 \pm 8,6$	$44,2 \pm 8,5$	$36,3 \pm 1,8$
(+)-ABZ-SO	$13,4 \pm 1,1$	$23,5 \pm 7,2$	$23,0 \pm 6,5$
(-)-ABZ-SO	$59,5 \pm 4,8$	$58,8 \pm 5,5$	$58,0 \pm 3,8$

A Figura 4.56 mostra um gráfico para melhor visualização dos valores de GI50 obtidos e verifica-se que os valores de GI50 para as três linhagens celulares foi menor quando o (+)-ABZ-SO foi avaliado como enantiômero puro do que quando ensaiado na mistura racêmica, sugerindo um antagonismo, ou seja, a presença do (-)-ABZ-SO contido na mistura racêmica inibe a ação do (+)-ABZ-SO.



**FIGURA 4.56:** Gráfico ilustrando os valores de GI50 obtido para os compostos avaliados na diferentes linhagens celulares.

Portanto, ensaios visando estudar o efeito do (+)-ABZ-SO, uma vez que foi o enantiômero que apresentou inibição, em células MCF-7 para avaliar o perfil do ciclo celular, indicam que este enantiômero diminui a porcentagem de células no ciclo G0/G1 e concomitantemente aumentou a porcentagem de células no ciclo sub-G1 sugestivo de apoptose (Tabela 4.34).

**TABELA 4.34:** Dados obtidos no estudo de apoptose para a linha celular MCF-7 com o (+)-ABZ-SO

<b>Células (%)</b>					
	Ciclo Celular			Sub-G1	Apoptose
	G0/G1	S	G2/M		
Branco	$56,8 \pm 1,2$	$27,8 \pm 1,4$	$16,5 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,6$
DMSO	56,1	25,6	18,7	0	$8,1 \pm 1,0$
(+)	$37,5 \pm 4,0^*$	$24,1 \pm 2,0$	$16,4 \pm 1,5$	$28,6 \pm 4,0^*$	$20,4 \pm 0,7^*$

Células tratadas com o meio (em branco) ou veículo composto (DMSO) foram incluídos como controle. Os resultados são a média±SE de pelo menos três experimentos independentes (exceto para o tratamento DMSO que só foi analisada uma vez para o perfil de ciclo celular e sub-G1). \*  $P \leq 0,01$  quando comparado com o tratamento em branco



*CONCLUSÕES*



## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho relatou que o metabolismo *in vitro* do ABZ, realizado em frações microsossomais de fígados de ratos Wistar foi influenciado pela má nutrição proteica. Embora essa avaliação seja proveniente de um estudo *in vitro*, este é um resultado importante, uma vez que este fármaco é administrado para o tratamento de doenças como a neurocisticercose, helmintoses e talvez possa futuramente ser também empregado no tratamento do câncer, doenças estas em que os pacientes comumente encontram-se debilitados. Adicionalmente, o metabolismo *in vitro* se mostrou enantiosseletivo apenas no grupo controle onde as concentrações do (+) e (-)-ABZ-SO apresentaram diferenças significativas quando avaliadas pelo teste *t* de *Student*, mostrando que a restrição proteica influencia também no metabolismo enantiosseletivo do albendazol. Estes resultados são inéditos para o ABZ em condições de restrição proteica e, portanto, importantes para que estudos posteriores, *in vitro* e *in vivo*, sejam conduzidos para avaliar o impacto deste parâmetro na atividade do fármaco.

A Cromatografia Multidimensional permitiu a análise e extração das frações microsossomais e o desenvolvimento de um método enantiosseletivo de análise simultânea dos enantiômeros do ABZ em frações microsossomais, com uma redução no tempo total de análise, totalizando 35 minutos para a determinação dos quatro compostos de interesse.

Este trabalho também mostrou a aplicabilidade das fases quirais de polissacarídeos no modo normal e modo polar orgânico para separação dos enantiômeros do ABZ-SO. A fase *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose apresentou excelente enantiorresolução nos dois modos de eluição. A fase *tris*[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose e *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose não se mostraram eficientes para resolução do ABZ-SO nas condições

avaliadas e a fase *tris*(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose apresentou, pela primeira vez, separação no modo normal de eluição para um sulfóxido.

Além disso, foram obtidos os enantiômeros do ABZ-SO com alto grau de pureza enantiomérica e rendimento, através da cromatografia semipreparativa. Os dois enantiômeros puros, juntamente com sua mistura racêmica e o ABZ foram avaliados frente a inibição do crescimento celular de três linhagens tumorais humanas. O (+)-ABZ-SO se mostrou mais potente que o (-)-ABZ-SO, particularmente na linhagem de células MCF-7, o qual se mostrou ser indutor da apoptose nesta linhagem celular.

*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARCELLOS, N.M.S., *Farmacocinética*, in <http://www.farmacia.ufmg.br/cespmed/text.htm#int>, acesso em 27/03/2007.
2. PEREIRA, D.G., "Importância do Metabolismo no Planejamento de Fármacos". *Química Nova*. **30** (1) 2007.
3. KATZUNG, B.G., *Farmacologia Básica e Clínica*. 5 ed. 1994, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 755.
4. HOWLAND, R.D.M., M. J. , *Farmacologia Ilustrada*. 3 ed. 2007, Porto Alegre: Artmed. 551.
5. DELAFORGE, M., "Importance of metabolism in pharmacological studies: Possible in vitro predictability". *Nuclear Medicine and Biology*. **25**(8): 705, 1998.
6. EKINS, S.; RING, B.J.; GRACE, J.; MCROBIE-BELLE, D.J. & WRIGHTON, S.A., "Present and future in vitro approaches for drug metabolism". *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **44**(1): 313, 2000.
7. OSHIMA-FRANCO, Y.F., L. M., "Biotransformação: Importância e Toxicidade". *Saúde em Revista*. **5**(9) 2003.
8. TANIGUSHI, C. & GUENGERICH, P., *Metabolismo dos Fármacos*, in *Farmacologia*.
9. LAZZERINI, M. & TICKELL, D., "Antibiotics in severely malnourished children: systematic review of efficacy, safety and pharmacokinetics". *Bulletin of the World Health Organization*. **89**(8): 593, 2011.
10. EDDERSHAW, P.J. & DICKINS, M., "Advances in in vitro drug metabolism screening". *Pharmaceutical Science & Technology Today*. **2**(1): 13, 1999.
11. TANG, L.; YE, L.; LV, C.; ZHENG, Z.J.; GONG, Y. & LIU, Z.Q., "Involvement of CYP3A4/5 and CYP2D6 in the metabolism of aconitine using human liver microsomes and recombinant CYP450 enzymes". *Toxicology Letters*. **202**(1): 47, 2011.
12. KINOSHITA, Y.; MATSUMOTO, N.; WATANABE, M.; TAKEBA, Y.; YOSHIDA, Y.; OHBA, K.; SUZUKI, S.; ITOH, F.; KUMAI, T. & KOBAYASHI, S., "Comparison of the Effects of Omeprazole and Rabeprazole on Ticlopidine Metabolism In Vitro". *Journal of Pharmacological Sciences*. **117**(1): 19, 2011.
13. UNSAL, D.; MENTES, B.; AKMANSU, M.; UNER, A.; OGUZ, M. & PAK, Y., "Evaluation of nutritional status in cancer patients receiving radiotherapy - A prospective study". *American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials*. **29**(2): 183, 2006.
14. MCGREGOR, I.A., "Malaria - nutritional implications". *Reviews of Infectious Diseases*. **4**(4): 798, 1982.
15. BAKKE, O.M.; AANDERUD, S.; SYVERSEN, G.; BASSOE, H.H. & MYKING, O., "Antipyrine Metabolism In Anorexia-Nervosa". *British Journal of Clinical Pharmacology*. **5**(4): 341, 1978.
16. VAN LETTOW, M.; HARRIES, A.D.; KUMWENDA, J.J.; ZIJLSTRA, E.E.; CLARK, T.D.; TAHA, T.E. & SEMBA, R.D., "Micronutrient malnutrition and wasting in adults with pulmonary tuberculosis with and without HIV co-infection in Malawi". *Bmc Infectious Diseases*. **4** 2004.

17. MAGADI, M.A., "Household and community HIV/AIDS status and child malnutrition in sub-Saharan Africa: Evidence from the demographic and health surveys". *Social Science & Medicine*. **73**(3): 436, 2011.
18. MAGALHAES, R.J.S. & CLEMENTS, A.C.A., "Mapping the Risk of Anaemia in Preschool-Age Children: The Contribution of Malnutrition, Malaria, and Helminth Infections in West Africa". *Plos Medicine*. **8**(6) 2011.
19. MENDES, E.C.S., S.; FONSECA, E. A. L.; SOUZA, H. R. R.; CARVALHO, R. W. , "A Neurocisticercose Humana na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro, Brasil". *Arq Neuropsiquiatr*. **63** (4) 2005.
20. AGAPEJEV, S., "Aspectos Clínicos-Epidemiológicos da Neurocisticercose no Brasil". *Arq. Neuropsiquiatr*. **2003**(61) 2003.
21. TAKAYANAGUI, O.M.L., J. P. , "Neurocisticercose". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **34**: 283, 2001.
22. WHO, *Control of neurocysticercosis*. 2003, Fifty-Sixty World Health Assembly A56/10
23. ROMAN, G.; SOTELO, J.; DEL BRUTTO, O.; FLISSER, A.; DUMAS, M.; WADIA, N.; BOTERO, D.; CRUZ, M.; GARCIA, H.; DE BITTENCOURT, P.R.M.; TRELLES, L.; ARRIAGADA, C.; LORENZANA, P.; NASH, T.E. & SPINA-FRANCA, A., "A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease". *Bulletin of the World Health Organization*. **78**(3): 399, 2000.
24. CRUZ, I.; CRUZ, M.E.; CARRASCO, F. & HORTON, J., "Neurocysticercosis - Optimal Dose Treatment With Albendazole". *Journal of the Neurological Sciences*. **133**(1-2): 152, 1995.
25. ARAÚJO, G.S.B., *Albendazol*, in *Monografia de Farmacologia*. 2005, Universidade de Brasilia: Brasilia. p. 16.
26. MORENO, L.; ECHEVARRIA, F.; MUNOZ, F.; ALVAREZ, L.; BRUNI, S.S. & LANUSSE, C., "Dose-dependent activity of albendazole against benzimidazole-resistant nematodes in sheep: relationship between pharmacokinetics and efficacy". *Experimental Parasitology*. **106**(3-4): 150, 2004.
27. RAMIREZ, T.; EASTMOND, D.A. & HERRERA, L.A., "Non-disjunction events induced by albendazole in human cells". *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **626**(1-2): 191, 2007.
28. DANAHER, M.; DE RUYCK, H.; CROOKS, S.R.H.; DOWLING, G. & O'KEEFFE, M., "Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **845**(1): 1, 2007.
29. DAYAN, A.D., "Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics". *Acta Tropica*. **86**(2-3): 141, 2003.
30. LOUKAS, A. & HOTEZ, P.J., *Quimioterapia das Infecções por Helmintos*, in *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 2001: Rio de Janeiro. p. 963.
31. RANG, H.P.; DALE, M.M. & RITTER, J.M., *Fármacos Anti-Helmínticos*, in *Farmacologia* 2001, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 622.
32. CHIAP, P.; EVRARD, B.; BIMAZUBUTE, M.A.; DE TULLIO, P.; HUBERT, P.; DELATTRE, L. & CROMMEN, J., "Determination of albendazole and its main metabolites in ovine plasma by liquid chromatography with dialysis as an integrated sample preparation technique". *Journal of Chromatography A*. **870**(1-2): 121, 2000.
33. BATZIAS, G.C. & DELIS, G.A., "Reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone and albendazole 2-aminosulphone in sheep plasma". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **805**(2): 267, 2004.

34. FORMENTINI, E.A.; MESTORINO, O.N.; MARINO, O.N. & ERRECALDE, J.O.O., "Pharmacokinetics of ricobendazole in calves". *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **24**(3): 199, 2001.
35. LANCHOTE, V.L.; MARQUES, M.P.C.; TAKAYANAGUI, O.M.; DE CARVALHO, R.; PAIAS, F.O. & BONATO, P.S., "Simultaneous determination of albendazole sulfoxide enantiomers and albendazole sulfone in plasma". *Journal of Chromatography B*. **709**(2): 273, 1998.
36. KITZMAN, D.; CHENG, K.J. & FLECKENSTEIN, L., "HPLC assay for albendazole and metabolites in human plasma for clinical pharmacokinetic studies". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **30**(3): 801, 2002.
37. SOTELO, J. & JUNG, H., "Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis". *Clinical Pharmacokinetics*. **34**(6): 503, 1998.
38. NAVARRO, M.; CANUT, L.; CARRETERO, A.; CRISTOFOL, C.; PEREZ-APARICIO, F.J.; ARBOIX, H. & RUBERTE, J., "Developmental toxicity in rat fetuses exposed to the benzimidazole netobimin". *Reproductive Toxicology*. **13**(4): 295, 1999.
39. VIRKEL, G.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; PIS, A. & LANUSSE, C., "Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle". *Drug Metabolism and Disposition*. **32**(5): 536, 2004.
40. RAWDEN, H.C.; KOKWARO, G.O.; WARD, S.A. & EDWARDS, G., "Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes". *British Journal of Clinical Pharmacology*. **49**(4): 313, 2000.
41. VELIK, J.; BALIHAROVA, V.; FINK-GREMMELS, J.; BULL, S.; LAMKA, J. & SKALOVA, L., "Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes". *Research in Veterinary Science*. **76**(2): 95, 2004.
42. ESCOBAR-GARCIA, D.; CAMACHO-CARRANZA, R.; PEREZ, I.; DORADO, V.; ARRIAGA-ALBA, M. & ESPINOSA-AGUIRRE, J.J., "S9 induction by the combined treatment with cyclohexanol and albendazole". *Mutagenesis*. **16**(6): 523, 2001.
43. BOLAS-FERNANDEZ, F.; RAMA-INIGUEZ, S. & TORRADO, J.J., "Ex vivo anthelmintic activity of albendazole-sulphoxide enantiomers". *Journal of Parasitology*. **90**(2): 407, 2004.
44. GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.; DEL VEGAS-SÁNCHEZ, M.; TORRADO-DURÁN, J. & BOLÁS-FERNÁNDEZ, F., "Enantiomeric pharmacokinetic prevalence of (+) albendazole sulphoxide in *Trichinella spiralis*; muscle larvae". *Parasitology Research*: 1,
45. GARCIA, J.J.; BOLAS-FERNANDEZ, F. & TORRADO, J.J., "Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma". *Journal of Chromatography B*. **723**(1-2): 265, 1999.
46. PAIAS, F.O.; LANCHOTE, V.L.; TAKAYANAGUI, O.M. & BONATO, P.S., "Enantioselective analysis of albendazole sulfoxide in plasma using the chiral stationary phase". *Chirality*. **9**(8): 722, 1997.
47. CAPECE, B.P.S.; CASTELLS, G.; GODOY, C.; ARBOIX, M. & CRISTOFOL, C., "Pharmacokinetics of albendazole sulfoxide enantiomers administered in racemic form and separately in rats". *Veterinary Journal*. **177**(2): 297, 2008.
48. NAMWANJE, H.; KABATEREINE, N.B. & OLSEN, A., "Efficacy of single and double doses of albendazole and mebendazole alone and in combination in the treatment of *Trichuris trichiura* in school-age children in Uganda". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **105**(10): 586, 2011.

49. LIMA, R.M.; FERREIRA, M.A.D.; CARVALHO, T.; FERNANDES, B.J.D.; TAKAYANAGUI, O.M.; GARCIA, H.H.; COELHO, E.B. & LANCHOTE, V.L., "Albendazole-praziquantel interaction in healthy volunteers: kinetic disposition, metabolism and enantioselectivity". *British Journal of Clinical Pharmacology*. **71**(4): 528, 2011.
50. GARCIA, H.H.; LESCANO, A.G.; LANCHOTE, V.L.; PRETELL, E.J.; GONZALES, I.; BUSTOS, J.A.; TAKAYANAGUI, O.M.; BONATO, P.S.; HORTON, J.; SAAVEDRA, H.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H. & CYSTICERCOSIS WORKING GRP, P., "Pharmacokinetics of combined treatment with praziquantel and albendazole in neurocysticercosis". *British Journal of Clinical Pharmacology*. **72**(1): 77, 2011.
51. URBANI, C. & ALBONICO, M., "Anthelmintic drug safety and drug administration in the control of soil-transmitted helminthiasis in community campaigns". *Acta Tropica*. **86**(2-3): 215, 2003.
52. POURGHOLAMI, M.H.; CAI, Z.Y.; BADAR, S.; WANGOO, K.; PORUCHYNSKY, M.S. & MORRIS, D.L., "Potent inhibition of tumoral hypoxia-inducible factor 1 alpha by albendazole". *Bmc Cancer*. **10** 2010.
53. POURGHOLAMI, M.H.; CAI, Z.Y.; LU, Y.; WANG, L. & MORRIS, D.L., "Albendazole: a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice". *Clinical Cancer Research*. **12**(6): 1928, 2006.
54. POURGHOLAMI, M.H.; SZWAJCER, M.; CHIN, M.; LIAUW, W.; SEEF, J.; GALETTIS, P.; MORRIS, D.L. & LINKS, M., "Phase I clinical trial to determine maximum tolerated dose of oral albendazole in patients with advanced cancer". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **65**(3): 597, 2010.
55. POURGHOLAMI, M.H.; WOON, L.; ALMAJD, R.; AKHTER, J.; BOWERY, P. & MORRIS, D.L., "In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole". *Cancer Letters*. **165**(1): 43, 2001.
56. INCA: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>, acesso em 01/11/2011
57. WHO, *World Cancer Report 2008*, IARC, Editor. 2008, <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/>, acesso em 22/10/2011: Lyon. p. 511.
58. NEIDLE, S. & THURSTON, D.E., "Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies". *Nature Reviews Cancer*. **5**(4): 285, 2005.
59. MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGROWOLFF, A.; GRAYGOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J. & BOYD, M., "Feasibility Of A High-Flux Anticancer Drug Screen Using A Diverse Panel Of Cultured Human Tumor-Cell Lines". *Journal of the National Cancer Institute*. **83**(11): 757, 1991.
60. POURGHOLAMI, M.H.; AKHTER, J.; WANG, L.; LU, Y. & MORRIS, D.L., "Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **55**(5): 425, 2005.
61. KHALILZADEH, A.; WANGOO, K.T.; MORRIS, D.L. & POURGHOLAMI, M.H., "Epothilone-paclitaxel resistant leukemic cells CEWdEpoB300 are sensitive to albendazole: Involvement of apoptotic pathways". *Biochemical Pharmacology*. **74**(3): 407, 2007.
62. HENRIKSSON, E.; KJELLEN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J. & KJELLSTROM, J.H., "Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro

- between colorimetric and cell count/colony assays". *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. **42**(10): 320, 2006.
63. VICHAI, V. & KIRTIKARA, K., "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening". *Nature Protocols*. **1**(3): 1112, 2006.
64. BONATO, P.S. & JABOR, V.A.R., "Análise Enantiosseletiva de Fármacos: Contribuições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar". *Química Nova*. **28** (4): 683, 2005.
65. BONATO, P.S.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C.M.; PAIAS, F.O.; IHA, M.H. & LIMA, R.P., "Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide- and protein-based chiral stationary phases". *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **13**(2): 190, 2002.
66. FELIX, G. & BERTHOD, A., "Commercial chiral stationary phases for the separations of clinical racemic drugs - Part I: From alimentary tract to cardiovascular system drugs". *Separation and Purification Reviews*. **36**(3-4): 285, 2007.
67. WATANABE, C.S.F., *Desenvolvimento, Validação e Aplicação de Métodos por Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência para o Controle de Qualidade de Fármacos Anti-Retrovirais*. 2003, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar: São Carlos. p. 129.
68. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S., *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*, in *Fundamentos de Cromatografia*, UNICAMP, E., Editor. 2006: Campinas. p. 273.
69. BEESLEY, T.E., "Review of Chiral Stationary Phase Development and Chiral Applications". *Lc Gc Europe*. **24**(5): 270, 2011.
70. CAVAZZINI, A.; PASTI, L.; MASSI, A.; MARCHETTI, N. & DONDI, F., "Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review". *Analytica Chimica Acta*. **706**(2): 205, 2011.
71. BOJARSKI, J.; ABOUL-ENEIN, H.Y. & GHANEM, A., "What's new in chromatographic enantioseparations". *Current Analytical Chemistry*. **1**(1): 59, 2005.
72. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. & GLAJCH, J.L., *Practical HPLC Method Development 2<sup>a</sup> ed.* 1997, New York: John Wiley and Sons Inc. 765p.
73. YASHIMA, E., "Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation". *Journal of Chromatography A*. **906**(1-2): 105, 2001.
74. TIRITAN, M.E., *Resolução Enantiomérica de Sulfóxidos Quirais por CLAE, em carbamatos de Polissacarídeos*. 1996, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar: São Carlos. p. 135p.
75. OKAMOTO, Y. & KAIDA, Y., "Resolution By High-Performance Liquid-Chromatography Using Polysaccharide Carbamates And Benzoates As Chiral Stationary Phases". *Journal of Chromatography A*. **666**(1-2): 403, 1994.
76. MATLIN, S.A.; TIRITAN, M.E.; CASS, Q.B. & BOYD, D.R., "Enantiomeric resolution of chiral sulfoxides on polysaccharide phases by HPLC". *Chirality*. **8**(1): 147, 1996.
77. YASHIMA, E. & OKAMOTO, Y., "Chiral discrimination on polysaccharides derivatives". *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **68**(12): 3289, 1995.
78. MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M. & VANDER HEYDEN, Y., "Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar organic solvent chromatography". *Journal of Chromatography A*. **1111**(1): 48, 2006.
79. BELAZ, K.R.A.; COIMBRA, M.; BARREIRO, J.C.; MONTANARI, C.A. & CASS, Q.B., "Multimilligram enantioresolution of sulfoxide proton pump inhibitors by liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phase". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **47**(1): 81, 2008.

80. SOUSA, M.E.; TIRITAN, M.E.; BELAZ, K.R.A.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M.S.J.; CASS, Q.B. & PINTO, M.M.M., "Multimilligram enantioresolution of low-solubility xanthonolignoids on polysaccharide chiral stationary phases using a solid-phase injection system". *Journal of Chromatography A*. **1120**(1-2): 75, 2006.
81. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. & CASSIANO, N., "The use of a polysaccharide-based column on multimodal elution". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **23**(7): 1029, 2000.
82. ALI, I. & ABOUL-ENEIN, H.Y., "Impact of immobilized polysaccharide chiral stationary phases on enantiomeric separations". *Journal of Separation Science*. **29**(6): 762, 2006.
83. ALI, I.; SALEEM, K.; HUSSAIN, I.; GAITONDE, V.D. & ABOUL-ENEIN, H.Y., "Polysaccharides Chiral Stationary Phases in Liquid Chromatography". *Separation and Purification Reviews*. **38**(2): 97, 2009.
84. KATAOKA, H., "New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis". *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **22**(4): 232, 2003.
85. CASSIANO, N.M.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **384**(7-8): 1462, 2006.
86. OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Evaluation of liquid chromatographic behavior of cephalosporin antibiotics using restricted access medium columns for on-line sample cleanup of bovine milk". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(4): 1180, 2006.
87. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; CASSIANO, N.M. & PEDRAZOLLI, J., "Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **766**(1): 153, 2002.
88. CASS, Q.B. & GALATTI, T.F., "A method for determination of the plasma levels of modafinil enantiomers, (+/-)-modafinilic acid and modafinil sulphone by direct human plasma injection and bidimensional achiral-chiral chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **46**(5): 937, 2008.
89. CASS, Q.B.; GOMES, R.F.; CALAFATTI, S.A. & PEDRAZOLLI, J., "Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **987**(1-2): 235, 2003.
90. GOMES, R.F.; CASSIANO, N.M.; PEDRAZZOLI, J. & CASS, Q.B., "Two-Dimensional Chromatography Method Applied to the Enantiomeric Determination of Lansoprazole in Human Plasma by Direct Sample Injection". *Chirality*. **22**(1): 35, 2010.
91. FONTANALS, N.; MARCE, R.M. & BORRULL, F., "On-line solid-phase extraction coupled to hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry for the determination of polar drugs". *Journal of Chromatography A*. **1218**(35): 5975, 2011.
92. FERREIRO-VERA, C.; MATA-GRANADOS, J.M.; GOMEZ, J.M.Q. & DE CASTRO, M.D.L., "On-line coupling of automatic solid-phase extraction and HPLC for determination of carotenoids in serum". *Talanta*. **85**(4): 1842, 2011.
93. BELAZ, K.R.A., *Quantificação dos Metabólitos do Albendazol em Plasma Bovino por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com Injeção Direta de Amostras*, in *Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar*. 2007: São Carlos. p. 148.
94. MENEZES, M.L. & FELIX, G., "On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **21**(18): 2863, 1998.

95. DE LIMA, V.V.; CASSIANO, N.M. & CASS, Q.B., "Development of restricted-access media chromatographic columns protein-immobilized and their evaluation for the analysis of drugs by direct injection of human plasma". *Quimica Nova*. **29**(1): 72, 2006.
96. BRADFORD, M.M., "Rapid And Sensitive Method For Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing Principle Of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry*. **72**(1-2): 248, 1976.
97. KRUGER, N.J., *The Bradford Method for Protein Quantitation*, in *The Protein Protocols Handbook* INC., J.M.W.H.P., Editor. 2002: Totowa. p. 15.
98. FDA, *Guidance For Industry - Bioanalytical Method Validation*. 2001: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>, acessado em 25/01/2007.
99. ANVISA, *Guia Para Validação De Métodos Analíticos E Bioanalíticos*. 2003: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm), acesso em 25/01/2007.
100. CHRISTIAN, G.D., *Analytical Chemistry*. 5 ed. 1994, Nova Iorque: John Wiley & Sons, INC. 812.
101. SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S. & BOYD, M.R., "New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening". *Journal of the National Cancer Institute*. **82**(13): 1107, 1990.
102. WALAWALKAR, P.S.; SERAI, P.S. & IYER, K.R., "Isolation and Catalytic Competence of Different Animal Liver Microsomal Fractions Prepared by Calcium-aggregation Method". *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **68**(2): 262, 2006.
103. LITTERST, C.L.; MIMNAUGH, E.G.; REAGAN, R.L. & GRAM, T.E., "Drug-Metabolism By Microsomes From Extrahepatic Organs Of Rat And Rabbit Prepared By Calcium Aggregation". *Life Sciences*. **17**(5): 813, 1975.
104. ZAMARATSKAIA, G. & ZLABEK, V., "EROD and MROD as Markers of Cytochrome P450 1A Activities in Hepatic Microsomes from Entire and Castrated Male Pigs". *Sensors*. **9**(3): 2134, 2009.
105. HANIOKA, N.; TATARAZAKO, N.; JINNO, H.; ARIZONO, K. & ANDO, M., "Determination of cytochrome P450 1A activities in mammalian liver microsomes by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection". *Journal of Chromatography B*. **744**(2): 399, 2000.
106. RASMUSSEN, M.K.; EKSTRAND, B. & ZAMARATSKAIA, G., "Comparison of cytochrome P450 concentrations and metabolic activities in porcine hepatic microsomes prepared with two different methods". *Toxicology in Vitro*. **25**(1): 343, 2011.
107. WAXMAN, T.K.H.C.A.D.J., *Enzymatic Analysis of cDNA-Expressed Human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 with 7-Ethoxyresorufin as Substrate*, in *Cytochrome P450 Protocols*. p. 469.
108. PEGOLO, S.; MERLANTI, R.; GIANTIN, M.; DACASTO, M.; MONTESISSA, C. & CAPOLONGO, F., "High performance liquid chromatography determination of cytochrome P450 1A and 2C activities in bovine liver microsomes". *Veterinary Journal*. **183**(1): 81, 2010.
109. DE PAULA, F.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up". *Journal of Chromatography A*. **1189**(1-2): 221, 2008.

110. OLIVEIRA, R.V.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup". *Talanta*. **71**(3): 1233, 2007.
111. PEREIRA, A.V. & CASS, Q.B., "High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **826**(1-2): 139, 2005.
112. BARREIRO, J.C.; VANZOLINI, K.L. & CASS, Q.B., "Direct injection of native aqueous matrices by achiral-chiral chromatography ion trap mass spectrometry for simultaneous quantification of pantoprazole and lansoprazole enantiomers fractions". *Journal of Chromatography A*. **1218**(20): 2865, 2011.
113. CASS, Q.B.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; CASSIANO, N.M.; DEGANI, A.L.G. & PEDRAZZOLI, J., "Enantiomeric determination of the plasma levels of omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral-chiral column-switching". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **798**(2): 275, 2003.
114. CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. & WAINER, I.W., "Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography". *Chirality*. **14**(9): 731, 2002.
115. BELAZ, K.R.A.; CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V., "Determination of albendazole metabolites by direct injection of bovine plasma and multidimensional achiral-chiral high performance liquid chromatography". *Talanta*. **76**(1): 146, 2008.
116. DE LIMA, V.V.; CASSIANO, N. & CASS, Q.B., "Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano". *Química Nova*. **29**(1): 72, 2006.
117. BONATO, P.S.; MORAES DE OLIVEIRA, A.R.; MALAGUENO DE SANTANA, F.J.; DUMET FERNANDES, B.J.; LANCHOTE, V.L.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H. & TAKAYANAGUI, O.M., "Simultaneous determination of albendazole metabolites, praziquantel and its metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **44**(2): 558, 2007.
118. MIRFAZAEIAN, A.; DADASHZADEH, S. & ROUINI, M.R., "A high performance liquid chromatography method for simultaneous-determination of albendazole metabolites in human serum". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **30**(4): 1249, 2002.
119. CASS, Q.B. & DEGANI, A.L.G., *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*. 1º ed. 2002, São Carlos: EdUFSCar.
120. ANDRADE, L.S.; DE MORAES, M.C.; ROCHA-FILHO, R.C.; FATIBELLO-FILHO, O. & CASS, Q.B., "A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk". *Analytica Chimica Acta*. **654**(2): 127, 2009.
121. NETO, B.D.B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E., *Como Fazer Experimentos*. 4. ed. 2010, Porto Alegre: Bookman. 413.
122. ZHANG, W.; PARENTAU, H.; GREENLY, R.L.; METZ, C.A.; AGGARWAL, S.; WAINER, I.W. & TRACY, T.S., "Effect of protein-calorie malnutrition on cytochromes P450 and glutathione S-transferase". *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. **24**(2): 141, 1999.

123. MAO, Z.L.; TAM, Y.K. & COUTTS, R.T., "Effect of protein and calorie malnutrition on drug metabolism in rat - in vitro". *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **9**(1): 60, 2006.
124. MEHTA, S., "MALNUTRITION AND DRUGS - CLINICAL IMPLICATIONS". *Developmental Pharmacology and Therapeutics*. **15**(3-4): 159, 1990.
125. BUCHANAN, N.; DAVIS, M.D.; HENDERSON, D.B.; MUCKLOW, J.C. & RAWLINS, M.D., "Acetanilide Pharmacokinetics In Kwashiorkor". *British Journal of Clinical Pharmacology*. **9**(5): 525, 1980.
126. LEFFINGWELL, J.C., "Chirality & Bioactivity I: Pharmacology". *Leffingwell Reports*. **3**(1): 1, 2003.
127. CASS, Q.B. & BATIGALHIA, F., "Enantiomeric resolution of a series of chiral sulfoxides by high-performance liquid chromatography on polysaccharide-based columns with multimodal elution". *Journal of Chromatography A*. **987**(1-2): 445, 2003.
128. MONTANARI, C.A.; CASS, Q.B.; TIRITAN, M.E. & DE SOUZA, A.L.S., "A QSERR study on enantioselective separation of enantiomeric sulphoxides". *Analytica Chimica Acta*. **419**(1): 93, 2000.
129. CHANKVETADZE, B.; YAMAMOTO, C. & OKAMOTO, Y., "Enantioseparation of selected chiral sulfoxides using polysaccharide-type chiral stationary phases and polar organic, polar aqueous-organic and normal-phase eluents". *Journal of Chromatography A*. **922**(1-2): 127, 2001.
130. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M. & HATADA, K., "Chromatographic Resolution .11. Controlled Chiral Recognition Of Cellulose Triphenylcarbamate Derivatives Supported On Silica-Gel". *Journal of Chromatography*. **363**(2): 173, 1986.
131. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. & CASSIANO, N.M., "Effects on enantioselectivity by the use of polysaccharide-based columns by multimodal elution". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **26**(13): 2083, 2003.
132. MILLER, L.; ORIHUELA, C.; FRONEK, R.; HONDA, D. & DAPREMONT, O., "Chromatographic resolution of the enantiomers of a pharmaceutical intermediate from the milligram to the kilogram scale". *Journal of Chromatography A*. **849**(2): 309, 1999.
133. HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J. & LEE, C.C., "The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity". *Methods*. **42**(4): 377, 2007.