

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

**"METABOLISMO *IN VITRO* DO ALBENDAZOL EM ESCALA
MILIGRAMA E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA SEMIPREPARATIVA"**

Marina Beghini Batistão *

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Profa. Dra. Regina V. Oliveira

* Bolsista CAPES

São Carlos-SP
2013

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

B333mv

Batistão, Marina Beghini.

Metabolismo *in vitro* do albendazol em escala miligrama e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa / Marina Beghini Batistão. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
119 f.

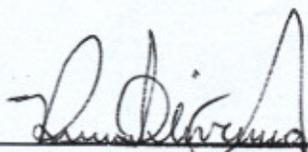
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Química analítica. 2. Metabolismo *in vitro*. 3. Benzimidazóis. 4. Cromatografia quiral. I. Título.

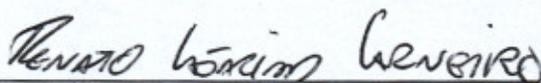
CDD: 543 (20^a)

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

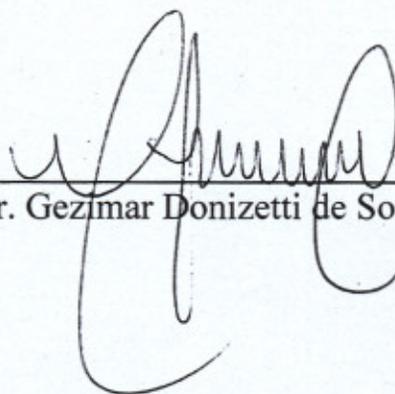
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata Marina Beghini Batistão, realizada em 06 de junho de 2012:



Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Dr. Gezimari Donizetti de Souza

*Não me dêem fórmulas certas, porque eu não espero acertar sempre.
Não me mostre o que esperam de mim, porque vou seguir meu coração!
Não me façam ser o que não sou,
não me convidem a ser igual, porque sinceramente sou diferente!
Não sei amar pela metade, não sei viver de mentiras,
não sei voar com os pés no chão.
Sou sempre eu mesma, mas com certeza não serei a mesma pra sempre!*

Clarice Lispector

Dedico...

*Aos meus pais **Dulcirene** e **Pedro** por todo amor, carinho, por serem os principais responsáveis por todos os meus objetivos até hoje alcançados, sem vocês eu nada seria; obrigada pelos sonhos abdicados para que os meus fossem realizados!*

*A minha irmã **Izabel**, pela amizade, amor, confiança e incentivo;*

*e luz de nossas vidas, minha sobrinha **Clara**.*

Amo muito vocês!!!!!!

*“Saudade é um sentimento que
quando não cabe no coração,
escorre pelos olhos”
Bob Marley*

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Regina V. Oliveira**, pela oportunidade de aprendizado, por todos os ensinamentos fundamentais na formação de um pesquisador, pela amizade, confiança e por ter aberto portas que jamais serão esquecidas.

À **Profa. Dra. Quezia B. Cass** pelo empréstimo de equipamentos, e concessão de materiais e reagentes

Ao **Prof. Thiago Russo** por ter cedido os fígados dos ratos do laboratório de plasticidade muscular, do departamento de Fisioterapia, da UFSCar.

À **Profa. Dra. Maria Célia Bertolini**, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microorganismos, da UNESP, Campus Araraquara, Instituto de Química, pelo empréstimo da ultracentrífuga, e ao **Tarcísio** pelo suporte técnico na utilização deste equipamento.

À todos os meus amigos do CLAE, que me ajudaram inúmeras vezes no desenvolvimento deste projeto. **Taci, Marina, Roberta, Manu, Kenia, Fran, Marcela, Pedro, Bibi, Juliana, Tiago, Fernando, Thais, Neila, Paulo, Ricardo, Vinicius e Bruna.**

Ao **Alexandre** pela amizade, disposição e assistência infinita com os equipamentos

À minha família, pelo incentivo e apoio constantes. Especialmente aos meus pais **Dulcirene e Pedro**, minha irmã **Bel**, minha sobrinha **Clara** e meu cunhado **Gustavo**, pelo amor, carinho e confiança dedicados..

A todas as minhas amigas **Lívia, Malu, Mônica, Priscila (Lobinha), Elisa** em especial a **Amanda e Cíntia** pela amizade, suporte todos esses anos, por serem a minha nova família., e por tornarem a minha vida mais alegre

Aos amigos **Zeh, Gustavão e Thiaguinho**, pela amizade, companhia e apoio nessa fase.

As amigas de Garça: **Gabi, Ariane, Lala, Jady, Laura, Bella, Lu, Mel, Naty** por estarem sempre torcendo e entenderam minha ausência em alguns momentos importantes;

Aos amigos do **LABBES**, pela paciência durante a minha iniciação científica, especialmente ao **Prof. Dr. Fatibello**, aos amigos **Bruno e Geiser**, pela amizade, força e confiança .

A **Tia Tita e Tio Marcos**, pelo apoio, sem vocês a dissertação não teria sido escrita..

A **CAPES** pelo auxílio financeiro.

A todos os **Professores e Funcionários** do Departamento de Química, da UFSCar.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho **MUITO OBRIGADA!!!**

*O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.*

Fernando Pessoa

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABZ	Albendazol
ABZ-SO	Albendazol sulfóxido
ABZ-SO ₂	Albendazol sulfona
ABZ-SO ₂ -NH ₂	Albendazol amino sulfona
ACN	Acetonitrila
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e eliminação
BSA	Albumina Sérica Bovina
CV	Coefficiente de Variação
D.I.	Diâmetro Interno
ELL	Extração Líquido-líquido
FDA	Food and Drug Administration
FEQ	Fase estacionária quiral
HEX	Hexano
HPLC/CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
ISO	Isopropanol
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LPME	Micro extração líquido-líquido
MeOH	Metanol
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PP	Precipitação de Proteínas
RAM	Fases de Acesso Restrito
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDME	Micro extração com gota suspensa Sequencial
SPE	Extração em Fase Sólida
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Micro extração fase sólida
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV-Vis	Ultra-violeta Visível
λ	Comprimento de onda

LISTA DE FIGURA

Figura 1.1 Oxidação da Cafeína. Reação de fase I. (adaptada de BARREIRO et al, 1996)	16
Figura 1.2 Acetilação da Isoniazida. Reação de fase II. (adaptada de. KATZUNG, 2003)	17
Figura 1.3 Estrutura química do albendazol e seus metabólitos. (1) Sulfeto de albendazol (ABZ); (2) Sulfóxido de albendazol (ABZ-SO); (3) albendazol sulfona (ABZ-SO ₂) e (4) albendazol 2-aminosulfona (ABZ-NH ₂ -SO ₂).....	35
Figura 1.4 Estrutura da fase quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.	44
Figura 4.1 Curvas de calibração obtida a partir de soluções padrão de BSA. (A) utilizada para quantificar as amostras extraídas por centrifugação diferencial; (B) utilizada para quantificar as amostras extraídas por agregação com CaCl ₂	71
Figura 4.2 Cromatograma obtido para a separação dos metabólitos do ABZ e seus metabólitos, no modo polar orgânico. (A) etanol (100%); (B) etanol:acetonitrila (95:5); (C) etanol:isopropanol (98:2). Condições Cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato)	76
Figura 4.3 Cromatograma das soluções padrão de: (1) ABZ, (2) (+)-ABZ-SO; (3) (-)-ABZ-SO e (4) ABZ-SO ₂ . Condições Cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 0,46 mm d.i.), vazão de 1,0mL/min, volume.....	77
Figura 4.4 Etapas envolvidas na extração de amostras em fase sólida.	79
Figura 4.5 Cromatograma da extração do ABZ e metabólitos em fração microsomal por SPE (A) e análise dos compostos em solvente (B).....	81
Figura 4.6 Etapas envolvidas na extração de amostras por PP.	81
Figura 4.7 Cromatogramas da extração de ABZ e metabólitos da fração microsomal por PP. (A) 400 µL metanol e (B) 400 µL de acetonitrila.....	82
Figura 4.8 Formação de (+)- e (-)-ABZ-SO em função do tempo de incubação.....	84
Figura 4.9 Formação do (+)- e (-)-ABZSO em função da concentração proteica da fração microsomal.	86
Figura 4.10 Formação do (+)- e (-)-ABZ-SO e do ABZ-SO ₂ em função da concentração do ABZ.....	87

Figura 4.11 Formação do (+) e (-) ABZSO em função da concentração de NADPH	88
Figura 4.12 Cromatograma obtido em escala analítica para a biotransformação in vitro do ABZ.....	89
Figura 4.13 Cromatograma da separação de NADP e NADPH. Condições Cromatográficas: Coluna C18 Nucleosil (10 x 0,21 cm d.i.). Fase móvel: trietilamina (1%; pH 6,0):ACN (97:3 v/v), vazão de 0,2 mL/min, volume de injeção de 10 µL e $\lambda = 260$ nm.	91
Figura 4.14 Formação de NADPH em função da concentração de G6P.....	92
Figura 4.15 Formação de NADPH em função da concentração de NADP.....	93
Figura 4.16 Formação de NADPH em função da concentração da enzima G6PD...	94
Figura 4.17 (A) Cromatograma da solução de NADPH 20mg/mL. (B)Cromatograma das melhores condições para obtenção do NADPH pelo SRN.	95
Figura 4.18 Cromatograma das amostras padrão de ABZ (1), (+)-ABZ-SO (2), (-)-ABZ-SO (3) e ABZ-SO ₂ (4).	96
Figura 4.19 Cromatogramas da biotransformação in vitro em escala miligrama utilizando NADPH comercial (A) e o SRN (B). (1) ABZ; (2) (+)-ABZ-SO; (3) (-)-ABZ-SO e (4) ABZ-SO ₂ . Condições cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS Nucleosil (20 x 0,70 cm d.i.) (20% g/g). Fase móvel: hexano:etanol (55:45 v/v), vazão de 3,0mL/min, e $\lambda = 290$ nm.	98
Figura 4.20 Cromatograma da separação semipreparativa após a biotransformação do ABZ com frações microssomais. Condições cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 x 0,70 cm d.i.) (20% g/g). Fase móvel: hexano:etanol (55:45 v/v), vazão da fase móvel de 3,0 mL/min e $\lambda = 290$ nm.	99
Figura 4.21 Cromatograma obtido para a determinação da pureza enantiomérica do (+)- e (-)-ABZ-SO.....	100
Figura 4.22 Cromatograma (A) e espectro (B) de full scan para a amostra padrão de ABZ-SO. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H ₂ O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 µL vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); Ionização por ESI (+). (M + H) = 282.	101
Figura 4.23 – Cromatograma (A) e espectro (B) de full scan para a amostra padrão de ABZ-NH ₂ -SO ₂ . Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica	

APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 µL; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); Ionização por ESI (+). (M + H) = 240. 101

Figura 4.24 – Cromatograma (A) e espectro (B) de full scan para a amostra padrão de ABZ-SO₂. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 µL; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); Ionização por ESI (+). (M + H) = 298. 102

Figura 4.25 Cromatograma (A) e espectros de full scan (B, C) para a amostra branco da incubação microsomal. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 µL; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); Ionização por ESI (+). 102

Figura 4.26 Cromatograma (A) e espectros (B - F) de full scan para a amostra de ABZ após incubação microsomal. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 µL; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); Ionização por ESI (+). 104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 Cromatografia Líquida e Aplicações na Investigação do Metabolismo in vitro de Fármacos (continua).....	23
TABELA 1.2 Quantidade de composto isolado e sua área de trabalho. (adaptado de HUBER e MAJORS, 2007).....	33
TABELA 1.3 - Métodos de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de ABZ e seus metabólitos (2007-2012).	38
TABELA 1.4 - Seletores quirais Natural e Sintético. Adaptado de LOURENÇO et al 2010).....	42
TABELA 3.1 Condições de análise do ABZ e seus metabólitos por LC-MS/MS empregando-se a coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm) e fontes de ionização por ESI.....	61
TABELA 4.1 Valores da Média de Absorbância (Abs), Coeficiente de Variação (CV%) e Exatidão (%) para a curva de calibração A, preparada em diferentes concentrações de BSA. $\lambda = 596$ nm.	72
TABELA 4.2 Valores da Média de absorbância (Abs), Coeficiente de Variação (CV%) e Exatidão (%) para a curva de calibração B, preparada em diferentes concentrações de BSA. $\lambda = 596$ nm.	72
TABELA 4.3 Fases móveis avaliadas para a separação cromatográfica do ABZ e seus metabólitos, com emprego da coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 % g/g) (150 x 4,6 mm; 7,0 μ m).....	75
TABELA 4.4 : Condições avaliadas para o tratamento de amostra por SPE	80
TABELA 4.5 Valores de recuperação obtidos durante o preparo de amostra por SPE	80
TABELA 4.6 Condições iniciais de incubação do ABZ em fracos microssomais de ratos Wistar. Tempo de incubação de 60 min.	83
TABELA 4.7 Parâmetros avaliados e parâmetros selecionados para a biotransformação in vitro do ABZ	89
TABELA 4.8 Parâmetros utilizados para a biotransformação in vitro em escala miligramas.....	97
TABELA 4.9 Dados obtidos da separação semipreparativa dos enantiômeros do ABZ-SO.....	100

RESUMO

Metabolismo *in vitro* do Albendazol em Escala Miligrama e Purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Semipreparativa

Este trabalho apresenta o metabolismo *in vitro* do albendazol (ABZ), realizado em frações microsossomais de fígados de ratos Wistar, em escala analítica e semipreparativa. Posteriormente, a separação e isolamento dos metabólitos majoritários foi realizada com emprego de Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência no modo normal de eluição. A separação cromatográfica do ABZ, albendazol sulfóxido (ABZ-SO), albendazol 2-aminosulfona (ABZ-NH₂-SO₂) e albendazol sulfona (ABZ-SO₂) foi obtida utilizando uma coluna cromatográfica quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (15,0 x 0,46 cm d.i.) ou (20,0 x 0,70 cm d.i.), fase móvel composta por hexano:etanol (55:45 v/v) e $\lambda=290$ nm. Diferentes parâmetros do processo de biotransformação *in vitro* foram avaliados, no modo univariado, e as melhores condições selecionadas, sendo estas: tempo de incubação (6 horas), concentração do ABZ (1,5 mg/mL), concentração proteica (20 mg/mL) e concentração de β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzida (NADPH; 20 mg/mL). Para o sistema regenerador de NADPH, utilizou-se β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADP) 100 mmol/L, glicose-6-fosfato (G6P) 100 mmol/L e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) 100 U/mL. Para a obtenção das frações microsossomais, tanto o método de precipitação com cloreto de cálcio quanto o de ultracentrifugação, foram apropriados para o isolamento dos microsossomas. A ultracentrifugação propiciou uma maior concentração protéica para as amostras extraídas (35,2 mg/mL). O preparo das amostras foi realizado por extração em fase sólida, com valores de recuperação de 89 a 109%. O metabolismo *in vitro* em escala miligrama propiciou a obtenção de 1,0 mg do (+)-ABZ-SO e 8,0 mg do (-)-ABZ-SO. O ABZ-NH₂-SO₂ e ABZ-SO₂ não foram observados nas condições de biotransformação avaliadas. O metabolismo *in vitro* em escala miligrama pode ser utilizado para a produção e isolamento de metabólitos para posterior estudos farmacocinéticos.

ABSTRACT

In vitro Metabolism of Albendazole in Milligram Scale and Purification by Semipreparative High Performance Liquid Chromatography

This work presents the *in vitro* metabolism of albendazole (ABZ) conducted with microsomal fractions obtained from Wistar rats and performed in analytical and semipreparative scale. Subsequent separation and purification of the major metabolites was accomplished using High Performance Chiral Liquid Chromatography in normal elution mode. The chromatographic separation of ABZ, albendazol sulphoxide (ABZ-SO), albendazole 2-aminesulphone (ABZ-NH₂-SO₂) and albendazole sulphone (ABZ-SO₂) was achieved on a chromatographic chiral column containing amylose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) (15.0 x 0.46 cm i.d.) or (20.0 x 0.70 cm i.d.), hexane:ethanol (55:45) as mobile phase and $\lambda = 290$ nm. Different parameters in the *in vitro* biotransformation were evaluated in a univariate mode and the best conditions selected as follows: incubation time (6 hours), concentration of ABZ (1.5 mg/mL), concentration of proteins (20 mg/ml) and concentration of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dehydrogenase (NADPH; 20 mg/ml). For the NADPH regenerating system was used nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) 100 mmol/L, glucose-6-phosphate (G6P) 100 mmol/L and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 100 U/mL. For the microsomal fractions both the calcium aggregation or ultracentrifugation methods were appropriate for microsome isolation. Ultracentrifugation provided the highest protein concentration for the extracted samples (35.2 mg/mL). The sample preparation was conducted by solid phase extraction and the recoveries were within 89 to 109%. The *in vitro* metabolism in milligram scale allowed the production of 1.0 mg of the (+)-ABZ-SO and 8.0 mg of the (-)-ABZ-SO. The ABZ-NH₂-SO₂ and ABZ-SO₂ were not observed under the biotransformation conditions tested. The *in vitro* metabolism in milligram scale can be used for the production and purification of metabolites for further pharmacokinetics studies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 METABOLISMO DE FÁRMACOS	15
1.2 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DO METABOLISMO DE FÁRMACOS	18
1.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E APLICAÇÕES NA INVESTIGAÇÃO DO METABOLISMO <i>IN VITRO</i> DE FÁRMACOS	22
1.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa	31
1.4 ALBENDAZOL: PROPRIEDADES QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS	34
1.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA QUIRAL DE ALTA EFICIÊNCIA	40
1.6 PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	44
1.6.1 Tratamento de Amostras <i>on-line</i>	45
1.6.2 Tratamento de amostras <i>off-line</i>	46
1.6.2.1 Precipitação de Proteínas (PP).....	46
1.6.2.2 Extração Líquido-Líquido (ELL).....	46
1.6.2.3 Microextração Líquido-Líquido (LPME)	47
1.6.2.4 Extração em Fase Sólida (SPE)	48
1.6.2.5 Microextração em Fase Sólida (SPME).....	49
2 OBJETIVOS.....	51
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	53
3.1 EQUIPAMENTOS	53
3.2 SOLVENTES E REAGENTES	54
3.3 ANIMAIS	55
3.4 EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES MICROSSOMAIS	56
3.4.1 Preparo da solução tampão salina.....	56
3.4.2 Preparo do tampão fosfato de potássio com sacarose e PMSF	56
3.4.3 Preparo da Solução de Cloreto de Cálcio	56
3.4.4 Obtenção das frações microssomais: extração por Centrifugação Diferenciada	57
3.4.5 Obtenção das frações microssomais: extração por agregação com cloreto de cálcio	58
3.4.6 Determinação proteica das frações microssomais	58
3.4.6.1 Preparo do reagente de Bradford	58
3.4.6.2 Preparo das soluções de BSA	59
3.4.6.3 Medidas espectrofotométricas das amostras	59
3.5 MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A ANÁLISE DE ALBENDAZOL E SEUS METABÓLITOS NO MODO NORMAL DE ELUIÇÃO.....	60
3.5.1 Escala Analítica.	60
3.5.2 Escala Semipreparativa	60
3.6 CONDIÇÕES LC-MS/MS PARA ANÁLISE DE ABZ E SEUS METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA	61
3.7 ESTUDO DO METABOLISMO <i>IN VITRO</i>	62
3.7.1 Preparo do Tampão Hepes com cloreto de magnésio.....	62
3.7.2 Preparo do Tampão Monobásico de Potássio (KH_2PO_4)	62
3.7.3 Preparo da solução de cloreto de magnésio (MgCl_2)	62

3.7.4	Preparo da solução de EDTA.....	62
3.7.5	Preparo da solução de NADPH (β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzido).....	63
3.8	SISTEMA REGENERADOR DE NADPH.....	63
3.8.1	Preparo da solução de NADP.....	63
3.8.2	Preparo da solução glicose-6-fosfato.....	63
3.8.3	Preparo da solução glicose-6-fosfato desidrogenase.....	64
3.8.4	Análise do sistema regenerador de NADPH.....	64
3.8.5	Obtenção do NADPH através do sistema regenerador de NADPH.....	64
3.9	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	64
3.9.1	Escala Analítica.....	64
3.9.2	Escala Semipreparativa.....	65
3.9.3	Preparo de amostras.....	65
3.9.3.1	Precipitação de proteína (PP).....	65
3.9.3.2	Extração em fase sólida (SPE).....	65
3.9.4	Tratamento de resíduos.....	66
4	- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES MICROSSOMAS POR CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIADA E POR AGREGAÇÃO COM $CaCl_2$	68
4.2	DETERMINAÇÃO PROTEICA DAS FRAÇÕES MICROSSOMAS.....	70
4.2.1	Curva de calibração.....	71
4.3	DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A ANÁLISE DE ALBENDAZOL E SEUS METABÓLITOS.....	74
4.4	PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	77
4.4.1	Preparo da amostra por extração em fase sólida (SPE).....	79
4.4.2	Preparo de amostra por precipitação de proteína (PP).....	81
4.5	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO ALBENDAZOL.....	82
4.5.1	Avaliação do tempo de incubação.....	84
4.5.2	Avaliação da concentração proteica.....	85
4.5.3	Avaliação da concentração do albendazol.....	86
4.5.4	Avaliação da concentração de NADPH.....	88
4.6	SISTEMA REGENERADOR DE NADPH (SRN).....	90
4.6.1	Método cromatográfico para a análise de NADP e NADPH.....	90
4.6.2	Otimização das condições para a obtenção do sistema regenerador de NADPH (SRN).....	91
4.7	PROCESSO DE METABOLIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM ESCALA MILIGRAMA.....	95
4.7.1	Isolamento dos produtos de biotransformação.....	98
5	CONCLUSÕES.....	106
6	REFERÊNCIAS.....	109

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo de Fármacos

O mecanismo de ação de um fármaco, administrado para humanos ou animais, é dividido em três fases, sendo estas: fase farmacêutica, fase farmacocinética e a fase farmacodinâmica. (PEREIRA, 2007)

A fase farmacêutica é responsável pela desintegração do medicamento e dissolução da substância ativa. A fase farmacocinética inclui os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) do fármaco, enquanto que a fase farmacodinâmica relaciona-se com a interação do fármaco com receptores e/ou enzimas. (PEREIRA, 2007; GUNARATNA, 2000)

A fase farmacocinética é um dos estágios mais importante a ser investigado em estudo pré-clínicos e clínicos, uma vez que essa é a etapa responsável pela concentração e o tempo de atuação das moléculas do fármaco no seu local de ação (PEREIRA, 2007). Estima-se que uma grande parcela de possíveis candidatos a fármacos falhem devido às propriedades insatisfatórias frente aos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME).

O processo de absorção tem por finalidade transferir o fármaco do local onde é administrado para os fluidos circulantes, representados especialmente pelo sangue; o termo distribuição se refere à transferência reversível do fármaco de um local a outro dentro do organismo. O metabolismo (biotransformação) de fármacos compreende o conjunto de reações enzimáticas que biotransformam estes e outros compostos xenobióticos levando à formação de metabólitos hidrofílicos e polares usualmente excretados via fígado, bile, intestino ou urina (GIBSON e SKETT, 2001).

Dentre os parâmetros de ADME, a fase de metabolismo apresenta um papel importante na biodisponibilidade e na farmacocinética dos compostos de interesse. A etapa do metabolismo é a responsável por promover a eliminação do composto administrado na forma de um ou mais metabólitos ativos ou inativos, sendo esta conversão mediada por dois tipos de reações: as reações designadas de fase I e as reações de fase II (FDA, 1997).

As reações de fase I são reações de funcionalização, tais como: oxidação, redução e quebra hidrolítica, responsáveis pela conversão do fármaco lipofílico em um primeiro metabólito mais polar. Esta etapa, na maioria das vezes

envolve o citocromo P450 hepático e compreende, basicamente, a inserção de um átomo de oxigênio, originário de uma molécula de O_2 , na estrutura do fármaco. Se os metabólitos formados na fase I não forem suficientemente polares para serem excretados, estes metabólitos sofrem adicionalmente reações de conjugação com pequenas moléculas endógenas de alta polaridade, como sulfatos, açúcares ou aminoácidos, formando conjugados altamente hidrossolúveis, os quais são excretados principalmente pela urina ou na bile. As reações de conjugação constituem as características básicas do metabolismo de fase II. Uma grande variedade de fármacos sofre essas reações de biotransformação seqüenciais, embora, em alguns casos, o fármaco original já possa ter um grupo funcional do tipo -OH, -NH₂ ou -COOH, capaz de formar diretamente um conjugado (HOWLAND e MYCEK, 2007; KATZUNG, 2003; IVANOVA *et al*, 2011).

Exemplos de reações de funcionalização de fase I e de conjugação de fase II estão ilustrados nas Figuras 1.1 e 1.2, respectivamente.

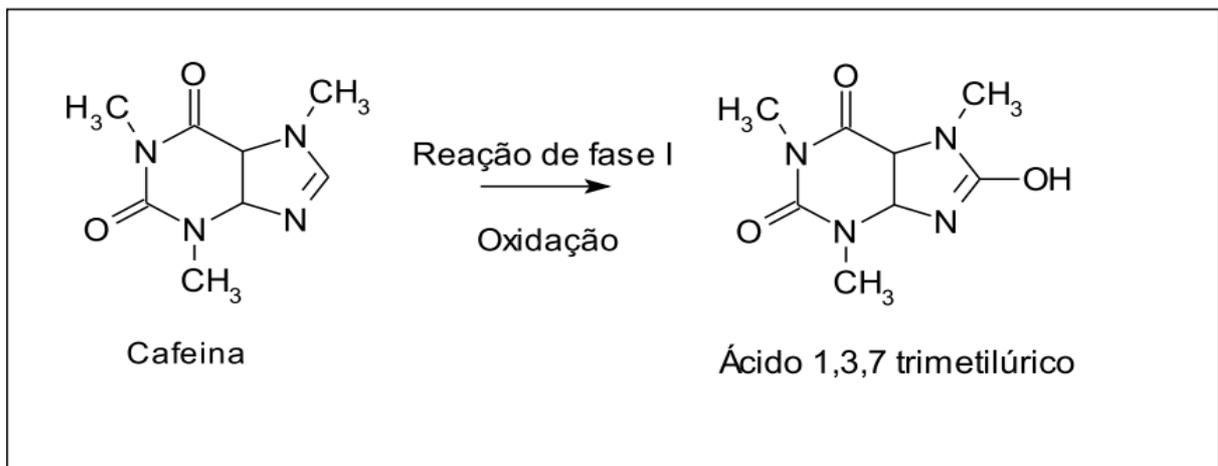


Figura 1.1 Oxidação da Cafeína. Reação de fase I. (adaptada de BARREIRO et al, 1996)

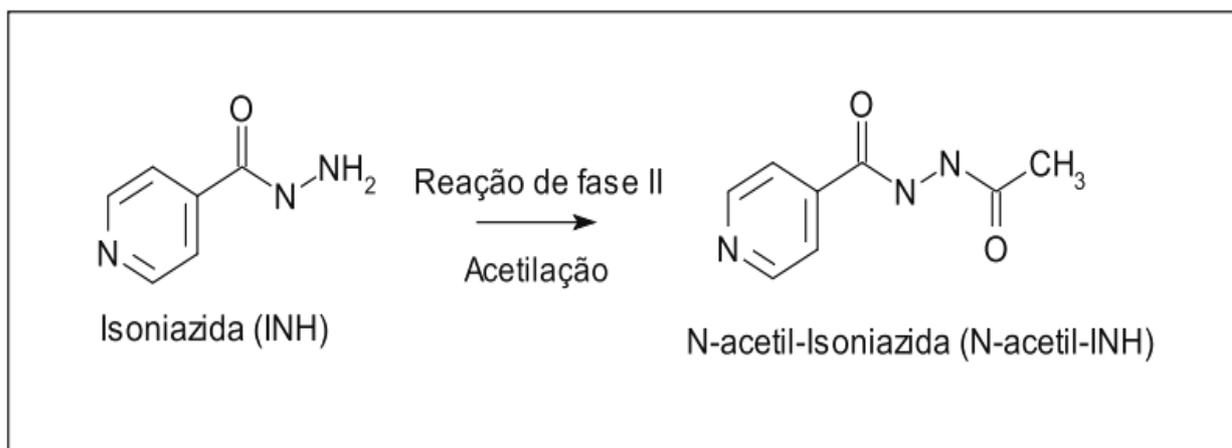


Figura 1.2 Acetilação da Isoniazida. Reação de fase II. (adaptada de. KATZUNG, 2003)

Diferentes enzimas podem atuar no processo de biotransformação de moléculas. O principal sistema enzimático envolvido no metabolismo de fármacos compreende as enzimas microsômicas hepáticas, onde se destaca uma hemoproteína oxidativa denominada citocromo P450. Tal enzima foi assim, denominada por OMURA & SATO, pois o complexo formado com o monóxido de carbono apresenta uma banda de absorção espectrofotométrica em 450 nm (OSHIMA-FRANCO e FRANCO, 2003; DELAFORGE, 1998).

O sistema citocromo P450 (CYP) é uma família de isoenzimas, codificadas pela superfamília de gens CYP. Estas enzimas catalisam numerosas reações, incluindo o metabolismo de ácidos graxos, biotransformação xenobiótica, além da síntese e metabolismo de substratos endógenos. As várias isoformas de CYP envolvidas com biotransformação xenobiótica e metabolismo de fármacos estão agrupadas nas subfamílias CYP1, CYP2 e CYP3 (BARREIRO et al, 1996; AUDI e PUSSI, 2000).

Embora todos os tecidos tenham alguma capacidade de metabolizar fármacos, o fígado é o principal órgão capaz de realizar essa metabolização. Outros tecidos que exibem considerável atividade incluem o trato gastrointestinal, os pulmões, a pele e os rins. (KATZUNG, 2003)

Um fármaco tem sua utilidade terapêutica medida em função da ação benéfica que exerce sobre um dado sistema biológico. Esta, por sua vez, depende da quantidade do fármaco administrada capaz de atingir, na concentração necessária, o sítio de ação desejado. Portanto o estudo do metabolismo dos fármacos se torna essencial para o completo conhecimento de fatores

farmacocinéticos relevantes ao uso adequado e seguro dos fármacos (BARREIRO, 1996).

1.2 Estudos *in vitro* do Metabolismo de Fármacos

O estudo *in vitro* do metabolismo de fármacos passou por inúmeros avanços na sua tecnologia. No entanto, nenhuma destas mudanças foi mais importante do que a transferência de tecnologia para as indústrias, a partir dos laboratórios acadêmicos, onde este conhecimento residiu de 1930 a 1970. Contudo, somente no final dos anos 1980 é que as abordagens de metabolismo *in vitro* começaram a provar o seu valor, em paralelo com os estudos *in vivo* (EKINS et al, 2000).

A primeira etapa no desenvolvimento de um novo fármaco é a descoberta ou síntese de uma molécula bioativa, seguida dos testes *in vitro* e pelos estudos *in vivo*, onde se pode comprovar a sua eficácia, seletividade e mecanismo de ação. Desta forma, a avaliação em seres humanos é realizada em três fases convencionais antes que o fármaco possa ser submetido à aprovação para uso geral. Por lei, a segurança e a eficácia do novo fármaco deve ser definida antes deste ser comercializado. (KATZUNG, 2003). Estima-se que o custo para o desenvolvimento de novos fármacos bem sucedidos desde a descoberta de novas moléculas seja de 1,8 bilhão de dólares. (STEVEN et al, 2010)

A eficácia terapêutica de um fármaco é função de duas características básicas: sua capacidade de exercer o efeito farmacológico desejado e suas propriedades toxicológicas. Assim, para se considerar a sua utilidade terapêutica é necessária à realização de uma série de investigações relacionadas às suas propriedades físico-químicas tais como estabilidade, solubilidade, permeabilidade; propriedades farmacológicas, toxicológicas, vias metabólicas e seus principais produtos de biotransformação, em diferentes espécies animais.

Os estudos farmacocinéticos são fundamentais para a avaliação de novos produtos farmacêuticos anteriormente à sua aplicação em ensaios clínicos e para a investigação de possíveis interações farmacocinéticas nas associações usadas na terapêutica, assim como, para conhecer os metabólitos principais formados no processo de metabolismo, onde estes podem apresentar atividade farmacológica similar ao fármaco precursor, inatividade ou, até mesmo, uma elevada

toxicidade, o que pode resultar na subterapia e no aumento de efeitos colaterais indesejados quando clinicamente administrados. Ainda, os metabólitos formados na biotransformação podem ser compostos quirais onde, na maioria das vezes, os enantiômeros exibem diferentes propriedades farmacológicas e podem ser biotransformados por vias de metabolização distintas (EKINS et al., 2005)

Desta forma, o conhecimento dos metabólitos formados durante a metabolização de uma molécula bioativa; as rotas de metabolização ocorridas e as enzimas envolvidas neste processo são de fundamental importância no desenvolvimento de novos fármacos, para complementar a caracterização da farmacocinética de um composto químico (EKINS et al., 2005).

Tradicionalmente a pesquisa de novos fármacos concentra seus esforços iniciais na fase farmacodinâmica. Triagens preliminares usam modelos *in vitro*, tais como enzimas, receptores ou tecidos, para obter a relação entre os novos compostos e sua potência agonista ou antagonista. A partir destes estudos, triagens secundárias e terciárias freqüentemente são conduzidas com a administração do composto em estudo para animais, com observação do seu efeito farmacológico. Porém, muitos dos compostos que se mostram promissores nos testes *in vitro* não apresentam boa atividade quando administrados *in vivo*. Os principais fatores que inviabilizam a introdução de fármacos e novos medicamentos no mercado têm relação direta ou, pelo menos, uma co-relação com problemas farmacocinéticos. Um perfil farmacocinético desfavorável, como baixa biodisponibilidade, volume de distribuição limitado ou excreção e metabolismo excessivamente rápidos, assim como a formação de metabólitos de alta toxicidade, pode determinar ineficácia terapêutica ou o aparecimento de efeitos tóxicos relevantes (LIN et al., 2003; CHENG et al., 2001). Assim, somente para um pequeno número de fármacos, os quais apresentam características farmacocinéticas desejáveis nos ensaios pré-clínicos, são conduzidos aos ensaios clínicos e destes apenas 10 % chegam ao mercado (OBACH et al., 1997). Desta forma, no processo de descoberta de novos fármacos e medicamentos, a previsão dos processos de ADME logo nos estágios iniciais da pesquisa é de extrema importância.

Uma fonte principal para a obtenção e estudo de produtos de biotransformação é a utilização de modelos animais ou testes *in vitro*. Uma das principais vantagens de sistemas *in vitro* é atribuída à rápida obtenção de resultados; à redução do uso de animais quando comparado com estudos *in vivo*; a

habilidade para investigar aspectos específicos do metabolismo, como parâmetros cinéticos e isoformas envolvidas no metabolismo e a disposição metabólica de um determinado composto. (KATZUNG, 2003)

Muitas enzimas envolvidas no metabolismo dos fármacos estão localizadas nas membranas lipofílicas do retículo endoplasmático do fígado e de outros tecidos. Quando essas membranas são isoladas por homogeneização e fracionamento da célula, elas se reorganizam em vesículas denominadas microsomas. Estas membranas celulares conservam a maioria das características morfológicas e funcionais das membranas intactas, incluindo as características do retículo endoplasmático rugoso e liso. Enquanto os microsomas rugosos tendem a se dedicar à síntese de proteína, os microsomas lisos são ricos em enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo de fármacos, enzimas estas conhecidas como monooxigenases (OFM) e as enzimas do citocromo P450. (KATZUNG, 2003)

Todas as enzimas do CYP450 são coletadas na fração microsomal. As enzimas mantêm sua atividade por alguns anos em frações microsomais ou enquanto fígados, quando estocados a baixas temperaturas (-80 °C). (GUNARATNA, 2000).

Os estudos de biotransformação *in vitro* permitem:

- Estabelecer a cinética de formação dos metabólitos e a identificação de suas estruturas químicas;
- A avaliação da estabilidade dos metabólitos formados ao longo do processo de metabolização do fármaco;
- A investigação da biodisponibilidade de fármacos nos diferentes compartimentos dos indivíduos ou animais;
- A comparação do perfil metabólico entre grupos;
- A obtenção de padrões para a identificação de metabólitos em amostras biológicas, assim como a geração de metabólitos para serem posteriormente utilizados em estudos farmacocinéticos, onde são conduzidos ensaios para avaliar os efeitos toxicológicos, incluindo as interações fármaco-fármaco e inibição/indução das enzimas do citocromo P450 (CYP450) (EKINS, 2000).

Atualmente, sistemas de biotransformação *in vitro* são muito empregados na indústria farmacêutica para estudar o metabolismo de novos fármacos e conhecer as rotas de biotransformação que podem ocorrer *in vivo*, nos

humanos (WIENKERS, 2005; EDDERSHAW, 1999). Para a indústria farmacêutica, é importante assegurar que metabólitos identificados *in vitro*, através do emprego de hepatócitos ou frações subcelulares, sejam também observados *in vivo* nos estudos pré-clínicos com animais, como: ratos, coelhos, cachorros ou macacos (GOMEZ-LECHON, 2007; DELAFORGE, 1998 ; TINGLE, 2006). Assim, os estudos *in vitro* oferecem importantes vantagens sobre os estudos clínicos, principalmente, por evitar a exposição de seres vivos a substâncias potencialmente tóxicas e por possibilitarem a obtenção de metabólitos, muitas vezes, idênticos ou ao menos semelhantes aos obtidos quando as mesmas moléculas são administradas aos humanos. Os estudos clínicos não podem ser totalmente substituídos por estudos *in vitro*, uma vez que estes são estudos iniciais, utilizados para dar segurança em estudos clínicos.

Em trabalho realizado por LÉVESQUE e colaboradores, 2005 foi reportado que os metabólitos formados por hepatócitos humanos incubados com substâncias banidas como a androstenediona e a norandrostenediona foram bem correlacionados com os metabólitos determinados na urina de humanos, após a sua administração (LEVESQUE *et al.*, 2005).

Alternativamente, pode ser realizada a obtenção em grande escala de produtos de biotransformação via processos de biosíntese *in vitro* e posterior isolamento dos compostos de interesse com emprego de cromatografia líquida preparativa de alta eficiência (ZGURIS, 2005; ROUPE, 2005; GIRI, 2001; LIU, 1996).

Utilizando-se essa abordagem, um procedimento *in vitro* eficiente foi desenvolvido por LIU *et al*, 1996 para a produção em escala de miligramas dos metabólitos do fármaco ciclosporina G (CMs), utilizando frações microssomais hepáticas de coelhos pré-tratados com rifampicina e um sistema de regeneração de NADPH. Neste procedimento 60 % da ciclosporina G (CsG) foi biotransformada em 12 metabólitos, durante 2 horas de incubação. As incubações foram realizadas utilizando CsG ou ciclosporina A (CsA) (0,2 a 1,0 mg/mL) dissolvido em DMSO, com concentração proteica variando de 1 a 5 mg/mL, em um volume total foi de 5 mL. As separações cromatográficas dos metabólitos gerados pelo sistema microssomal foram realizadas em duas colunas semipreparativas C8 (250 x 10 mm) (Supelco, Inv, Bellefonte, PA), sequencialmente ligadas e eluidas no modo gradiente, com vazão da fase móvel de 2,5 mL/min e $\lambda = 214$ nm. As quantidades de CMs gerados a partir de 22,5 mg de CsG, em um volume final 45,0 mL, foi de 1585 ± 103 μ g para GM1;

648 ± 33 µg para MG9; 126 ± 17 µg para GM4N; 221 ± 74 µg para GM19. Os isômeros aldeídicos (GM1cAL e GM1AL) foram obtidos em 193 ± 61 µg. Os demais metabólitos produzidos não foram quantificados.

1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Aplicações na Investigação do Metabolismo *in vitro* de Fármacos

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica muito versátil, que além de ser eficientemente empregada em análises qualitativas e quantitativas, ainda é utilizada para uma ampla gama de aplicações, dentre elas pode-se citar: a separação de enantiômeros; determinação de impurezas enantioméricas em preparações farmacêuticas e também no controle de qualidade de medicamentos; análise de contaminantes em alimentos e meio ambiente, assim como, para a quantificação de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos.

Nos estudos farmacocinéticos, os resultados provenientes da biotransformação de um fármaco, ou seja, os metabólitos relevantes são tipicamente analisados por cromatografia líquida acoplada a detector de diodo array e/ou espectrometria de massas (LC-PDA e/ou LC-MS/MS) (PLUMB, 2005) e, nos últimos anos, diversas são as aplicações da cromatografia líquida na investigação do metabolismo de fármacos com empregado de frações celulares. Na Tabela 1.1 é possível notar o elevado número de publicações referente ao tema, no período de 2007 a 2011.

TABELA 1.1 Cromatografia Líquida e Aplicações na Investigação do Metabolismo in vitro de Fármacos (continua)

Composto	Fração celular	Sistema de Análise e Detecção	Referência Bibliográfica
Trioxano CDRI99/411	Microssoma hepático de ratos	HPLC-DAD ^a	MISHRA et al, 2012
Cinitapride	Microssoma hepático humano	UHPLC ^b	MARQUEZ et al, 2011
1-metil-1,6-diidropiridínicos-2-carbaldoxime de cloreto de pralidoxima (pró-2-PAM)	Homogenato de cérebro de porco e rato	HPLC-UV ^c	KHAN et al, 2011
1-oxobufuralol 1-hidroxibufuralol	Microssoma hepático de rato	HPLC-UV ^c	BARTH et al, 2011
Ginsenoside Rg ₁	Fungo Absidia coerulea	HPLC-IR ^d RMN ^e MS ^f	LIU et al, 2011

^acromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array; ^bcromatografia líquida de ultra-alta pressão; ^cCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de Ultravioleta; ^dCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de índice de refração; ^eRessonância magnética Nuclear; ^fEspectrometria de massa; ^gCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de UltraVioleta; ^hDicroísmo Circular; ⁱCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas; ^jCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de fluorescência.

TABELA 1.1 – Cromatografia Líquida e Aplicações na Investigação do Metabolismo *in vitro* de Fármacos (continua)

Composto	Fração celular	Sistema de Análise e Detecção	Referência Bibliográfica
Isopimpinellin	Fungo <i>Glomerella cingulata</i>	RMN ^e MS ^f	MARUMOTO e MIYAZAWA, 2011
Prasugrel	Microsoma hepático humano de microssomas recombinantes	LC-MS ^g	DAALI, 2011
Dehidroisoeugenol (DDIE)	Microsomas hepáticos, urina e fezes de ratos	HPLC-UV ^c RMN ^e MS ^f CD ^h	LI e YANG, 2011
Artemisinina	Microsoma hepático, urina, bile e plasma de rato	LC-MS ⁱ	LIU et al, 2011

^acromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array; ^bcromatografia líquida de ultra-alta pressão; ^cCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de Ultravioleta; ^dCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de índice de refração;

^eRessonância magnética Nuclear; ^fEspectrometria de massa; ^gCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de UltraVioleta;

^hDicroísmo Circular; ⁱCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas; ^jCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de fluorescência.

TABELA 1.1 – Cromatografia Líquida e Aplicações na Investigação do Metabolismo *in vitro* de Fármacos (continua)

Composto	Fração celular	Sistema de Análise e Detecção	Referência Bibliográfica
Albendazol	Microssomas de ratos	HPLC-FL ^j	BELAZ, 2011
Brubopiona	Microssoma hepático placentário de babuínos	LC-MS ⁱ	WANG et al, 2011
Mangiferina	Flora intestinal de ratos	LC-MS ⁱ	LIU et al, 2011
3-(1H-Indol-2-il)-fenil(3,4,5-trimetoxifenil) metanona (I-387)	Microssoma hepático de rato, cachorro, macaco e humano	LC-MS ⁱ	AHN et al, 2011

^acromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array; ^bcromatografia líquida de ultra-alta pressão; ^cCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de Ultravioleta; ^dCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de índice de refração; ^eRessonância magnética Nuclear; ^fEspectrometria de massa; ^gCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de UltraVioleta; ^hDicroísmo Circular; ⁱCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas; ^jCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de fluorescência.

TABELA 1.1 – Cromatografia Líquida e Aplicações na Investigação do Metabolismo *in vitro* de Fármacos (continua)

Composto	Fração celular	Sistema de Análise e Detecção	Referência Bibliográfica
Brometo de aclidinium	Microsoma hepático e hepatócitos de ratos, ratazanas, coelho, cães, e humanos	LC-detecção radiométrica	ALBERTI et al, 2011
Isradipina (ISR)	Microsoma hepático de rato	HPLC-UV ^c	SIMÕES et al, 2011
Schizandrin	Microsoma hepático humano, de rato e miniporco	LC-MS ⁱ RMN ^e	CAO et al, 2010
Fluoxetina	Microsoma hepático de peixes	LC-MS ⁱ	SMITH et al, 2010

^acromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array; ^bcromatografia líquida de ultra-alta pressão; ^cCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de Ultravioleta; ^dCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de índice de refração; ^eRessonância magnética Nuclear; ^fEspectrometria de massa; ^gCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de UltraVioleta; ^hDicroísmo Circular; ⁱCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas; ^jCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de fluorescência.

TABELA 1.1 – Cromatografia Líquida e Aplicações na Investigação do Metabolismo *in vitro* de Fármacos (continua)

Composto	Fração celular	Sistema de Análise e Detecção	Referência Bibliográfica
Venlafaxina(V)	Microsoma hepático de rato	HPLC-UV ^c	FONSECA e BONATO, 2010
Carbosulam	Microsoma hepático humano, rato, cachorro, coelho, miniporco e macaco	LC-MS ⁱ	ABASS et al, 2009
Rifampicina	Microsoma hepático de rato	LC-MS ⁱ LC-DAD-MS ^{a,i}	PRASAD e SINGH, 2009
Flupirtina	Microsoma hepático de rato e humano	LC-MS ⁱ RMN ^e	METHLING et al, 2009
ARQ 501 (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] pirano-5,6-diona, beta-lapachona	hepatócitos criopreservados de camundongos, ratos, cães e humanos	LC-MS ⁱ	MIAO et al, 2009
Jatrorhizine	flora intestinal e microsoma hepático de ratos	LC-MS ⁱ	ZHANG et al, 2008

^acromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array; ^bcromatografia líquida de ultra-alta pressão; ^cCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de Ultravioleta; ^dCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de índice de refração; ^eRessonância magnética Nuclear; ^fEspectrometria de massa; ^gCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de UltraVioleta; ^hDicroísmo Circular; ⁱCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas; ^jCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de fluorescência.

TABELA 1.1 – Cromatografia Líquida e Aplicações na Investigação do Metabolismo *in vitro* de Fármacos (continua)

Composto	Fração celular	Sistema de Análise e Detecção	Referência Bibliográfica
3-Amino-5,6,7,8-tetrahydro-2-{4-[4-(hidroxi-2-il)piperazin-1-il]butilquinazolin-4 (3H)-ona (TZB-30878)	Microssoma hepático humano	HPLC-radiométrica LC-MS ⁱ	MINATO et al, 2008
Oxibutinina (OXY)	fração microssomal de fígado de rato	HPLC-UV ^c	FONSECA et al, 2008
Flubendazol (FLBZ)	Microssoma e fração Citosólica hepática de ovelha e mucosa duodenal	HPLC-UV ^c	MATE et al, 2008
Amlodipina	culturas primárias de hepatócitos de ratos	LC-MS ⁱ	SUCHANOVA et al, 2008
Combretastatin A-4 (CA-4)	ratos e frações subcelulares do fígado humano	LC-UV-MS ^{c,i}	APRILE et al, 2007

^acromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array; ^bcromatografia líquida de ultra-alta pressão; ^cCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de Ultravioleta; ^dCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de índice de refração; ^eRessonância magnética Nuclear; ^fEspectrometria de massa; ^gCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de UltraVioleta; ^hDicroísmo Circular; ⁱCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas; ^jCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de fluorescência.

TABELA 1.1 – Cromatografia Líquida e Aplicações na Investigação do Metabolismo *in vitro* de Fármacos (conclusão)

Composto	Fração celular	Sistema de Análise e Detecção	Referência Bibliográfica
Letrozol	microsoma hepático de rato	HPLC-FL ^j LC-MS ⁱ	TAO et al, 2007
Zearalenona (ZEN)	Microsoma hepático de rato	LC-MS ⁱ GC-MS ^k	PFEIFFER et al, 2007

^acromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array; ^bcromatografia líquida de ultra-alta pressão; ^cCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de Ultravioleta; ^dCromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de índice de refração; ^eRessonância magnética Nuclear; ^fEspectrometria de massa; ^gCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de UltraVioleta; ^hDicroísmo Circular; ⁱCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas; ^jCromatografia Líquida de alta eficiência acoplada com detector de fluorescência.

Dentre os trabalhos reportados, pode-se citar o trabalho recente desenvolvido por BELAZ que desenvolveu um método multidimensional enantiosseletivo para investigar o metabolismo *in vitro* do sulfeto de albendazol, com o objetivo de avaliar a influência da restrição proteica na biodisponibilidade do sulfóxido de albendazol, principal metabólito formado. O estudo foi realizado empregando frações microssomais de ratos Wistar controles e de animais submetidos a uma dieta com restrição proteica. Os compostos (\pm)-albendazol-sulfóxido, albendazol-sulfona e 2-amino-sulfona foram extraídos da matriz biológica através do emprego de uma coluna extratora de fase de acesso restrito de albumina sérica bovina (C8-RAM-BSA) (5,0 x 0,46 cm d.i.) e analisados em uma coluna cromatográfica quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (15,0 x 0,46 cm d.i.). A separação cromatográfica de todos os compostos de interesse foi obtida através do uso de uma fase móvel composta por tampão fosfato (0,01 mol/L; pH 7,5):acetonitrila (60:40 v/v), vazão de 0,5 mL/min e detecção por fluorescência, λ_{exc} e λ_{em} de 290 e 320 nm, respectivamente, em 35 minutos de análise. (BELAZ, 2011)

FONSECA e BONATO (2010) desenvolveram um método enantiosseletivo por cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de vanlafaxina (VF) e seus metabólitos, *O*-desmetilvenlafaxina (ODV) e *N*-desmetilvenlafaxina (NDV) em preparações microssomais, com emprego de microextração em fase líquida trifásica (LPME) para o preparo das amostras. Na separação cromatográfica utilizou-se uma coluna quiral AD Chiralpak, no modo normal de eluição, com fase móvel composta por hexano:2-propanol (95:5 v/v) com dietilamina 0,025%, a uma vazão de 1,0 mL/min e detecção em 230 nm. O método foi validado e posteriormente utilizado para estudar a biotransformação *in vitro* de VF usando fração microssomal de fígados de ratos.

OLIVEIRA *et al* (2009) desenvolveram um método cromatográfico para monitorar a biotransformação de um novo complexo de Rutenio nitrosil, $[Ru(NH.NHq)(terpy)NO]^{+3}$, utilizando frações microssomais extraídas de fígado de ratos. Os resultados obtidos mostraram que a biotransformação investigada obedeceu a cinética de Michaelis Menten, com $V_{max} = 0,1625 \pm 0,010$ mmol/mg proteína/min e $K_m = 79,97 \pm 11,52$ mM e, desta forma, estes resultados indicam que o complexo nitrosilo é metabolizado via CYP450.

No entanto, a análise dos íons fragmentos (MS/MS) de um composto desconhecido usualmente fornece limitada informação estrutural em relação à sua estrutura química e, torna-se ainda adequado o emprego de ressonância magnética nuclear (RMN) para auxiliar a completa identificação estrutural. Para isso, quantidades em microgramas do composto em estudo se fazem necessário e a sua obtenção é comumente realizada via síntese química da estrutura proposta, procedimento este, muitas vezes, lento e trabalhoso.

COMBOURIEU et al, 2001 utilizaram análises de RMN-H¹ em 1 e 2 dimensões para estudar a biotransformação *in vitro* de dois glucosilatos alimentares pela microflora digestiva humana, a sirigrina (SIN) e a glucotropaeolina (GTL). As estruturas moleculares dos novos metabólitos, provenientes da porção aglicona dos glucosilatos, foram identificadas e a modulação do metabolismo de carbono foi estudada para quantificar metabólitos bacterianos emitidos a partir da incubação de xenobióticos, na presença ou ausência de uma fonte de glicose livre. Com o auxílio de ensaios *in vitro* e RMN, pela primeira vez, foi demonstrado que a SIN e GTL foram biotransformadas quantitativamente em alilamina e benzilamina, respectivamente. A comparação da cinética de transformação da SIN e GTL, com e sem glicose, mostrou que a presença de glicose não alterou a natureza dos metabólitos ou a taxa de transformação dos glicosilatos (degradação completa dentro de 30 h).

1.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa

Desde os primórdios da Química, a geração de novos compostos consiste em duas etapas: a síntese do composto e sua purificação. Além das técnicas tradicionais de purificação, como extração, cristalização e destilação, entre os anos de 1950 e 1960 foram desenvolvidos os primeiros métodos para a realização de cromatografia em escala preparativa. Estes consistiam de uma coluna cromatográfica, um reservatório para o eluente e a amostra era injetada manualmente no topo da coluna, sendo esta então conectada ao reservatório do eluente. Estes primeiros sistemas de separação não possuíam bombas cromatográficas, assim a vazão da fase móvel era obtida pela pressão hidrostática do eluente. Em 1970, visando o aumento no poder de processamento e separação cromatográfica, foram desenvolvidos os primeiros sistemas de CLAE preparativo. (HUBER e MAJORS, 2007)

O termo preparativo é normalmente associado a grandes colunas e altas vazões de fase móvel, porém não são somente esses fatores que determinam se o experimento é ou não em escala preparativa, mas também o objetivo da separação, no que diz respeito a quantidade de amostra analisada. (HUBER e MAJORS, 2007)

A cromatografia em escala analítica tem por objetivo a determinação quali e quantitativa de um composto, sem o interesse de utilizá-lo para outra finalidade após a separação cromatográfica. No entanto, a cromatografia em escala preparativa é aquela na qual o interesse maior é, além da separação dos compostos, coletar as frações contendo os analitos para posterior uso, tais como: elucidação estrutural por ressonância magnética nuclear; determinação da atividade biológica de um ou mais constituintes presentes na fração; verificar a aplicação de uma fração isolada, por exemplo, como catalisador; purificação de um fármaco através do isolamento das impurezas, dentre outras. (LANÇAS, 2009).

Nos últimos anos, o uso de CLAE preparativa para a obtenção de enantiômeros puros em larga escala fez com que a técnica se desenvolvesse rapidamente, tornando-se uma ferramenta indispensável em diversas áreas, dentre as quais se pode citar as indústrias farmacêuticas, de produtos naturais, petroquímica e alimentícia.

Nas indústrias químicas, de biotecnologia e de bioquímica, sistemas de CLAE preparativos são utilizados para o isolamento e purificação de produtos que, dependendo da área de trabalho, a quantidade de composto a ser isolado pode diferir consideravelmente, indo de uma escala de microgramas, chegando em gramas. Já em escala industrial, a produção de algum composto puro alcança escalas na ordem de quilogramas (Tabela 1.2)

TABELA 1.2 Quantidade de composto isolado e sua área de trabalho. (adaptado de HUBER e MAJORS, 2007)

Quantidade do composto	Área de Trabalho
Microgramas	- Isolamento de enzimas;
Miligramas	- Testes biológicos e bioquímicos; - Elucidação e caracterização estrutural de produtos secundários provenientes de processos de biotransformação; - Elucidação e caracterização estrutural de produtos naturais.
Gramas	- Obtenção de compostos de referência (padrões analíticos) - Obtenção de compostos para teste toxicológicos - Isolamento de produtos naturais bioativos
Quilogramas	- Obtenção em escala industrial de compostos ativos para utilização em fármacos.

A separação cromatográfica em escala preparativa e industrial envolve um custo elevado, principalmente de fase estacionária e fase móvel, fazendo com que testes de diferentes condições experimentais para a otimização das condições de análise, sejam estabelecidas, primeiramente, em pequena escala, como a analítica.

O escalonamento de uma separação analítica para uma separação preparativa pode ser feito usando por base os volumes das colunas analíticas e preparativas. Assim, o fator de escalonamento S , pode ser calculado pela equação (1.1), onde R_P e R_A são os diâmetros e L_P e L_A o comprimento das colunas preparativas e analíticas respectivamente. (CASS e DEGANI, 2001)

$$S = \frac{R_P^2 L_P}{R_A^2 L_A} \quad \text{Equação 1.1}$$

Em um processo de separação cromatográfica os parâmetros, resolução, velocidade de separação, quantidade de amostra e capacidade de carga do adsorvente estão interrelacionados, assim, quando se faz a otimização de um destes parâmetros, os outros podem ser comprometidos. Enquanto na cromatografia líquida em escala analítica, a velocidade de separação e a resolução são imprescindíveis e a quantidade de amostra desprezada, na cromatografia líquida

preparativa o foco é voltado para a massa purificada, de forma que deve ser enfatizada a capacidade de carga da coluna. Este requisito, para ser usualmente alcançado, compromete a velocidade e/ou a resolução cromatográfica (GUIOCHON e TARAFDER, 2011).

Desta forma, a cromatografia líquida de alta eficiência preparativa foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho, com o objetivo de isolar os metabólitos provenientes da biotransformação do sulfeto de albendazol, em meio microsomal, para posterior aplicação em estudos farmacocinéticos pré-clínicos

1.4 Albendazol: Propriedades Químicas e Farmacológicas

Uma das doenças mais comuns nas regiões tropicais e sub-tropicais é a parasitose intestinal, causada por infestação de helmintos. As helmintíases trazem efeitos nocivos ao desenvolvimento físico e mental, principalmente de crianças, além de serem considerados um problema social, relacionado com a higiene e saúde pública. (BUENO e BERGOLD, 1997).

Em 1997, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou uma lista de fármacos essenciais, em programas de controle de doenças helmínticas, dentre os quais o uso do albendazol (ABZ) é recomendado. (WHO,1997)

O albendazol (ABZ) [5-(propiltio)-1 H-benzimidazol-2-I] carbamato é um pró-fármaco anti-helmíntico da classe dos benzimidazóis, utilizado em animais e humanos. (DAYAN, 2003)

A ativação do ABZ ocorre predominantemente no fígado, embora atividade metabólica possa também ocorrer em tecidos extra-hepáticos, como pulmão e trato gastrointestinal (SHAIKH *et al.*, 2009), tanto em animais como em humanos. Após a sua administração, o ABZ (1) é rapidamente oxidado em seu metabólito farmacologicamente ativo, o albendazol sulfóxido (ABZ-SO) - (2), metabólito majoritário e quiral. (KITZMAN *et al.*, 2002)

O ABZ-SO é considerado diretamente ou indiretamente responsável pela eficácia e toxicidade do albendazol, porém a farmacodinâmica do (+)- e (-)-enantiômero não é totalmente compreendida. O ABZ-SO, por sua vez, é oxidado em albendazol sulfona (ABZ-SO₂) – (3). O grupo carbamato também é rapidamente removido por hidrólise, levando à formação do albendazol 2-amino-sulfona (ABZ-NH₂-SO₂) – (4). Este último é o metabólito minoritário e, assim como o albendazol

sulfona, não apresentam atividade farmacológica (Figura 1.3). (GARCIA *et al.*, 1999; DAYAN, 2003; CHIAP *et al.*, 2000)

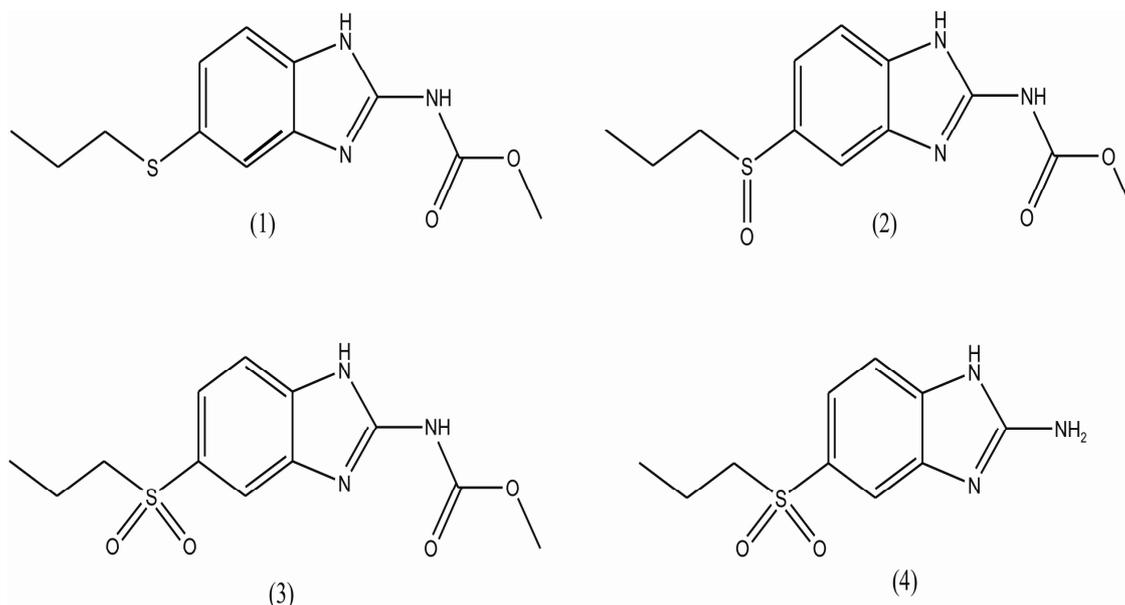


Figura 1.3 Estrutura química do albendazol e seus metabólitos. (1) Sulfeto de albendazol (ABZ); (2) Sulfóxido de albendazol (ABZ-SO); (3) albendazol sulfona (ABZ-SO₂) e (4) albendazol 2-aminosulfona (ABZ-NH₂-SO₂).

A metabolização do ABZ-SO é enantiosseletiva, onde citocromos P450 são os responsáveis pela formação de (-)-ABZ-SO, enquanto que a formação do (+)-ABZ-SO é proveniente da metabolização via enzimas flavinas. A oxidação subsequente para formação de ABZ-SO₂ é dependente de isoenzimas da CYP450, sendo em ratos a CYP1A. (DAYAN, 2003; VELIK, *et al.*, 2003).

Estudos clínicos têm demonstrado que o (+)-enantiômero é a forma predominante no plasma humano e espécies animais. (DAYAN, 2003) Portanto, estudos clínicos enantiosseletivos para avaliar a disposição cinética do (+)- e (-)-ABZ-SO, assim como a quantificação do ABZ-SO₂ e ABZ-NH₂-SO₂, podem fornecer informações adicionais sobre o metabolismo do ABZ.

Estudos realizados por CARLSSONA *et al* (2011) mostraram que o ABZ, em concentrações maiores que 0,30 mol/L, causou malformação de cabeça e cauda em embriões de peixe zebra. Em contraste, os metabólitos não apresentaram toxicidade para o desenvolvimento dos embriões em qualquer concentração. Porém uma análise química mostrou que em concentrações subletais a maior parte do ABZ foi metabolizado a ABZ-SO.

VELIK *et al*,(2003) estudaram a oxidação *in vitro* do ABZ em hepatócitos de ovelhas e em hepatócitos de ratos. A formação de (\pm)-ABZ-SO não diferiu significativamente entre as duas espécies, porém, após a determinação enantiosseletiva por cromatografia líquida quiral, observou-se uma diferença significativa na quantidade produzida de cada enantiômero para cada espécie estudada. A relação enantiomérica de (+)/(-)-ABZ-SO em hepatócitos de ovelha foi de 3,3 enquanto que em hepatócitos de ratos obteve-se uma relação próxima de 1,0. Adicionalmente, a formação de ABZ-SO₂ foi aproximadamente cinco vezes maior em ratos do que em ovelhas.

PRASAD *et al*, (2008) selecionaram vinte e cinco culturas de fungos para a biotransformação do ABZ. Destas, apenas cinco foram capazes de realizar a metabolização do fármaco precursor em pelo menos um metabólito. O fungo filamentoso *Cunninghamella blakesleeana* foi o que obteve uma melhor resposta, sendo este capaz de transformar 58,86% do ABZ em três metabólitos. A caracterização dos metabólitos foi realizada por LC-MS/MS e pode-se confirmar a presença do ABZ-SO, ABZ-SO₂ e de um novo metabólito, um análogo *N*-metilado do ABZ-SO. Os resultados revelaram que o modelo microbiano pode ser usado para produzir grandes quantidades destes metabólitos.

Em 2010, PRASAD *et al* realizaram estudos sobre a microbiotransformação do ABZ utilizando doze cepas bacterianas, representando seis gêneros e cinco culturas actinomicetos. Entre as culturas estudadas, algumas conseguiram biotransformar o ABZ em apenas um metabólito, enquanto outras foram capazes de produzir dois metabólitos, em quantidades significativas. As análises foram conduzidas por CLAE e os dados obtidos por LC-MS/MS, permitiram a identificação de dois metabólitos, ABZ-SO e ABZ-SO₂, os principais encontrados em mamíferos. Uma vez que o metabólito ativo é o ABZ-SO, estes resultados provam a versatilidade de microorganismos para realizar reações químicas de interesse industrial.

Recentemente, estudos realizados com células tumorais humanas de câncer colorretal (POURGHOLAMI, 2005), de tumores peritoneal de câncer de ovário (OVCAR-3) (POURGHOLAMI, 2006); carcinoma hepatocelular (POURGHOLAMI, 2001) e células T leucêmicas (KHALILZADEH, 2007), tem fornecido evidências para a atividade antitumoral do ABZ. Estudos em humanos e

camundogos usando mebendazol e albendazol como inibidores de microtubulos indicaram a ação anticancerígena destes fármacos. (IURIAN, 20008)

BELAZ, 2011 realizou um estudo de inibição *in vitro* de células tumorais humanas com o ABZ e ABZ-SO, onde avaliou-se a atividade inibitoria do (±)-ABZ-SO, do (+)-ABZ-SO e do (-)-ABZ-SO. Para este estudo utilizou-se o método da sulforrodolina 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). Os resultados de GI_{50} (inibição de 50% do crescimento celular) mostraram que o ABZ foi o composto mais ativo frente as três linhagens celulares avaliadas. No entanto, os enantiômeros do ABZ-SO também se mostraram ativos, com destaque para a linhagem MCF-7, onde o (+)-ABZ-SO ($GI_{50} = 13,4 \pm 1,1$) mostrou ser cerca de quatro vezes mais ativo que o (-)-ABZ-SO, com um valor de GI_{50} de $59,5 \pm 4,8$. Estes resultados mostraram uma enantiosseletividade considerável, no que 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.

Com relação aos métodos de análise para o ABZ e seus metabólitos em matrizes biológicas ou formulações farmacêuticas, vários trabalhos por cromatografia líquida acoplada a diferentes detectores estão descritos na literatura para a determinação destes compostos em plasma e soro humano, plasma de animais, em tecido animais, entre outros. Majoritariamente, os tratamentos de amostras adotados são os métodos convencionais de extração líquido-líquido e extração em fase sólida e, em menor numero, métodos mais recentes que fazem uso de técnicas de microextrações e de injeções direta de amostras (Tabela 1.3)

TABELA 1.3 - Métodos de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de ABZ e seus metabólitos (2007-2012).

Composto	Matriz	Modo de detecção	Fase Estacionária e modo e Modo Cromatográfico	Pré-tratamento de amostras	Referência
ABZ ABZ-SO ABZ-SO ₂	Plasma de peru	HPLC-FL ^a	-	--	GRABOWSKI <i>et al</i> , 2011
Ivermectina(IVM) e ABZ	Formulações farmacêuticas	HPTLC-UV ^b	Silica Gel 60 F254	--	VARGHESE <i>et al</i> , 2011
ABZ ABZ-SO ABZ-SO ₂ ABZ-SO ₂ -NH ₂	Tecidos muscular de peixe	UPLC-MS ^c	C18 Fase Reversa	ELL	ZHANG <i>et al</i> , 2011
ABZ ABZ-SO ABZ-SO ₂ ABZ-SO ₂ -NH ₂	Carne de carpa	UPLC-MS/MS ^c	C18 Fase Reversa	ELL	ZHANG <i>et al</i> , 2011(b)
11 benzimidazóis e metabólitos de ABZ, mebendazol, fenbendazole	Músculo e fígado de suínos, bovinos, ovinos e frango.	LC-MS/MS ^d	C18 fase reversa	Extração líquida a alta pressão (PLE)	CHEN <i>et al</i> , 2011
FluBZ, ABZ, FBZ, MBZ, TBZ, flubendazolhidrolisado ABZ-SO, ABZ-SO ₂ , ABZ-SO ₂ NH ₂ , OFZ, FBZ-SO ₂ , aminomebendazol, Hidroximebendazol e 5-OHTBZ	Plasma	LC-MS/MS ^d	C18 Fase reversa	Extração pH dependente	ZHU <i>et al</i> , 2011

^aCromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência; ^bCromatografia em camada delgada de alto desempenho acoplada com detector por UltraVioleta, ^ccromatografia líquida de ultra-alta pressão acoplada com espectrômetro de massa; ^dcromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas; ^ecromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array

TABELA 1. 3 - Métodos de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de ABZ e seus metabólitos (2007-2012). Continua

Composto	Matriz	Modo de detecção	Fase Estacionária e modo e Modo Cromatográfico	Pré-tratamento de amostras	Referência
ABZ ABZ-SO ABZ-SO ₂ ABZ-SO ₂ NH ₂	Tecido muscular de perca amarela	HPLC-FL ^a (Excitação 290nm; emissão 330nm)	C18 Fase reversa	ELL	YU <i>et al</i> , 2011
ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO ₂ , ABZ-SO ₂ NH ₂ , FBZ, OFZ, FBZ-SO ₂ , MBZ, TBZ, 5-OH-TBZ	Ovo, leite, carne de frango e porco	LC-MS ^d	Coluna capilar monolítica Fase reversa	Microextração com polímero monolítico	XI-ZHOU <i>et al</i> , 2010
19 Benzimidazois e levamisol	Leite bovino	LC-MS ^d	-	ELL	JEDZINIAK <i>et al</i> , 2009
ABZ, FenBZ, TBZ, FuBZ, MBC, BEN, FluBZ	Amostras de águas	HPLC-DAD ^e (200 e 240nm) ^e	C18-kromasil Fase reversa	Microextração em fase solida molecularment e impressa (MISPE)	CACHO <i>et al</i> , 2009
ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO ₂ , ABZ-SO ₂ NH ₂	Plasma bovino	HPLC-FL ^a (excitação 290nm; emissão 320nm)	quiral <i>tris</i> (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose Modo reverso	Colunas RAM	BELAZ <i>et al</i> , 2008
ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO ₂ , ABZ-SO ₂ NH ₂	Tecidos muscular de peixe	HPLC-FL ^a (excitação 290nm; emissão 330nm)	C18 Fase Reversa	ELL	RUMMEL & SHAIKH, 2008
ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO ₂ , Praziquantel, trans-4-hidroxipraziquantel	Plasma	LC-MS/MS ^d	Cianopropil Fase reversa	ELL	BONATO <i>et al</i> , 2007

^aCromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência; ^bCromatografia em camada delgada de alto desempenho acoplada com detector por UltraVioleta, ^ccromatografia líquida de ultra-alta pressão acoplada com espectrômetro de massa; ^dcromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas; ^ecromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de diodo array

De forma geral, o uso de fases quimicamente ligadas C₁₈ e eluição no modo reverso são encontrados nos trabalhos. A etapa de pré-tratamento da matriz biológica para a extração dos analitos é realizada, na sua maioria, por procedimentos de extração *off-line*, com emprego de extração líquido-líquido, onde, muitas vezes o pré-tratamento é extensivo. (SNYDER *et al*, 2010)

Com o intuito de minimizar os procedimentos para o tratamento de amostras, BELAZ *et al*, 2008, desenvolveram um método totalmente automatizado por cromatografia líquida de alta eficiência multidimensional, envolvendo o acoplamento aquiral-quiral, para a determinação simultânea do ABZ e seus metabólitos (ABZ-SO, ABZSO₂ e ABZ-SO₂NH₂) em plasma bovino. Para a exclusão das proteínas da matriz biológica, utilizou-se na primeira dimensão uma coluna de acesso restrito (C8-RAM-BSA 50mm x 4,6mm) e, na segunda dimensão, a análise enantiosseletiva foi realizada com uma coluna quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (150 x 4,6 mm ID), no modo reverso de eluição e detecção por fluorescência. Ambos os métodos foram validados e se mostraram apropriados para aplicações farmacocinéticas.

Diante das aplicações farmacológicas encontradas para ABZ e uma vez que os resultados mostram que os enantiômeros apresentam biodisponibilidade diferentes entre si, em diferentes espécies animais, é importante a obtenção de seus metabólitos para posteriores ensaios farmacocinéticos pré-clínicos. Assim, esse composto foi selecionado como modelo para o desenvolvimento do metabolismo *in vitro* em quantidades miligramas, com posterior purificação e isolamento por cromatografia líquida quiral preparativa.

1.5 Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência

É grande o interesse na obtenção de enantiômeros puros, uma vez que muitos deles apresentam atividades farmacológicas distintas, o que requer a investigação da farmacocinética, toxicologia e atividades metabólicas dos enantiômeros, quando um novo fármaco quiral está em desenvolvimento (HYNECK *et al*, 1990).

Métodos de análise enantiosseletivos, particularmente os de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), têm sido desenvolvidos rapidamente com o objetivo de suprir as necessidades essenciais para a pesquisa e

desenvolvimento de fármacos quirais em diversas áreas de aplicação, tais como: agroquímica, farmacêutica e de produtos naturais.

Desta forma, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é extensamente utilizada na resolução de enantiômeros, que por possuírem propriedades termodinâmicas similares não podem ser separados através de métodos convencionais. Utilizando-se esta técnica, os enantiômeros podem ser separados pelo método indireto ou direto (KIRKLAND e KERN, 1997).

O método direto consiste na derivação dos enantiômeros com um reagente quiral e formação de um par de diastereoisômeros que, por diferirem nas propriedades termodinâmicas, podem ser resolvidos em colunas quirais ou aquirais (GILBERT, 1987 ; WAINER, 1993).

Apesar do método indireto ser bastante utilizado este apresenta algumas desvantagens, como por exemplo: a alta pureza requerida do reagente quiral, de modo a evitar a formação dos enantiômeros do par diastereoisomérico a ser formado e, no caso de cromatografia preparativa, onde faz-se necessária a hidrólise dos diastereoisômeros para se obter os enantiômeros na sua forma pura, o que torna o trabalho dispendioso.

A utilização de um seletor quiral adicionado à fase estacionária ou à fase móvel é a base de separação do modo direto, não sendo necessária a derivação prévia dos enantiômeros. Neste modo, a separação ocorre através da formação de um complexo diastereoisomérico do seletor quiral com cada um dos enantiômeros. A diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos resulta em diferentes tempos de retenção. (SNYDER *et al* 2010)

Nos últimos anos, o número de fases estacionárias quirais (FEQs) desenvolvidas e disponíveis comercialmente tem aumentado significativamente. Berthod (2006) classificou as fases estacionárias quirais de acordo com o tipo de seletor quiral da fase estacionária, sendo este natural ou sintético. (LOURENÇO *et al*, 2010)(Tabela 1.4)

TABELA 1.4 - Seletores quirais Natural e Sintético. Adaptado de LOURENÇO et al (2010).

Seletor Quiral	FEQ
de origem natural	Proteínas Ciclodextrinas Polissacarídeos Glicopeptídeos Macrocíclicos Cinchona
de origem sintético	Tipo Pirkle Troca de ligantes Éteres de coroa Polímeros sintéticos Polímeros impressos molecularmente (MIPs)

As principais vantagens da separação de enantiômeros empregando fases estacionárias quirais são: aplicação a uma larga variedade de compostos racêmicos; possibilidade de obtenção de ambos os enantiômeros; elevados graus de pureza ótica dos enantiômeros isolados; facilidade de operacionalização e a possibilidade de separação de enantiômeros de misturas racêmicas com características especiais, tais como compostos de difícil derivação (hidrocarbonetos, por ex.), facilmente racemizáveis, ou que tenham um tipo incomum de quiralidade (quiralidade do tipo helicoidal, por ex.). (SILVA JUNIOR et al, 2006)

Cromatografia preparativa em fase estacionária quiral é hoje considerada a técnica mais geral e eficiente para a obtenção de enantiômeros com elevado grau de pureza ótica e tem sido uma ferramenta importante na pesquisa farmacêutica e nas fases iniciais do desenvolvimento de novos fármacos (SILVA JUNIOR et al, 2006)

Dentre as fases estacionárias quirais, merecido destaque é dado às fases de polissacarídeos, em função da grande versatilidade no modo de separação que essas apresentam e por demonstrarem excelente discriminação quiral para um extensa gama de compostos.

Os polissacarídeos de maior aplicabilidade como fases estacionárias quirais são a amilose e a celulose, estes 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, porém 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. (BONATO *et al*, 2005)

Entre os derivados de polissacarídeos, os carbamatos de celulose e amilose são os mais empregados como fases estacionárias quirais em CLAE. A grande vantagem destas fases quirais, quando comparadas com as fases quirais dos outros tipos, é que uma maior variedade de classes de compostos quirais pode ser eficientemente resolvida. (CASS *et al*, 1997; LOURENÇO *et al*, 2010).

As fases quirais de polissacarídeos apresentam excelentes enantiosseletividades para uma ampla variedade de classes de compostos e, assim, são as primeiras fases avaliadas quando não se tem referências de separações enantioméricas para a mistura. Dentre as FEQs de polissacarídeos, as fases *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e a de amilose, e a *tris*[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose apresentam propriedades complementares e devem ser avaliadas nos três modos de eluição: normal, reverso e polar orgânico.(LOURENÇO *et al*, 2010)

CASS *et al*, 2000, 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.

BELAZ *et al*, 2012 utilizaram a técnica de cromatográfica líquida de alta eficiência no modo analítico e semipreparativo para separar os enantiômeros do ABZ-SO. No modo analítico avaliou-se quatro fases estacionárias quirais sendo elas: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose e de celulose), *tris*[(S)-1-feniletil] de amilose e *tris*(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose, sob três condições de eluição: normal, reverso e polar orgânico. A melhor condição cromatográfica encontrada foi utilizando a fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose no modo polar orgânico (100% metanol). Esta condição foi, então, redimensionada para a obtenção em quantidades miligramas do enantiômeros puros, por cromatografia líquida em escala semipreparativa e os enantiômeros puros foram utilizados em posteriores estudos *in vitro*.

LOURENÇO *et al* 2012 utilizaram a técnica de cromatografia de leito móvel simulado com zonas de variáveis (VARICOL) para promover a separação enantiomérica do ABZ-SO. Este estudo apresentou uma recuperação global de 97% com uma pureza enantiomérica de 99,5% e de 99,0% para o refinado e extrato,

respectivamente. Um total de 880 mg de (+)-ABZ-SO e 930 mg do (-)-ABZ-SO foram recolhidos após 55 ciclos ou 11 h de processo, o que resulta numa taxa de massa de 2 g/dia. Além disso, a configuração absoluta dos compostos enantiopuros foi determinada pela primeira vez por vibracional dicroísmo circular (VCD), sendo estas, (-)-(S)-ABZ-SO e (+)-(R)-ABZ-SO.

Desta forma, as FEQs baseadas em polissacarídeos comprovadamente apresentam grande versatilidade e aplicabilidade, com alto poder de discriminação quiral e reprodutibilidade, tanto em escala analítica, quanto em escala preparativa. Estas também são muito populares devido a possibilidade de enantioresolver diferentes classes de compostos quirais com sucesso (SOUZA et al, 2006). Baseado nos resultados anteriores obtidos no grupo, onde a enantioseparação de ABZ-SO foi obtida com as fases quirais de polissacarídeos, a fase *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (Figura 1.4) foi também selecionada para a realização deste trabalho.

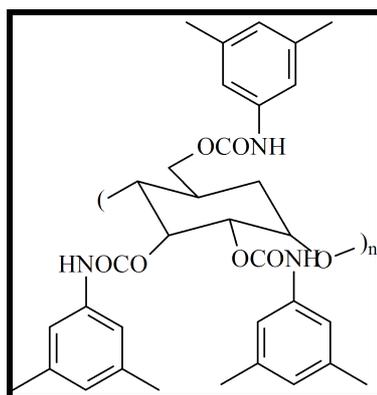


Figura 1.4 Estrutura da fase quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

1.6 Pré-Tratamento de Amostras Biológicas

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica amplamente utilizada na análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos. Porém, amostras de matrizes biológicas não devem ser diretamente injetadas nas fases cromatográficas, uma vez que as proteínas presentes nos biofluidos provocam rápido entupimento da coluna cromatográfica e perda de eficiência da mesma, devido a sua adsorção acumulativa no suporte. (LIMA *et al*, 2006)

O preparo de amostras é a etapa fundamental de uma análise cromatográfica, sendo responsável por 80% de todo o processo analítico e, sem dúvida, é a etapa mais crítica e trabalhosa durante o desenvolvimento de métodos de análise, sendo este também um requisito essencial para a obtenção de um método seletivo e sensível destinado a análise de traços em matrizes complexas. (KATAOKA, 2003)

Idealmente o tratamento de amostras deve ser um processo rápido, exato, preciso, de fácil execução, barato e compatível com uma grande variedade de equipamentos. Deve também gerar perda mínima de amostra, levando a uma boa recuperação dos analitos e ser eficiente quanto à eliminação de interferentes presentes na matriz, com o menor número possível de etapas durante o manuseio das amostras. (CHEN *et al*, 2009)

Desta forma, o pré-tratamento de amostras biológicas visa obter uma amostra enriquecida com os analitos de interesse, livre da interferência de compostos endógenos e da presença de proteínas da matriz biológica.

Os métodos utilizados no pré-tratamento e/ou pré-concentração de analitos presentes em amostras complexas são classificados em métodos de extração *on-line* e *off-line*.

1.6.1 Tratamento de Amostras *on-line*

Métodos de extração de amostras *on-line* têm sido desenvolvidos através da injeção direta de amostras nos sistemas cromatográficos, visando simplificar, minimizar tempo e manuseio das amostras. Como exemplos de métodos *on-line* pode-se citar: extração em fase sólida *on-line*, cromatografia de fluxo turbulento, colunas monolíticas, polímeros molecularmente impressos e colunas de meio de acesso restrito. (DIONÍSIO *et al*, 2010)

No modo *on-line*, faz-se uso da comutação de colunas, onde uma coluna extratora faz a separação dos interferentes e pré-concentração do analito e, através de uma válvula seletora, a fração contendo o analito é transferida para uma segunda coluna de maior eficiência que será a responsável por realizar a separação desejada. Esses métodos são extremamente vantajosos em pesquisa e análises clínicas, toxicológicas e farmacêuticas, devido a sua capacidade de reduzir o tempo

e a mão-de-obra empregados no procedimento analítico e, nos últimos anos, estão sendo bastante explorados. (CASSIANO *et al*, 2006; CASSIANO *et al* 2009)

1.6.2 Tratamento de amostras *off-line*

No modo *off-line* de tratamento de amostras, a etapa de extração e/ou concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico e, após extração, a mesma é transferida para o auto-injetor do equipamento. Neste tipo de pré-tratamento faz-se uso de procedimentos classificados como: precipitação de proteínas(PP), extração líquido-líquido(ELL), extração em fase sólida(SPE) e, mais recentemente, técnicas miniaturizadas como a microextração em fase sólida(SPME) e microextração líquido-líquido(LPME) . (QUEIROZ *et al*, 2001)

1.6.2.1 Precipitação de Proteínas (PP)

A PP é convenientemente utilizada para promover o rompimento das ligações formadas entre os analitos de interesse e as proteínas do meio biológico.

Esta ruptura ocorre através da denaturação e precipitação proteica e pode ser realizada de diversas maneiras: com o emprego de aquecimento da mistura; através da adição de ácidos, bases ou de solventes orgânicos como o ácido trifluoracético, trietilamina, metanol, etanol, acetonitrila, dentre outros. Na sequência, para que as proteínas precipitadas sejam separadas, a mistura é centrifugada e o sobrenadante recolhido. O sobrenadante, por sua vez, pode ser diretamente injetado no sistema cromatográfico ou submetido a um procedimento de concentração, com emprego de evaporadores a vácuo. (CASS e DEGANI, 2001)

A PP é uma técnica de extração simples e de baixo custo, porém apresenta algumas desvantagens como pouca eficiência na retirada de interferentes das matrizes complexas; baixa reprodutibilidade e consideráveis perdas dos analitos, acarretando em baixos valores de recuperação.(ORLANDO *et al*, 2009).

1.6.2.2 Extração Líquido-Líquido (ELL)

A extração líquido-líquido é caracterizada pela partição da amostra entre duas fases imiscíveis, sendo estas, uma orgânica e uma aquosa. A eficiência

da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases imiscíveis e do número de extrações realizadas (VALENTE e AUGUSTO, 2000)

A ELL apresenta as vantagens de ser simples e poder utilizar uma grande variedade de solventes, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade para diferentes analitos de interesse. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são denaturadas e precipitam, diminuindo os problemas relacionados ao entupimento das colunas cromatográficas. Por outro lado, a ELL apresenta algumas desvantagens, dentre elas, a necessidade de que os solventes utilizados tenham elevado grau de pureza e sejam disponíveis comercialmente; elevada produção de resíduos orgânicos; formação de emulsões durante a etapa de extração, solubilidade mútua do analito nas duas fases, ocasionando baixos valores de recuperação e dificuldade de automação da técnica. Ademais há a necessidade de evaporação de volumes consideráveis de solventes, os quais geram vapores orgânicos no ambiente e também baixos níveis de repetibilidade e/ou reprodutibilidade entre as extrações. Apesar destas desvantagens, a ELL é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e tem sido ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos. (QUEIROZ et al, 2001; SNYDER et al, 2010)

1.6.2.3 Microextração Líquido-Líquido (LPME)

Das técnicas de microextração líquido-líquido empregadas no preparo de amostras para análise por cromatografia líquida de alta eficiência, destacam-se a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês: *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), a microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME, do inglês: *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*) e a microextração com gota suspensa (SDME, do inglês: *Single-Drop Microextraction*). (DIONÍSIO, et al 2010)

A DLLME, introduzida por Rezaee *et al.* em 2006, utiliza uma mistura de dois solventes orgânicos, um com alta densidade e imiscível em água (solvente extrator) e outro miscível no solvente extrator e em água (solvente dispersor). Quando essa mistura é rapidamente injetada na solução da amostra, uma grande turbulência é produzida, acarretando na formação de uma emulsão de gotículas que se dispersam por toda a amostra. Após a centrifugação da solução turva, a fase

sedimentada (gotículas constituídas pelo solvente extrator e analito) é retirada e analisada. (DIONÍSIO, et al 2010)

A microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME) foi desenvolvida por PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN,1999. Nesse tipo de extração, um solvente orgânico imiscível em água é imobilizado nos poros de uma fibra oca porosa e o interior da fibra (lúmen) é preenchido com poucos microlitros de uma solução aceptora (aquosa ou orgânica). Os analitos são extraídos da amostra aquosa (fase doadora) pelo solvente orgânico, imobilizado nos poros da fibra, e transferidos para a solução aceptora presente no lúmen da fibra oca. Após a extração, a solução aceptora é injetada no sistema cromatográfico. (de OLIVEIRA *et al*, 2008; DIONÍSIO, *et al* 2010; ALMEIDA *et al*, 2011.)

Na microextração com gota suspensa (SDME), a fase extratora é uma gota de um solvente orgânico imiscível em água (tipicamente poucos microlitros) suspensa na ponta da agulha de uma microseringa. A gota, na qual os analitos sofrem partição, depois de exposta à amostra é retraída para a seringa e, então, injetada no cromatógrafo. (DIONÍSIO *et al*, 2010)

1.6.2.4 Extração em Fase Sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE) é um método de preparo de amostra efetivo para a remoção de interferentes e enriquecimento do analito. Ela apresenta uma ampla aplicação, seja nas análises de matrizes biológicas, ambiental ou alimentícia. (KANTIANI *et al.*, 2009; BARALLA *et al.* 2011) A eficiência de extração por SPE é determinada pela maior afinidade das substâncias alvo pelo suporte sólido do que pela matriz e/ou eluente. (PAVLOVIC *et al.*, 2007).

A SPE emprega sorventes recheados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros. Em geral, os procedimentos de SPE contêm 5 etapas: i) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; ii) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; iii) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; iv)

limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; v) eluição e coleção do analito. Atualmente um número grande de sorventes estão disponíveis comercialmente. Em geral, os materiais de recheio, empregados para EFS, são similares aos usados em cromatografia líquida. Assim, carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florasil), fases quimicamente ligadas e polímeros, têm sido empregados. Dependendo do adsorvente e do solvente de eluição empregado, a SPE é dividida em modo reverso de eluição (o sorvente é menos polar que o solvente de eluição), modo normal (o solvente é menos polar que o sorvente) e de troca iônica. (QUEIROZ *et al*, 2001; SNYDER *et al*, 2010)

Além de ser uma técnica com altas taxas de recuperação e baixo consumo de solventes, a SPE também oferece a vantagem de possuir excelente capacidade de automação, o que permite uma maior capacidade e velocidade de análise ao método, aumentando a precisão das análises e oferecendo um ambiente de trabalho mais seguro e menos tedioso ao operador.

1.6.2.5 Microextração em Fase Sólida (SPME)

A SPME é uma microtécnica, em que os processos de extração e pré-concentração dos analitos ocorre em uma escala muito pequena. O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida (FS) de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente. A extração ocorre mergulhando-se a seção recoberta na amostra, ou no seu "headspace". A teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas. (VALENTE e AUGUSTO, 2000; QUEIROZ *et al*, 2005)

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e otimizar um sistema para a obtenção dos metabólitos do albendazol, em escala miligramas, via biotransformação *in vitro*, com emprego de frações microssomais obtidas a partir de fígados de ratos Wistar, com posterior separação e purificação do material obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Semipreparativa.

2.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver um método cromatográfico em escala semipreparativa para a análise de albendazol, albendazol sulfóxido, albendazol sulfona e albendazol 2-aminosulfona, investigando as melhores condições de fase móvel, suporte cromatográfico, vazão de fase móvel, sistema de detecção e volumes de injeção;
- Otimizar as condições de extração e preparo de frações microssomais à partir de fígados de ratos Wistar, com emprego de ultracentrifugação ou precipitação com cloreto de cálcio;
- Determinar a concentração proteica das frações obtidas empregando métodos espectrofotométricos;
- Determinar as condições ótimas dos ensaios de metabolismo do albendazol, de modo univariado;
- Otimizar o preparo de amostras para análise cromatográfica com emprego de extração em fase sólida ou precipitação de proteínas;
- Aplicação do método cromatográfico semipreparativo para a purificação de amostras provenientes de ensaios *in vitro*.

PROCEDIMENTO

EXPERIMENTAL

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, equipado com duas bombas LC 10-ATvp, válvula seletora de solvente FCV-10ALvp, degaseificador de membrana SHIMADZU DGU-14 A, detector de UV-Vis, de comprimento de onda variável SPD-10 Avp, auto-injetor SIL 10-ADvp. O equipamento estava acoplado a uma interface SCL-10 Avp, os dados foram adquiridos via *software* CLASS-VP.

As análises cromatográficas por LC-MS/MS foram realizadas em um sistema de cromatografia da marca SHIMADZU, equipado com duas bombas LC-20AD, válvula seletora de solvente FCV-10 ALvp, degaseificador de membrana DGU-20A5, auto-injetor SIL-20A, válvula de seis caminhos VALCO, interface CBM-20A, detector UV-Vis. Foi utilizado um espectrômetro de massas ESQUIRE 6000 *Ion Trap* da marca BRUKER DALTONICS, com disponibilidade de fontes de ionização por ESI ou APCI. Os dados foram adquiridos via *software* DATA ANALYSIS para MS e o CLASS-VP para o HPLC.

Para a separação e isolamento em escala semipreparativa utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, equipado com uma bomba modelo LC-10AD acoplada a um detector de UV-Vis, de comprimento de onda variável, SPD-10AV, injetor manual RHEODYNE 7725i com alça dosadora de 500 μ L. O equipamento apresentava-se ligado a uma interface CBM SCL-10A e os cromatogramas foram registrados através de um *software* CLASS-VP.

Para as medidas de absorvidade molar na região do Ultravioleta-visível utilizou-se um espectrofotômetro V630 da marca JASCO e cubetas de vidro e de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Os fígados de ratos Wistar foram homogeneizados com um homogeneizador IKA, modelo ULTRA-TURBAX T10.

As etapas de centrifugação foram realizadas em uma centrífuga JOUAN B4i/BR4i e uma ultracentrífuga SORVALL ULTRA modelo PRO 80. A etapa de ultracentrifugação foi realizada no Laboratório de Bioquímica, do Instituto de

Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araraquara.

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

O preparo de amostra por extração em fase sólida foi realizado em um coletor de frações com o auxílio de uma bomba de vácuo TE-058 TECNAL, utilizando Cartuchos Oasis HLB 3cc (30 mg) ou cartuchos Oasis HBL 12cc (500mg), da WATERS.

Para a concentração das soluções utilizou-se um concentrador do tipo *speed vac*, da ThermoSavant SPD 131 DDA.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada balança analítica AND, modelo HR200, com precisão de $\pm 0,01$ 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.

3.2 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram todos grau HPLC (MALLINCKRODT, J. T. BAKER ou 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 PHENOMENEX de 0,45 μm , e posteriormente degaseificados em ultra-som BRANSONIC modelo 1510R.

No preparo de todas as soluções aquosas foi utilizada água deionizada através do aparelho Milli-Q da MILLIPORE.

Para o preparo das fases móveis as proporções dos solventes foram medidas na relação volume/volume.

Os demais reagentes químicos utilizados foram de diferentes marcas:

- Albumina sérica bovina (fraction V powder minimum 98%) SIGMA
- Fosfato de potássio monobásico J.T. BAKER;

- Fosfato de sódio monobásico J. T. BAKER;
- Fosfato de sódio dibásico MALLINCKRODT;
- Sacarose MALLINCKRODT;
- Cloreto de magnésio MALLINCKRODT;
- Ácido fosfórico concentrado J. T. BAKER;
- Corante *Comassie Brilliant Blue* da MALLINCKRODT;
- ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (Hepes) ($\geq 99,5\%$ titration) SIGMA
- β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzida (NADPH) SIGMA;
- β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADP) SIGMA
- Glicose- 6- fosfato sal de sódio (G6P) SIGMA;
- Glicose-6- fosfato desidrogenase SIGMA;
- Fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF) ($\geq 99\%$ T) SIGMA
- Albendazol, SIGMA;
- Albendazol-2-amino-sulfona 98% LAN AESER
- Albendazol sulfona, sintetizado no laboratório.(BELAZ *et al*, 2008.)
- Albendazol sulfóxido, doação da Empresa Ouro Fino Produtos Veterinários (Ribeirão Preto, SP)
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) SIGMA;
- Cloreto de Cálcio anidro (CaCl_2) VETEC;
- Cloreto de sódio (NaCl) J.T. BAKER.

3.3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar de 6 a 8 semanas, os quais eram mantidos em sala apropriada, livre de patógenos, em ar limpo e com suplemento de água *ad libitum*. A temperatura da sala foi mantida entre 20 – 23 °C, com umidade relativa de aproximadamente 50 % e ciclos de luz e escuridão de 12 h. Os animais foram cedidos pelo professor Thiago Russo do Laboratório de Plasticidade Muscular, Departamento de Fisioterapia, UFSCar. O uso dos animais para a obtenção dos homogenatos de fígado foi conduzido de acordo com protocolo aceito pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Federal de São Carlos (protocolo 024/2007).

3.4 Extração das Frações microssomais

3.4.1 Preparo da solução tampão salina

A solução tampão salina foi preparada pesando-se 8,77 g (150 mmol/L) de NaCl, 1,92 g (13 mmol/L) de Na₂HPO₄ e 0,340 g de NaH₂PO₄.H₂O (2,83 mmol/L) e solubilizando-se em volume total de 1L de água deionizada.

Não foi necessário o ajuste do valor do pH deste tampão, uma vez que, o pH final da solução foi de 7,3, ideal para o uso.

3.4.2 Preparo do tampão fosfato de potássio com sacarose e PMSF

A solução de fosfato de potássio monobásico foi preparada pesando-se 0,680 g de KH₂PO₄ (10 mmol/L) e solubilizando-se em 500 mL de água deionizada. A solução de fosfato de potássio dibásico foi preparada pesando-se 0,870 g de K₂HPO₄ (10 mmol/L) e solubilizando-se em um volume de 500 mL de água deionizada. A solução de PMSF foi preparada pesando-se 23,3 mg do composto (13,4 mmol/L) e solubilizando-se em 400 µL de etanol. Pesou-se 85,6 g de sacarose (0,250 mol/L) e a solubilizou com a solução de fosfato de potássio monobásico preparada. Para o ajuste do pH em 6,8 misturou-se as soluções de fosfato de potássio dibásico com a solução de fosfato de potássio monobásico e, em seguida, foi adicionado os 400µL da solução de PMSF ao tampão.

3.4.3 Preparo da Solução 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.

3.4.4 Obtenção das frações microssomais: extração por Centrifugação Diferenciada

Os fígados foram extraídos conforme descrito na literatura (PHILLIPS e SHEPHARD, 1998; PRASAD e SINGH, 2009) com algumas modificações. De maneira geral, os ratos foram colocados com a face ventral para cima e uma larga incisão foi realizada no animal, de modo a expor a cavidade abdominal até o diafragma. O fígado foi retirado e colocado em solução tampão salina (pH 7,3), sob banho de gelo. Depois, extensivamente lavados para remoção do sangue, com solução tampão salina gelada. Na sequência, os fígados foram armazenados em ultrafreezer a -80°C .

Para a extração microssomal por centrifugação diferenciada, em um tubo tipo falcon (50 mL) pesou-se os fígados ainda congelados e adicionou solução tampão fosfato de potássio com sacarose e PMSF (10mmol/L, pH 6,8) na proporção de 1g fígado-5 mL de solução tampão. Após a pesagem, os fígados foram picados e homogeneizados com emprego de um homogeneizador Turrax, utilizando-se 3 ciclos de 5 s a 20000 rpm. Em seguida, o homogenato foi submetido a uma seqüência de centrifugações diferenciais, para a obtenção das frações microssomais. A primeira centrifugação tem por objetivo a exclusão de células intactas e fibras, onde utilizou-se uma velocidade de 500 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado para a eliminação dos núcleos a 5400 rpm por 10 min. Novamente, o sobrenadante foi recolhido e submetido a uma nova centrifugação desta vez, para excluir mitocôndrias, lisossomas e peroxissomas, a uma velocidade de centrifugação de 10000 rpm por 20 min. Por fim, para obtenção das frações microssomais realizou-se uma ultracentrifugação a 45000 rpm durante 60 min. Nesta última etapa, o sobrenadante foi descartado e o material sedimentado (*pellets*) foi dissolvido em tampão fosfato de potássio com sacarose e PMSF, homogeneizado e armazenado em ultrafreezer a -80°C .

Todas as etapas foram realizadas em banho de gelo, e as centrifugações realizadas a 4°C , para que a atividade enzimática não fosse prejudicada.

A concentração proteica das frações microssomais obtidas foram determinadas segundo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.4.5 Obtenção das frações microssomais: extração por agregação com cloreto de cálcio

Para a extração microssomal por agregação com cloreto de cálcio, os fígados congelados em ultrafreezer a -80°C foram pesados em um tubo tipo falcon (50 mL) onde adicionou-se solução tampão fosfato de potássio com sacarose e PMSF (10 mmol/L, pH 6,8) na proporção 1,0 g de fígado-5,0 mL de tampão. Após a pesagem os fígados foram picados e homogeneizados com homogeneizador Turrax (3 ciclos de 5 s a 20000 rpm). Em seguida, realizou-se os seguintes ciclos de centrifugação: o primeiro a 500 rpm por 5min, em seguida, o sobrenadante obtido foi novamente centrifugado a 5400 rpm por 10 min e, na terceira e última centrifugação, o sobrenadante foi centrifugado a uma velocidade de 10000 rpm por 20 min. Nesta etapa, o sobrenadante foi recolhido e então adicionou-se um volume de solução de CaCl_2 (40mmol/L) quatro vezes maior que o volume total do sobrenadante. A mistura resultante foi deixada em repouso em banho de gelo por 10 minutos. Após esse período, a mistura foi novamente centrifugada a 10000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o material sedimentado (*pellets*) obtido foi dissolvido no tampão fosfato de potássio com sacarose e PMSF e armazenados em ultrafreezer -80°C para posterior determinação proteica.

Todas as etapas foram realizadas em banho de gelo e as centrifugações foram realizadas a 4°C , para que a atividade enzimática não fosse prejudicada.

3.4.6 Determinação proteica das frações microssomais

3.4.6.1 Preparo do reagente de Bradford

Seguindo o procedimento descrito por Bradford (BRADFORD, 1976), dissolveu-se 50,0 mg do corante azul brilhante “Comassie Brilhante Blue” em 25,0 mL de etanol. Posteriormente, adicionou-se 50,0 mL de ácido fosfórico (85% P.A.), sob constante agitação. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água deionizada. A solução do reagente apresentou uma concentração final de 100 mg/mL e foi estocada em um frasco de vidro âmbar.

3.4.6.2 Preparo das soluções de BSA

Preparou-se uma solução estoque de albumina sérica bovina na concentração de 1,0 mg/mL em água deionizada, pesando-se 5,0 g de albumina e diluindo para um balão volumétrico de 5,0 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 absorvância da BSA. E, então, a absorvância da solução foi ajustada para 0,659. (WALKER, J. M.; 2002).

À partir desta solução estoque, repetidas diluições foram conduzidas para o preparo de soluções de calibração nas concentrações de 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0 e 1000 µg/mL, através de alíquotas de 10-100 µL, as quais foram pipetadas em tubo de ensaio e diluídas com água até um volume total de 100 µL, (com exceção da última alíquota que não precisou de diluição posterior). Cada solução de calibração foi preparada em triplicata (n = 3).

3.4.6.3 Medidas espectrofotométricas das amostras

Adicionou-se 5,0 mL da solução do reagente de BRADFORD às soluções de calibração de BSA, acima preparadas, agitou-se as soluções com o auxílio de um vórtex por 5 s e a mistura final ficou em repouso por 7 minutos para ocorrência da reação. Em seguida, transferiu-se uma alíquota da mistura para uma cubeta de vidro e registrou a absorvância em $\lambda = 596$ nm, relativo à máxima absorção do complexo proteína–corante. As leituras espectrofotométricas foram medidas contra um branco de corante.

O mesmo procedimento foi repetido para todas as amostras em triplicata, bem como para a solução microssomal, a qual se desejava determinar a concentração protéica. A solução microssomal foi previamente diluída com água em volume suficiente para que a concentração final estivesse dentro do intervalo de concentração da curva de calibração obtida. A diluição efetuada foi considerada no cálculo da concentração total de proteínas nas amostras.

3.5 Método cromatográfico para a análise de albendazol e seus metabólitos no modo normal de eluição

3.5.1 Escala Analítica.

A condição cromatográfica quiral para a separação do albendazol e seus metabólitos, no modo normal de eluição e em escala analítica, fez uso das seguintes condições de análise: Coluna quiral: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); lab-made (CASS et al, 1999), fase móvel composta por hexano: etanol (55:45 v/v); $\lambda = 290\text{nm}$; volume de injeção: 100 μL ; vazão da fase móvel: 1,00 mL/min e temperatura ambiente.

3.5.2 Escala Semipreparativa

O escalonamento da separação cromatográfica da escala analítica para a escala semipreparativa foi realizado através da equação 3.1.

$$S = \frac{R_p^2 L_p}{R_A^2 L_A}$$

Onde, R_p e R_A representam os diâmetros e o L_p e L_A representam os comprimentos das colunas semipreparativa e analítica, respectivamente. (CASS;DEGANI 2001).

Para as separações em escala semipreparativa foi empregada uma coluna quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (200 x 7,0 mm), preparadas no laboratório (CASS et al, 1999); nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel hexano:etanol (55:45 v/v); $\lambda = 290\text{nm}$; volume de injeção: 500 μL ; vazão da fase móvel: 3,00 mL/min e temperatura ambiente.

3.6 Condições LC-MS/MS para análise de ABZ e seus metabólitos por cromatografia de fase reversa

As condições cromatográficas e de detecção no *ion-trap* para a análise de ABZ e seus metabólitos por LC-MS/MS foi realizada empregando-se a coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm) e fontes de ionização por ESI, conforme descrito na Tabelas 3.1.

TABELA 3.1 Condições de análise do ABZ e seus metabólitos por LC-MS/MS empregando-se a coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm) e fontes de ionização por ESI.

Parâmetros LC	
Fase Móvel	ACN/H ₂ O (50:50, v/v)
Vazão	0,8 mL/min
Volume de Injeção	10 µL
Parâmetros MS	
Fonte de Ionização	ESI
fluxo	70 µL/min
Modo de Aquisição	Positivo
Potencial do Capilar	- 4500 V
Temperatura do Gás Secante	365 °C
Gás Secante	9,0 L/min
Nebulizador	40 psi
<i>Target</i> ^a	50000
<i>Max. Accu. Time</i> ^{b*}	50 ms
Transição SRM	281 → 240 ABZ-SO 240 → 198 ABZ-SO ₂ -NH ₂ 298 → 266 ABZ-SO ₂
Amplitude de Fragmentação	0,20 V

^aQuantidade de íons acumulados no *Ion-Trap*; ^bTempo máximo de acúmulo de íons.

3.7 Estudo do Metabolismo *in vitro*

3.7.1 Preparo do Tampão Hepes com cloreto de magnésio

O Tampão Hepes (0,100mol/L) foi preparado pesando-se 1,192 g de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES) e 50,8 mg de cloreto de magnésio (5,0 mmol/L), estes sais foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 7,8 com solução de NaOH (1,00 mol/L).

3.7.2 Preparo do Tampão Monobásico de Potássio (KH_2PO_4)

A solução do tampão fosfato monobásico de potássio (0,010 mol/L) foi preparado pesando-se 0,136 g do sal e solubilizando-o em 100 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 7,4 com solução de KOH concentrada. A solução foi estocada em frasco âmbar na geladeira, por no máximo 15 dias.

3.7.3 Preparo da solução de cloreto de magnésio (MgCl_2)

A solução de cloreto de magnésio (0,010 mol/L) foi preparada solubilizando-se 0,200 g do sal em 100 mL de água deionizada. A solução foi armazenada em frasco adequado e guardada em geladeira, por no máximo 15 dias.

3.7.4 - Preparo da solução de EDTA

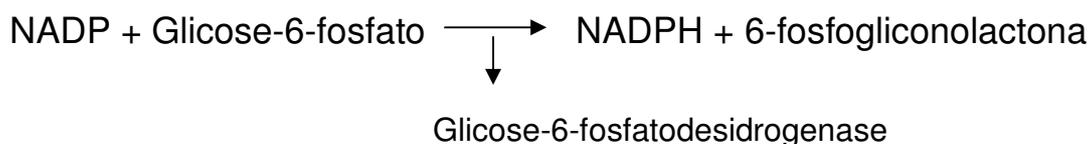
A solução de EDTA foi preparada diluindo-se 0,740 g em 100 mL de água deionizada. Esta solução foi estocada em geladeira, por no máximo 15 dias.

3.7.5 Preparo da solução de NADPH (β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzido)

A solução de NADPH (20 mg/mL) era preparada diariamente, através da pesagem de 2,0 mg do sal e diluição em 100 μ L de tampão Hepes (100 mmol/L; pH 7,8 com 5mmol $MgCl_2$).

3.8 Sistema regenerador de NADPH

O NADPH é uma coenzima que fornece equivalentes redutores nas reações de biotransformação de fármacos. Este é gerado através de uma reação enzimática entre β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADP) e glicose-6-fosfato catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. De acordo com a reação a baixo.



3.8.1 Preparo da solução de NADP

A solução de NADP (100 mmol/L) foi diariamente preparada diluindo-se a massa necessária do reagente no volume apropriado de tampão Hepes (100 mmol/L; pH 7,8 com 5mmol $MgCl_2$), a ser utilizado no dia.

3.8.2 Preparo da solução glicose-6-fosfato

A solução de glicose-6 fosfato (100 mmol/L) foi diariamente preparada diluindo-se a massa necessária do reagente no volume adequado de tampão Hepes (100 mmol/L; pH 7,8 com 5mmol $MgCl_2$), a ser utilizado no dia.

3.8.3 Preparo da solução glicose-6-fosfato desidrogenase

A solução estoque de glicose-6-fosfato desidrogenase foi preparada na concentração de 500 U/mL e armazenada em freezer a -20°C. A solução de glicose-6-fosfato desidrogenase (100 U/mL) era diariamente preparada pela adequada diluição da solução estoque.

3.8.4 Análise do sistema regenerador de NADPH

Para a otimização das condições da reação enzimática, através do emprego do sistema regenerador de NADPH, foi utilizado um método cromatográfico para a análise de NADP e NADPH, utilizando uma coluna cromatográfica C18 Nucleosil (10 x 021 cm), fase móvel composta por trietilamina (1%; pH 6,0):ACN (97:3) na vazão de 0,2 mL/min e comprimento de onda de 260 nm, à temperatura ambiente.

3.8.5 Obtenção do NADPH através do sistema regenerador de NADPH

Para a obtenção do NADPH, através do sistema regenerador de NADPH, adicionou-se volumes iguais dos reagentes, glicose-6-fosfato, glicose-6-fosfato desidrogenase e NADP nas concentrações 100 mmol/L, 100 U/mL e 100 mmol/L, respectivamente. Esta solução era então adicionada ao sistema de incubação.

3.9 Ensaio *in vitro*

3.9.1 Escala Analítica

Os ensaios *in vitro* foram realizados em tubos de ensaio, onde primeiramente adicionou-se, 820 µL de tampão HEPES (0,100 mol/L; pH 7,8; contendo 5mmol/L MgCl₂). Em seguida, adicionou-se 100 µL de solução microsomal (20 mg/mL) e 30 µL de solução do albendazol (1,5 mg/mL). Esta mistura foi pré-incubada por 3 min à temperatura de 37°C. Passado esse tempo, adicionou-se 50 µL da solução de NADPH (20 mg/mL) ou 50 µL da solução do

sistema regenerador de NADPH e a mistura foi deixada em temperatura controlada de 37°C, sob agitação constante, por 6 horas. Então procedeu-se à extração por precipitação de proteínas ou extração em fase sólida (item 3.9.1 e 3.9.2).

3.9.2 Escala Semipreparativa

Os ensaios *in vitro* foram realizados em tubos do tipo falcon (50 mL), onde primeiramente adicionou-se 16,4 mL de tampão Hepes (100 mmol/L; pH 7,8 com 5mmol MgCl₂) e, em seguida, adicionou-se 2,0 mL de solução microsomal (20 mg/mL) e 600 µL de solução do albendazol (1,5 mg/mL). Esta mistura foi pré-incubada por 3 min à temperatura de 37°C. Passado esse tempo, adicionou-se 1,00 mL de solução de NADPH (20 mg/mL) ou 1,00 mL da solução do sistema regenerador de NADPH. A mistura foi deixada em temperatura controlada de 37°C, sob agitação constante, por 6 horas. e procedeu-se à extração em fase sólida (item 3.9.2).

3.9.3 Preparo de amostras

3.9.3.1 Precipitação de proteína (PP)

Ao final da biotransformação *in vitro*, após a adição de 400 µL de acetonitrila, afim de interromper a atividade enzimática e também promover a precipitação das proteínas. A mistura foi submetida à agitação por 10 s em um agitador do tipo vórtex e centrifugada a 10000 rpm, 4 °C, durante 15 min. O sobrenadante recolhido foi evaporado no concentrador do tipo *Speed Vac* (65 °C, 90 min de corrida, dos quais 45 min de aquecimento) e o resíduo obtido foi reconstituído em 200 µL de etanol e 100 µL injetado no sistema cromatográfico.

3.9.3.2 Extração em fase sólida (SPE)

Em escala analítica, o preparo de amostra utilizando SPE foi realizado com emprego de cartuchos Oasis HLB 3cc (30 mg), onde os cartuchos foram condicionados com a eluição de 2,0 mL de MeOH e 1,0 mL de H₂O, com posterior aplicação das amostras. Na sequência, os cartuchos foram lavados com 3,0 mL H₂O

e 1,0 mL da mistura H₂O:MeOH (95:05) e, após secos, foram eluídos com 2,0 mL de MeOH.

As amostras eluídas foram recolhidas e evaporadas em concentrador do tipo *Speed Vac* (65 °C, 90 min de corrida, dos quais 45 min de aquecimento) e os resíduos obtidos foram reconstituídos em 200 µL de etanol levados ao auto-injetor para a injeção de 100 µL das amostras no sistema cromatográfico.

Em escala semipreparativa, o preparo de amostra utilizando SPE foi realizado com emprego de cartuchos Oasis HLB 12cc (500 mg), onde os cartuchos foram condicionados com a eluição de 20,0 mL de MeOH e 10,0 mL de H₂O, com posterior aplicação das amostras. Na sequência, os cartuchos foram lavados com 10,0 mL H₂O e 5,0 mL da mistura H₂O:MeOH (95:05) e, após secos, foram eluídos com 10,0 mL de MeOH.

As amostras eluídas foram recolhidas e evaporadas em concentrador do tipo *Speed Vac* (65 °C, 90 min de corrida, dos quais 45 min de aquecimento) e os resíduos obtidos foram reconstituídos em 1,0mL de etanol e injetados no sistema cromatográfico em injeções de 500µL cada.

3.9.4 Tratamento de resíduos

Os resíduos de todos os solventes orgânicos utilizados durante o desenvolvimento deste projeto foram tratados de acordo com o protocolo da unidade de tratamento de resíduos químicos da Universidade Federal de São Carlos. Os resíduos biológicos foram inativados com hipoclorito de sódio e, posteriormente, encaminhados para a unidade de tratamento de resíduos químicos da Universidade Federal de São Carlos. Lixos biológicos, como ponteiras, luvas, inserts, tubos eppendorf (contaminados com microssomas, sangue, etc) foram retirados pela Prefeitura Universitária e devidamente incinerados juntamente com o lixo biológico da Universidade Federal de São Carlos.

RESULTADOS E

DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na descoberta de novos fármacos, os métodos *in vitro* apresentam um papel importante, uma vez que a utilização de sistemas microssomais permite a rápida obtenção de resultados, além de propiciar estudos relacionados à estabilidade dos metabólitos formados; a investigação das rotas metabólicas e isoformas envolvidas no metabolismo; assim como, a produção de metabólitos em larga escala para a utilização destes em ensaios bioanalíticos e em estudos de comparação de perfis metabólitos, dentre outros. (EKINS *et al.*, 2000)

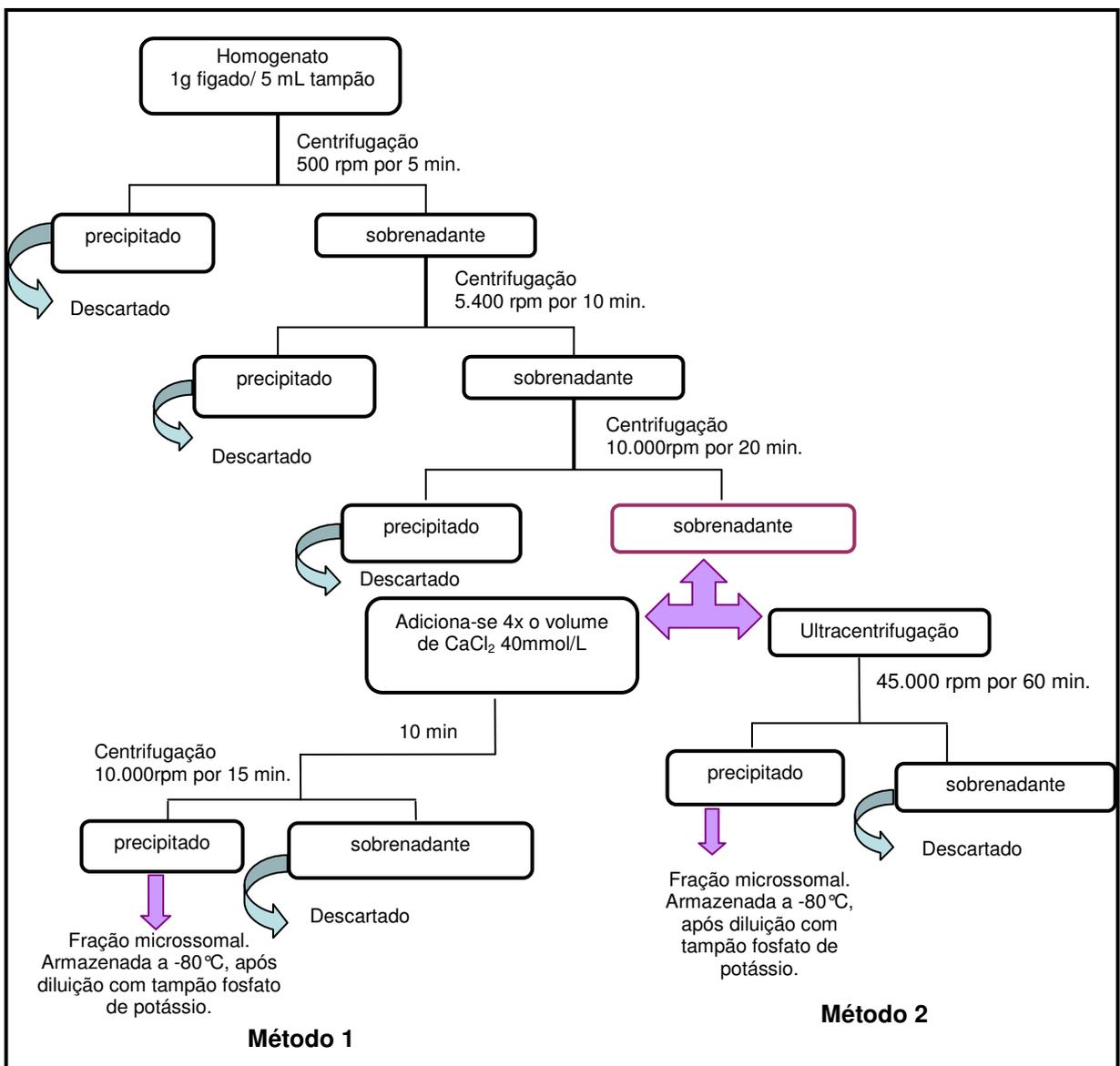
Microssomas são vesículas celulares, localizadas no retículo endoplasmático, as quais contêm um conjunto importante de enzimas, os chamados citocromos P450, sendo estes responsáveis pela catálise de uma grande diversidade de reações de biotransformação. Por esse motivo, os microssomas são amplamente empregados em pesquisas científicas para a investigação do metabolismo *in vitro* de moléculas. Essas frações celulares podem ser obtidas por precipitação, através da adição de cloreto de cálcio, ou através de procedimentos de centrifugação diferenciada. (VOET *et al.*, 2004)

As vantagens em se utilizar sistemas *in vitro*, incluem a facilidade de preparo das frações celulares, a reprodutibilidade dos experimentos, a possibilidade de armazenamento dos microssomos por longos períodos. Por outro lado, os procedimentos de biotransformação *in vitro* exigem a estabilidade das enzimas e também a adição de coenzimas para iniciar as reações, como a β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzida (NADPH). (EKINS *et al.*, 2000)

4.1 Obtenção das frações microssomais por centrifugação diferenciada e por agregação com CaCl_2

As frações microssomais foram extraídas de fígados de ratos Wistar, tanto pelo método de centrifugação diferenciada (método 2), adaptado de PHILLIPS e SHEPHARD, 1998 como pelo método de agregação com CaCl_2 (método 1), adaptado de LITTERST *et al.*, 1975 e WALAWALKAR *et al.*, 2006. Os dois métodos de extração das frações microssomais são bastante semelhantes e foram ambos realizados neste trabalho para se avaliar a eficiência na extração da fração celular e

posterior estudos de metabolização *in vitro*. Os dois procedimentos diferem entre si somente após a terceira etapa de centrifugação, realizada a 10.000 rpm por 20 minutos. Neste ponto o sobrenadante sofreu uma ultracentrifugação a 45.000 rpm por 60 minutos, ou a ele foi adicionado um volume de solução de cloreto de cálcio (40 mmol/L), que representou 4 vezes o volume do sobrenadante e, após 10 minutos de descanso, esta mistura foi submetida a uma nova centrifugação (Esquema 4.1). Nos dois casos, os resíduos obtidos foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio (0,01 mol/L; pH 7,4) e armazenados em ultrafreezer -80°C, para posterior quantificação proteica.



Esquema 4.1 Extração da Fração Microssomal.

Ambos os métodos para a obtenção das frações microssomais se mostraram eficientes, uma vez que possibilitaram o isolamento dos microssomas, sendo o método de ultracentrifugação mais fácil de ser realizado do que o de agregação com cloreto de cálcio, onde o primeiro não requer determinar o volume de sobrenadante para realizar a centrifugação final, enquanto que o segundo pode ser realizado em qualquer laboratório de pesquisa, pois dispensa o uso de ultracentrífugas, de alto custo.

4.2 Determinação proteica das frações microssomais

Após a obtenção das frações microssomais extraídas dos fígados de ratos Wistar, determinou-se a concentração proteica das frações obtidas. A determinação da concentração proteica das frações microssomais é uma etapa importante nos estudos de metabolização *in vitro*, pois este parâmetro é uma das etapas principais na obtenção de resultados satisfatórios para a produção de metabólitos.

Para a determinação proteica diversos métodos espectrofotométricos estão disponíveis na literatura, no entanto, não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios biológicos. De modo geral, os métodos mais utilizados são o método do Biureto (GORNALL *et al.*, 1949), o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), o método do “Coomassie brilliant blue” (CBB) ou reagente de Bradford (BRADFORD, 1976), o método do BCA ou reagente de Smith (SMITH *et al.*, 1985) e o método de absorção de proteínas no ultravioleta (ZAIA *et al.*, 1998). Neste trabalho o método de Bradford foi selecionado para ser empregado por ser um método simples, rápido e sensível na determinação de proteínas totais e, além disso, este é um método já amplamente utilizado pelo grupo e de fácil aplicação, onde a determinação proteica é realizada por detecção por espectrofotometria no ultravioleta visível. Este método é baseado na interação entre o corante e as proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH da reação, a interação entre a proteína de elevada massa molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 596 nm (COMPTON & JONES, 1985).

4.2.1 Curva de calibração

Para a quantificação das proteínas totais, curvas de calibração foram construídas a partir de solução padrão de albumina sérica bovina (BSA) em seis diferentes concentrações: 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, onde cada amostra foi preparada em replicada ($n=3$). Os valores de absorbância foram medidos em $\lambda = 596 \text{ nm}$. A Figura 4.1 ilustra as duas curvas de calibração obtidas através de polinômio do segundo grau. A curva de calibração (A) foi realizada para quantificar as amostras extraídas por centrifugação diferenciada e a curva de calibração (B) para quantificar as amostras extraídas pelo procedimento de agregação com CaCl_2 . Ambas as curvas foram obtidas com um coeficiente de correlação (r) de 0,99. A Tabela 4.1 e 4.2 apresenta os valores das médias das absorbâncias, a precisão e exatidão das medidas realizadas para as frações obtidas com centrifugação diferenciada e por agregação com CaCl_2 , respectivamente.

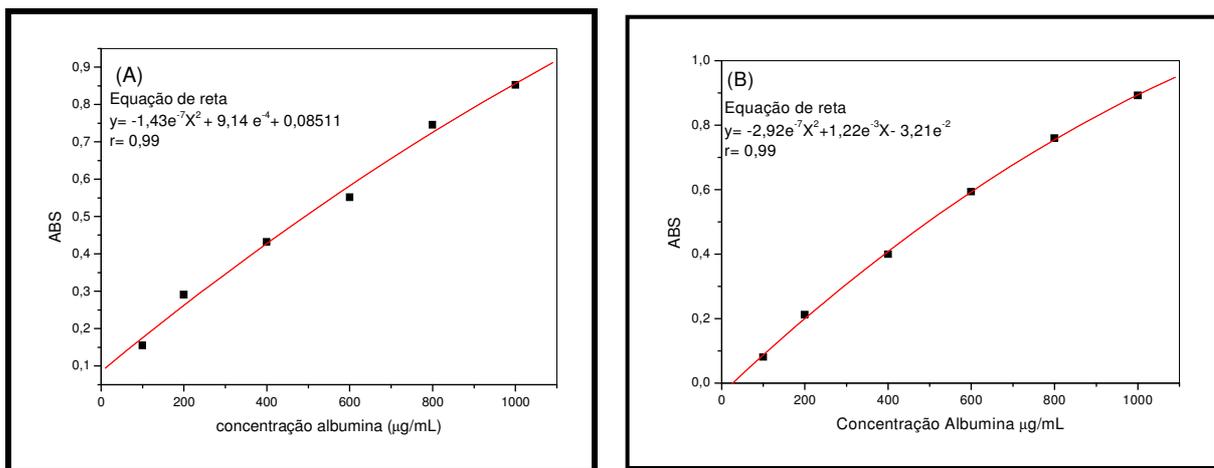


Figura 4.1 Curvas de calibração obtida a partir de soluções padrão de BSA. (A) utilizada para quantificar as amostras extraídas por centrifugação diferencial; (B) utilizada para quantificar as amostras extraídas por agregação com CaCl_2 .

TABELA 4.1 Valores da Média de Absorbância (Abs), Coeficiente de Variação (CV%) e Exatidão (%) para a curva de calibração A, preparada em diferentes concentrações de BSA. $\lambda = 596$ nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média Abs (n = 3)	CV(%)	Exatidão (%)
100,0	91,20	7,84	91,2
200,0	212,6	11,5	106
400,0	399,1	5,66	99,8
600,0	600,5	2,04	100
800,0	791,0	3,27	98,9
1000	1006	1,18	101

TABELA 4.2 Valores da Média de absorbância (Abs), Coeficiente de Variação (CV%) e Exatidão (%) para a curva de calibração B, preparada em diferentes concentrações de BSA. $\lambda = 596$ nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média Abs (n = 3)	CV(%)	Exatidão (%)
100,0	0,0810	5,24	111
200,0	0,212	4,07	94,3
400,0	0,399	0,88	98,6
600,0	0,593	0,36	98,8
800,0	0,760	2,63	107
1000	0,892	1,95	98,1

A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação do polinômio obtido na curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as quantificadas. A precisão das medidas das concentrações de BSA apresentou coeficientes de variação entre 1,18 a 11,5 para a curva de calibração A e de 0,360 a 5,24 para a curva de calibração B. Os valores de exatidão variaram de 91,2 a 106 % e de 98,1 a 111 %, para a curva de calibração A e B, respectivamente. Todos estes valores foram considerados aceitáveis, uma vez que o critério de aceitação foi de 15%. (RE nº 899, 2003)

Para a determinação das concentrações protéicas das amostras desconhecidas, as amostras foram igualmente diluídas, de forma a obter valores de

absorbância dentro do intervalo de concentração das curvas de calibração, sendo os valores médios das absorbâncias ($n = 3$) interpolados na curva de calibração específica e as concentrações determinadas. As concentrações protéicas encontradas foram de 35,16 mg/mL e de 26,35 mg/mL para as frações microssomais obtidas por ultracentrifugação e por agregação por CaCl_2 , respectivamente. Estes valores estão de acordo com os valores reportados em diferentes trabalhos (PRASAD e SINGH, 2009; ROMÃO *et al.*, 2009), nos quais a concentrações protéicas variam de 20 a 40 mg/mL, demonstrando que os procedimentos experimentais adotados são eficientes para a extração desejada.

Adicionalmente, ambas frações microssomais foram empregadas em estudos de metabolismo *in vitro* do albendazol (ABZ) e observou-se que a atividade enzimática, através da produção dos metabólitos de interesse, foi a mesma para as duas diferentes frações microssomais obtidas, ou seja, embora a concentração proteica encontrada para a extração microssomal por agregação com CaCl_2 ofereça uma menor concentração final de proteínas totais, a concentração proteica utilizada nos ensaios de biotransformação é ainda menor (10 ou 20 mg/mL) e uma diluição das amostras é sempre realizada. Desta forma, a escolha por um dos processos de extração está relacionada ao rendimento protéico das frações celulares, assim como, dos equipamentos disponíveis no laboratório.

Com o intuito da obtenção dos metabólitos do ABZ em quantidades miligrama, optou-se por utilizar as extrações microssomais obtidas através da ultracentrifugação, uma vez que este procedimento resultou em uma maior concentração protéica e, portanto, maior rendimento.

Diferentes extrações microssomais foram realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho, onde o mesmo procedimento experimental foi empregado e as seguintes concentrações protéicas foram encontradas: 36,1; 29,6 e 33,0 mg/mL, com um desvio padrão de 4,23% entre os valores. Com isso, foi possível observar a reprodutibilidade do método adotado para as diferentes extrações realizadas.

4.3 Desenvolvimento de um método cromatográfico para a análise de albendazol e seus metabólitos.

Para que a investigação da biotransformação do ABZ pudesse ser avaliada, as condições cromatográficas de análise dos analitos de interesse foram inicialmente desenvolvidas e otimizadas em um sistema de cromatografia líquida acoplada a um detector de ultravioleta (LC-UV).

A farmacocinética do ABZ já foi investigada em diferentes espécies animais, tendo sido comprovado que este é rapidamente metabolizado para a forma albendazol sulfóxido (ABZ-SO), albendazol sulfona (ABZ-SO₂) e albendazol 2-aminosulfona (ABZ-SO₂-NH₂). (BELAZ, *et al*, 2008, MERINO *et al*. 2003). O ABZ-SO, metabólito majoritário e ativo, por sua vez, possui um centro assimétrico no átomo de enxofre e se apresenta na forma de dois enantiômeros, o (+)-ABZ-SO e o (-)-ABZ-SO (WU, 2005). Desta forma, neste trabalho, para a investigação da metabolização do ABZ e formação dos seus metabólitos optou-se pela utilização de cromatografia líquida quiral, com emprego de uma coluna quiral de polissacarídeo, composta por uma fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 % g/g) (150 x 4,6 mm; 7,0 µm).

A escolha da fase estacionária quiral *tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 % g/g) (150 x 4,6 mm; 7,0 µm) foi baseada em estudo anteriores realizados no grupo, onde este seletor quiral mostrou uma excelente capacidade enantiosseletiva para os enantiômeros do ABZ-SO em fase reversa, normal e polar orgânica. (BELAZ *et al*, 2012). A coluna quiral já estava disponível no grupo e foi preparada conforme descrito por BELAZ, 2011.

Considerando-se a posterior purificação e separação dos metabólitos obtidos via processo de metabolização *in vitro*, o modo de eluição escolhido para a análise e separação de todos os analitos de interesse foi o modo normal de eluição e o modo polar orgânico, visto que estes dois modos permitem o fácil isolamento das substâncias separadas, através da simples evaporação dos solventes empregados.

No modo normal de eluição, a fase móvel é constituída por misturas de hexano e diferentes álcoois como modificadores orgânicos. No modo polar orgânico a fase móvel é caracterizada pelo uso de 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, 2-propanol ou ainda misturas desses solventes

(MATTHIJS 2006). Diferentes fases móveis compostas por solventes orgânicos puros ou misturas entre eles foram avaliadas e estão descritas na Tabela 4.3.

TABELA 4.3 Fases móveis avaliadas para a separação cromatográfica do ABZ e seus metabólitos, com emprego da coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 % g/g) (150 x 4,6 mm; 7,0 μm)

	Fase Móvel	Proporção (v/v)
Modo Polar Orgânico	metanol	100
	etanol	100
	acetonitrila	100
	etanol:acetonitrila	95:5; 90:10
	etanol:isopropanol	95:5; 90:10; 99:1; 98:2
Modo Normal	hexano: isopropanol	90:10; 80:20; 10:90; 20:80
	hexano:etanol	90:10; 80:20; 70:30; 75:25; 60:40; 55:45; 50:50

No modo polar orgânico, as melhores separações cromatográficas foram obtidas para o (\pm)-ABZ-SO e ABZ-SO₂, com fase móvel constituída por etanol (100%) e mistura de etanol com acetonitrila (95:5) (Figura 4.2). No entanto, em ambos os casos, pode-se observar a coeluição da ABZ-SO₂-NH₂ com o primeiro enantiômero do ABZ-SO, inviabilizando o emprego destas duas fases móveis. Com a troca de acetonitrila por isopropanol na composição da fase móvel, a mistura composta por etanol: isopropanol (98:2) apresentou a separação desejada entre o ABZ-SO₂-NH₂ e o primeiro enantiômero do ABZ-SO, no entanto, com o emprego de concentrações analíticas dos analitos mais elevadas, a resolução ficou comprometida e, assim, essa fase móvel não foi selecionada para os estudos posteriores.

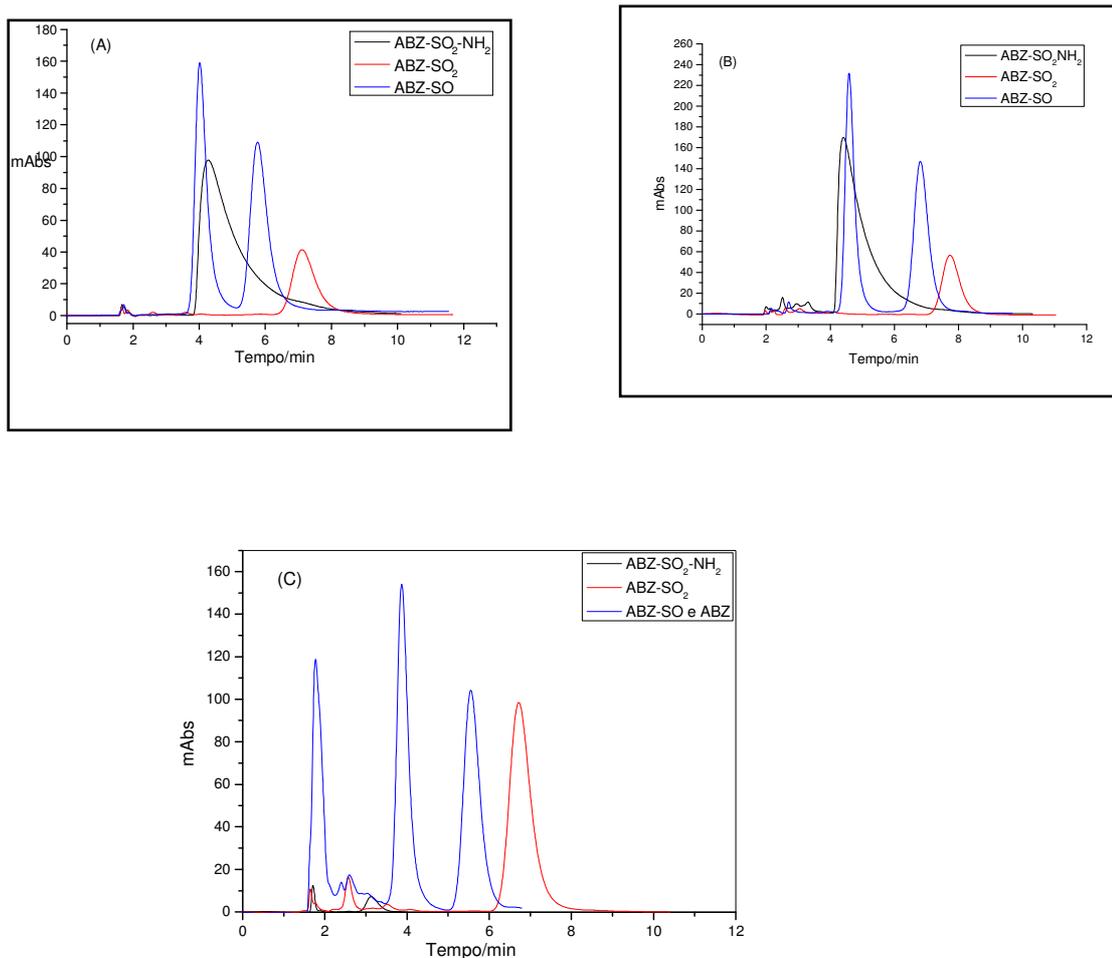


Figura 4.2 Cromatograma obtido para a separação dos metabólitos do ABZ e seus metabólitos, no modo polar orgânico. (A) etanol (100%); (B) etanol:acetonitrila (95:5); (C) etanol:isopropanol (98:2). Condições Cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbam

No modo normal de eluição, nas diferentes misturas de hexano com etanol ou isopropanol, foi também observada a coeluição da ABZ-SO₂-NH₂ com o primeiro enantiômero do ABZ-SO e, quando não ocorria a coeluição, os tempos de análise eram longos (> 45 min) para a eluição de todos os compostos de interesse (Figura 4.3). Diante da dificuldade em se obter uma separação adequada para a mistura de compostos, com tempo de análise satisfatório, priorizou-se a separação entre o ABZ, (±)-ABZ-SO e ABZ-SO₂, uma vez que, baseado em estudos anteriores no grupo (Belaz, 2011) a formação da ABZ-SO₂-NH₂ não era esperada nos ensaios *in vitro*. Dentre as condições cromatográficas avaliadas no modo normal de eluição, a melhor condição obtida para a separação cromatográfica dos compostos de interesse foi com o emprego da fase móvel hexano:etanol (55:45 v/v), com uma

vazão de 1,0 mL/min, comprimento de onda de 290 nm e temperatura ambiente, conforme ilustrado na Figura 4.3 (C).

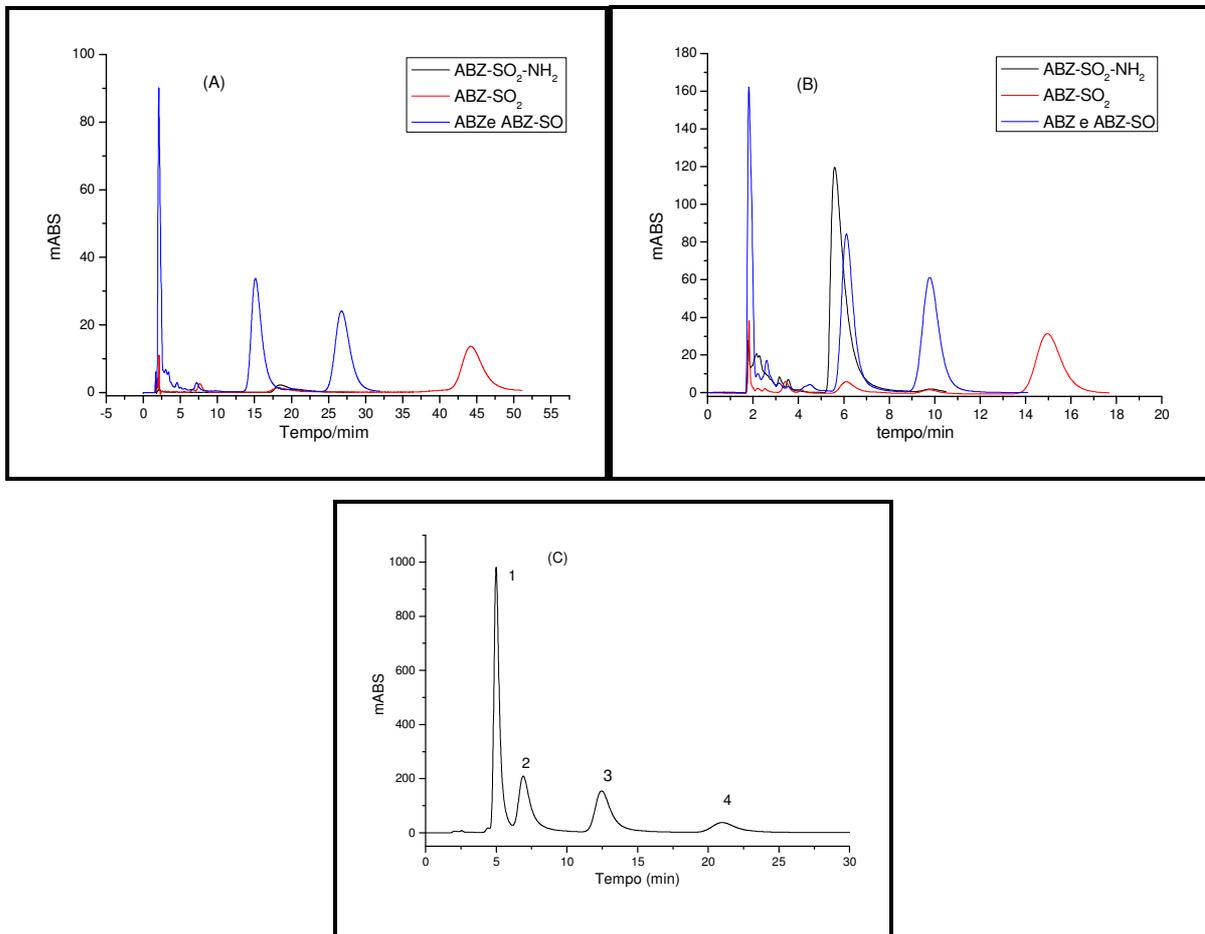


Figura 4.3 Cromatograma das soluções padrão de: (1) ABZ, (2) (+)-ABZ-SO; (3) (-)-ABZ-SO e (4) ABZ-SO₂. Condições Cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 0,46 mm d.i.), vazão de 1,0mL/min, volume

A condição cromatográfica estabelecida foi, então, utilizada em todas as etapas de desenvolvimento e otimização do tratamento das amostras biológicas, assim como, durante a otimização do processo de metabolização *in vitro*, uma vez que, inicialmente, estas etapas foram realizadas em escala analítica.

4.4 Preparo de amostras para análise por cromatografia líquida

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica amplamente utilizada na análise de fármacos e metabólicos em fluidos biológicos, porém estas amostras não devem ser injetadas diretamente nas colunas cromatográficas, já que

as proteínas presentes nos biofluidos provocam entupimento da coluna e perda da eficiência das mesmas (LIMA, *et al* 2006). Assim, o preparo de amostras antes da análise cromatográfica é um requisito essencial para o estabelecimento de um método cromatográfico sensível e seletivo destinado à análise de compostos em matrizes complexas (DIONÍSIO, *et al* 2010).

Para o pré-tratamento das amostras biológicas, caracterizadas por frações microssomais no metabolismo *in vitro*, foram selecionados dois procedimentos *off-line* convencionais e rotineiramente utilizados nos métodos de determinação de fármacos em fluidos biológicos: a precipitação por proteínas (PP) e a extração em fase sólida (SPE).

A SPE caracteriza-se por empregar cartuchos na forma de seringa ou barril, sendo estes empacotados com fases estacionárias idênticas àquelas utilizadas em colunas empregadas na cromatografia líquida de alta eficiência e, portanto, possuem os mesmos mecanismos de retenção.

Em geral, os procedimentos de SPE contêm 5 etapas, sendo estas: i) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; ii) condicionamento do sorvente com um solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; iii) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; iv) limpeza da fase estacionária para retirar os interferentes menos retidos que o analito; v) eluição e coleta do analito. (QUEIROZ, *et al.* 2001). A SPE apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos favorecendo, desta forma, a seletividade analítica. Adicionalmente possibilita a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas (QUEIROZ e LANÇAS, 2005).

O preparo de amostra por precipitação de proteína consiste na adição de sais e/ou solventes orgânicos que competem com as proteínas pela água disponível, ocasionando a denaturação e precipitação das proteínas, com posterior separação destas através da centrifugação. É uma técnica muito simples; com baixo custo, porém, com pouca eficiência na retirada de interferentes; sendo também de difícil automação e baixa precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), o que pode acarretar em perdas consideráveis dos analitos de interesse. (ORLANDO *et.al.* 2009)

4.4.1 Preparo da amostra por extração em fase sólida (SPE)

Neste trabalho, os procedimentos de extração em fase sólida foram avaliados com o objetivo de promoverem uma limpeza eficiente das frações microssomais e também propiciar uma elevada recuperação dos analitos, uma vez que os metabólitos produzidos poderiam estar em baixas concentrações. A SPE foi dividida em quatro etapas, representadas na Figura 4.4: condicionamento dos cartuchos; aplicação da amostra; lavagem dos interferentes e eluição dos analitos de interesse. Na Tabela 4.4 estão descritas as diferentes condições testadas para o tratamento das amostras, onde se alterou a mistura de solventes utilizada na etapa de lavagem dos interferentes e na eluição dos analitos em estudo.

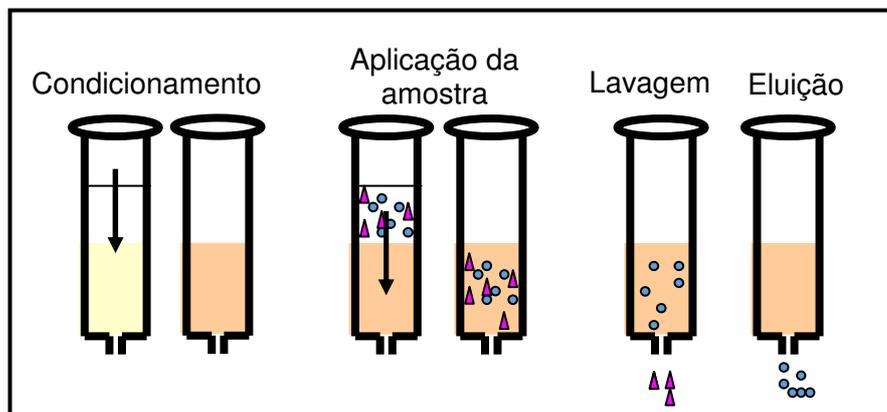


Figura 4.4 Etapas envolvidas na extração de amostras em fase sólida.

TABELA 4.4 : Condições avaliadas para o tratamento de amostra por SPE

	Condição 1	Condição 2	Condição 3
Condicionamento	2,0 mL MeOH	2,0 mL MeOH	2,0 mL MeOH
	1,0 mL H ₂ O	1,0 mL H ₂ O	1,0 mL H ₂ O
Aplicação da Amostra	1,0mL	1,0mL	1,0mL
Lavagem	3,0 mL H ₂ O	3,0 mL H ₂ O	3,0 mL H ₂ O
	1,0mL H ₂ O/MeOH	1,0mL H ₂ O/MeOH	1,0mL H ₂ O/MeOH
	90:10	95:05	95:05
Eluição	3 mL MeOH	2mL MeOH	3mL MeOH

Os valores de recuperação obtidos para as diferentes condições de extração por SPE avaliadas estão apresentados na Tabela 4.5.

TABELA 4.5 Valores de recuperação obtidos durante o preparo de amostra por SPE (n=3)

	Condição 1	Condição 2	Condição 3
ABZ-SO ₂ -NH ₂	41,0 ± 18,0	109 ± 7,40	85,2 ± 16,0
(+)-ABZ-SO	38,5 ± 24,3	98,7 ± 6,60	98,2 ± 3,60
(-)-ABZ-SO	50,3 ± 24,4	88,6 ± 5,40	101 ± 13,8
ABZ-SO ₂	49,0 ± 25,0	94,8 ± 6,50	105 ± 13,3

De acordo com os dados de recuperação (Tabela 4.5), optou-se por utilizar a condição de extração 2 para o procedimento de SPE, onde foram obtidos os melhores valores de recuperação para todos os compostos de interesse avaliados, sendo estes de 88,6 a 109 %, com um desvio de 5,4 a 7,4 %.

A Figura 4.5 apresenta o cromatograma representativo da recuperação dos analitos em frações microssomais, após extração por SPE e a análise dos compostos de interesse em solvente.

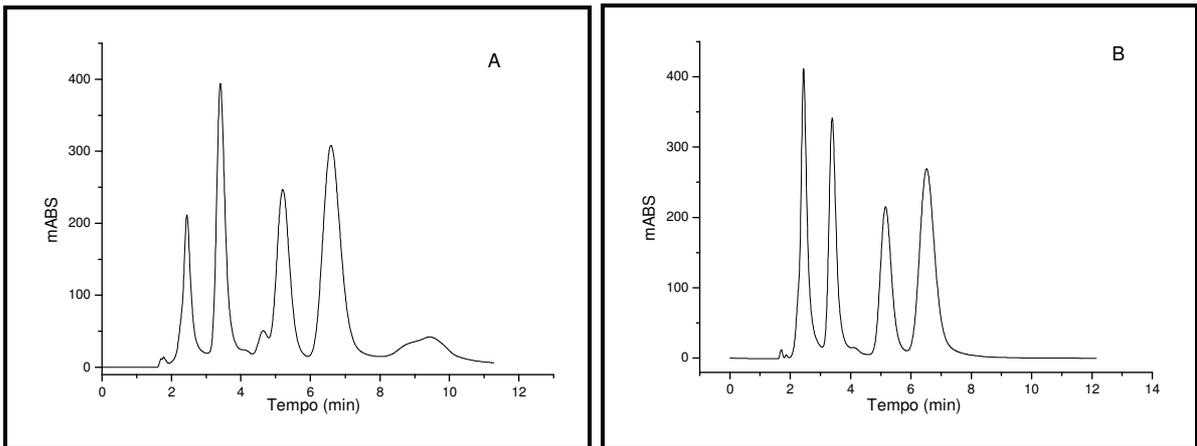


Figura 4.5 Cromatograma da extração do ABZ e metabólitos em fração microsossomal por SPE (A) e análise dos compostos em solvente (B).

4.4.2 Preparo de amostra por precipitação de proteína (PP)

O procedimento de precipitação de proteína também foi avaliado, por ser este de fácil execução e de baixo custo, quando comparado com os cartuchos de SPE. Este procedimento consistiu em adicionar um volume de 400 μ L de solvente orgânico no meio biológico, onde foram avaliados dois diferentes agentes precipitantes: acetonitrila e metanol, ambos adicionados a temperatura ambiente. A Figura 4.6 ilustra o procedimento experimental de precipitação de proteínas (PP).

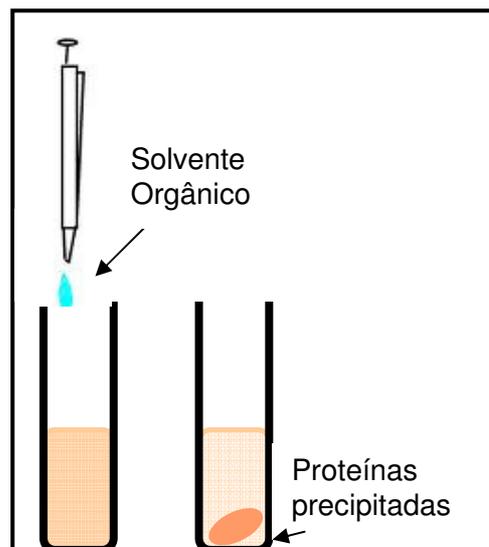


Figura 4.6 Etapas envolvidas na extração de amostras por PP.

A Figura 4.7 apresenta os cromatogramas obtidos das análises cromatográficas após tratamento das amostras biológicas com precipitação de proteínas com emprego de metanol (A) e de acetonitrila (B).

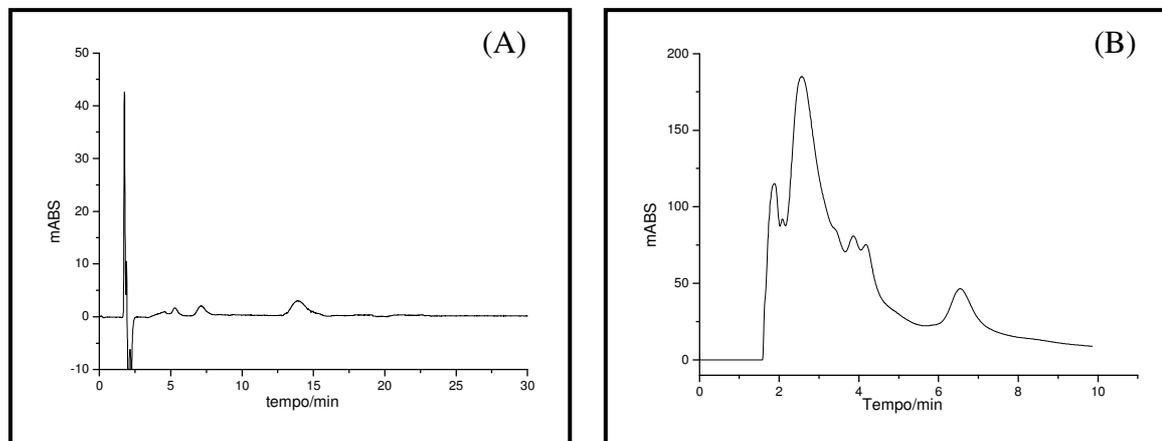


Figura 4.7 Cromatogramas da extração de ABZ e metabólitos da fração microssomal por PP. (A) 400 µL metanol e (B) 400 µL de acetonitrila.

Comparando os dois agentes precipitantes utilizados, o MeOH e a ACN, observa-se que o metanol promove a precipitação conjunta dos analitos em estudo com as proteínas, ocasionando uma baixa recuperação. Por outro lado, a acetonitrila não efetua uma limpeza eficiente dos interferentes da amostra, uma vez que é possível detectar a presença de muitas impurezas durante a análise cromatográfica, inviabilizando a seletividade do método.

Comparando-se a SPE e a PP como métodos de preparo de amostra, conclui-se que a extração em fase sólida apresentou uma melhor eficiência na limpeza dos interferentes, com recuperação satisfatória dos compostos de interesse, enquanto que, a precipitação de proteínas mostrou pouca eficiência de limpeza e de recuperação dos analitos. Assim, neste trabalho, a extração em fase sólida foi o procedimento selecionado para o preparo das amostras.

4.5 Otimização dos parâmetros de biotransformação do albendazol

As etapas de otimização das condições ótimas de biotransformação do ABZ em seus metabólitos, via emprego de frações microssomais obtidas de fígados

de ratos Wistar, foram todas realizadas com emprego do método cromatográfico quiral anteriormente descrito.

Inicialmente, três condições de incubação foram testadas, conforme parâmetros descritos na Tabela 4.6.

TABELA 4.6 Condições iniciais de incubação do ABZ em fracos microsossomais de ratos Wistar. Tempo de incubação de 60 min.

Condição 1	Condição 2	Condição 3
730 µL tampão fosfato (0,100 mol/L; pH 7,4)	820 µL tampão Hepes (0,100 mol/L e MgCl ₂ 5,00 mmol/L; pH 6,8)	760 µL tampão Hepes (0,100 mol/L e MgCl ₂ 5,00 mmol/L; pH 6,8)
60,0 µL EDTA (1,00 mol/L)	100 µL microsossoma (10,0 mg/mL)	60,0 µL EDTA (1,0 mol/L)
30,0 µL MgCl ₂ (0,100 mol/L)	30,0 µL ABZ (1,00 mg/mL)	100 µL microsossoma (10,0 mg/mL)
100 µL microsossoma (10,0 mg/mL)	50,0 µL NADPH (10,0 mg/mL)	30,0 µL ABZ (1,00 mg/mL)
30,0 µL ABZ (1,00 mg/mL)		50,0 µL NADPH (10,0 mg/mL)
50,0 µL NADPH (10,0 mg/mL)		

As condições selecionadas contemplaram o uso de tampão fosfato e tampão Hepes, uma vez que diferentes soluções salinas podem ocasionar maior estabilidade e/ou atividade enzimática ao sistema avaliado. Adicionalmente, avaliou-se a presença de EDTA, como agente complexante e de diferentes concentrações proteicas, através do emprego de diferentes volumes da fração microsossomal.

Dentre as condições avaliadas, observou-se que a condição experimental (2) apresentou os melhores resultados, com uma maior produção e estabilidade dos metabólitos formados. Assim, essa condição experimental foi utilizada nos ensaios posteriores, onde se avaliou, de modo univariado, as melhores condições experimentais considerando-se o tempo de incubação, a concentração proteica, a concentração do ABZ e a concentração da coenzima (NADPH). O uso do complexante EDTA, não mostrou diferença no processo de biotransformação.

4.5.1 Avaliação do tempo de incubação

Para a avaliação do tempo de incubação, realizaram-se os testes de incubação em replicata ($n=2$), onde o tempo foi variado de 1 a 12 horas e alíquotas do processo de metabolização foram obtidas de hora em hora. Tempos menores que 1h não foram considerados, uma vez que estudos anteriores mostraram que neste período não havia a formação dos metabólitos em quantidade apreciável. Nestes estudos utilizou-se a condição (2) de biotransformação, descrita na Tabela 4.6, conforme procedimento experimental descrito no item 3.8.1. A mistura foi mantida em banho termostatizado (37°C) com agitação constante pelo tempo a ser avaliado.

A Figura 4.8 mostra a formação dos principais metabólitos do ABZ, o (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO, nos diferentes tempos de incubação.

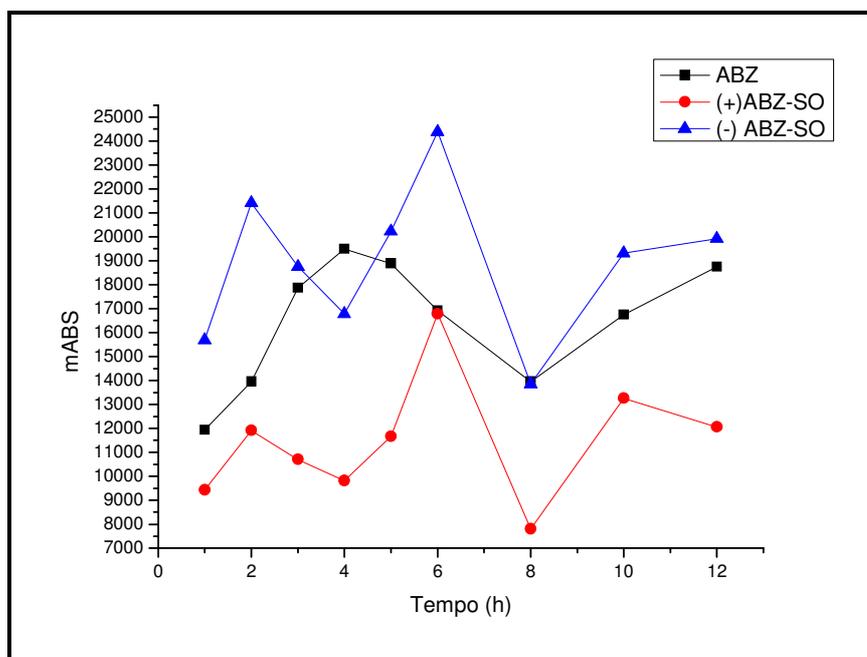


Figura 4.8 Formação de (+)- e (-)-ABZ-SO em função do tempo de incubação.

Como pode ser observado na Figura 4.8, a produção dos enantiômeros do ABZ-SO, variou consideravelmente com o tempo de incubação de 1 a 12h. Observa-se também que não houve uma resposta linear de aumento da concentração dos metabólitos com o tempo de incubação, uma vez que em certos momentos ocorreu um decaimento significativo da área referente a estes compostos. Uma justificativa para estes resultados pode ser o procedimento de interrupção da reação com precipitação através da adição de $400\ \mu\text{L}$ de ACN, o que indica que esta etapa não se mostrou reprodutiva para as diferentes extrações realizadas, nestas

condições experimentais. Isso pode ter sido ocasionado pelo volume de solvente utilizado o qual, além de interromper a reação também promove a precipitação das proteínas e conseqüentemente uma extração dos compostos no meio orgânico ou a precipitação destes juntamente com as proteínas. Ambas possibilidades podem ocorrer de forma distinta para cada analito, em função das suas solubilidades no solvente empregado. Com os resultados obtidos, optou-se por realizar o processo de metabolização *in vitro* por um período de 6 horas.

Neste estudo não foi possível observar a produção dos metabólitos ABZ-SO₂ e ABZ-SO₂-NH₂, no entanto, observou-se que a obtenção dos metabólitos quirais foi enantiosseletiva, em qualquer tempo de análise avaliado.

4.5.2 Avaliação da concentração proteica

Para a avaliação da melhor concentração proteica a ser empregada nas frações microssomais, realizou-se incubações em replicata (n=2), avaliando-se as seguintes concentrações proteicas no meio reacional: 2,50; 5,00; 10,0; 20,0 e 30,0 mg/mL. Nestes estudos utilizou-se: 820 µL de tampão Hepes (0,100 mol/L com MgCl₂ 5,00 mmol/L; pH 6,8), 100 µL de fração microssomal nas concentrações selecionadas, 10 µL de solução de ABZ (1,00 mg/mL) e 50,0 µL solução de NADPH (10,0 mg/mL), com agitação constante por 6 horas.

A Figura 4.9 mostra a relação entre as concentrações proteicas avaliadas e a produção dos metabólitos principais do ABZ.

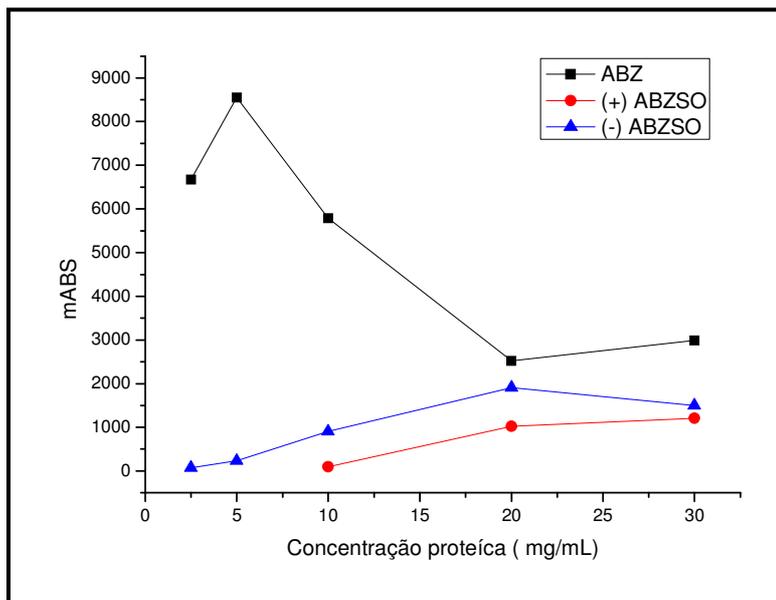


Figura 4.9 Formação do (+)- e (-)-ABZSO em função da concentração proteica da fração microssomal.

Como pode ser observado na Figura 4.9, houve um aumento na produção dos metabólitos (+)- e (-)-ABZ-SO com o aumento da concentração proteica utilizada. Com concentrações proteicas menores, de 2,5 e 5,0 mg/mL, não foi possível observar a formação de (+)-ABZ-SO. Com a concentração proteica de 20 mg/mL obteve-se uma maior produção do (-)-ABZ-SO e do (+)-ABZ-SO, quando comparado com a concentração de 10 mg/mL. Com o aumento da concentração para 25 mg/mL, a concentração do (-)-ABZ-SO diminuiu e do (+)-ABZ-SO, apresentou um leve aumento. Em determinações farmacocinéticas, estudos posteriores e uma maior amostragem tornam-se necessários para avaliar a enantiosseletividade observada na formação destes dois enantiômeros. Outro ponto que também requer análises adicionais é novamente o efeito do solvente orgânico adicionado na interrupção da metabolização. Com o objetivo de padronizar um condição experimental que permitisse a produção e isolamento dos compostos de interesse, optou-se pela concentração de 20 mg/mL. Novamente, nestas condições experimentais, o ABZ-SO₂ e ABZ-SO₂-NH₂ não foram detectados.

4.5.3 Avaliação da concentração do albendazol

Para a avaliação da melhor concentração de ABZ nos ensaios *in vitro*, realizou-se as incubações em replicata (n=2), avaliando-se as seguintes

concentrações do fármaco: 0,100; 0,200; 0,400; 0,600; 0,800; 1,00; 1,50; 2,00 e 2,50 mg/mL, as quais foram adicionadas ao meio no volume de 30,0 μ L. Nestes estudos utilizou-se: 820 μ L de tampão Hepes (0,100 mol/L com $MgCl_2$ 5,00 mmol/L; pH 6,8), 100 μ L de fração microsomal (20,0 mg/mL), 30,0 μ L de solução de ABZ nas concentrações selecionadas e 50,0 μ L solução de NADPH (10,0 mg/mL), com tempo reacional de 6 horas. A Figura 4.10 apresenta a formação dos metabólitos em função da concentração do ABZ adicionado.

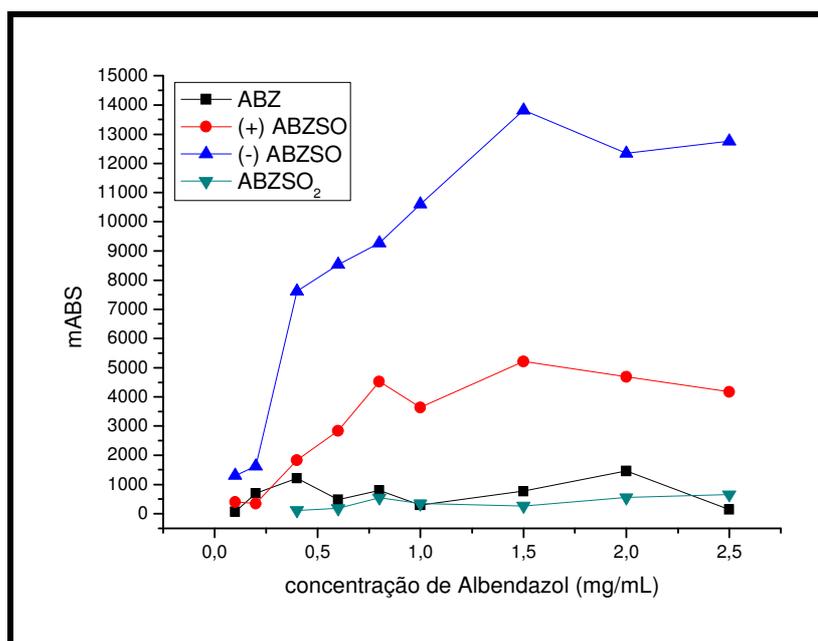


Figura 4.10 Formação do (+)- e (-)-ABZ-SO e do ABZ-SO₂ em função da concentração do ABZ.

Como pode ser observado na Figura 4.10, com o aumento da concentração do ABZ houve um aumento na produção dos metabólitos principais, o (+)- e (-)-ABZ-SO, e também houve a detecção do metabólito ABZ-SO₂. A maior produtividade foi obtida quando do emprego de 1,5 mg/mL do fármaco precursor, com o volume de 30 μ L. Sendo assim, a concentração de 1,5 mg/mL foi selecionada para os ensaios *in vitro*.

Para as diferentes concentrações de ABZ avaliadas, não se observou uma diferença significativa na produção do metabólito ABZ-SO₂, no entanto, em concentrações menores do que 0,4 mg/mL, este metabólito não foi detectado. Nestes ensaios, o metabólito ABZ-SO₂-NH₂ não foi detectado em nenhuma das condições avaliadas.

4.5.4 Avaliação da concentração de NADPH

Para avaliar qual a melhor concentração de NADPH realizou-se incubações também em replicata (n=2) com a adição de 50 μL de solução de NADPH nas concentrações de 2,50; 5,00; 10,0; 15,0; 20,0 e 30,0 mg/mL. Estes ensaios foram realizados utilizando-se 820 μL de tampão Hepes (0,100 mol/L com MgCl_2 5,00 mmol/L; pH 6.8), 100 μL de fração microsomal (20,0 mg/mL), 30,0 μL de solução de albendazol (1,50 mg/ml) e 50,0 μL da solução de NADPH nas concentrações selecionadas, com tempo de incubação de 6 horas. A Figura 4.11 mostra a formação dos metabólitos obtidos em função da concentração de NADPH adicionado.

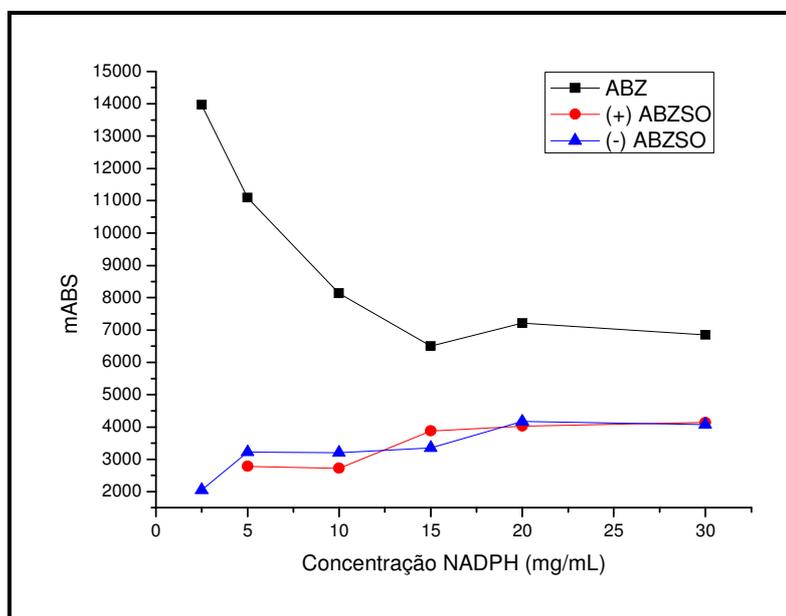


Figura 4.11 Formação do (+) e (-) ABZSO em função da concentração de NADPH.

A concentração de NADPH selecionada para o estudo da biotransformação *in vitro* do ABZ foi de 20 mg/mL pois observou-se uma maior produção do (-)-ABZ-SO nestas condições, enquanto que para o (+)-ABZ-SO a concentração de 15,0 e 20,0 mg/mL apresentou resultados similares. Apesar da concentração de ABZ ser de 1,5 mg/mL (30 μL), não foi observado a produção de ABZ-SO₂ como no ensaio anterior e também de ABZ-SO₂-NH₂.

Os parâmetros avaliados e estabelecidos estão descritos na Tabela 4.7, sendo este último utilizado para realizar as biotransformações *in vitro* do ABZ. A

Figura 4.12 ilustra uma análise cromatográfica obtida nas condições experimentais determinadas pelo método univariado.

TABELA 4.7 Parâmetros avaliados e parâmetros selecionados para a biotransformação in vitro do ABZ

Parâmetros	Avaliado	Selecionado
Tampão e solução Salina	1- Hepes (0,100 mol/L; pH 6,8) + 5,0 mmol/L MgCl ₂ ; 2- Hepes (0,100 mol/L; pH 6,8) + 5,0 mmol/L MgCl ₂ ; + EDTA 0,100 mol/L; 3- Fosfato (0,100 mol/L; pH 7,4), EDTA 0,100 mol/L, + MgCl ₂ 0,100 mol/L	Hepes (0,100 mol/L; pH 6,8) + 5,0 mmol/L MgCl ₂
Tempo de incubação	1-12 horas	6 horas
Concentração proteica	2,50 -30,0 mg/mL	20,0 mg/mL
Concentração ABZ	0,1- 2,5 mg/mL	1,50 mg/mL
Concentração NADPH	2,50 – 30,0mg/mL	20,0 mg/mL

Os parâmetros selecionados proporcionaram uma melhor biotransformação do ABZ, proporcionando a formação dos enantiômeros do ABZ-SO e ABZ-SO₂. O metabólito ABZ-NH₂-SO₂, minoritário, não foi obtido em nenhum dos ensaios avaliados.

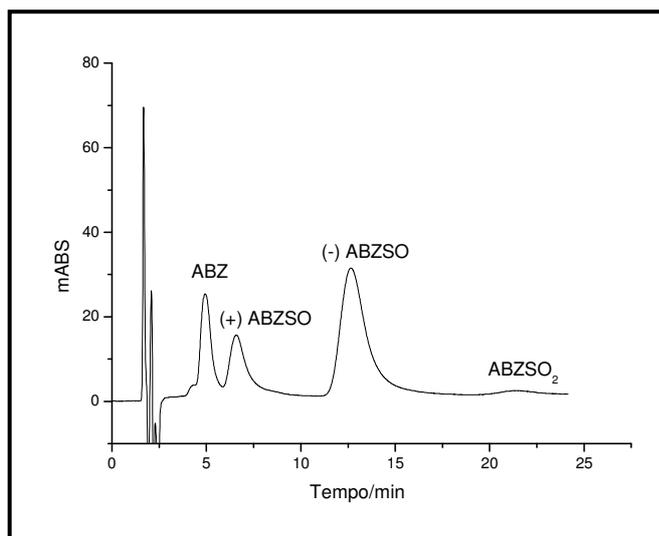
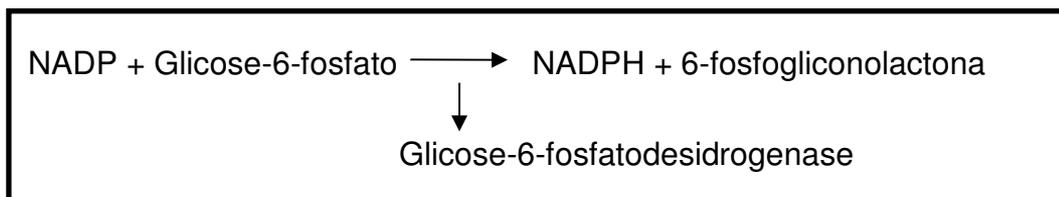


Figura 4.12 Cromatograma obtido em escala analítica para a biotransformação in vitro do ABZ.

Condições Cromatográficas: coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (150 x 4,6 mm d.i.) (20% g/g). Fase móvel: hexano:etanol (55:45 v/v), vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 100 µL e $\lambda = 290$ nm.

4.6 Sistema regenerador de NADPH (SRN)

Outro parâmetro analítico avaliado na realização deste trabalho foi a utilização de um sistema regenerador de β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzida (NADPH), o qual pode ser obtido através de uma reação enzimática entre β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADP) e glicose-6-fosfato (G6P), catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), conforme reação (1).



Reação 1: Reação Enzimática para a obtenção de NADPH

Alguns trabalhos reportam o uso de sistema regenerador de NADPH na biotransformação *in vitro* de compostos (CAI *et al* 2011; GYOUBU E MIYAZAWA 2007). A vantagem deste sistema está diretamente relacionada ao custo dos materiais envolvidos, os quais são mais acessíveis do que o NADPH sendo, portanto, uma maneira atrativa para a condução de experimentos *in vitro* para a obtenção de compostos em quantidade miligrama. No entanto, como os ensaios anteriores foram realizados com NADPH, a produção deste através do sistema regenerador, foi primeiramente investigada através de um método cromatográfico, onde se ajustou as concentrações de cada um dos reagentes, de modo a obter a mesma concentração de NADPH no meio. A produção do NADPH formado pelo sistema regenerador foi otimizado de modo univariado.

4.6.1 Método cromatográfico para a análise de NADP e NADPH

Para verificar a formação do NADPH utilizando o SRN desenvolveu-se um método cromatográfico para separação do NADP e NADPH, onde diferentes condições cromatográficas foram testadas visando a separação dos dois compostos de interesse. A primeira coluna testada foi uma coluna cromatográfica com sílica diol (10 x 0,46cm d.i.), com fase móvel tampão fosfato (0,100 mol/L; pH 6,0):MeOH, nas proporções: 80:20; 90:10; 95:5 e vazão da fase móvel de 0,2 e 0,5 mL/min. No

entanto, estas condições cromatográficas não apresentaram boa resolução cromatográfica e, na sequência, avaliou-se uma coluna C18 Nucleosil (10 x 0,21 cm d.i.), com diferentes fases móveis: 1- tampão fosfato (0,100 mol/L; pH 6,0):MeOH nas proporções 80:20 e 95:5 e 2- trietilamina (1%; pH 6,0):ACN nas proporções 98:2 e 97:3, com vazão de fase móvel de 0,10; 0,20 e 0,50 mL/min. O comprimento de onda foi mantido em 260 nm para todas as análises.

Dentre as condições avaliadas, a condição cromatográfica que apresentou a melhor separação para os analitos de interesse foi utilizando-se uma coluna C18 Nucleosil (10 x 0,21 cm d.i.) e fase móvel composta por trietilamina (1%; pH 6,0):ACN (97:3 v/v); com vazão de 0,2 mL/min e comprimento de onda de 260 nm.

A Figura 4.13 apresenta a separação cromatográfica do NADP e NADPH, utilizando as condições cromatográficas descritas.

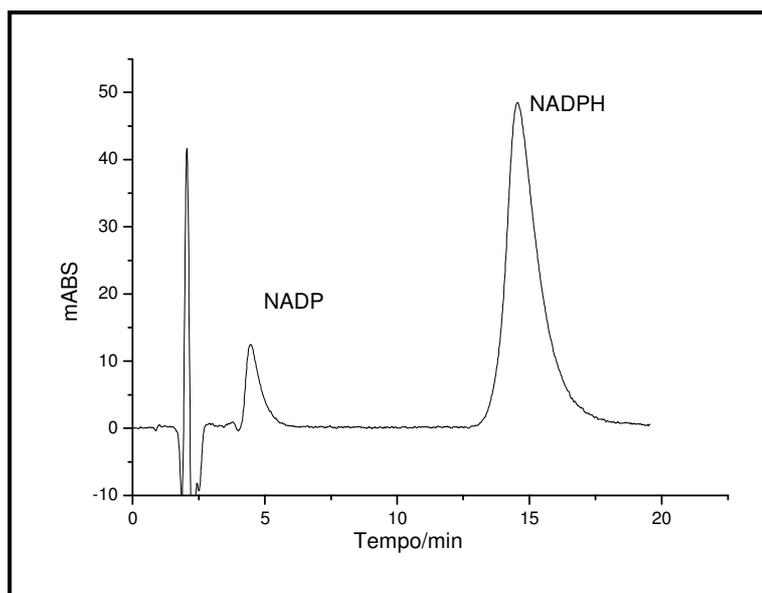


Figura 4.13 Cromatograma da separação de NADP e NADPH. Condições Cromatográficas: Coluna C18 Nucleosil (10 x 0,21 cm d.i.). Fase móvel: trietilamina (1%; pH 6,0):ACN (97:3 v/v), vazão de 0,2 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e $\lambda = 260$ nm.

4.6.2 Otimização das condições para a obtenção do sistema regenerador de NADPH (SRN)

Para a obtenção de uma maior produção de NADPH e um melhor aproveitamento do SRN os parâmetros concentração de G6P, concentração de NADP e concentração de G6PD, foram analisados de forma univariada.

O primeiro parâmetro avaliado foi a concentração de G6P, a qual foi avaliada nos valores de 10,0; 100, 250 e 500 mmol/L e as concentrações de G6PD e NADP foram mantidas a 100 mmol/L. O volume adicionado na mistura dos três componentes foi 500 μ L para cada um.

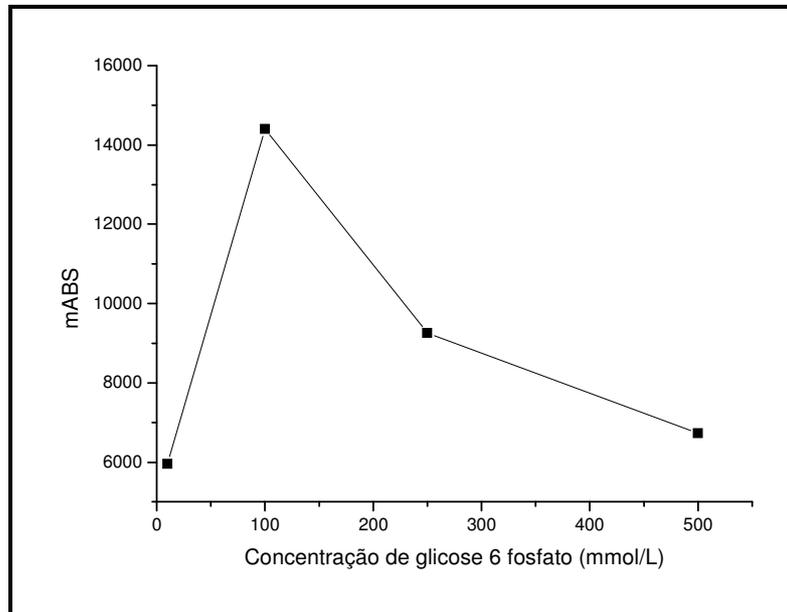


Figura 4.14 Formação de NADPH em função da concentração de G6P.

Como pode ser observado na Figura 4.14, com a adição de G6P na concentração de 10,0 mmol/L, a produção de NADPH é muito pequena e nas concentrações de 250 e 500 mmol/L, a produção de NADPH sofreu um decréscimo significativo, quando comparado com a produção obtida de NADPH com a concentração de 100 mmol/L de G6P. Assim, selecionou-se a concentração de 100 mmol/L para a produção de NADPH, com emprego do SRN.

O segundo parâmetro avaliado foi a concentração de NADP, onde esta foi investigada nas concentrações de 10,0; 15,0; 20,0; 50,0; 100 e 500 mmol/L. A concentração de G6P e a concentração da enzima G6PD foram mantidas constante em 100 mmol/L e o volume de cada componente foi de 500 μ L.

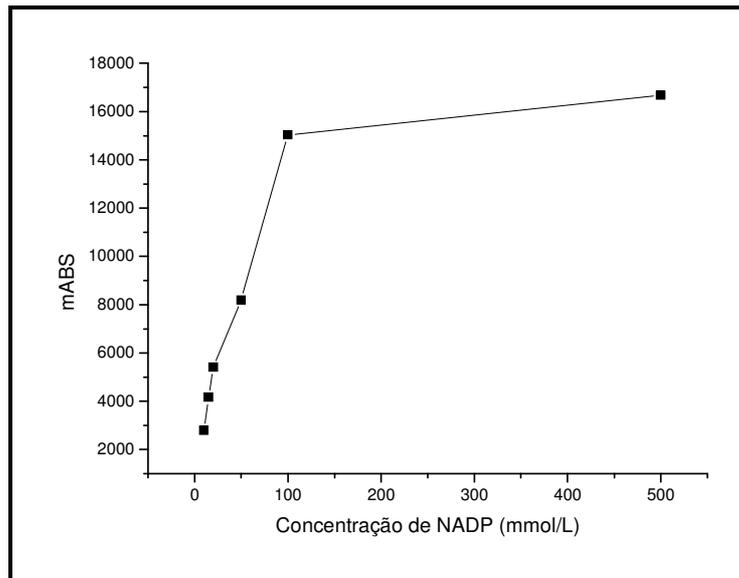


Figura 4.15 Formação de NADPH em função da concentração de NADP.

Com o aumento da concentração de NADP, houve um aumento na produção de NADPH até a concentração de 100 mmol/L, acima deste valor, a produção de NADPH foi praticamente igual, sem aumento significativo que justificasse o seu uso. Assim, a concentração selecionada para o NADP foi de 100 mmol/L.

O último parâmetro avaliado foi a concentração da G6PD, que foi avaliada de 10,0; 50,0; 100 e 500 mmol/L. A concentração de NADP e de G6P foram mantidas em 100 mmol/L. O volume adicionado de cada reagente foi de 500 μ L.

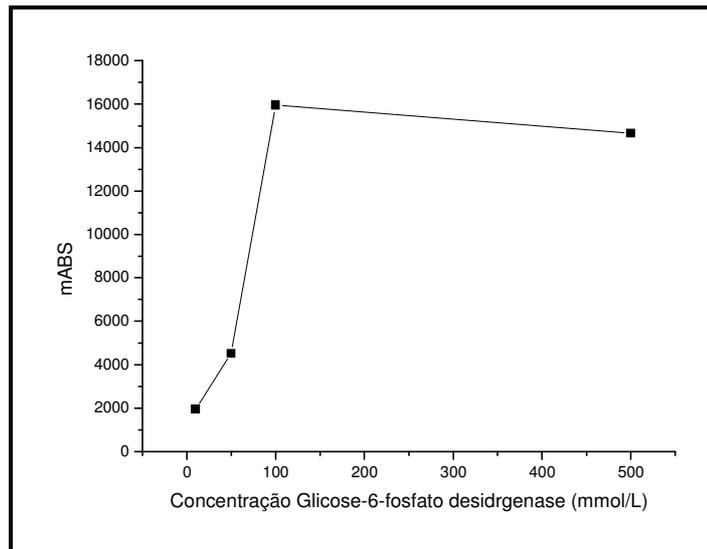


Figura 4.16 Formação de NADPH em função da concentração da enzima G6PD.

Dentre as diferentes concentrações avaliadas, a concentração de 100 mmol/L foi selecionada para ser a concentração da enzima G6PD no SRN, pois nesta concentração houve a maior produção de NADPH. Na concentração de 500 mmol/L houve uma pequena queda na produção e, em concentrações menores que 100 mmol/L, a produção de NADPH foi bastante baixa.

Com as concentrações ótimas de NADP, G6P e G6PD determinadas obteve-se o cromatograma da Figura 4.17, o qual ilustra a produção de NADPH. A concentração de NADP, G6P e G6PD foi de 100 mmol/L para cada reagente. Vale destacar que a quantidade produzida de NADPH foi comparada com a concentração da solução estoque de NADPH (20 mg/mL) e otimizada para os ensaios *in vitro* em escala analítica e as absortividades molares obtidas foram similares, o que indica que qualitativamente a mesma quantidade de NADPH está sendo introduzida no processo de biotransformação, através do SRN.

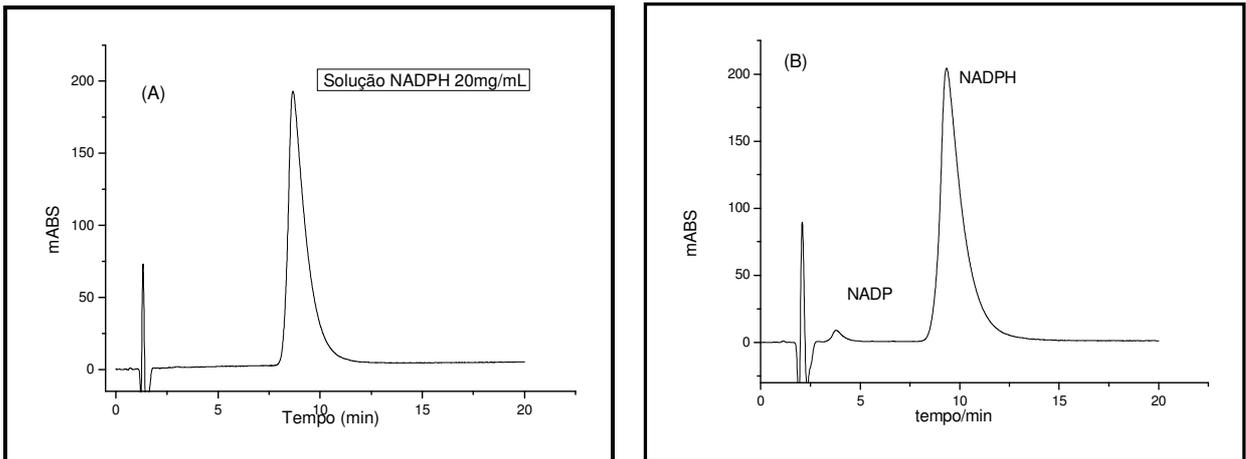


Figura 4.17 (A) Cromatograma da solução de NADPH 20mg/mL. (B) Cromatograma das melhores condições para obtenção do NADPH pelo SRN. Condições Cromatográficas: Coluna C18 Nucleosil (10 x 0,21 cm d.i.). Fase móvel: trietilamina (1%; pH 6,0):ACN (97:3 v/v), vazão de 0,2 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e $\lambda = 260$ nm..

4.7 Processo de metabolização *in vitro* em escala miligrama

Visando futuras investigações sobre o metabolismo do ABZ e sobre os possíveis efeitos de seus metabólitos em estudos farmacocinéticos realizou-se o escalonamento da biotransformação *in vitro* para a sua realização em escala miligrama e posterior separação dos metabólitos em cromatografia líquida quiral semipreparativa.

A separação semipreparativa dos metabólitos do ABZ foi realizada utilizando a mesma condição cromatográfica otimizada para a separação em escala analítica com emprego de uma coluna *tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 x 0,70 cm d.i.) (20% g/g), com a mesma fase estacionária quiral da coluna analítica e com maiores dimensões (Belaz, 2011). A nova vazão da fase móvel foi determinada utilizando a Equação 1 (CASS e DEGANI, 2001).

$$S = \frac{R_p^2 L_p}{R_A^2 L_A} \quad \text{Equação 1}$$

Onde, R_p e R_A são os diâmetros e L_p e L_A , o comprimento das colunas preparativa e analítica, respectivamente.

Inicialmente, uma solução padrão contendo a mistura de ABZ, (\pm)-ABZ-SO e ABZ-SO₂ de concentração de 50 mg/mL foi injetada (500 μ L) na coluna

tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e, através do emprego da Equação 1, a separação foi realizada a uma vazão de 3,0 mL/min, utilizando hexano:etanol (55:45) como fase móvel. A separação foi monitorada em $\lambda=290\text{nm}$. O cromatograma da separação semipreparativa obtida para a solução padrão dos analitos está apresentado na Figura 4.18.

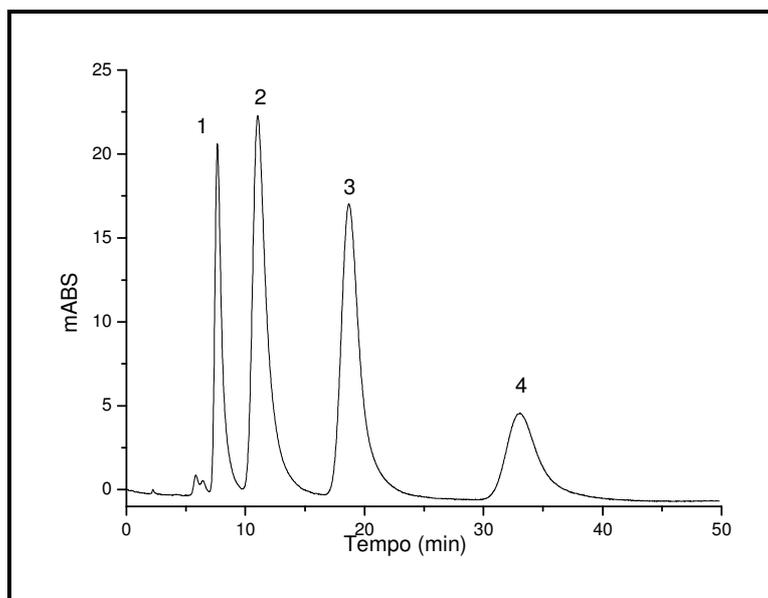


Figura 4.18 Cromatograma das amostras padrão de ABZ (1), (+)-ABZ-SO (2), (-)-ABZ-SO (3) e ABZ-SO₂ (4).

Condições cromatográficas: Coluna *tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 x 0,70 cm d.i.) (20% g/g). Fase móvel: hexano:etanol (55:45 v/v), vazão de 3,0 mL/min e $\lambda = 290 \text{ nm}$.

A biotransformação *in vitro* também foi realizada em maiores escalas, onde os volumes e concentrações pré-definidos foram aumentados em um fator de 20 vezes. A condição final empregada na biotransformação *in vitro* em escala miligramas esta descrita na Tabela 4.8.

TABELA 4.8 Parâmetros utilizados para a biotransformação in vitro em escala miligramas.

Parâmetros	Volume / Concentração
Tampão	16,2 mL de tampão Hepes (0,100 mol/L; pH 6,8) + 5 mmol/L MgCl ₂ ;
Microssoma	2,0 mL microssoma (20 mg/mL);
Albendazol	600 mL albendazol (1,5 mg/mL);
NADPH	1,0 mL NADPH (20 mg/mL).
SRN	1,0 mL de NADP (100 mmol/L), glicose-6-fosfato (100 mmol/L) e glicose-6-fosfato desidrogenase (100 mmol/L), sendo 350 µL de cada composto, preparados previamente à incubação

Para o tratamento das amostras por SPE utilizou-se cartuchos Oasis 12cc com capacidade para 500 mg. As etapas da SPE também foram adaptadas para a biotransformação em escala miligramas, onde as condições previamente estabelecidas foram escalonadas, sendo estas:

Condicionamento do cartucho: 20 mL MeOH e 10 mL H₂O

Aplicação da amostra: 20 mL da mistura

Lavagem: 10 mL H₂O e 5 mL H₂O/MeOH (95:5 v/v)

Eluição: 10 mL MeOH

Utilizando-se as condições da Tabela 4.8, duas incubações foram realizadas, utilizando NADPH comercial e o SRN. Os resultados demonstraram que ambos os sistemas permitem a formação dos metabólitos principais do ABZ, no entanto, o SRN possibilitou uma maior produção de (+)- e (-)-ABZ-SO, sendo este selecionado para os estudos posteriores (Figura 4.19).

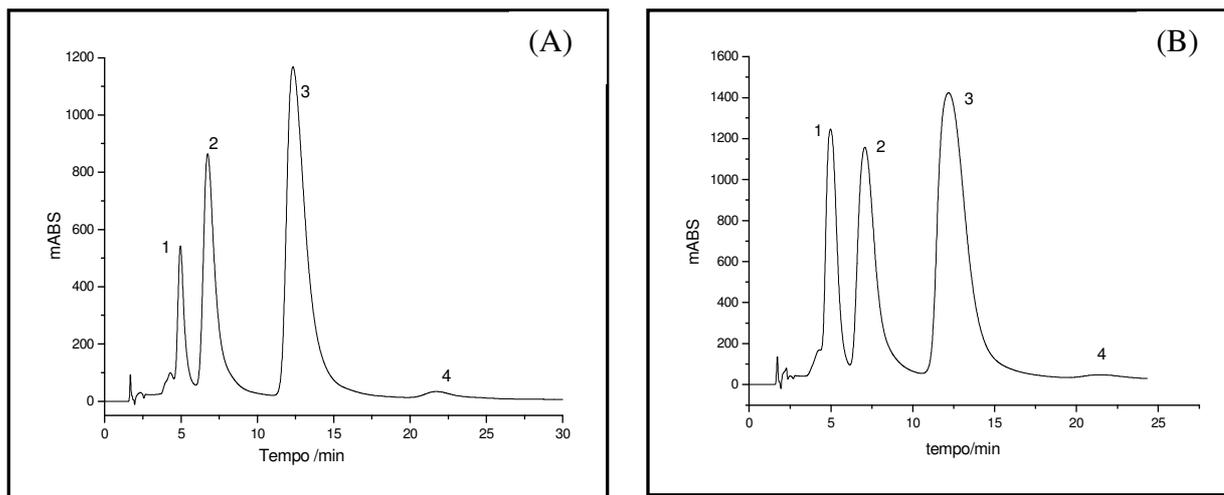


Figura 4.19 Cromatogramas da biotransformação *in vitro* em escala miligrama utilizando NADPH comercial (A) e o SRN (B). (1) ABZ; (2) (+)-ABZ-SO; (3) (-)-ABZ-SO e (4) ABZ-SO₂. Condições cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS Nucleosil (20 x 0,70 cm d.i.) (20% g/g). Fase móvel: hexano:etanol (55:45 v/v), vazão de 3,0mL/min, e $\lambda = 290$ nm.

4.7.1 Isolamento dos produtos de biotransformação

De acordo com DAYAN 2003, a biotransformação do ABZ nos seus metabólitos majoritários, o (+)-ABZ-SO e (-)-ABZ-SO, é enantiosseletiva, onde citocromos P450 são os responsáveis pela formação do (-)-ABZ-SO, enquanto que a formação do (+)-ABZ-SO é proveniente da metabolização via enzimas flavinas monooxigenases. A oxidação subsequente para formação de ABZ-SO₂ é dependente de isoenzimas da CYP450. No presente trabalho, pode-se observar que a biotransformação do ABZ em (\pm)-ABZ-SO foi enantiosseletiva, pois os metabólitos (+)- e (-)-ABZ-SO foram produzidos em quantidade diferentes, onde o (-)-ABZ-SO enantiômero foi produzido em 8,0 mg e o (+)-ABZ-SO foi produzido em apenas 1,0 mg. Estas massas foram isoladas após a separação em escala semipreparativa, provenientes de 16 incubações *in vitro*, cada uma com volume final de 20 mL. A Figura 4.20 ilustra a separação em escala semipreparativa obtida após a biotransformação *in vitro* do ABZ.

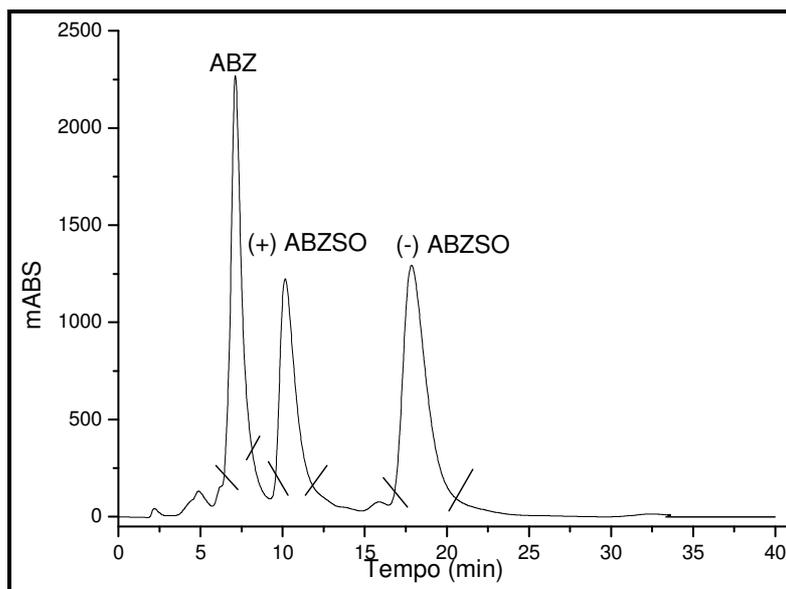


Figura 4.20 Cromatograma da separação semipreparativa após a biotransformação do ABZ com frações microsossomais. Condições cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 x 0,70 cm d.i.) (20% g/g). Fase móvel: hexano:etanol (55:45 v/v), vazão da fase móvel de 3,0 mL/min e $\lambda = 290$ nm.

As frações de cada um dos enantiômeros do ABZ-SO foram coletadas nas áreas demarcadas (Figura 4.20) e a fase móvel foi removida por evaporação a vácuo e os metabólitos armazenados em freezer a -20°C . A ordem de eluição de cada enantiômero foi confirmada através da injeção dos enantiômeros puros, previamente separados por cromatografia semipreparativa quiral no modo polar orgânico. (BELAZ, 2011).

A pureza enantiomérica de cada um dos enantiômeros foi determinada utilizando a coluna analítica *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15 x 0,46 cm d.i.). A Figura 4.21 ilustra os cromatogramas da determinação enantiomérica do (+) ABZ-SO e (-) ABZ-SO. A Tabela 4.9 apresenta os dados obtidos na separação em escala semipreparativa do (+)- e (-)-ABZ-SO.

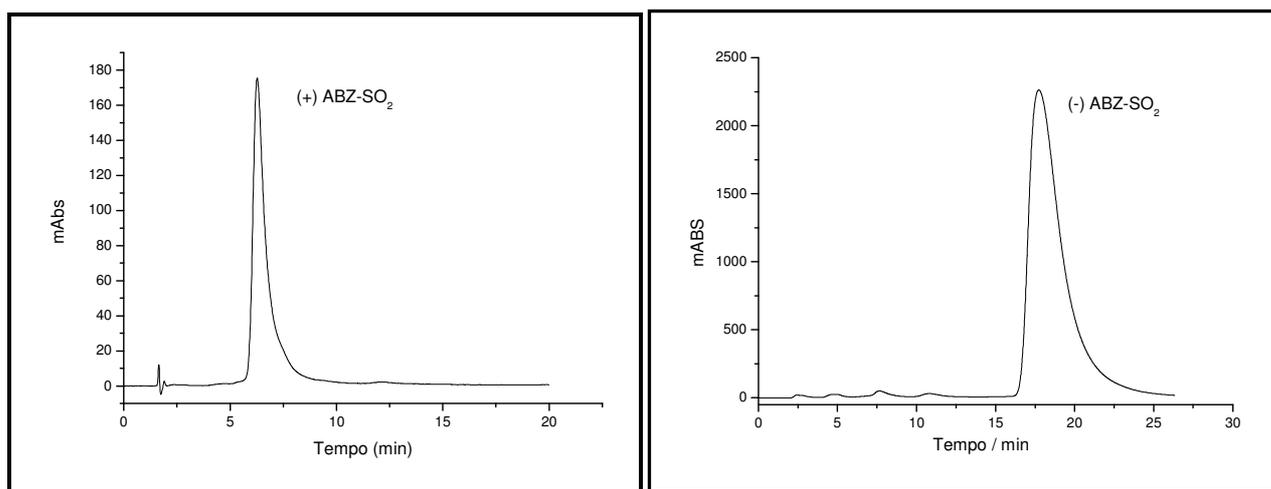


Figura 4.21 Cromatograma obtido para a determinação da pureza enantiomérica do (+)- e (-)-ABZ-SO.

Condições cromatográficas: Coluna tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20 x 0,70 cm) (20% g/g). Fase móvel: hexano:etanol (55:45 v/v), vazão da fase móvel de 3,0 mL/min e $\lambda = 290$ nm.

TABELA 4.9 Dados obtidos da separação semipreparativa dos enantiômeros do ABZ-SO.

	(+)-ABZ-SO	(-)-ABZ-SO
Massa Obtida	8,0 mg	1,0 mg
Pureza enantiomerica %	98,0	97,5

Mesmo após varias incubações (n=16) não foi possível o isolamento dos demais metabólitos: ABZ-SO₂ e ABZ-SO₂-NH₂. Com o objetivo de comprovar a não formação dos compostos ou a baixa concentração dos mesmo no meio reacional e consequente baixa sensibilidade para estes analitos pelo detector de UV-VIS empregado, amostras da biotransformação do ABZ foram também analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), onde não se constatou a presença de ABZ-SO₂-NH₂ ou do ABZ-SO₂. Desta forma, para a obtenção e isolamento destes dois compostos, novas condições de incubação *in vitro*, assim como de extração das amostras, devem ser investigadas.

Os resultados para estes ensaios estão ilustrados nas Figuras 4.22 a 4.26, através de cromatogramas e respectivos espectros de *full scan*, das amostras padrão, amostra branco da biotransformação e da amostra de ABZ metabolizada *in vitro*. Nos espectros de *full scan* obtidos da amostra de ABZ após biotransformação *in vitro* (Figura 4.25-4.26) foi possível detectar a presença de *m/z* 282 e

posteriormente da transição m/z 282 \rightarrow 240, quando do uso de experimentos MS/MS, o que confirma a presença dos enantiômeros do ABZ-SO.

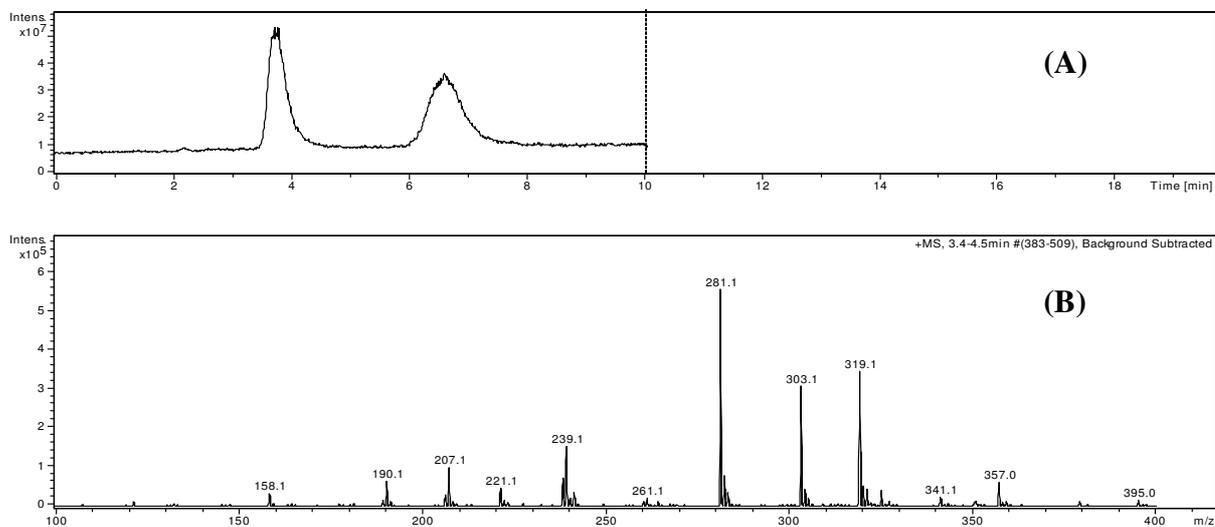


Figura 4.22 Cromatograma (A) e espectro (B) de full scan para a amostra padrão de ABZ-SO. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 μ L vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); ionização por ESI (+). (M + H) = 282.

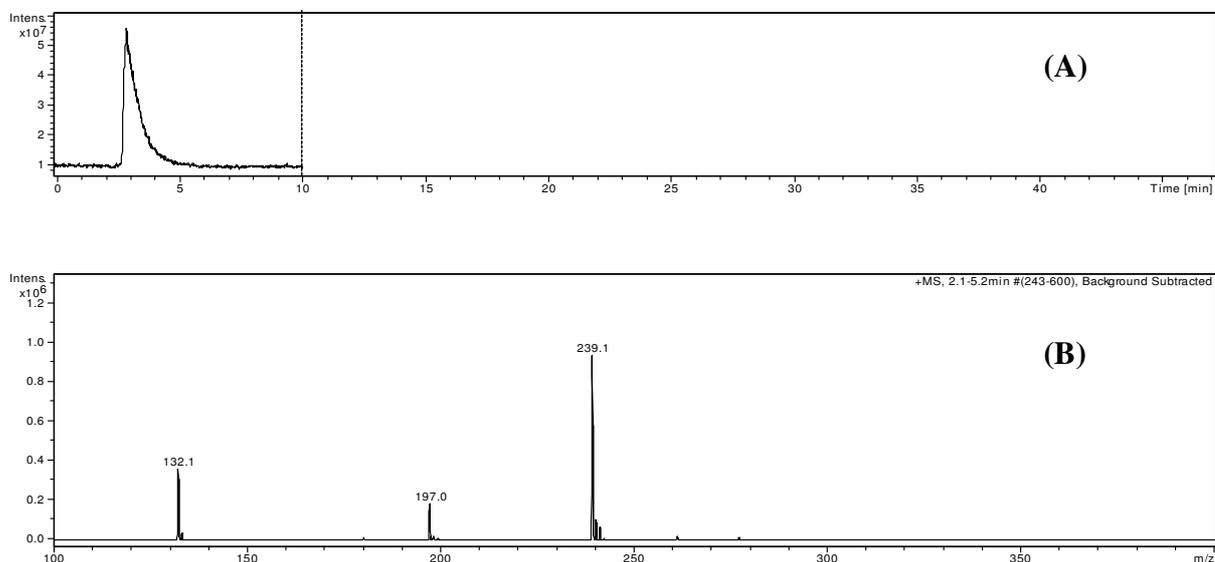


Figura 4.23 – Cromatograma (A) e espectro (B) de full scan para a amostra padrão de ABZ-NH₂-SO₂. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 μ L; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); ionização por ESI (+). (M + H) = 240.

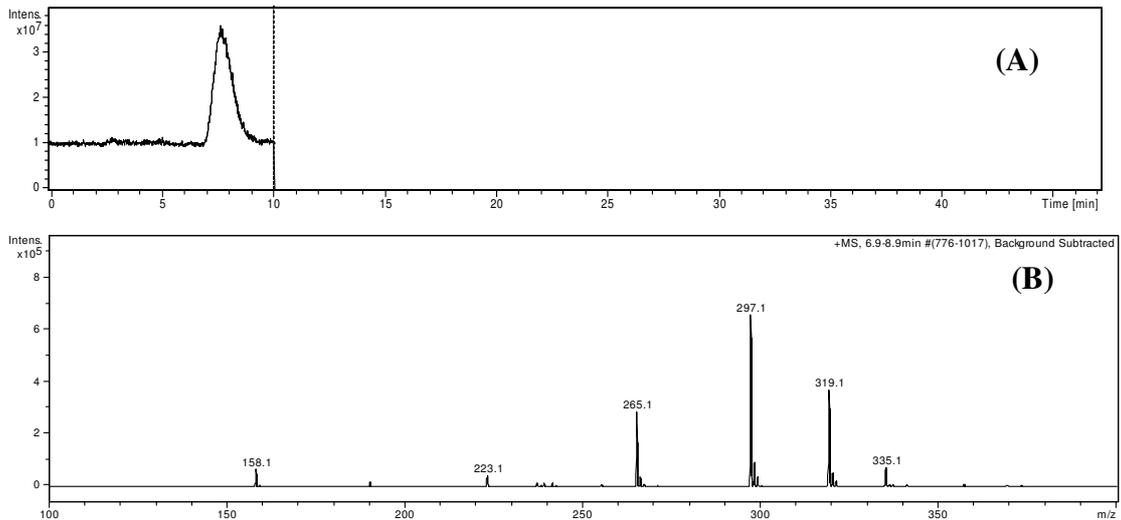


Figura 4.24 – Cromatograma (A) e espectro (B) de full scan para a amostra padrão de ABZ-SO₂. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 µL; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); ionização por ESI (+). (M + H) = 298.

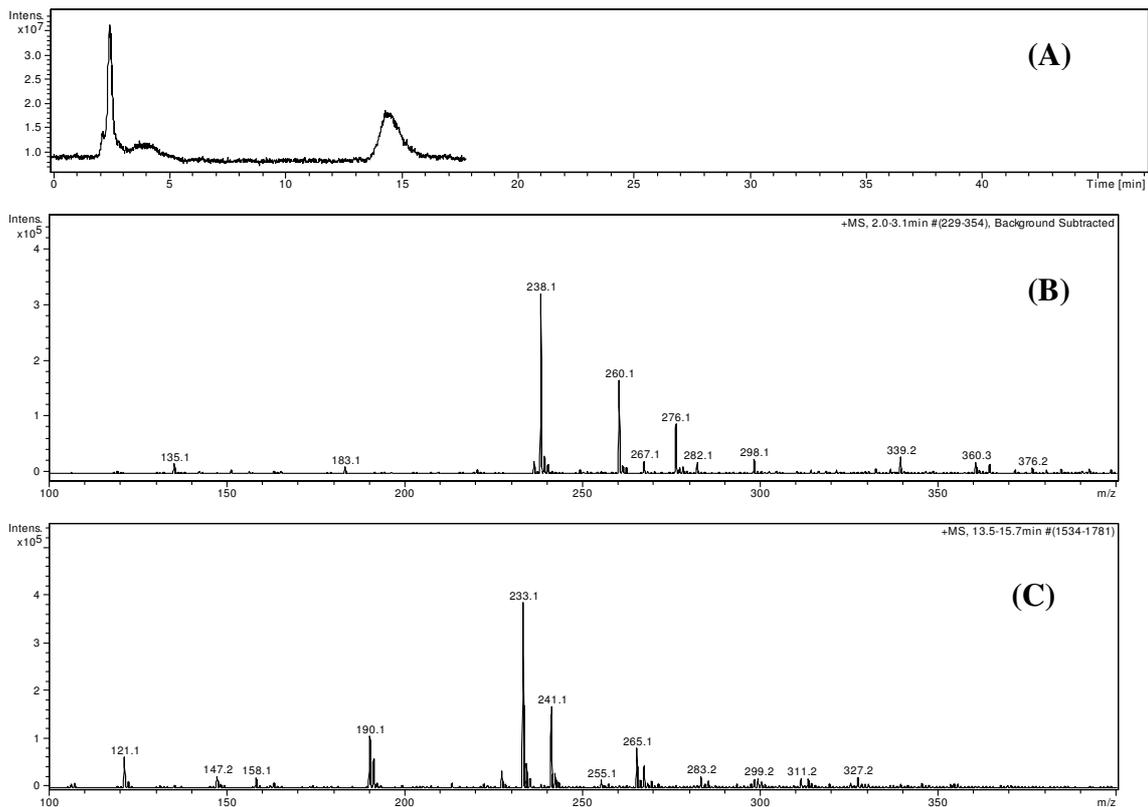


Figura 4.25 Cromatograma (A) e espectros de full scan (B, C) para a amostra branco da incubação microsomal. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 µL; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); ionização por ESI (+). B – espectro de 2,0 a 5,2 min e C – espectro de 13,0 a 16,0 min.

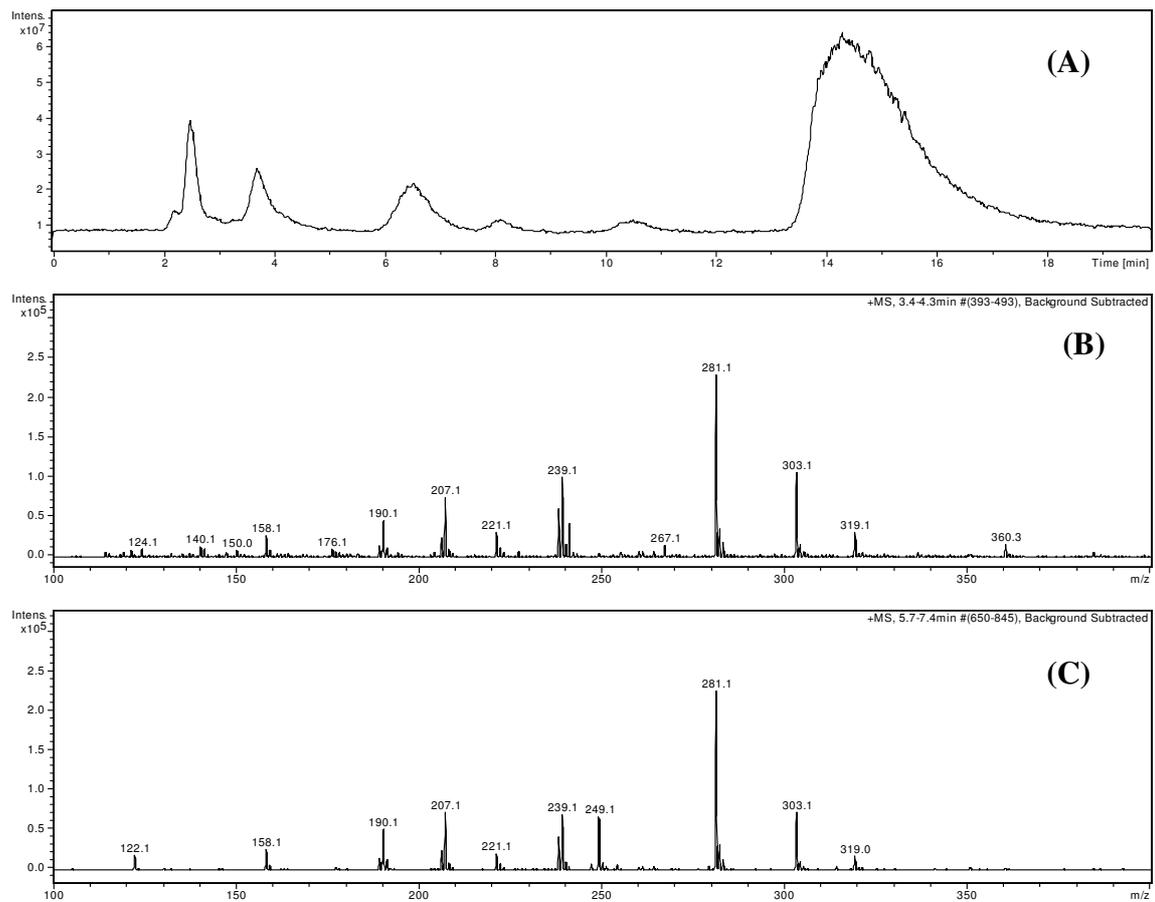


Figura 4.26 Cromatograma (A) e espectros (B - F) de full scan para a amostra de ABZ após incubação microsomal. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 μ L; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); Ionização por ESI (+). A – espectro de 3.3 a 4.3 min; B – espectro de 5.9 a 7.4 min; C – espectro de 7.7 a 9.1 min; D – espectro de 9.7 a 11.3 min e E – espectro de 13.1 a 17.7 min.

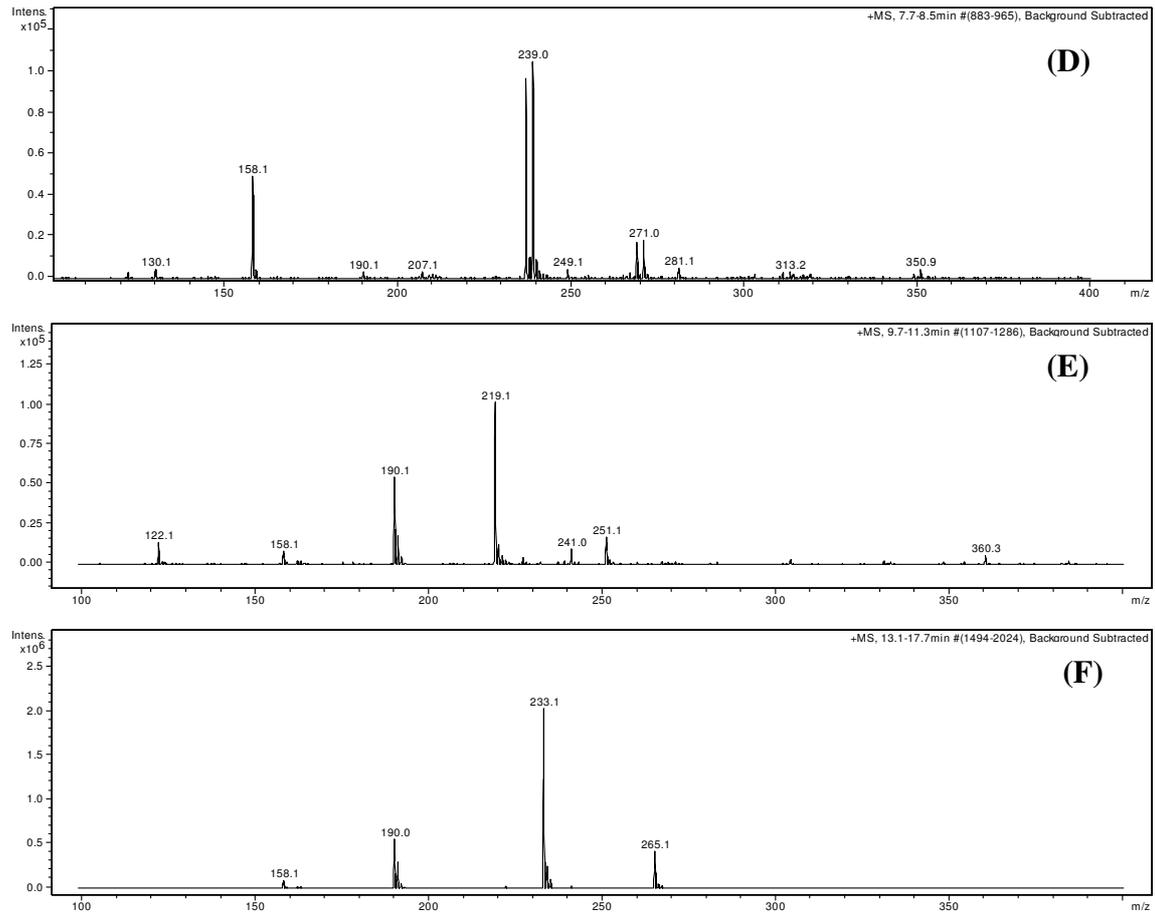


Figura 4.27 (continuação) Cromatograma (A) e espectros (B - F) de full scan para a amostra de ABZ após incubação microsomal. Coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (20% g/g) (150 x 4,6 mm); fase móvel composta por H₂O:ACN (50:50 v/v); volume de injeção: 10 µL; vazão da fase móvel: 0,80 mL/min (com divisão de fluxo para 0,07 mL/min de entrada no MS); ionização por ESI (+).

A – espectro de 3.3 a 4.3 min; B – espectro de 5.9 a 7.4 min; C – espectro de 7.7 a 9.1 min; D – espectro de 9.7 a 11.3 min e E – espectro de 13.1 a 17.7 min.

CONCLUSÕES

5 Conclusões

Este trabalho reportou o metabolismo *in vitro* do ABZ, realizado em frações microssomais de fígados de ratos Wistar, em escala analítica e em escala semipreparativa. Adicionalmente, o metabolismo *in vitro* se mostrou enantiosseletivo, onde as concentrações do (+) e (-)-ABZ-SO apresentaram diferenças significativas, as quais foram comprovadas pelo isolamento e pesagem dos produtos de biotransformação.

Na obtenção das frações microssomais, tanto o método de precipitação com cloreto de cálcio quanto o de ultracentrifugação, se mostraram eficientes para o isolamento dos microssomas dos fígados de ratos Wistar, sendo o método de ultracentrifugação mais fácil de ser realizado do que o de agregação com cloreto de cálcio, uma vez que este não requer determinar o volume de sobrenadante para a centrifugação final, enquanto que o segundo pode ser realizado em qualquer laboratório de pesquisa, pois dispensa o uso de ultracentrífugas, de alto custo. Adicionalmente, a técnica de ultracentrifugação propicia uma maior concentração proteica das amostras e, conseqüentemente, maior rendimento das amostras isoladas.

O método de Bradford foi eficientemente aplicado para a determinação quantitativa da concentração proteica das frações microssomais obtidas, sendo este um método rápido, de baixo custo e seletivo.

O preparo das amostras biológicas foi eficientemente conduzido por extração de amostras em fase sólida, o qual promoveu elevados valores de recuperação para os analitos de interesse, na ordem de 89 a 109%.

O escalonamento da biotransformação *in vitro* do ABZ da escala analítica para a semipreparativa foi possível e resultou no isolamento dos metabólitos (+)- e (-)-ABZ-SO em quantidades de 1,0 mg e de 8,0 mg, respectivamente. Os metabólitos amino-sulfona e 2-aminosulfona não foram detectados nas biotransformações realizadas, o que requer estudos posteriores com novas condições de biotransformação e de isolamento das amostras.

O sistema regenerador de NADPH foi tão eficiente quanto o NADPH comercial, o que possibilitou o emprego de um sistema de coenzimas de menor custo.

A Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência permitiu o desenvolvimento de um método enantioselectivo de análise simultânea dos enantiômeros do albendazol em frações microssomais, juntamente com sulfeto de albendazol e albendazol sulfona, em um tempo total de análise de 20 min para a determinação dos quatro compostos de interesse, no modo normal de eluição.

Este trabalho também mostrou a aplicabilidade das fases quirais de polissacarídeos no modo normal de eluição para separação dos enantiômeros do albendazol-sulfóxido, sulfeto de albendazol e albendazol sulfona, onde a fase *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose permitiu a separação dos enantiômeros do albendazol com elevado grau de pureza enantiomérica, através da cromatografia quiral semipreparativa.

O método de biotransformação *in vitro* em escala miligrama pode ser utilizado para a produção e isolamento de produtos de metabolização para posteriores estudos farmacocinéticos onde, muitas vezes, os metabólitos de interesse não estão disponíveis comercialmente. Parâmetros como tempo de incubação, concentração do substrato, concentração da coenzima e tampão devem ser criteriosamente otimizados.

REFERÊNCIAS

6 Referências

- ABASS, K.; REPONEN, P.; MATTILA, S.; PELKONEN, O. "Metabolism of carbosulfan. I. Species differences in the vitro biotransformation by mammalian hepatic microsomes including human." *Chemico-Biological Interactions*, 181 (2) : 210-219, 2009.
- AHN, S.; KEARBNEY, J.D.; LI, C.M.; DUKE, C.B.; MILLER, D.D.; DALTON, J.T. "Biotransformation of a Novel Antimitotic Agent, I-387, by Mouse, Rat, Dog, Monkey, and Human Liver Microsomes and in Vivo Pharmacokinetics in Mice." *Drug Metabolism and Disposition* 39 (4) : 636-643, 2011.
- ALBERTI, J.J.; SENTELLAS, S.; SALVA, M. "In vitro liver metabolism of acridinium bromide in preclinical animal species and humans: Identification of the human enzymes involved in its oxidative metabolism." *Biochemical Pharmacology*, 81 (6) : 761-776, 2011.
- amylose tris(3,5-dimethoxyphenyl carbamate): Application to commercial pharmaceutical chiral drugs" *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 22: 3091-3099, 1999
- APRILE, S.; DEL GROSSO, E.; TRON, G.C.; GROSA, G. "In Vitro Metabolism Study of Combretastatin A-4 in Rat and Human Liver Microsomes." *Drug Metabolism and Disposition*, 35 (12) : 2252-2261, 2007.
- AUDI, E.A.; PUSSI, F.D. " Isoenzimas do CYP 450 e biotransformação de drogas" *Acta Scientiarum*, 22 (2) : 599-604, 2000.
- BARALLA, E.; NIEDDU, M.; BOATTO, G.; VANORI, M. V.; PALOMBA, D.; DEMONTIS, M. P.; PASCIU, V. & ANANIA, V. "Quantitative assay for bradykinin in rat plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54: 557, 2011.
- BARREIRO, E.J.; FERREIRA, V.F.; COSTA, P. R .R.; "Substâncias enantiomericamente puras (SEP): A questão dos fármacos quirais" *Química Nova*, 20 (6) : 647- 656, 1997.
- BARREIRO, E.J.; SILVA, J. F. M.; FRAGA, C.A.M. "Noções básicas do metabolismo de fármacos, *Química Nova*, 19 (6): 1996.
- BARTH, T.; SIMOES, R.A.; PUPO, M.T.; OKANO, L.T.; BONATO, P.S. "Stereoselective liquid chromatographic determination of 1'-oxobufuralol and 1'-hydroxybufuralol in rat liver microsomal fraction using hollow-fiber liquid-phase microextraction for sample preparation" *Journal of Separation Science*, 34 (24) : 3578-3586, 2011
- 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*, 30, 76 (1): 146-53, 2008.
- BELAZ, K. R. A. Quantificação dos metabolitos do albendazol em plasma bovino por cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência, com injeção direta de amostras. Dissertação de Mestrado: Programa de Pós Graduação em Química-UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, 2007.
- BELAZ, K. R. A. Investigação in vitro do Efeito da Restrição Protéica no Metabolismo do Albendazol em Ratos e Estudos de Inibição do Crescimento de Células Tumoriais Humanas

pelos Enantiômeros do Albendazol Sulfóxido. Tese de Doutorado: Programa de Pós Graduação em Química-UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, 2011.

BELAZ, K.R.A.; DENADAI, M.; ALMEIDA, A.P.; LIMA, R.T.; VASCONCELOS, M.H.; PINTO, M.; CASS, Q.B.; OLIVEIRA, R.V. "Enantiomeric resolution of albendazole sulfoxide by semipreparative HPLC and *in vitro* study of growth inhibitory effects on human cancer cell lines *in press*.

BISTOLETTI, M.; MORENO, L.; ALVAREZ, L.; LANUSSE, C. "Multiresidue HPLC method to measure benzimidazole anthelmintics in plasma and egg from laying hens. Evaluation of albendazole metabolites residue profiles" *Food Chemistry*, 126 : 793–800, 2011.

BLASCHKE, G.; KNOCH, B. Investigation on the *in vitro* racemization of Thalidomide by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal chromatography A*, 666: 235-240, 1994.

BONATO, P.S.; DE OLIVEIRA, A.R.M.; DE SANTANA, F.J.M.; FERNANDES, B.J.D.; 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) : 558-563, 2007.

BONATO, P.S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C.M.; "Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar" *Química Nova*, 28 (4): 683-691, 2005.

BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical. Biochemistry.*, 72: 248-254, 1976.

BROOKS, C.; CRAMER, S.M.; ROSANO, T. "Preparative Chromatographic Purification of Cyclosporine Metabolites" *Clinical Chemistry* 39 (3) : 457-466, 1993.

BUENO, F.; BERGOLD, A. M. "Otimização de metodologia qualitativa" *Caderno de Farmácia*, 13 (2) : 153-155, 1997.

CACHO, C.; TURIEL, E.; PEREZ-CONDE, C. "Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples" *Talanta*, 78 : 1029–1035 2009.

CAI, H.; SALE, S.; BRITTON, R. G.; BROWN, K.; STEWARD, W.P.; GESCHER, A. J. "Pharmacokinetics in mice and metabolism in murine and human liver fractions of the putative cancer chemopreventive agents 3',4',5',5',7-pentamethoxyflavone and tricetin (4',5',7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone)" *Cancer Chemother Pharmacol*, 67 : 255–263, 2011.

CALDWELL, J.; "Importance of stereospecific bionalytical monitoring in drug development" *Journal Chromatography A*, 719 : 3-13, 1996.

CAO, Y.F.; ZHANG, Y.Y.; LI, J.; GE, G.B.; HU, D.; LIU, H.X.; HUANG, T.; WANG, Y.C.; FANG, Z.Z.; SUN, D.X.; HUO, H.; YIN, J.; YANG, L. "CYP3A catalyses schizandrin biotransformation in human, minipig and rat liver microsomes." *Xenobiotica*, 40 (1) : 38-47, 2010.

CARDOSO, C. D.; BONATO, P.S. " Enantioselective analysis of the metabolites of hydroxychloroquine and application to an *in vitro* metabolic study" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37 : 703–708, 2005.

- CARLSSONA, G.; PATRINGB, J.; ULLERASA, E.; OSKARSSONA, A. "Developmental toxicity of albendazole and its three main metabolites in zebrafish embryos" *Reproductive Toxicology* 32 (1) : 129 – 137, 2011.
- CASLAVSKA, J.; THORMANN, W. "Stereoselective determination of drugs and metabolites in body fluids, tissues and microsomal preparations by capillary electrophoresis (2000–2010), Review" *Journal of Chromatography A*, 1218 : 588–601, 2011.
- CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. "Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos, EdUFSCar, 70p., 2001.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. & CASSIANO, N. M. "The Use of a Polysaccharide Based Column on Multimodal Elution." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23 (13) : 1029-1038, 2000.
- CASS, Q.B.; TIRITAN, E.M.; BASSI, A.L.; CALAFATTI, S.A.; DEGAN, A.L.G. "Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas." *Química Nova*, 20 (1) : 49-57, 1997.
- CASS, Q.B.; TIRITAN, M.E.; CALAFATTI, S.A.; MATLIN, S.A. "Enantioseparation on
- CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MORAES, M.C.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. "Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications" *Bioanalysis* 1 (3) : 577-594. 2009.
- 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 : 1462–1469, 2006.
- CHEN, L.; WANG, H.; ZENG, Q.; XU, Y.; SUN, L.; XU, H. & DING, L. "On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography – a review". *Journal Chromatography Science*, 47: 614-623, 2009.
- CHEN, D.; TAO, Y.; ZHANG, H.; PAN, Y.; LIU, Z.; HUANG, L.; WANG, Y.; PENG, D.; WANG, X.; DAI, M.; YUAN, Z. "Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues" *Journal of Chromatography B*, 879 : 1659-1667, 2011.
- CHENG, A.; DILLER, D.J.; DIXON, S.L.; EGAN, W.J.; LAURI, G.; MERZ, K.M. Jr. "Computation of the Physio-Chemical Properties and Data Mining of Large Molecular Collections." *Journal of Computational Chemistry*. 23 : 172-183, 2001.
- CHIAP, B.; EVRARD, B.; BIMAZUBUTE, M.A.; de TULLIO, 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 : 121–134, 2000.
- CHROMATOGRAPHY 3^a ed. 2010, New Jersey: John Wiley and Sons Inc. 891p
- COMBOURIEU, B.; ELFOUL, L.; DELORT, A.M.; RABOT, S. "Identification of new derivatives of sinigrin and glucotropaeolin produced by the human digestive microflora using H-1 NMR spectroscopy analysis of in vitro incubations" *Drug Metabolism And Disposition*, 29 (11) : 1440-1445, 2001.

- Da FONSECA, P.; BONATO, P.S. "Chiral HPLC analysis of venlafaxine metabolites in rat liver microsomal preparations after LPME extraction and application to an in vitro biotransformation study." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (2) : 817-824, 2010.
- DAYAN, A.D. "Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics" *Acta Tropica*, 86: 141-159, 2003.
- DELAForge, M. "Importance of Metabolism in Pharmacological Studies: Possible in Vitro Predictability" *Nuclear Medicine & Biology*, 25: 705-709, 1998.
- DELATOUR, P.; BENOIT, E.; BESSE, S.; BOUKRAA, A. "Comparative enantioselectivity in the sulphoxidation of albendazole in mam, dogs and rats." *Xenobiotica*, 21 : 217-221, 1991.
- DIONÍSIO, A.G.G.; BATISTÃO, M.B.; dos SANTOS, V.B.; ICERI, T.M. CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B. "Novas tendências em preparo de amostras para Cromatografia Líquida". *Scientia Chromatographica* 2: 19-29, 2010.
- EDDERSHAW, P.J.; DICKINS, M. "Advances in in vito drug metabolism screening" *Pharmaceutical Science e technology today* 2 (1) : 13-19, 1999.
- EKINS, S.; NIKOLSKY, Y.; NIKOLSKAYA, T. "Techniques: Application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity." *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 26 : 202-209, 2005.
- 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 : 313- 324, 2000.
- ELIEL, E.; WILEN, S. H. "Stereochemistry of Organic Compounds" New York, Jonh Wiley & Sons Inc., 297-440, 1999.
- FDA US. Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: studies in vitro 2007 ed. Rockville: [http:// www.fda.gov/cder/guidance/clin3.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/clin3.pdf).1997.
- FONSECA, P.; DE FREITAS, L.A.P.; PINTO, L.F.R.; PESTANA, C.R.; BONATO, P.S. "Enantioselective analysis of oxybutynin and N-desethyloxybutynin with application to an in vitro biotransformation study." *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, 875 (1) : 161-167, 2008.
- GARCIA, J.J.; BOLÁS-FERNANDEZ, F.; TORRADO, J, J. "Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma" *Journal Chromatography B*, 723 : 265-271, 1999.
- GIBSON, G.G.; SKETT,P. "Introduction to Drug Metabolism, united kigdom: Nelson thornes ltd 3rd ed. 2001.
- GILBERT, M. T. "Chiral chromatography". IN: *High Performance Liquid Chromatography*. Bristol, Wright, 1987. p.291-312.
- GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C.C.; SINGH, A.; WARD, O.P.; NARASU, M.L. "Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current trends and future prospectors" *Biotechnology advances*, 19 (3) : 175-199, 2001.
- GOMEZ-LECHON M.J.; CASTEL, J.V.; DONATO, M.T. "Hepatocytes – The choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo" *Chemico-Biological Interactions*, 168 (1): 30-50, 2007.

- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction "Journal *Biological Chemistry*, 177: 751-766, 1949. nome revista
- GRABOWSKI, T ; JAROSZEWSKI, J.J ; SWIERCZEWSKA, A; SAWICKA, R ; MASLANKA, T ; MARKIEWICZ, W ; ZIOLKOWSKI, H "Application of ultra-performance columns in high-performance liquid chromatography for determination of albendazole and its metabolites in turkeys " *Biomedical chromatography*, 25 (10) : 1159-1167, 2011.
- GUIOCHON, G.; TARAFDER, A.; "Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid Chromatography" *Journal of Chromatography A*, 1218 : 1037–1114, 2011.
- GUNARATNA, C. "Drug metabolism e pharmacokinetics in drug discovery: A primer for bioanalytical chemists, Part I" *Current Separations*, 19 (1) : 17-23, 2000.
- GYOUBU, K.; MIYAZAWA, M. "In vitro metabolismo of (-) –camphor using human liver microsomes and CYP2A6". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30 (2): 230-233, 2007.
- HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J. "Drug metabolism e pharmacokinetics in drug discovery: A primer for bioanalytical chemists, Part I. 2000 " *Farmacologia Ilustrada*", Porto Alegre, Artmed, 3ª ed., 551 , 2007.
- HSU, L. C.; KIM, H.; YANG, X.; ROSS, D. " Large Scale Chiral Chromatography for the Separation of an Enantiomer to Accelerate Drug Development" *Chirality*, 23:361–366, 2011.
- HUBER, U.; MAJORS, R.E. "Principles in preparative HPLC" <http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5989-6639EN.pdf> acessado em 12/11/12
- HYNECK, M.; DENT, J. & HOOK, J. "Chirality: pharmacology action and drug development". IN: *Chirality In Drug Design And Synthesis*. Brown C. (Ed.). Londres, Academic Press, 1990. p. 1-28.
- IMA, V.L.E. "Os fármacos e a quiralidade: Uma breve abordagem" *Química Nova*, 20 : (6) 657- 663, 1997.
- IURIAN, S.; NEAMTU, M.; NEAMTU, B.; COSTEA, R. "Albendazole, Imunomodulator in Children with Asthma" Proceedings of the XIX World Congress of Asthma, 157-162 , 2008.
- IVANOVA, L.; FAESTE, C.K.; UHLIG, S. "In vitro phase I metabolism of the depsipeptide enniantin B" *Analytical bioanalytical chemistry*, 400: 2889-2901, 2011.
- JEDZINIAK, P.; SZPRENGIER-JUSZKIEWCZ, T.; OLEJNIK, M.; "Determination of benzimidazoles and levamisole residues in milk by liquid chromatography-mass spectrometry: Screening method development and validation" *Journal of Chromatography A*, 1216 (46) : 8165-8172, 2009.
- KANTIANI, L.; FARRÉ, M.; SIBUM, M.; POSTIGO, C.; ALDA, M. L. & BARCELÓ, D. "Fully automated analysis of β -lactams in bovine milk by online solid phase extraction - liquid chromatography - electrospray - tandem mass spectrometry". *Analytical Chemistry*, 81: 4285, 2009.
- KATAOKA, H., "New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 22 (4) : 232, 2003.
- KATZUNG, Bertram. *Farmacologia básica e clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap.1, 2,3,4 e 5.

- 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- 414, 2007.
- KHAN, F. A.; CAMPBELL, A. J.; HOYT, B.; HERDMAN, C.; KU, T.; THANGAVELU, S.; GORDON, R.K. "Oxidative mechanisms for the biotransformation of 1-methyl-1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxime to pralidoxime chloride" *Life Sciences*, 89 : 911–917, 2011.
- KIRKLAND, K. & KERN, W. J. "Chiral separations". IN: *Practical HPLC Method Development*. Nova Yorque, John Wiley & Sons, INC., 1997. p.537-615.
- KITZMAN, D.; CHENG, K.; FLECKENSTEIN, L. " HPLC assay for albendazole and metabolites in human plasma for clinical pharmacokinetic studies" *Journal Pharm.Biomed. Anal.* 30: 801-813, 2002.
- KNOCHE, B.; BLASCHKE, G. "Stereoselectivity of the in-vitro metabolism of thalidomide" *Chirality*, 6: 221-224, 1994.
- LANÇAS, F.M.: "Cromatografia Líquida Moderna", Editora Átomo, 2009.
- LEVESQUE, J.F.; GAUDREAU, M.; HOULE, R.; CHAURENT, N. "Evaluation of human hepatocyte incubation as a new tool for metabolism study of androstenedione and norandrostenedione in a doping control perspective" *Journal of chromatography B- analytical Technologies in the biomedical and life Sciences*, 780 (1) : 145-153, 2002.
- LEVESQUE, J.F.; TEMPLETON, E.; TRIMBLE, L.; BERTHELETTE, C.; CHAURET, N. "Discovery, Biosynthesis, and Structure Elucidation of Metabolites of a Doping Agent and a Direct Analogue, Tetrahydrogestrinone and Gestrinone, Using Human Hepatocytes." *Analytical Chemistry*. 77 : 3164-3172, 2005.
- LI, F.; YANG, X.W.; "Metabolism of the Lignan Dehydrodiisoeugenol in Rats." *Planta Medica*, 77 (15) : 1712-1717, 2011.
- LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M. & 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): 72-78, 2006.
- LIN, J.; SAHAKIAN, D.C.; De MORAES, S.M.; XU, J.J.; POLZER, R.J.; WINTER, S.M. "The Role of Absorption, Distribution, Metabolismo, Excretion and Toxicity in Drug Discovery" *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3 (10) : 1125-1154, 2003.
- LIU, H.H.; WANG, K.; TANG, Y.H.; SUN, Z.L.; JIAN, L.H.; LI, Z.X.; WU, B.; HUANG, C.G.; "Structure elucidation of in vivo and in vitro metabolites of mangiferin." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (5) : 1075-1082, 2011.
- LIU, T.; DU, F.Y.; WAN, Y.K.; ZHU, F.P.; XING, J. "Rapid identification of phase I and II metabolites of artemisinin antimalarials using LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer in combination with online hydrogen/deuterium exchange technique." *Journal of Mass Spectrometry*, 46 (8) : 725-733, 2011.
- LIU, W.T.; TAMOLANG, M.B.; PANG, H.; REN, Y.; WONG, P.Y. "Semipreparative Chromatographic Separation of Cyclosporin G Metabolites Generated by Microsomes From Rabbits Treated With Rifampicin" *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 35 : 121-129, 1996.

- LIU, X.; QIAO, L.R.; XIE, D.; ZHANG, Y.; ZOU, J.H.; CHEN, X.G.; DAI, J.G. "Microbial transformation of ginsenoside-Rg (1) by *Absidia coerulea* and the reversal activity of the metabolites towards multi-drug resistant tumor cells" *Fitoterapia*, 82 (8) : 1313-1317, 2011.
- LOURENÇO, T.C.; BATISTA Jr. J.; FURLAN, M.; HE, Y.; NAFIE, L.A.; SANTANA, C.C.; CASS, Q.B. "Albendazole sulfoxide enantiomers: Preparative chiral separation and absolute stereochemistry." *Journal Chromatography A*, 1230 : 61-65, 2012.
- LOURENÇO, T.C.; CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B. "Fases estacionárias quirais para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência" *Quimica Nova*, 33 (10) : 2155-2164, 2010.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; "Protein measurement with the Folin phenol reagent" *Journal of Biological Chemistry*, 193 : 265-275, 1951.
- MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. " Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives" *Journal of Chromatography A*, 906 : 3–33 2001.
- MAO, Z.L. TAM, Y. K. & COUTTS, R.T. "Effect of Protein and Calorie Malnutrition on Drug Metabolism in Rat – in Vitro". *Journal of Pharm Pharmaceut Sci*, 9: 60-70, 1985.
- MARQUEZ, H.; ALBERTI, J.; SALVA, M.; SAURINA, J.; SENTELLAS, S. "Development of a UHPLC method for the assessment of the metabolic profile of cinitapride." *Journal of Separation Science*, 34 (24) : 3502-3508, 2011.
- MARUMOTO, S.; MIYAZAWA, M. "Microbial Transformation of Isopimpinellin by *Glomerella cingulata*." *Journal of Oleo*, 60 (1) : 575- 578, 2011.
- DAALI, Y.; ANCRENAZ, V.; BOSILKOVSKA, M.; DAYER, P.; DESMEULES, J. "Ritonavir inhibits the two main prasugrel bioactivation pathways in vitro: a potential drug-drug interaction in HIV patients." *Metabolism-Clinical and Experimental*, 60 (11) : 1584-1589, 2011.
- MATE, L.; VIRKEL, G.; LIFSCHITZ, A.; BALLENT, M.; LANUSSE, C. "Hepatic and extra-hepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep." *Biochemical Pharmacology* , 76 (6) : 773-783, 2008.
- MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M. & HEYDEN, Y. V. "Screening Approach for Chiral Separation of Pharmaceuticals IV. Polar Organic Solvent Chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1111: 48-61, 2006.
- MERINO, G.; MOLINA, A. J.; GARCIA, J. L.; PULIDO, M. M.; PRIETO, J. G.; ÁLVAREZ, A. I. "Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors" *International journal of pharmaceutics*, 263 : 123-132, 2003.
- METHLING, K.; RESZKA, P.; LALK, M.; VRANA, O.; SCHEUCH, E.; SIEGMUND, W.; TERHAAG, B.; BEDNARSKI, P.J. "Investigation of the in Vitro Metabolism of the Analgesic Flupirtine" *Drug Metabolism and Disposition*, 37 (3) : 479-493, 2009.
- MIAO, X.S.; ZHONG, C.Y.; WANG, Y.X.; SAVAGE, R.E.; YANG, R.Y.; KIZER, D.; VOLCKOVA, E.; ASHWELL, M.A.; CHAN, T.C.K. " In vitro metabolism of beta-lapachone (ARQ 501) in mammalian hepatocytes and cultured human cells." *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 23 (1) : 12-22, 2009.
- MILLER-STEIN, C.; FERNANDEZ- METZLER. "Determination of chiral sulfoxides in plasma by normal-phase liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, 964 : 161–168, 2002.

- MILLOT, M.C.; "Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors, Review" *Journal of Chromatography B*, 797 : 131–159, 2003.
- MINATO, K.; SUZUKI, R.; ASAGARASU, A.; MATSUI, T.; SATO, M. "Biotransformation of 3-amino-5,6,7,8-tetrahydro-2-{4-[4-(quinolin-2-yl) piperazin-1-yl] butyl} quinazolin-4(3H)-one (TZB-30878), a novel 5-hydroxytryptamine (5-HT)(1A) agonist/5-HT3 antagonist, in human hepatic cytochrome P450 enzymes." *Drug Metabolism and Disposition*, 36 (5) : 831-840, 2008.
- MISHRA, S.; MANICKAVASAGAM, L.; JAIN, G.K. " Determination of metabolic profile of anti-malarial trioxane CDRI 99/411 in rat liver microsomes using HPLC." *Biomedical Chromatography*, 26 (1) : 115-122, 2012.
- MIYAZAWA M.; HAIGOU R. "Determination of cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of (-)-terpinen-4-ol by human liver microsomes." *Xenobiotica*, 42 (12) : 1056-1062, 2011.
- OBACH, R.S.; BAXTER, J.G.; LISTON, T.E.; SILBER, B.M.; JONES, B.C.; MACINTYRE, F.; RANCE, D.J.; WASTALL, P. "The Prediction of Human Pharmacokinetic Parameters from Preclinical and *In Vitro* Metabolism Data." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 283 : 46-58, 1997.
- OLIVEIRA, A. R. M. ; MAGALHAES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M. ; BONATO P. S. "Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos." *Química Nova (Online)*, 31 : 637-644, 2008.
- OLIVEIRA, A.R.M.; FONSECA, P.; CURTI, C.; SILVA, R.S.; BONATO, P. S. "In vitro metabolism study of a new nitrosyl ruthenium complex $[Ru(NH.NHq)(terpy)NO]^{+3}$ nitric oxide donor using rat microsomes" *Nitric Oxide* 21 : 14–19 2009.
- ORLANDO, R.M.; CORDEIRO,D.D.; MATHIAS, A.E.B.; REZENDE,K.R.; GIL, E.S. "Pré-Tratamento de Amostras," *Vita et Sanitas Trindade-Go.*, 03, 2009.
- OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L. M. "Biotransformação: Importância e Toxicidade". *Saúde em Revista*. 5 (9): 69-76, 2003.
- PAUL, S.M.; MYTELKA, D.S.; DUNWIDDIE, C.T.; PERSINGER, C.C.; MUNOS, B.H.; LINDBORG, S.R.; SCHACHT, A.L. "How to improve R&D productivity : the pharmaceutical industry's grand challenge" *Nature reviews drug discovery*, 9 (3): 203-214, 2010.
- PAVLOVIC, D. M.; BABIC, S.; HORVAT, A. J. M. & KASTELAN-MACAN, M. "Sample preparation in analysis of pharmaceuticals". *Trends Analytical Chemistry*, 26 (11): 1062, 2007.
- PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. "Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis." *Analytical Chemistry* , 71 (1) : 2650 – 2656, 1999.
- PEREIRA, D.G.; "Importância do metabolismo no planejamento de fármacos" *Química Nova*, 30 (1) : 171-177, 2007.
- PFEIFFER, E.; HEYTING, A.; METZLER, M. "Novel oxidative metabolites of the mycoestrogen zearalenone *in vitro*" *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (7) : 867-871, 2007.

PLUMB, R.S.; GRANGER, J.H.; STUMPF, C.L.; JOHNSON, K.A.; SMITH, B. W.; GAULITZ, S.; WILSON, I.D.; CASTRO-PEREZ, J. "A rapid screening approach to metabonomics using UPLC and OA-TOF mass spectrometry: application to age, gender, and diurnal variation in normal/ Zucker obese rat and black, white and nude mice" *Analyst*, 130 (6): 844-849, 2005.

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- 432, 2005.

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): 1928-1935, 2006.

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): 43-49, 2001.

PRASAD G. S.; GIRISHAM, S.; REDDY, S. M.; SRISAILAM, K. " Biotransformation of albendazole by fungi" *World Journal Microbiol Biotechnol*, 24: 1565–1571, 2008.

PRASAD, B.; SINGH, S. " In vitro and in vivo investigation of metabolic fate of rifampicin using an optimized sample preparation approach and modern tools of liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (3) : 475-490, 2009.

PRASAD, G. S.; GIRISHAM, S.; REDDY, S. M. " Microbial transformation of albendazole" *Indian Journal of Experimental Biology* 48 (4) : 415-20, 2010.

QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. "Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência" *Química Nova*, 28 (5) : 880-886, 2005.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. & JARDIM, I. C. S. F. "Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica" *Química Nova*, 24 (1): 68-76, 2001.

RENTSCH, K.M. "The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory" *Journal of Biochemical and Biophysical*, 54 : 1 –9, 2002.

Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003

ROUPE, K.A.; HELMS, G.L.; HALLS, S.C.; YANEZ, J. A.; DAVIES, N.M. "Preparative enzymatic synthesis and HPLC analysis of rhapontigenin : Applications to metabolism, pharmacokinetics and anti-cancer studies" *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8 (3) : 374-386, 2005.

RUMMEL, N.; SHAIKH, B.; " Determination of albendazole and its metabolites in the muscle tissue of hybrid striped and largemouth bass using liquid chromatography with fluorescence detection" *Journal Of AOAC International* , 91 (2) : 269-477, 2008.

SHAIKH, B.; RUMMEL, N.; GIESEKER, C.; CHEELY, C. S.; REIMSCHUESSEL, R. Residue depletion of albendazole and its metabolites in the muscle tissue of large mouth and hybrid striped bass after oral administration" *Journal of Chromatography A*, 1216 : 8173–8176, 2009.

- SILVA JUNIOR, I. J.; VEREDAS, V.; SANTOS, M. A. G.; SANTANA, C. C.; CARPES, M.J.S.; CORREIA, C.R.D. "Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala" *Química Nova*, 29 (5) :1027-1037, 2006.
- SIMÕES, R. A.; OLIVEIRA, A.R.M.; BONATO, P.S. "Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of isradipine and its main metabolite followed by chiral HPLC analysis: application to an in vitro biotransformation study." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 : 2435-2443, 2011.
- SMITH, E.M.; CHU, S.G.; PATERSON, G.; METCALFE, C.D.; WILSON, J.Y. "Cross-species comparison of fluoxetine metabolism with fish liver microsomes." *Chemosphere*, 79 (1) : 26-32, 2010.
- SMITH, P. K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.D. "Measurement of protein using Bicinchoninic Acid" *Analytical Biochemistry*, 150 (1) : 76-86, 1985.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. INTRODUCTION TO MODERN LIQUID
- SOUZA, 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 : 75-81, 2006.
- SUCHANOVA, B.; KOSTIAINEN, R.; KETOLA, R.A. "Characterization of the in vitro metabolic profile of amlodipine in rat using liquid chromatography-mass spectrometry." *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33 (1) : 91-99, 2008.
- TAO, X.; PIAO, H.; CANNEY, D.J.; BORENSTEIN, M.R.; NNANE, I.P. "Biotransformation of letrozole in rat liver microsomes: Effects of gender and tamoxifen." *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 43 (3) : 1078-1085, 2007.
- TINGLE, M.D.; HELSBY, N.A. "Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies?" *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21 (2) : 184-190, 2006.
- TORIBIO, L.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; NIETO, E.M. "Use of semipreparativa supercritical fluid chromatography to obtain small quantities of the albendazole sulfoxide enantiomers" *Journal of Chromatography A*, 1011 : 155-161, 2003.
- VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. "Microextração por fase sólida" *Química Nova*, 23 (4) : 523-530, 2000.
- VARGHESE, S.J.; VASANTHI P.; RAVI, T.K.; "Simultaneous Densitometric Determination of Ivermectin and Albendazole by High-Performance Thin-Layer Chromatography" *JPC- Journal of Planar Chromatography-modern*, 24 (4) : 344-447, 2011.
- VELIK, J.; BALIHAROVÁ, V.; SKALOVA, K.; SZOTÁKOVA, B.; WSOL, V.; LAMKA, J. "Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes" *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26 : 297-302, 2003.
- WAINER, I.W. "HPLC chiral stationary phases for the stereochemical resolution of enantiomeric compound. The current state of the art" IN: Drug stereochemistry analytical methods and pharmacology, New York, Marcel Dekker Inc. 2° Ed., p. 139-182, 1993.

- WALKER, J. M. "The Protein Protocols Handbook", New Jersey, 2^a ed., 1146 p., 2002.
- WANG, X.M.; ABDELRAHMAN, D.R.; FOKINA, V.M.; HANKINS, G.D.V.; AHMED, M.S.; NANOVSKEYA, T.N. "Metabolism of bupropion by baboon hepatic and placental microsomes" *Biochemical Pharmacology* 82 (3) : 295-303, 2011.
- WIENKERS, L.C.; HEATH, T.G. "Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data" *Nature reviews drug discovery*, 4 (10) : 825-833, 2005.
- WU, Z.; MEDLICOTT, N.J.; TUCKER, I.G "Development and optimization of rapid HPLC method for Analysis of Ricobendazole and albendazole Sulfone in Sheep Plasma" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39: 225-232, 2005.
- XI-ZHOU, H.; JIAN-XING, W.; YU-QI, F. "Determination of Benzimidazole Residues In Edible Animal Food by Polymer Monolith Microextraction Combined With Liquid Chromatography-Mass Spectrometry" *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 58 (1) : 112-119, 2010
- YU, D.L.; RUMMEL, N.; SHAIKH, B. "Development of a Method to Determine Albendazole and Its Metabolites in the Muscle Tissue of Yellow Perch Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection" *Journal of AOAC International*, 94 (2) 446-452, 2011.
- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. " Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes" *Química Nova*, 21 (6):787-793, 1998.
- ZARENA, A.S.; SANKAR, K.U. " Isolation and identification of pelargonidin 3-glucoside in mangosteen pericarp " *Food Chemistry*, 130 : 665–670, 2012.
- ZGURIS, J.C.; ITLE, L.J.; HAYES, D.; PISHKO, M.V. "Microreactor microfluidic system with human microsomas and hepatocytes for use in metabolite studies" *Biomedical Microdevices*, 7 (2) : 117-125, 2005.
- ZHANG, X.; XU, H.; ZHANG, H.; GUO, Y.; DAI, Z.; CHEN, X. "Simultaneous determination of albendazole and its metabolites in fish muscle tissue by stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry" *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 401 : 727-734, 2011.
- ZHANG, X.J. ; ZHENG, B.; ZHANG, H. ; YU, H.X.; CHEN, X.C.; GUO, Y.M.; MEI, G.M.; " Determination of Albendazole and Its Metabolites in Grass Carp Meat by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Chinese Journal Of Analytical Chemistry*, 39 (6) : 815-820, 2011 (b)
- ZHANG, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, J.; SONG, B.; BHADURY, P.S.; HU, D.; YANG, S. "Analytical and semi-preparative HPLC enantio separation of novel pyridazin-3(2H)-one derivatives with α -aminophosphonate moiety using immobilized polysaccharide chiral stationary phases" *Journal of Separation Science*, 34: 402–408, 2011.
- ZHANG, Y.; WU, W.H.; HAN, F.M.; CHEN, Y. "LC/MS/MS for identification of in vivo and in vitro metabolites of jatrorrhizine." *Biomedical Chromatography*, 22 (12) : 1360-1367, 2008.
- ZHU X, WANG S, LIU Q, XU Q, ZHANG C, XU S, WANG X, LI D, HU H. "Simultaneous Determination of Benzimidazoles and Their Metabolites in Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Application to Pharmacokinetic Studies in Rabbits" *Journal of AOAC International*, 94 (3) : 839-846, 2011.
- (WHO), W. H. O. In WHO Technical Report Series no. 867. Geneva, 1997.