

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

**“OTIMIZAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE METOPROLOL POR
FUNGOS E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS PARA ANÁLISE”**

Daniela Elisabeth Hercules Schiavon

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

**São Carlos - SP
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S329o Schiavon, Daniela Elisabeth Hercules
Otimização da biotransformação de metoprolol por fungos e desenvolvimento de métodos cromatográficos para análise / Daniela Elisabeth Hercules Schiavon. - São Carlos : UFSCar, 2016.
77 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Química tecnológica. 2. Microorganismos. 3. Fungos. 4. Biocatálise. 5. Métodos cromatográficos.
I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Daniela Elisabeth Hercules Schiavon, realizada em 22/01/2016:

Prof. Dr. Renato Lajarin Carneiro
UFSCar

Prof. Dr. Edení Rodrigues Pereira Filho
UFSCar

Prof. Dr. Gezimar Donizetti de Souza
ACCERT

DEDICATÓRIA

A Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Aos meus pais, Elisabeth H. Schiavon e Alfredo S. G. Schiavon, que me mostraram a importância da fé, amor, perseverança e honestidade, além do permanente incentivo em todos os momentos, minha eterna gratidão.

Ao meu marido, Rodrigo F. Magnani, a quem amo muito e admiro, pelo constante e incondicional apoio, paciência, compreensão e principalmente companheirismo.

À empresa Accert por ter aceitado o programa de mestrado profissional, por ter oferecido a infraestrutura para o desenvolvimento total da parte experimental do trabalho, bem como ter flexibilizado meus horários de trabalho e possibilitar o cumprimento de todas as etapas do programa de Pós-Graduação. Almejo retribuir com os conhecimentos adquiridos e difundi-los aos demais colegas da empresa.

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro, pela confiança, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos, orientação e suporte na condução deste trabalho.

Ao Dr. Gezimar Donizetti de Souza, pelos ensinamentos, incentivos, apoio ao longo do trabalho e pela orientação na trajetória do meu crescimento profissional.

Aos meus colegas de trabalho, que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos. À Gabriela, pela colaboração na etapa de fermentação; à Cláudia, por estar sempre disposta a ajudar e tirar minhas dúvidas; ao Israel, pela contribuição na interpretação dos espectros de RMN e ao restante da equipe, que também teve participação, o meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pelo apoio e doação das cepas fúngicas de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, utilizadas neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar.

A todas as pessoas, que de alguma forma colaboraram na execução deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIFINA – Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades.

ANOVA - Análise da Variância.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

art. – artigo.

BDA – Batata Dextrose Agar.

BOD - *Biological Oxygen Demand*.

d – Desejabilidade.

D – Desejabilidade Global.

ESI – Electrospray.

DSC - Differential Scanning Calorimetry.

GC – *Gas Chromatography*.

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*.

HPLC-DAD – *High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector*.

HPLC-MS/MS - *High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*.

NIR – *Near Infrared Spectrometry*.

µL – Microlitro.

m/z – Relação massa/carga.

mw – *Molecular weight*.

PNRS – Política Nacional de Resíduos Sólidos.

RMN – Ressonância Magnética Nuclear.

RSS – Resíduos de Serviços de Saúde.

UV/Vis – *Ultraviolet/visible*

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 3.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FÁRMACOS..... | 22 |
| TABELA 3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS FRASCOS ERLLENMEYERS. | 23 |
| TABELA 3.3. GRADIENTE DE ELUIÇÃO. | 24 |
| TABELA 3.4. COMPRIMENTO DE ONDA..... | 25 |
| TABELA 3.5. PLANEJAMENTO DE MISTURA TERNÁRIA PARA PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO. | 27 |
| TABELA 3.6. IDENTIFICAÇÃO DOS FRASCOS ERLLENMEYERS. | 28 |
| TABELA 3.7. GRADIENTE DE ELUIÇÃO. | 29 |
| TABELA 3.8. COMPRIMENTO DE ONDA..... | 30 |
| TABELA 3.9. GRADIENTE UTILIZADO NAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS..... | 31 |
| TABELA 3.10. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS COLETADAS..... | 32 |
| TABELA 3.11. CONDIÇÕES DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA (ESI+). | 32 |
| TABELA 3.12. VARIÁVEIS TESTADAS E SEUS NÍVEIS NO PLANEJAMENTO FATORIAL. | 33 |
| TABELA 3.13. CONFIGURAÇÃO DOS 16 EXPERIMENTOS REALIZADOS VISANDO O AUMENTO NA PRODUÇÃO DO METABÓLITO DE INTERESSE. | 34 |
| TABELA 3.14. DATA DA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS..... | 35 |
| TABELA 3.15. VARIÁVEIS TESTADAS E SEUS NÍVEIS NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL. | 36 |
| TABELA 3.16. PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO HPLC-DAD PARA O METABÓLITO DE INTERESSE. | 37 |
| TABELA 4.1. ÁREA DAS AMOSTRAS NO HPLC-DAD. | 39 |
| TABELA 4.2. RESULTADOS EM ÁREA DA BANDA CROMATOGRÁFICA EM 2,65 MIN..... | 40 |
| TABELA 4.3. TABELA ANOVA. | 40 |
| TABELA 4.4. ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS OBSERVADOS NOS EXPERIMENTOS DE RMN ¹ H..... | 50 |
| TABELA 4.5. RESULTADOS OBTIDOS PARA OS 16 EXPERIMENTOS REALIZADOS..... | 52 |
| TABELA 4.6. VALORES DE ÁREA E DE Z PARA CADA UMA DAS REGIÕES ASSOCIADAS AOS EFEITOS DISPOSTOS EM ORDEM CRESCENTE. | 53 |
| TABELA 4.7. PLANEJAMENTO FRACIONADO PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO HPLC PARA O METABÓLITO DE INTERESSE. | 57 |
| TABELA 4.8. RESULTADOS DE COEFICIENTES DE REGRESSÃO SIGNIFICATIVOS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA RESPOSTA RESOLUÇÃO 58 | 58 |
| TABELA 4.9. TABELA ANOVA PARA RESPOSTA RESOLUÇÃO..... | 59 |
| TABELA 4.10. RESULTADOS DE COEFICIENTES DE REGRESSÃO SIGNIFICATIVOS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA RESPOSTA TEMPO DE RETENÇÃO. | 61 |
| TABELA 4.11. TABELA ANOVA PARA RESPOSTA TEMPO DE RETENÇÃO..... | 62 |
| TABELA 4.12. VALORES NORMALIZADOS PARA AS RESPOSTAS. | 65 |
| TABELA 4.13. DESEJABILIDADES INDIVIDUAIS E GLOBAL OBTIDAS PELA APLICAÇÃO DAS FUNÇÕES DE DESEJABILIDADE. | 65 |
| TABELA 4.14. CUSTO TOTAL DO PROJETO..... | 70 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1.1. REAÇÃO ENZIMÁTICA OBSERVADA PARA A CAFEÍNA, REALIZADA PELO MICROORGANISMO <i>PENICILLIUM SP.</i> | 7 |
| FIGURA 1.2. SINVASTATINA, MW: 418,566 G/MOL..... | 9 |
| FIGURA 1.3. CLORIDRATO DE PROPRANOLOL, MW: 295,804 G/MOL. | 9 |
| FIGURA 1.4. SUCCINATO DE METOPROLOL, MW: 652,816 G/MOL. | 10 |
| FIGURA 1.5. CARBAMAZEPINA, MW: 236,268 G/MOL..... | 10 |
| FIGURA 1.6. ÁCIDO MICOFENÓLICO, MW: 320,337 G/MOL. | 10 |
| FIGURA 3.1. PLACAS DE PETRI CONTENDO O FUNGO <i>P. SP.</i> (003) E <i>P. GRISEORISEUM</i> (025). | 23 |
| FIGURA 3.2. ESQUEMA QUE ILUSTRA A REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS. | 25 |
| FIGURA 3.3. PLACAS DE PETRI CONTENDO O FUNGO <i>A. ACULEATUS</i> (026), <i>A. FLAVUS</i> (027) E <i>A. NIGER</i> (028) | 28 |
| FIGURA 3.4. ETAPAS DO PROCESSO..... | 30 |
| FIGURA 3.5. AMOSTRAS ANTES DA ADIÇÃO DO FÁRMACO A 25°C E 60 RPM..... | 34 |
| FIGURA 4.1. FÓRMULA ESTRUTURAL DO METOPROLOL..... | 39 |
| FIGURA 4.2. GRÁFICO DE MISTURA TERNÁRIA PARA A BANDA EM 2.65 MIN. | 41 |
| FIGURA 4.3. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA SMET A, FO, 003 EM 274 NM. | 42 |
| FIGURA 4.4 CROMATOGRAMA DA AMOSTRA SMET B, FO, 003 EM 274 NM. | 42 |
| FIGURA 4.5 CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS NO MODO SCAN POSITIVO, AMOSTRA SMET F.O. 003 A, EXTRATO 500 µG/ML. | 43 |
| FIGURA 4.6 CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS NO MODO SCAN POSITIVO, AMOSTRA SMET F.O. 003 B, EXTRATO 500 µG/ML. | 44 |
| FIGURA 4.7 CROMATOGRAMA SOLUÇÃO PADRÃO SMET 100 µG/ML EM 274 NM. | 44 |
| FIGURA 4.8 CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS NO MODO SCAN POSITIVO DA SOLUÇÃO PADRÃO SMET 10 µG/ML EM METANOL, CONE 20 V. | 45 |
| FIGURA 4.9 ESPECTRO DE MASSAS DA BANDA EM 3.08 MINUTOS DA SOLUÇÃO SMET 10 µG/ML EM METANOL. | 45 |
| FIGURA 4.10. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA BRANCO A, FO, EM 274 NM. | 47 |
| FIGURA 4.11. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA CONTROLE A, FO, 028 EM 274 NM. | 47 |
| FIGURA 4.12. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA SMET + MEIO DE CULTURA, FO, 028 EM 274 NM..... | 47 |
| FIGURA 4.13. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA SMET A, FO, 028 EM 274 NM. | 47 |
| FIGURA 4.14. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA SMET A 1 PH 10 FO 3,3 MG/ML HPLC-DAD. | 48 |
| FIGURA 4.15. ESPECTRO DE UV DO PICO 2, AMOSTRA SMET A 1 PH 10, EM 274 NM..... | 49 |
| FIGURA 4.16. ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO PARA O PICO 2, AMOSTRA SMET A 1 PH 10..... | 49 |
| FIGURA 4.17. ESTRUTURA QUÍMICA DO METOPROLOL (À ESQUERDA) E DA 1-(ISOPROPYLAMINO)-2-[4-(2-METHOXYETHYL)PHENOXY]ETANOL (À DIREITA)..... | 51 |
| FIGURA 4.18. GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO NORMAL PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO. | 54 |
| FIGURA 4.19. AMOSTRAS ANTES DA ADIÇÃO DO FÁRMACO A 25°C E 30 °C E 60 RPM..... | 55 |
| FIGURA 4.20. AMOSTRAS APÓS ADIÇÃO DO FÁRMACO A 25°C E 30 °C E 60 RPM. | 55 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 4.21. AMOSTRAS BRANCO A 25°C E 30°C E 60 RPM. | 56 |
| FIGURA 4.22. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO AS VARIÁVEIS X3 E X4 COM X1 FIXO EM -1. | 60 |
| FIGURA 4.23. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO AS VARIÁVEIS X3 E X4 COM X1 FIXO EM 0. | 60 |
| FIGURA 4.24. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO AS VARIÁVEIS X3 E X4 COM X1 FIXO EM +1. | 61 |
| FIGURA 4.25. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO AS VARIÁVEIS X2 E X4 COM X3 FIXO EM -1. | 63 |
| FIGURA 4.26. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO AS VARIÁVEIS X2 E X4 COM X3 FIXO EM 0. | 63 |
| FIGURA 4.27. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO AS VARIÁVEIS X2 E X4 COM X3 FIXO EM +1. | 64 |
| FIGURA 4.28. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA SMET 003 A II C I, PH 10 FO HPLC-DAD, EM 274 NM. ... | 66 |
| FIGURA 4.29. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA SMET 003 A II C I, PH 10 FO HPLC-DAD, EM 274 NM E 24 MINUTOS DE CORRIDA. | 67 |
| FIGURA 4.30. CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS NO MODO SCAN POSITIVO, AMOSTRA SMET 003 A II C I, PH 10 FO (DILUÍDA 10 VEZES). | 68 |
| FIGURA 4.31. ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO EM TR = 5.37 MIN NO MODO SCAN ⁺ | 68 |
| FIGURA 4.32. GRÁFICO RELACIONADO AOS CUSTOS DA FERMENTAÇÃO E CUSTO TOTAL, EM RELAÇÃO AO PERÍODO ANTES DA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO E DEPOIS DA OTIMIZAÇÃO. | 71 |
| FIGURA 4.33. GRÁFICO RELACIONADO AOS CUSTOS DA EXTRAÇÃO, CUSTO DA ANÁLISE E CUSTO POR MG DE METABÓLITO, EM RELAÇÃO AO PERÍODO ANTES DA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO E DEPOIS DA OTIMIZAÇÃO. | 71 |

RESUMO

Otimização da biotransformação de metoprolol por fungos e desenvolvimento de métodos cromatográficos para análise.

As pesquisas na área de biotransformação e biocatálise encontram-se atualmente em amplo desenvolvimento em vários ramos da química e da biotecnologia. A utilização de microorganismos no desenvolvimento de processos de biocatálise e biotransformação visando à reciclagem de medicamentos e fármacos vencidos, ou fora de uso, foi uma das propostas deste projeto. Para tanto foram utilizados os fungos *Penicillium* sp, *P. griseoroseum*, *Aspergillus aculeatus*, *A. flavus* e *A. niger* para promover a biotransformação dos fármacos Sinvastatina, Micofenolato Sódico, Carbamazepina, Cloridrato de Propranolol e Succinato de Metoprolol. Métodos quimiométricos foram utilizados no decorrer do projeto com o intuito de otimizar os processos de fermentação, extração e cromatografia. Para avaliação do processo fermentativo foi realizado um planejamento fatorial completo 2⁴. Já para o processo de extração, utilizou-se um planejamento experimental de mistura ternária. Por fim, o método analítico através de HPLC-DAD foi otimizado para a quantificação do metabólito de interesse, para tanto foi realizado um planejamento composto central. Os resultados obtidos para a fermentação demonstraram que as variáveis utilizadas no nível positivo contribuem para o aumento na produção da substância de interesse. De acordo com o planejamento composto central realizado para cromatografia, onde foram avaliadas as respostas resolução e tempo de retenção, a melhor condição encontrada foi quando utilizada temperatura da coluna a 45°C, 0,1% de ácido fórmico, início da fase B em 15% e 0,70 mL/min de vazão. Avaliando-se os aspectos econômicos, pode-se concluir que a aplicação da quimiometria na otimização das etapas de fermentação e metodologia analítica, promoveu um aumento de 38,73 % na produção do metabólito de interesse, de 171,12 mg/L para 237,4 mg/L, e uma redução de 7,5% nos custos totais envolvidos. Dessa forma, este trabalho demonstra que a quimiometria aliada à biotransformação de fármacos, como o Succinato de Metoprolol via fungos do gênero *Penicillium* sp., podem ser utilizados para a recuperação e reciclagem de fármacos vencidos ou fora de uso.

ABSTRACT

Optimization of metoprolol biotransformation by fungi and development of methods for chromatographic analysis.

The researches in biotransformation and biocatalysis are found widespread in several activities in Chemistry and Biotechnology. The use of microorganisms in biocatalysis and biotransformation process to recycle expired or unused medicines have been the aim of this investigation. Therefore, the fungi *Penicillium* sp, *P. griseoroseum*, *Aspergillus aculeatus*, *A. flavus* and *A. niger* have been used to carry out the biotransformation of the drugs Simvastatin, Sodium Mycophenolate, Carbamazepine, Propranolol Hydrochloride and Metoprolol Succinate. Chemometric methods have been applied in this investigation in order to optimize the fermentation processes, extraction procedures and the chromatography parameters. In order to evaluate the fermentation processes, a 2^4 factorial planning has been applied, whereas for the extraction procedures, an experimental planning for a ternary mixture has been applied. Lastly, an analytical method by HPLC-DAD was optimized in order to quantify a metabolite. A central composite design was carried out in order to do that. The results achieved from the fermentation showed that the variables used in the positive level contributed to the increased production of the substance of interest. According to the central composite design performed to the chromatography parameters, in which the resolution response and retention time were evaluated, the best conditions found were the column rate temperature at 45 °C, 0.1% formic acid, the beginning of phase B at 15% and the flow rate at 0.70 mL/min. Evaluating the economic aspects, it can be concluded that the application of Chemometrics to optimize the stages of fermentation and analytical approach produced an increase of 38.73% in the production of the metabolite of interest, from 171.12 mg/L to 237.4 mg/L, and a 7.5% reduction in the total costs involved. Thus, this work demonstrates that Chemometrics allied with drug biotransformation, such as Metoprolol Succinate via fungi of the genus *Penicillium* sp., can be used to recover and recycle expired or unused drugs.

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | v |
| LISTA DE TABELAS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| RESUMO | ix |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. LOGÍSTICA REVERSA | 2 |
| 1.2. PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS | 5 |
| 1.2.1. Biotransformação e Biocatálise | 6 |
| 1.2.2. Moléculas a serem metabolizadas | 8 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL | 19 |
| 3.1. EQUIPAMENTOS | 20 |
| 3.2. REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS | 20 |
| 3.3. PREPARO DE SOLUÇÕES | 21 |
| 3.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE FÁRMACOS POR ESPÉCIES DE <i>Penicillium</i> E <i>Aspergillus</i> | 22 |
| 3.4.1. CULTIVO DOS FUNGOS <i>Penicillium</i> | 22 |
| 3.4.2. ADIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE AO <i>Penicillium</i> | 23 |
| 3.4.3. EXTRAÇÃO E ANÁLISE POR HPLC-DAD E HPLC-MS/MS DO <i>Penicillium</i> | 24 |
| 3.5. PLANEJAMENTO MISTURA TERNÁRIA | 25 |
| 3.6. EXPERIMENTO COM O FUNGO <i>Aspergillus</i> | 27 |
| 3.6.1. CULTIVO DOS FUNGOS <i>Aspergillus</i> | 27 |
| 3.6.2. ADIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE AO <i>Aspergillus</i> | 28 |
| 3.6.3. EXTRAÇÃO E ANÁLISE POR HPLC-DAD DO <i>Aspergillus</i> | 29 |
| 3.7. BIOTRANSFORMAÇÃO DE SUCCINATO DE METOPROLOL POR <i>Penicillium</i> sp - Repetição 30 | |
| 3.8. OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO | 32 |
| 3.9. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO | 35 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 38 |
| 4.1. PLANEJAMENTO MISTURA TERNÁRIA | 39 |
| 4.2. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE FÁRMACOS POR ESPÉCIES DE <i>Penicillium</i> E <i>Aspergillus</i> | 42 |
| 4.2.1. RESULTADOS EXPERIMENTAIS DOS FUNGOS <i>Penicillium</i> sp e <i>Penicillium griseoroseum</i> | 42 |
| 4.2.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS DOS FUNGOS <i>Aspergillus</i> | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3. RESULTADOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE SUCCINATO DE METOPROLOL POR <i>Penicillium sp</i> - Repetição | 48 |
| 4.3.1. RESULTADOS OBTIDOS NAS ANÁLISES POR RMN ¹H | 50 |
| 4.4. OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO | 52 |
| 4.5. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO | 56 |
| 4.5.1. Desejabilidade Global | 64 |
| 4.6. ASPECTOS ECONÔMICOS | 68 |
| 5 CONCLUSÕES | 72 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 74 |

Anexo I – Cromatogramas

Anexo II – RMN

1 INTRODUÇÃO

1. - INTRODUÇÃO

1.1. LOGÍSTICA REVERSA

O descarte inadequado de medicamentos impõe riscos consideráveis para a saúde humana e para o meio ambiente de uma maneira geral. Diversos estudos, em âmbito internacional, têm apontado para o fato de que o descarte não judicioso de medicamentos vencidos ou sobras, feito pela população em geral, no lixo comum ou na rede pública de esgoto, traz consequências em termos da agressão ao meio ambiente e à saúde humana. Dentre os efeitos associados à presença de resíduos de certos medicamentos no meio ambiente, a literatura especializada aponta riscos como a contaminação da água, do solo, da flora e da fauna. Além disso, há claramente o risco direto à saúde de pessoas que possam reutilizá-los por acidente ou mesmo intencionalmente (HIRATUKA, 2013).

As indústrias farmacêuticas são geradoras de uma quantidade considerável de resíduos de medicamentos. Isso se deve à devolução e ao recolhimento de medicamentos do mercado, ao descarte de medicamentos rejeitados pelo controle de qualidade, perdas inerentes ao processo, matéria prima e medicamentos vencidos.

Neste contexto, o estabelecimento de um programa adequado de descarte de medicamentos integra a agenda regulatória da Anvisa desde 2008, tornando-se um tema estratégico a partir de 2010, com a promulgação da Lei nº 12.305 que instituiu a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), regulamentada pelo Decreto nº 7.404/2010, que reúne o conjunto de princípios, objetivos, instrumentos, diretrizes, metas e ações adotadas pelo Governo Federal, isoladamente ou em regime de cooperação com Estados, Distrito Federal, Municípios ou particulares, com vistas à gestão integrada e ao gerenciamento ambientalmente adequado dos resíduos sólidos (HIRATUKA, 2013).

Uma das premissas estabelecidas pela PNRS consiste no reconhecimento de que o processo de gerenciamento dos resíduos sólidos deve envolver atribuições a toda a sociedade. Desta forma, consta como princípio da regulação dos resíduos a necessária cooperação entre as diferentes esferas do poder público, o setor empresarial e demais segmentos da sociedade. Sendo assim, compreendendo que o poder público, o setor empresarial e a coletividade são responsáveis pela efetividade das ações de gestão dos resíduos sólidos, a PNRS acaba por instituir no

art. 30 a responsabilidade compartilhada pelo ciclo de vida dos produtos. O ciclo de vida, por sua vez, é entendido como a série de etapas que envolve o desenvolvimento do produto, a obtenção de matérias-primas e insumos, o processo produtivo, o consumo e a disposição final. Ainda, de acordo com o parágrafo 2º. do art. 18 do decreto 7.404/2010, os fabricantes, importadores, distribuidores e comerciantes ficam responsáveis pela realização da logística reversa no limite da proporção dos produtos que colocarem no mercado interno, conforme metas progressivas, intermediárias e finais, estabelecidas no instrumento que determinar a implementação da logística reversa.

A PNRS define Logística Reversa como: instrumento de desenvolvimento econômico e social caracterizado por um conjunto de ações, procedimentos e meios, destinados a viabilizar a coleta e a restituição dos resíduos sólidos ao setor empresarial, para reaproveitamento, em seu ciclo ou em outros ciclos produtivos, ou outra destinação final ambientalmente adequada (Brasil, 2010).

A PNRS prevê, portanto, a implantação e operacionalização dos sistemas de logística reversa para a restituição dos resíduos sólidos ao setor empresarial, no intuito de promover o reaproveitamento no ciclo produtivo ou destinação final ambientalmente adequada (Brasil, 2010).

Nos termos do art. 30, parágrafo único, do PNRS, os objetivos da responsabilidade compartilhada consistem em propiciar a compatibilização da gestão ambiental com os processos de gestão empresarial, promovendo o uso de insumos menos agressivos, a redução na geração de resíduos ou o seu respectivo aproveitamento, com o seu direcionamento para a sua própria cadeia produtiva ou para outras que possam lhe oferecer destinação adequada.

Os fabricantes de medicamentos são obrigados a tomar medidas necessárias para a proteção do meio ambiente, de acordo com RDC nº 17 de abril de 2010 que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação (ANVISA, 2010). Devem, assim, tratar e destinar adequadamente os resíduos de medicamentos gerados.

Atualmente a incineração é o tratamento mais utilizado para a eliminação dos resíduos gerados, sendo um processo de redução do peso, volume e das características de periculosidade dos resíduos, com conseqüente eliminação da matéria orgânica e características de patogenicidade, através da combustão controlada (FALQUETO, 2010). Contudo, o processo de incineração representa um

alto gasto para empresa, visto que atualmente custa em torno de R\$ 17,00 o Kilo para resíduos identificados/classificados como GRUPO B.

Drogarias, farmácias, distribuidores e hospitais são considerados estabelecimentos geradores de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS). As Resoluções RDC Anvisa nº 306/04 e Conama nº 358/05 que dispõem sobre o gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde reconhecem explicitamente que os resíduos de alguns medicamentos, contendo substâncias químicas, podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade. (HIRATUKA, 2013)

A Resolução da Diretoria Colegiada, RDC Nº 44, de 17 de agosto de 2009 (ANVISA, 2009), dispõe sobre Boas Práticas Farmacêuticas para o controle sanitário do funcionamento, da dispensação e da comercialização de produtos e da prestação de serviços farmacêuticos em farmácias e drogarias. Somente pontua em seu art. 93 que as farmácias e drogarias estão permitidas a participar de programa de coleta de medicamentos a serem descartados pela comunidade, com vistas a preservar a saúde pública e a qualidade do meio ambiente.

Dentre os programas de coleta de medicamentos a serem descartados pela comunidade, destaca-se o “Programa Descarte Consciente” que objetiva alcançar uma abrangência nacional nas ações de recolhimento de medicamentos não utilizados, que estão em poder da população. Até novembro de 2011, o programa contava com 170 pontos de coleta, em 60 cidades, em 5 Unidades da Federação do Brasil. As instituições envolvidas no Programa são as seguintes: instituições públicas da cidade de São Paulo (Limpurb e Covisa), Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (Abrelpe), Associação Brasileira do Comércio Farmacêutico (ABCFarma), do Centro de Inovação, Empreendedorismo e Tecnologia (Cietec), Drogeria Raia, Drogeria Panvel, Grupo WalMart, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Hospital Alemão Oswaldo Cruz, Farmacêutica Medley e Farmacêutica E.M.S. De acordo com estudo da Anvisa (2011), os resultados preliminares do Programa mostram que foram recolhidos mais de quatro toneladas de medicamentos, seis toneladas de material reciclável (bulas e embalagens) e mais de sete toneladas de vidros e aerossóis num período de 11

meses (HIRATUKA, 2013). Maiores informações podem ser encontradas na página do programa na internet (<http://www.descarteconsciente.com.br/>).

Neste contexto, percebendo a necessidade das indústrias farmacêuticas em buscar alternativas para o uso dos resíduos gerados, foi proposto, neste trabalho, o reaproveitamento em seu ciclo ou em outros ciclos produtivos de medicamentos e/ou matérias primas vencidas ou fora de uso, contribuindo dessa forma com a Logística Reversa. Da mesma maneira, esta dissertação está em consonância com outros dois projetos abordados pela empresa Accert: Fapesp 2012/51338-9 e CNPq 456044/2012-4 (Reciclagem de Fármacos: uma abordagem envolvendo química e biotecnologia verde), com o intuito de desenvolver pesquisas em aspectos fundamentais para a utilização de microorganismos, estratégicos para vários setores da indústria mundial, no desenvolvimento de processos, biotransformação e reciclagem de medicamentos/fármacos.

1.2. PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

O uso de processos biotecnológicos é conhecido pela humanidade há milhares de anos. A fermentação de cereais em grãos para produção de bebidas alcoólicas pelos sumérios e babilônios, há cerca de 6000 a. C., consta como um dos primeiros relatos de processos fermentativos aplicados pelas civilizações antigas (OLIVEIRA, 2009). Desde então, inúmeros são os relatos do uso de processos biotecnológicos para a produção principalmente de bebidas e alimentos, como queijos e iogurtes, embora os agentes responsáveis por esses processos ainda fossem desconhecidos (LERESCHE, 2006).

Atualmente, tais microrganismos são empregados pela indústria biotecnológica para a produção de inúmeros compostos bioativos, como enzimas, insumos agrícolas, precursores e medicamentos de ação humana e animal, além de outros metabólitos com usos diversos. Como exemplo, podemos citar os processos de síntese dos fármacos (1R-2S)-efedrina com atividade beta-adrenérgica mediado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e dos antibióticos ampicilina, amoxicilina, cefalexina e cefadroxil, utilizando-se a enzima Penicilina acilase (CONTI, 2001).

A utilização destes microrganismos na indústria constitui um setor fundamental para a economia moderna. Embora o Brasil ainda ocupe uma posição pouco expressiva neste mercado, os investimentos neste setor têm crescido

consideravelmente nos últimos anos (SMEDSGAARD, 2005). Contudo, o número total de empresas ainda é muito pequeno, se comparado com potências econômicas como Estados Unidos, China e Europa.

Em 2014, por exemplo, o déficit da balança comercial brasileira, envolvendo os chamados “compostos finos”, produzidos a partir de síntese orgânica, biotecnologia ou suas especialidades, foi de US\$ 9,52 bilhões, um crescimento de 21,67 % com relação a 2013, segundo a ABIFINA (ABIFINA). Isso ocorre, pois a imensa maioria destes compostos químicos são produzidos fora do Brasil, onerando toda a cadeia produtiva e fazendo com que o preço praticado para o consumidor final seja muito elevado. Além disso, muitas vezes algumas dessas substâncias chegam ao Brasil tendo passado por um precário sistema de controle sanitário. O maior peso na composição desse desequilíbrio está associado ao mercado farmacêutico, com a importação de medicamentos, farmoquímicos e vacinas, que contribuem com aproximadamente 70% deste déficit. Estes produtos constituem matéria-prima ou produtos já acabados que serão destinados ao consumo humano.

1.2.1. Biotransformação e Biocatálise

Nos processos de biotransformação, um agente biológico é utilizado para a conversão de um substrato por um número limitado de etapas, sendo uma(s) enzima(s) o principal agente dessas reações (OLIVEIRA, 2009). O emprego destes biocatalizadores tem sido aplicado desde 1858, quando Luis Pasteur utilizou o fungo *Penicillium glaucum* para a obtenção do L-tartarato de amônio a partir do D-tartarato de amônio.

Outro exemplo, já estudado na empresa Accert, envolve a biotransformação da cafeína pelo fungo *Penicillium sp* para gerar a teofilina. Através dos experimentos realizados, foi possível identificar que uma de nossas cepas do microorganismo *P. sp* efetua desmetilações na posição N-7 destes tipos de xantinas (bases purínicas), possivelmente através do sistema enzimático citocromo P450. Este sistema é um dos mais importantes para os processos oxidativos naturais (GUENGERICH, 2001).

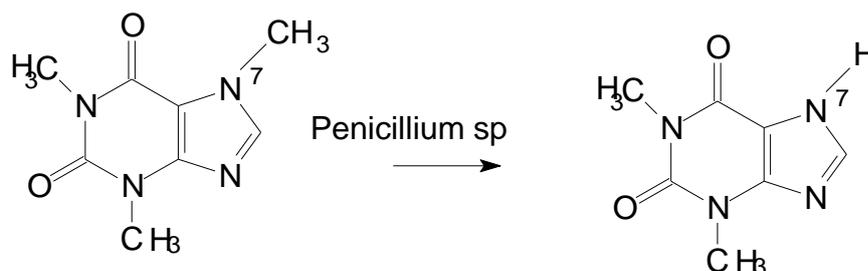


FIGURA 1.1. Reação enzimática observada para a cafeína, realizada pelo microorganismo *Penicillium sp.*

A biocatálise é uma ferramenta bastante versátil e está cada vez mais presente na indústria química. A princípio, todos os seres vivos são fontes de biocatalisadores e as enzimas presentes podem ser utilizadas nos mais diversos tipos de reações orgânicas (OMORI, 2012).

O processo de biocatálise ou biotransformação é geralmente iniciado, a partir da escolha de um biocatalisador, capaz de promover reações químicas altamente específicas, (químio, régio e enantiosseletivas), tendo-se em vista as condições para que esta reação ocorra e a velocidade que a transformação desejada é efetuada. Estes pontos envolvem atributos relacionados a bases estruturais e mecânicas das transformações químicas (OLIVEIRA, 2009), (KOELLER, 2001).

As enzimas que operam em sistemas vivos atuam em sistemas aquosos com fino ajuste de pH (tamponados) e com controle de força iônica (composição de micronutrientes). Ao longo da concepção de um processo envolvendo biocatálise, é importante atentar-se aos fatores relacionados ao tempo de vida útil do biocatalisador e à sua manutenção em meios artificiais. (OLIVEIRA, 2009), (LIU, 2007).

No processo de escolha de um biocatalisador, é importante avaliar se o conjunto enzimático a ser explorado constitui uma célula íntegra ou um extrato enzimático puro ou parcialmente purificado. Entre as vantagens em se utilizar enzimas isoladas puras ou parcialmente purificadas, estão a alta especificidade, maior produtividade e facilidade de isolamento dos produtos, embora os fatores relacionados a custo, disponibilidade da enzima e inexistência de sistemas apropriados de regeneração de cofatores para determinadas classes enzimáticas possam inviabilizar sua aplicação (OLIVEIRA, 2009), (KOELLER, 2001).

Neste sentido, a utilização de microorganismos “inteiros” surge como uma alternativa elegante e de baixo custo para determinados processos biotecnológicos, principalmente pela robustez e fácil manipulação das cepas microbianas. Contudo, os produtos gerados normalmente estão presentes em matrizes mais complexas, o que dificulta o processo de isolamento dos mesmos. Além disso, o ajuste fino das condições de fermentação pode inserir mais variáveis ao processo como um todo.

Os biocatalisadores apresentam características que os diferenciam dos catalisadores químicos, e estão intrinsecamente ligados aos princípios da Química Verde. Dentre estas características, podem-se citar como exemplos: condições brandas de reação, pois o solvente utilizado geralmente é a água; o uso de reagentes degradáveis, uma vez que os catalisadores são enzimas de plantas, animais, ou são microorganismos e podem ser decompostos no ambiente após o uso (OMORI, 2012).

Dentro deste contexto, pretendeu-se desenvolver procedimentos que envolviam biocatálise e biotransformação de substratos específicos (abrangendo alguns dos principais medicamentos e fármacos que geram resíduos para a indústria farmacêutica nacional), no sentido de verificar se novas substâncias químicas ativas poderiam ser obtidas, em especial aquelas com potencial ação farmacológica.

1.2.2. Moléculas a serem metabolizadas

O principal referencial para a escolha dos fármacos que foram utilizados como material de partida foi o interesse do setor farmacêutico nestas moléculas. Tal interesse muitas vezes é dirigido por aspectos mercadológicos e regulatórios e um dos desafios, deste presente projeto, foi a capacidade de adaptação das tecnologias em desenvolvimento a tais necessidades.

Os fármacos utilizados como material de partida foram: Sinvastatina, Cloridrato de Propranolol, Succinato de Metoprolol, Carbamazepina e Ácido Micofenólico (FIGURA 1.2 à FIGURA 1.6) com o intuito de obter, através do processo de biotransformação, as moléculas Hidroxi Ácido Sinvastatina, 4-hidroxi propranolol, alfa-hidroximetoprolol e adicionar grupos hidroxilas na Carbamazepina e no Ácido Micofenólico.

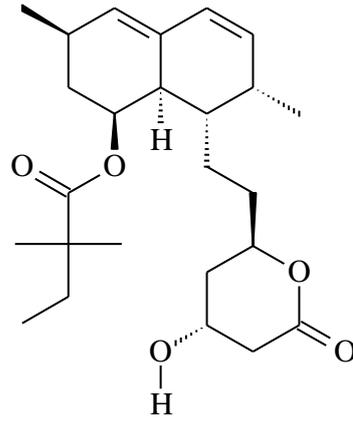


FIGURA 1.2. Simvastatina, *mw*: 418,566 g/mol.

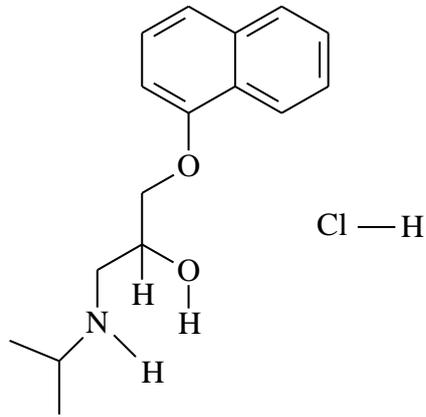


FIGURA 1.3. Cloridrato de Propranolol, *mw*: 295,804 g/mol.

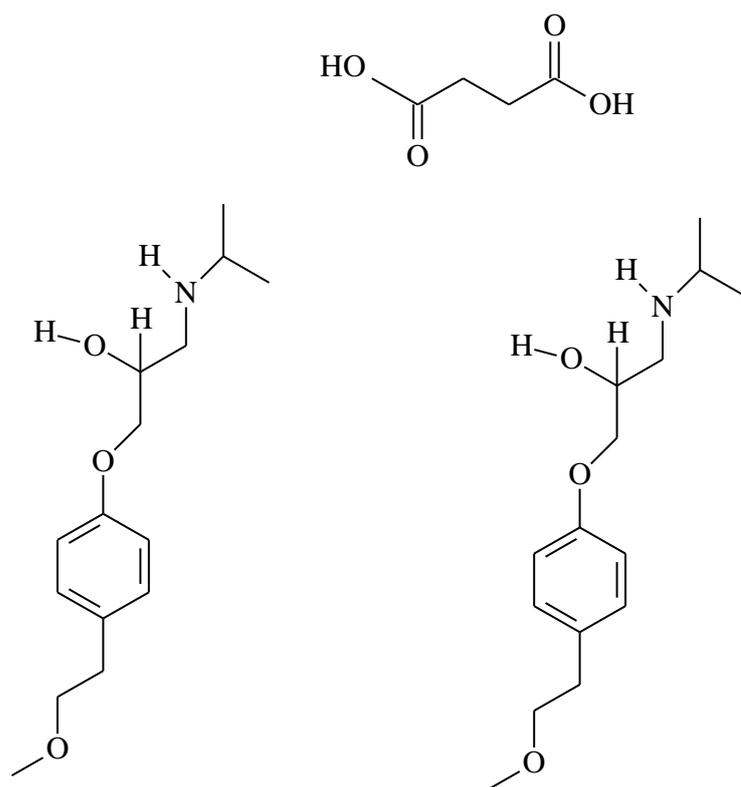


FIGURA 1.4. Succinato de Metoprolol, *mw*: 652,816 g/mol.

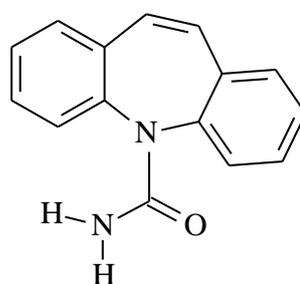


FIGURA 1.5. Carbamazepina, *mw*: 236,268 g/mol.

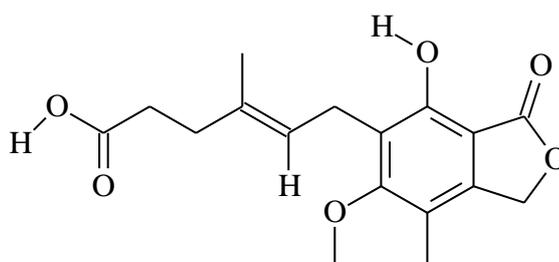


FIGURA 1.6. Ácido Micofenólico, *mw*: 320,337 g/mol.

1.3. Controle de Qualidade

Além da fermentação e / ou biocatálise, uma etapa fundamental para a avaliação da eficiência do processo de obtenção dos metabólitos é o controle de qualidade dos produtos obtidos. Para quantificar ou identificar substâncias de qualquer natureza, é necessário, na maioria dos casos, separar o composto de interesse dos demais elementos constituintes da amostra. Quanto mais pura e homogênea a substância a ser analisada, menores serão as possibilidades de erro na sua identificação e quantificação. Dentre as principais técnicas de separação utilizadas, a cromatografia vem sendo, há mais de meio século, a grande responsável pelo avanço e aperfeiçoamento dos métodos de análise empregados em controle de qualidade. Versatilidade, rapidez, precisão, baixo custo, robustez e flexibilidade são algumas das diversas características positivas dessa técnica (GIL, 2007).

Na indústria farmacêutica, por exemplo, os métodos cromatográficos são os mais aplicados no doseamento dos produtos de interesse. Entre eles, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) está presente como método de escolha para mais de 90% dos produtos constantes nas monografias da Farmacopéia Americana (SILVA, 1998).

Na indústria química em geral, a associação de ferramentas quimiométricas com técnicas instrumentais (espectroscopia NIR, RMN, UV/Vis, GC, HPLC, fluorescência de Raio-X, DSC) são empregadas no desenvolvimento de métodos analíticos para controle de qualidade, qualificação de matéria prima e controle de processos. No Brasil, o seu avanço ainda é tímido, e as principais áreas que empregam estes métodos são as Indústrias de Alimentos, Papel e Celulose, Petróleo, e mais recentemente, a Indústria Farmacêutica, mas o seu potencial se estende a todas as áreas da Química (RIBEIRO, 2007).

1.4. QUIMIOMETRIA

A Quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico. (SOUZA, 2012)

A utilização de técnicas de análise multivariada em dados cromatográficos favorece a obtenção de resultados de forma rápida e eficaz, ao associarem conhecimentos de matemática, estatística e química, tanto para o desenvolvimento de métodos de separação quanto para análise dos dados obtidos com os cromatogramas. As aplicações dessas ferramentas em cromatografia são amplas e diversificadas e um dos enfoques que têm sido mais difundido nos trabalhos de cromatografia associados à quimiometria é o desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos com redução de tempo de análise, do custo e da produção de resíduos, além da substituição de solventes por opções de menor toxicidade, sem perda significativa da qualidade da separação (princípios coerentes com os atuais conceitos de química verde). (CASS e CASSIANO, 2015)

Uma das respostas a ser avaliada nas análises cromatográficas é o parâmetro resolução. A resolução mede a qualidade da separação entre duas bandas adjacentes. Leva em conta as larguras das bandas, além de seus respectivos tempos de retenção. De acordo com a Farmacopeia Americana (USP), pode ser calculada conforme a equação 1.

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} \text{ (Equação 1)}$$

Onde: R_s é resolução, t_{R1} e t_{R2} são tempo de retenção dos dois componentes e W_1 e W_2 são as larguras correspondentes dos dois componentes.

A resolução de 1,5 conhecida como *baseline resolution* (separação na linha de base) corresponde ao menor valor em que ocorre a separação total entre duas bandas cromatográficas adjacentes.

Métodos quimiométricos foram utilizados, no decorrer do projeto, com o intuito de otimizar os processos de fermentação, extração e cromatografia. Para avaliação do processo fermentativo, foi realizado um planejamento fatorial completo onde o intuito foi avaliar, dentro de um elevado número de variáveis, aquela ou aquelas que apresentam maior importância ou efeito sobre a resposta (aumento na produção de produtos de biotransformação).

Em um planejamento fatorial, como o aqui empregado, são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Normalmente, os

níveis dos fatores quantitativos (i.e. concentrações de uma substância, valores de pH, etc.) são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto. Porém, o que importa é a relação inicial entre o sinal dado e o efeito obtido, não sendo um critério definido a nomeação dos sinais. Para fatores qualitativos (i.e. tipos de ácidos, tipos de catalisadores, etc.), como não existem valores altos ou baixos, fica a critério do experimentalista nomear os seus níveis (TEÓFILO, 2006).

Com o uso de planejamento fatorial, é possível:

- ✓ observar interações sinérgicas ou antagônicas entre as variáveis;
- ✓ prever a resposta do sistema em estudo em uma condição que não foi testada na prática;
- ✓ conhecer antecipadamente quantos experimentos deverão ser realizados para alcançar determinado objetivo;
- ✓ e gerar menos resíduos químicos, o que contribui para os princípios de química verde e economia de tempo (PEREIRA FILHO, 2015).

Já para o processo de extração, utilizou-se um planejamento experimental de mistura ternária. Misturas ternárias são constituídas por três componentes e suas propriedades finais são determinadas pelas proporções de seus componentes. A soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%. Para uma mistura qualquer de q componentes, podemos escrever a equação 2:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \text{ (Equação 2)}$$

onde x_i representa a proporção do i -ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, só é necessário fixar as proporções de $q-1$ componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100% (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

Uma mistura de três componentes obedecerá à restrição: $X_1+X_2+X_3=1$, que define um triângulo equilátero. Todas as composições possíveis de uma mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, enquanto os

pontos situados no interior do triângulo representam misturas de três componentes (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

Por fim, o método analítico através de HPLC-DAD foi otimizado para a quantificação do metabólito de interesse, para tanto foi realizado um planejamento composto central.

A proposta do planejamento composto central é efetuar um ajuste fino das variáveis mais importantes, no sentido de propor modelos empíricos locais que correlacionem as variáveis estudadas com as respostas que estão sendo monitoradas (PEREIRA FILHO, 2015).

Em geral, um planejamento composto central para k fatores, devidamente codificados como (x_1, \dots, x_k) , é formado de três partes (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010):

- a) Uma parte chamada fatorial (ou cúbica), contendo um total de n_{fat} pontos de coordenadas $x_i = -1$ ou $x_i = +1$, para todos os $i = 1, \dots, k$;
- b) Uma parte axial (ou estrela), formada por $n_{ax} = 2k$ pontos com todas as coordenadas nulas, exceto uma, que é igual a um certo valor α (ou $-\alpha$);
- c) Um total de n_{centr} ensaios realizados no ponto central, onde é claro, $x_1 = \dots, x_k = 0$.

O planejamento Composto Central é uma opção interessante para a geração de modelos quadráticos devido ao fato de ser uma ampliação natural do planejamento fatorial com ponto central, o qual pode ser realizado em uma primeira etapa. A este planejamento inicial, são adicionados pontos axiais (planejamento em estrela) que fornecem os níveis adicionais para o cálculo dos coeficientes do modelo quadrático. A distância dos pontos axiais ao centro do planejamento é $\pm \alpha$, sendo que α pode variar de 1 até \sqrt{k} , onde k é o número de variáveis. O valor de α depende de certas propriedades desejáveis para o planejamento e da possibilidade de realização de experimentos ao longo do domínio experimental (BREITKREITZ, 2014).

Uma etapa muito importante é a avaliação dos modelos construídos, ou seja, sua adequação às respostas obtidas experimentalmente, a qual ditará sua capacidade de previsão. Este diagnóstico pode ser realizado de diversas maneiras, sendo as mais comuns a Análise da Variância (ANOVA), a avaliação do gráfico de resíduos (diferenças entre os valores obtidos experimentalmente e aqueles previstos

pelo modelo) e gráfico de valores experimentais versus valores previstos pelo modelo. Enquanto o gráfico de resíduos deve apresentar um padrão aleatório, o gráfico de valores experimentais versus valores previstos deve conter os pontos próximos a uma reta com inclinação de 45° e intercepto próximo a zero (BREITKREITZ, 2014).

Outra forma de avaliar as respostas foi utilizando a metodologia de otimização simultânea proposta por G. C. Derringer e R. Suich (1980). As funções de desejabilidade, tem como princípio a transformação das várias respostas em uma única resposta por meio de transformações matemáticas.

O método de Derringer e Suich se baseia na definição de uma função de desejabilidade para cada resposta, com valores restritos ao intervalo $[0, 1]$. Zero significa um valor inaceitável, e 1 o valor mais desejável. A natureza da função depende dos objetivos do experimento (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

Uma vez que as funções de desejabilidade tenham sido especificadas para todas as respostas, devemos combiná-las em uma desejabilidade global, normalmente dada pela média geométrica das m desejabilidades individuais conforme equação 3 (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

$$D = \sqrt[m]{d_1 \cdot d_2 \cdot \dots \cdot d_m} \quad (\text{Equação 3})$$

Dessa forma, a otimização simultânea das várias respostas se reduz à maximização de um único valor, a desejabilidade global.

No caso de otimização para um valor alvo, ou seja, um valor intermediário que não seja uma maximização ou minimização utiliza-se A como valor alvo ótimo cujos limites inferior e superior são representados por LI e LS , respectivamente. Nesse caso, a função de desejabilidade da resposta é definida pelas equações 4 a 6 (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

$$d = \left(\frac{\hat{y} - LI}{A - LI} \right)^s, \text{ para } LI \leq \hat{y} \leq A; \quad (\text{Equação 4})$$

$$d = \left(\frac{\hat{y} - LS}{A - LS} \right)^t, \text{ para } A \leq \hat{y} \leq LS; \quad (\text{Equação 5})$$

$d = 0$, para \hat{y} fora do intervalo (LI, LS) (Equação 6)

onde \hat{y} , é a resposta e s e t são expoentes.

Pode-se observar que o valor d está restrito ao intervalo $[0, 1]$. Uma desejabilidade igual a 1 só será obtida se a resposta coincidir exatamente com o valor-alvo, e tornar os numeradores das frações iguais aos respectivos denominadores. À medida que o valor de \hat{y} se afasta do alvo A , o valor da desejabilidade irá caindo, tornando-se zero quando um dos limites da faixa de aceitação for alcançado (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

A taxa de variação da desejabilidade com a resposta estimada pelo modelo é definida pelos valores dos expoentes s e t . Fazendo-os variar, podemos acelerá-la ou retardá-la, e assim atribuir diferentes desejabilidades aos diversos níveis da resposta (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

Muitas vezes não temos um valor-alvo, e sim um limite unilateral, acima ou abaixo (maximização ou minimização) do qual queremos que a resposta fique. Nestes casos, as equações se resumem a:

$$d = \left(\frac{\hat{y} - LI}{LS - LI} \right)^t, \text{ para } LI \leq \hat{y} \leq LS; \text{ (Equação 7)}$$

$$d = 0, \text{ para } \hat{y} \leq LI \text{ e } d = 1 \text{ para } \hat{y} \geq LS; \text{ (Equações 8 e 9)}$$

para maximização e;

$$d = \left(\frac{\hat{y} - LS}{LI - LS} \right)^t, \text{ para } LI \leq \hat{y} \leq LS; \text{ (Equação 10)}$$

$$d = 0, \text{ para } \hat{y} \geq LS \text{ e } d = 1 \text{ para } \hat{y} \leq LI; \text{ (Equações 11 e 12)}$$

para minimização.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Foram propostos três objetivos para o presente trabalho:

- ✓ Utilizar microorganismos no desenvolvimento de processos de biocatálise e biotransformação, visando à reciclagem de medicamentos e fármacos vencidos, ou fora de uso e contribuir para a eliminação do resíduo da indústria farmacêutica.
- ✓ Empregar métodos quimiométricos de otimização durante o desenvolvimento dos processos de fermentação e extração.
- ✓ Desenvolver métodos cromatográficos otimizados, utilizando planejamento experimental multivariado, para determinar a concentração de produtos de degradação de fármacos gerados via biotransformação por fungos dos gêneros *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos, acessórios e materiais utilizados foram:

- Cromatógrafo Líquido Waters modelo *H-Class*, equipado com detector de DAD e ELSD (Waters, USA);
- Cromatógrafo Líquido Shimadzu equipado com detector de DAD e RID (Shimadzu, JP);
- Espectrômetro de Massas Quattro Premier XE (*triple-quadupole*, ESI/APCI, Micromass – Waters, Manchester, UK);
- Centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Alemanha);
- Balança eletrônica com capacidade de 3100 gramas (Ohaus, EUA);
- Balança analítica com capacidade de 210 gramas (Ohaus, EUA);
- Capela de Exaustão de Gases (Multi Science, Brasil);
- Sistema de Purificação de Água (Megapurity, EUA);
- Cabine de biossegurança – capela de fluxo laminar (Veco, Brasil);
- Evaporador rotativo RD 10 digital (IKA, Suécia);
- Agitador magnético com aquecimento (IKA, Suécia);
- Incubadora de Bancada Shaker Refrigerada (Nova Ética, Brasil);
- Incubadora BOD 411-D (*Biochemical Oxygen Demand*) (Nova Ética, Brasil);
- Estufa de Esterilização e Secagem 400-5ND (Nova Ética, Brasil);
- pHmetro B500 (Ion, Brasil);
- Agitador de tubos AP66 (Phoenix, Brasil);
- Bomba de vácuo ME-1C (Vacuubrand, Alemanha);
- Autoclave CS 75L (Primatec, Brasil);
- Micropipeta 100-1000 μL , (Eppendorf, Alemanha);
- Micropipeta 10-100 μL , (Eppendorf, Alemanha);
- Micropipeta 1-10 μL , (Eppendorf, Alemanha);
- Vidrarias em geral.

3.2. REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

- Colunas cromatográficas para HPLC (diversas marcas e modelos);

- Materiais plásticos em geral (tubos *corning*, ponteiras, etc...);
- Materiais para trabalho com microrganismos (lâminas, bisturis, alça de platina, algodão hidrofóbico, placas de petri descartáveis etc...);
- Papel de filtro qualitativo (84g ϕ =12,5 cm) Boeco;
- Filtro para seringa 0,22 e 0,45 μ m;
- Solventes grau analítico em geral;
- Solventes grau HPLC;
- Meios de cultura e aditivos em geral;
- Reagentes em geral;

3.3. PREPARO DE SOLUÇÕES

Preparo do Meio BDA: Em um Erlenmeyer de 500 mL foi adicionado uma massa de 9,75 g de meio BDA desidratado. Em seguida adicionou-se 250 mL de água ultrapura, solubilizou-se o meio e esterilizou-se em autoclave por 15 minutos a 121 °C e 1 atm de pressão. Após autoclavado o meio líquido foi vertido para as placas de Petri, aproximadamente 25 mL em cada. Após resfriado totalmente, os meios foram armazenados por dois dias a fim de verificar possíveis contaminações.

Preparo do Meio líquido Czapek com extrato de levedura: em um Erlenmeyer de 2L, foram adicionados 4,5 g de nitrato de sódio (NaNO_3), 1,5 g de fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), 0,75 g de cloreto de potássio (KCl), 0,75 g de sulfato de magnésio (MgSO_4), 0,015g de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 45 g de glicose, 30 g de extrato de levedura e 1,5 L de água ultrapura; agitou-se até a completa dissolução dos sais. Homogeneizada a solução, fracionou-se 60 mL de meio em frascos erlenmeyers e esterilizou-se em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C e 1 atm de pressão.

Solução de fármacos (material de partida) para inoculação nos fungos: Todos os fármacos utilizados foram preparados para que, ao final do procedimento, tivessem a concentração de 100 mg/mL por frasco. Para a preparação da solução, pesou-se 1,5 g de cada fármaco em frascos separados e adicionou-se a cada um dos frascos seus respectivos solventes, de forma que ocorresse a solubilização completa dos mesmos. Os solventes utilizados estão descritos na Tabela 3.1.

TABELA 3.1. Preparo das soluções de fármacos.

| Fármaco | Sigla | Fármaco (g) | Solvente | V Solvente (mL) |
|---------------------------|-------|-------------|------------------------|-----------------|
| Sinvastatina | SV | 1,5 | Etanol | 15 |
| Ácido Micofenólico | MICO | 1,5 | Água ultra pura | 15 |
| Carbamazepina | CBZ | 1,5 | Etanol:clorofórmio 1:1 | 15 |
| Cloridrato de Propranolol | CPRO | 1,5 | Água ultra pura | 15 |
| Succinato de Metoprolol | SMET | 1,5 | Água ultra pura | 15 |

3.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE FÁRMACOS POR ESPÉCIES DE *Penicillium* E *Aspergillus*

Os fungos utilizados para promover a biotransformação dos fármacos Sinvastatina, Ácido Micofenólico, Carbamazepina, Cloridrato de Propranolol e Succinato de Metoprolol, neste trabalho, foram *Penicillium* sp, *Penicillium griseoroseum*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus Níger*.

3.4.1. CULTIVO DOS FUNGOS *Penicillium*

As cepas fúngicas, de *Penicillium* sp e *Penicillium griseoroseum*, utilizadas estão depositadas no micobanco da empresa Accert.

Para cultivar um microrganismo como o *Penicillium* sp e *Penicillium griseoroseum* utilizou-se um meio de cultura esterilizado e adicionamos a ele uma pequena quantidade de material, contendo células vivas deste fungo; a este material damos o nome de inóculo e à adição do inóculo ao meio estéril chamamos de inoculação.

Para dar início aos experimentos, a ativação das cepas ocorreu através da inoculação de repiques (0,5 x 0,5 cm) dos fungos, separadamente em placas de Petri, contendo meio BDA (Batata -Dextrose - Ágar). O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com material autoclavado e estéril. Os inóculos foram então incubados, por 7 dias, em câmara BOD (*Biological Oxygen Demand*) a 25° C para atingirem crescimento satisfatório, como pode ser visto na FIGURA 3.1.

Para a realização dos experimentos, as cepas ativadas foram cultivadas em meio líquido Czapek. Após o crescimento dos microrganismos na placa de Petri, transferiram-se dois pedaços de 1 cm² para frascos Erlenmeyers de 250 mL (fermentação submersa – SmF – com 60 mL de meio em cada frasco). Todos os frascos foram previamente autoclavados uma vez a 121 °C por 15 minutos. Em seguida, os frascos foram transferidos para shaker (mesa agitadora) e aguardou-se o crescimento durante 4 dias a 27 °C e 160 rpm.

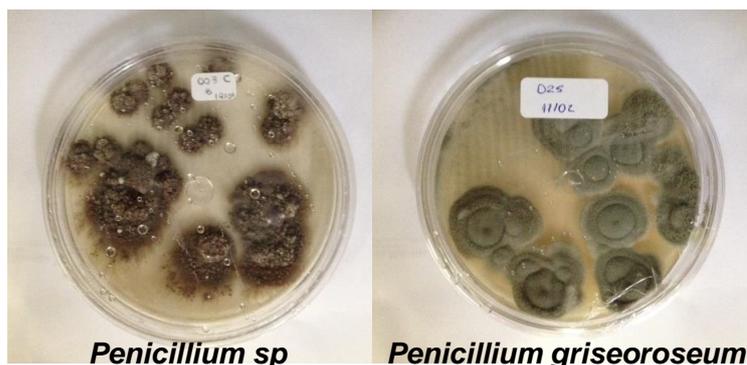


FIGURA 3.1. Placas de Petri contendo o fungo *P. sp.*(003) e *P. griseoroseum* (025).

3.4.2. ADIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE AO *Penicillium*

Foram destinados, para cada fungo, 10 Erlenmeyers, que corresponderam a duplicatas das substâncias de interesse e foram identificadas de acordo com a Tabela 3.2

Após 4 dias, retiraram-se os frascos do shaker e foram adicionados 3 mL das substâncias de interesse Succinato de Metoprolol (SMET), Cloridrato de Propranolol (CPRO), Sinvastatina (SV), Carbamazepina (CBZ), Ácido Micofenólico (MICO) na concentração 100 mg/mL em seus respectivos frascos. Retornaram-se os frascos para o shaker nas mesmas condições (27 °C e 160 rpm) e aguardou-se mais 15 dias até o final da fermentação.

TABELA 3.2. Identificação dos frascos Erlenmeyers.

| Fungo | Substância de Interesse | | | | |
|--------|-------------------------|--------|--------|-------|--------|
| | 003 | SMET A | CPRO A | SV A | CBZ A |
| SMET B | | CPRO B | SV B | CBZ B | MICO B |
| 025 | SMET A | CPRO A | SV A | CBZ A | MICO A |
| | SMET B | CPRO B | SV B | CBZ B | MICO B |

003 = *Penicillium sp.*; 025 = *Penicillium griseoroseum*

3.4.3. EXTRAÇÃO E ANÁLISE POR HPLC-DAD E HPLC-MS/MS DO *Penicillium*

Após 15 dias, filtrou-se o inóculo com o auxílio de funil e papel de filtro. O filtrado foi submetido ao processo de partição líquido-líquido, por 3 vezes, utilizando 25 mL de acetato de etila em cada etapa. A fase orgânica contendo acetato de etila e a fase aquosa resultante da partição foram evaporadas para um volume final de 5 mL em evaporador rotativo, transferidas para um frasco previamente identificado com o valor de massa anotado, então foram submetidos à evaporação até *secura*.

Pesou-se uma alíquota de 1 mg do extrato bruto da fase orgânica do acetato de etila (FO) em microtubo de 2 mL e solubilizou-se com 1 mL de metanol grau HPLC. As amostras (concentração 1mg/mL) foram então submetidas a análise por HPLC-DAD para verificação do perfil dos produtos da reação de biotransformação.

Tomando-se como base a pesquisa bibliográfica realizada previamente, optou-se pelas condições cromatográficas descritas abaixo:

A Fase Móvel utilizada foi 5 mM Acetato de Amônio (bomba A), Ácido Fórmico 1% (bomba B) e Acetonitrila 100% (bomba C). O gradiente utilizado está descrito na Tabela 3.3. A solução de lavagem da agulha foi Metanol:Água (80:20), temperatura da coluna e do amostrador foram 30 °C e 20 °C, respectivamente. Volume de injeção 1 µL, tempo total de corrida 15 minutos e a coluna empregada foi Acquity UPLC BEH Phenyl 1,7 µm 2.1 x 100 mm (Waters), s/n: 01213010215539 ACC_028.

TABELA 3.3. Gradiente de eluição.

| Tempo (min) | Vazão (mL/min) | %A | %B | %C | Curva |
|-------------|----------------|----|----|----|---------|
| Inicial | 0,40 | 85 | 10 | 5 | Inicial |
| 10,00 | 0,40 | 0 | 10 | 90 | 6 |
| 12,00 | 0,40 | 0 | 10 | 90 | 6 |
| 12,10 | 0,40 | 85 | 10 | 5 | 1 |
| 15,00 | 0,40 | 85 | 10 | 5 | 1 |

Na Tabela 3.4. estão descritos os comprimentos de onda utilizados, no DAD foi utilizado 210 – 400 nm para todos os fármacos.

TABELA 3.4. Comprimento de onda.

| Fármaco | Comprimento de Onda (nm) |
|-----------------------|--------------------------|
| Metoprolol | 220 |
| Propranolol | 220 |
| Carbamazepina | 285 |
| Sinvastatina | 238 |
| Micofenolato de Sódio | 250 |

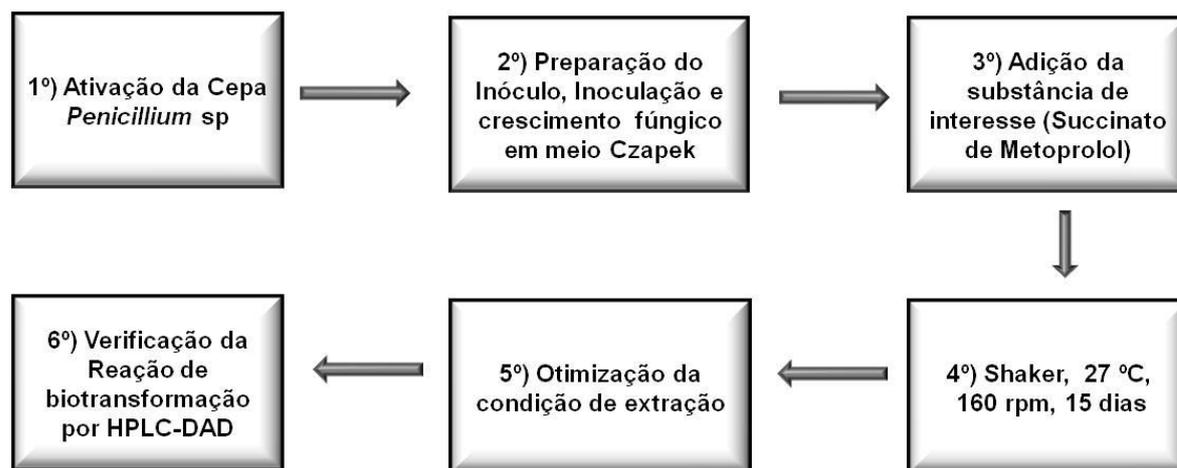
A FIGURA 3.2 ilustra o processo empregado desde a inoculação da cepa fúngica até a análise dos extratos.



FIGURA 3.2. Esquema que ilustra a realização dos estudos.

3.5. PLANEJAMENTO MISTURA TERNÁRIA

Diante dos resultados encontrados para as amostras dos extratos SMET F.O. 003 A e B, o procedimento de reação de biotransformação (Fluxograma 3.1) foi repetido com o intuito de aplicar um planejamento experimental de mistura ternária para otimizar a extração dos metabólitos da fermentação.



FLUXOGRAMA 3.1. Etapas envolvidas no procedimento de biotransformação.

Antes da extração, utilizando planejamento experimental de mistura ternária, foi realizado um teste para verificar se haveria a necessidade de ajustar ou não o pH das amostras.

Para este teste, foi preparado o meio de cultura Czapek (autoclave por 15 min a 121 °C), adicionado uma solução de succinato de metoprolol (SMET) e transferido para shaker por 24 h a 160 rpm. Após o período de 24 h, a amostra foi dividida em nove alíquotas, sendo que, a cada lote de três, estas foram identificadas como: sem ajuste de pH, com ajuste em pH ácido (pH=3,0) e com ajuste em pH básico (pH=10,0). Após os ajustes de pH, as amostras foram submetidas ao processo de extração utilizando acetato de etila como solvente extrator.

As amostras com ajuste de pH 10, foram submetidas ao processo de partição líquido-líquido, utilizando planejamento experimental de mistura ternária, onde foram avaliados os solventes éter, acetato de etila e diclorometano, segundo a TABELA 3.5. O ponto central foi feito em triplicata.

Os valores apresentados representam a fração de cada solvente em cada mistura avaliada.

TABELA 3.5. Planejamento de mistura ternária para partição líquido-líquido.

| Éter | Acetato de Etila | Diclorometano |
|------|------------------|---------------|
| X1 | X2 | X3 |
| 1,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,00 | 1,00 | 0,00 |
| 0,00 | 0,00 | 1,00 |
| 0,50 | 0,50 | 0,00 |
| 0,50 | 0,00 | 0,50 |
| 0,00 | 0,50 | 0,50 |
| 0,33 | 0,33 | 0,33 |
| 0,67 | 0,17 | 0,17 |
| 0,17 | 0,67 | 0,17 |
| 0,17 | 0,17 | 0,67 |

3.6. EXPERIMENTO COM O FUNGO *Aspergillus*

3.6.1. CULTIVO DOS FUNGOS *Aspergillus*

As cepas fúngicas de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, utilizadas neste trabalho, foram cedidas pelo LaBioMMi – Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos de responsabilidade do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, do Departamento de Química da UFSCar e estão depositadas no micobanco da empresa Accert. Estas cepas foram identificadas com a numeração 026, 027 e 028, respectivamente.

Para dar início aos experimentos e a ativação das cepas, realizou-se a inoculação de repiques (0,5 x 0,5 cm) dos fungos, separadamente, em placas contendo meio BDA (Batata - Dextrose - Ágar). O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com material autoclavado e estéril. Os inóculos foram então incubados, por 7 dias em câmara BOD a 25 °C para atingirem crescimento satisfatório, como pode ser visto na FIGURA 3.3

Para a realização dos experimentos, os inóculos foram cultivados em meio líquido Czapek. Após o crescimento dos microrganismos, transferiram-se dois pedaços de 1 cm² para frascos Erlenmeyers de 250 mL (fermentação submersa – SmF – com 60 mL de meio em cada frasco). Todos os frascos foram previamente autoclavados uma vez a 121 °C por 15 minutos. Em seguida, os frascos foram transferidos para shaker (mesa agitadora) e aguardou-se o crescimento, durante 4 dias, a 27 °C e 160 rpm.



FIGURA 3.3. Placas de Petri contendo o fungo *A. aculeatus* (026), *A. flavus* (027) e *A. niger* (028)

3.6.2. ADIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE AO *Aspergillus*

Foram destinados para cada fungo 6 Erlenmeyers, que corresponderam a duplicatas das substâncias de interesse e duplicatas do Controle (meio de cultura + fungo) e foram identificadas de acordo com a TABELA 3.6. Além destes, foram realizados também em duplicata o Branco (meio de cultura) e em simplificada o meio de cultura mais o fármaco.

Decorridos 4 dias, retiraram-se os frascos do shaker e foram adicionados 3 mL das substâncias de interesse Succinato de Metoprolol (SMET) e Carbamazepina (CBZ) na concentração 100 mg/mL em seus respectivos frascos. Retornaram-se os frascos para o shaker nas mesmas condições (27 °C e 160 rpm) e aguardou-se mais 15 dias até o final da fermentação.

TABELA 3.6. Identificação dos frascos Erlenmeyers.

| Fungo | Substância de Interesse | | Controle |
|-------|-------------------------|-------|------------|
| 026 | SMET A | CBZ A | Ctrl 026 A |
| | SMET B | CBZ B | Ctrl 026 B |
| 027 | SMET A | CBZ A | Ctrl 027 A |
| | SMET B | CBZ B | Ctrl 027 B |
| 028 | SMET A | CBZ A | Ctrl 028 A |
| | SMET B | CBZ B | Ctrl 028 B |

026 = *Aspergillus aculeatus*, 027 = *Aspergillus flavus* e 028 = *Aspergillus niger*

O preparo do meio BDA, do meio líquido Czapek com extrato de levedura e das soluções de fármacos estão descritos no item 3.3.

3.6.3. EXTRAÇÃO E ANÁLISE POR HPLC-DAD DO *Aspergillus*

Após 19 dias da inoculação, filtrou-se o inóculo com o auxílio de funil e papel de filtro para separar a fase aquosa do micélio.

Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi submetido ao processo de partição líquido-líquido, por 3 vezes, utilizando 2,5 mL de acetato de etila em cada etapa. A fase orgânica (FO), contendo acetato de etila, foi transferida para um frasco previamente identificado e com o valor de massa anotado. Em seguida, a fase orgânica foi submetida à evaporação em Dry Block até secura e então o frasco foi pesado novamente com o intuito de obter o valor da massa de extrato obtido. As amostras foram solubilizadas com 1 mL de metanol grau HPLC, filtradas com filtro de seringa 0,20 µm (PET) e transferidas para vial. Estas foram submetidas à análise por HPLC-DAD para verificação do perfil dos produtos da reação de biotransformação.

A fase aquosa restante, após partição com acetato de etila, foi centrifugada e filtrada com filtro de seringa 0,20 µm (PET) e transferida para vial. Em seguida foram submetidas à análise por HPLC-DAD para verificar a presença da substância de interesse na fase aquosa.

Tomando-se como base pesquisas bibliográficas realizadas previamente, optou-se pelas condições cromatográficas descritas abaixo:

A Fase Móvel utilizada foi 5 mM Acetato de Amônio (bomba A), Ácido Fórmico 1 % (bomba B) e Acetonitrila 100 % (bomba C) e o gradiente utilizado está descrito na TABELA 3.7. A solução de lavagem da agulha foi Metanol:Água (80:20), temperatura da coluna e do amostrador foram 30 °C e 20 °C, respectivamente. O volume de injeção utilizado foi de 1 µL, o tempo total de corrida 15 minutos e a coluna empregada foi Acquity UPLC BEH Phenyl 1,7 µm 2.1x100mm (Waters), s/n: 01213010215539 ACC_028.

TABELA 3.7. Gradiente de eluição.

| Tempo (min) | Vazão (mL/min) | %A | %B | %C | Curva |
|-------------|----------------|----|----|----|---------|
| Inicial | 0,40 | 85 | 10 | 5 | Inicial |
| 10,00 | 0,40 | 0 | 10 | 90 | 6 |
| 12,00 | 0,40 | 0 | 10 | 90 | 6 |
| 12,10 | 0,40 | 85 | 10 | 5 | 1 |
| 15,00 | 0,40 | 85 | 10 | 5 | 1 |

Na TABELA 3.8 estão descritos os comprimentos de onda utilizados, no DAD foi utilizado 210 – 400 nm para todos os fármacos.

TABELA 3.8. Comprimento de onda.

| Fármaco | Comprimento de Onda (nm) |
|---------------|--------------------------|
| Metoprolol | 220 |
| Carbamazepina | 285 |

A FIGURA 3.4 ilustra o processo empregado desde a inoculação da cepa fúngica até a análise dos extratos.

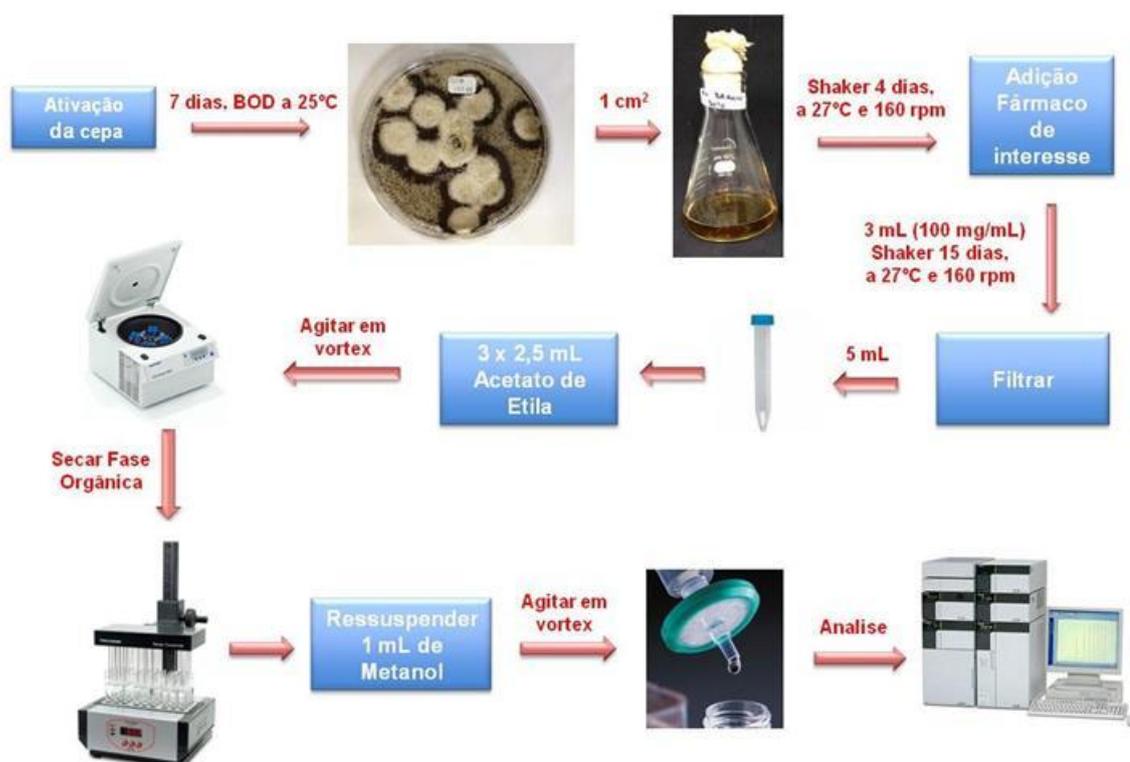


FIGURA 3.4. Etapas do processo.

3.7. BIOTRANSFORMAÇÃO DE SUCCINATO DE METOPROLOL POR *Penicillium sp* - Repetição

O procedimento de reação de biotransformação para o fungo *Penicillium sp*, descrito nos itens 3.4.1 e 3.4.2, foram repetidos com o intuito de transferir a metodologia analítica para escala preparativa, visando a coleta das bandas

cromatográficas de interesse para posterior análise. O método de extração utilizado foi o mesmo descrito no item 3.6.3.

Estabeleceu-se um novo método cromatográfico para o HPLC preparativo, utilizando um modificador de ácido volátil na fase móvel, para não interferir em futuras análises por RMN. Além disso, a fase móvel também deveria ser compatível com o acoplamento ao espectrômetro de massas.

Primeiramente, utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa SHIMADZU Prep-ODS (H) Kit-Shimppack 4,6 x 250 mm, 5 µm. Como fase móvel, utilizou-se um gradiente contendo água e metanol, ambos suplementados com 0,1 % de ácido fórmico. As condições do método cromatográfico desenvolvido estão apresentadas na TABELA 3.9.

A temperatura utilizada na coluna foi de 30 °C, o volume de injeção foi de 12 µL e o detector de DAD foi ajustado para varrer de 190 – 800 nm.

TABELA 3.9. Gradiente utilizado nas corridas cromatográficas.

| Tempo (min) | Vazão (mL/min) | A% | B% |
|-------------|----------------|----|----|
| Início | 1,25 | 95 | 5 |
| 11.00 | 1,25 | 80 | 20 |
| 25.00 | 1,25 | 70 | 30 |
| 50.00 | 1,25 | 40 | 60 |
| 51.00 | 1,25 | 95 | 5 |
| 60.00 | 1,25 | 95 | 5 |

Devido a pouca quantidade de amostra disponível, após a extração, foi decidido realizar as coletas das bandas cromatográficas de interesse em coluna analítica. Para a coleta, utilizou-se sistema automatizado e este processo foi repetido por 20 vezes, evaporando-se o solvente em dry block a 35 °C sob atmosfera de ar comprimido. Este procedimento permitiu a obtenção de cerca de 100 µg de amostra e as bandas cromatográficas coletadas foram identificadas conforme TABELA 3.10.

Em seguida, as amostras (pico 1 até pico 8) foram solubilizadas em 100 µL de metanol e submetidas à novas análises por HPLC-MS, estas amostras também foram submetidas a experimentos de RMN.

TABELA 3.10. Identificação das bandas coletadas.

| | Intervalo do Tempo de Coleta (minutos) | |
|--------|--|----------------------------------|
| | Amostra SMET A 1 pH 10 3,3 mg/mL | Amostra SMET A 2 pH 10 3,8 mg/mL |
| Pico 1 | 14,00 – 14,20 | 14,10 – 14,50 |
| Pico 2 | 14,80 – 15,40 | 14,80 – 15,40 |
| Pico 3 | 16,40 – 17,00 | 16,15 – 16,60 |
| Pico 4 | ----- | 17,45 – 17,70 |
| Pico 5 | 23,80 – 24,55 | 21,40 – 22,00 |
| Pico 6 | 40,40 – 40,60 | 24,00 – 24,25 |
| Pico 7 | 48,30 – 48,70 | 40,50 – 40,90 |
| Pico 8 | 40,70 – 41,00 | ----- |

As condições de ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo de ionização para as bandas coletadas estão descritas na TABELA 3.11.

TABELA 3.11. Condições do espectrômetro de massas para (ESI+).

| | |
|----------------------------------|------|
| Temperatura da Fonte (°C) | 110 |
| Temperatura de Desolvatação (°C) | 350 |
| Capilar (kV) | 3,50 |
| Cone (V) | 20 |
| Gás de Desolvatação (L/hr) | 350 |
| Gás do Cone (L/hr) | 30 |

3.8. OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO

Tendo como objetivo identificar, dentro de um número elevado de variáveis, aquela ou aquelas que apresentam maior importância ou efeito sobre o aumento na produção do metabólito de interesse, foi realizado um planejamento fatorial completo. Foram selecionadas 4 variáveis, dentre elas temperatura da fermentação, agitação, quantidade de açúcar e tipo de açúcar para serem testadas em dois níveis. Em um planejamento fatorial, no qual são testadas quatro variáveis em dois níveis, são realizados $2^4 = 16$ experimentos.

Na realização desse experimento, foi utilizado o fungo *Penicillium sp.*, identificado como 003 e, para inoculação, foram utilizados dois fragmentos (1x1cm²) de micélio fúngico, previamente cultivados em meio BDA, por 7 dias, em câmara

BOD, para cada frasco erlenmeyer. Decorridos 4, dias retiraram-se os frascos do shaker e foram adicionadas 3 mL da substância de interesse Succinato de Metoprolol (SMET), na concentração 100 mg/mL, em seus respectivos frascos. Retornaram-se os frascos para o shaker nas mesmas condições apresentadas na TABELA 3.12 e aguardou-se mais 14 dias até o final da fermentação.

Os 16 experimentos foram realizados em duplicata e, para efeito de comparação, foi realizada uma fermentação, em simplificada com apenas o meio e o microrganismo (controle) para cada uma das condições, além de um frasco “Branco”, para cada um dos meios de cultura, contendo apenas o meio, para verificar uma possível contaminação.

As codificações a serem testadas no planejamento estão descritas nas TABELA 3.12 e TABELA 3.13 que apresentam a configuração dos experimentos realizados.

TABELA 3.12. Variáveis testadas e seus níveis no planejamento fatorial.

| Níveis | Temperatura Fermentação (°C) | Agitação (rpm) | Quantidade de açúcar (g/L) | Tipo de açúcar |
|--------|------------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| -1 | 25 | 60 | 4 | Glicose |
| 1 | 30 | 150 | 40 | Sacarose |

TABELA 3.13. Configuração dos 16 experimentos realizados visando o aumento na produção do metabólito de interesse.

| Experimento | X1 Temperatura Fermentação (°C) | X2 Agitação (rpm) | X3 Quantidade de açúcar (g/L) | X4 Tipo de açúcar |
|-------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 |

A FIGURA 3.5 apresenta os frascos a 25 °C e 60 rpm no início do experimento.



FIGURA 3.5. Amostras antes da adição do fármaco a 25°C e 60 rpm.

Os 16 experimentos foram realizados em duas etapas devido a disponibilidade de apenas dois shakers, conforme TABELA 3.14. Nos oito primeiros, foram utilizadas as temperaturas de 25 °C e 30 °C e velocidade de agitação de 60 rpm. Estes experimentos tiveram início em 14/11/14 e término em 03/12/14. Logo em seguida, no dia 04/12/14, deu-se início aos outros 8 experimentos a temperaturas de 25 °C e 30 °C e velocidade de agitação de 150 rpm com término em 23/12/14.

TABELA 3.14. Data da realização dos experimentos.

| | Experimentos | Início (data) | Adição do Fármaco (data) | Término (data) |
|----------------|---------------|------------------|-----------------------------|-------------------|
| 25°C e 60 rpm | 1, 5, 9 e 13 | 14/11/14 | 19/11/14 | 03/12/14 |
| 30°C e 60 rpm | 2, 6, 10 e 14 | | | |
| 25°C e 150 rpm | 3, 7, 11 e 15 | 04/12/14 | 09/12/14 | 23/12/14 |
| 30°C e 150 rpm | 4, 8, 12 e 16 | | | |

3.9. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A partir do extrato obtido com maior concentração do metabólito de interesse (denominado como pico 2), foi otimizado o método analítico por HPLC-DAD para a quantificação do metabólito. O método otimizado também foi utilizado no controle de qualidade dos produtos purificados obtidos.

Como a técnica HPLC-DAD é de alta precisão existem diversos parâmetros a serem otimizados. Nesse sentido, foi utilizado um planejamento composto central, para estudar a importância e a interação entre as variáveis e, assim, identificar as melhores condições de trabalho de um método analítico.

As variáveis e os seus respectivos valores codificados e não codificados estão apresentados na TABELA 3.15 para o planejamento composto central. Foram testadas 4 variáveis, que variaram de -1,5 até 1,5.

TABELA 3.15. Variáveis testadas e seus níveis no planejamento composto central.

| Níveis | Temperatura | % Ácido Fórmico | Fase B (inicial) | Vazão (mL/min.) |
|--------|-------------|-----------------|------------------|-----------------|
| -1,5 | 26,25 | 0 | 10 | 0,20 |
| -1 | 30 | 0,1 | 15 | 0,30 |
| 0 | 37,5 | 0,3 | 25 | 0,50 |
| 1 | 45 | 0,5 | 35 | 0,70 |
| 1,5 | 48,75 | 0,6 | 40 | 0,80 |

A TABELA 3.16 apresenta os 27 experimentos realizados para as quatro variáveis, cada uma a cinco níveis.

O planejamento composto central foi organizado inicialmente com um planejamento fatorial 2^4 (experimentos de 1 a 16) com as variáveis normalizadas entre -1 e 1. Os experimentos de 17 a 19 são três réplicas no ponto central (variáveis normalizadas em 0). Já os experimentos de 20 a 27 representam os pontos axiais ou estrela (variáveis normalizadas entre -1,5 e 1,5). Foram utilizados os valores -1,5 e 1,5 ao invés de - 2,0 e 2,0, pois a intenção foi não se afastar do ponto central, para não criar uma superfície que não pudesse ser modelada.

A resposta monitorada foi tempo de eluição e resolução do metabólito (pico 2).

TABELA 3.16. Planejamento Composto Central para desenvolvimento de método HPLC-DAD para o metabólito de interesse.

| Experimento | X1 Temperatura | X2 % Ácido Fórmico | X3 Fase B (inicial) | X4 Vazão |
|-------------|-------------------|-----------------------|------------------------|-------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | -1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | -1,5 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 1,5 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | -1,5 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 1,5 | 0 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | -1,5 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 1,5 |

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. PLANEJAMENTO MISTURA TERNÁRIA

Antes da extração, utilizando planejamento experimental de mistura ternária para otimização foi realizado um teste para verificar se haveria a necessidade de ajustar ou não o pH das amostras.

Após os ajustes de pH, as amostras foram submetidas ao processo de extração utilizando acetato de etila como solvente extrator. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.1

TABELA 4.1. Área das amostras no HPLC-DAD.

| | pH = 3 | pH = 10 | pH = sem ajuste |
|---------------|--------|---------|-----------------|
| Frasco 1 F.O. | 23643 | 591666 | 42031 |
| Frasco 2 F.O. | 21289 | 586505 | 48047 |
| Frasco 3 F.O. | 3.678 | 583366 | 41920 |
| Frasco 1 M.C. | 236446 | 3055 | 284950 |
| Frasco 2 M.C. | 239958 | 2834 | 286859 |
| Frasco 3 M.C. | 238776 | 2748 | 286922 |

F.O. = Fase orgânica e M. C. = Meio de Cultura

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que o metoprolol, por possuir um grupo amina em sua estrutura (FIGURA 4.1), quando em pH básico permanece na forma molecular (não protonada), favorecendo sua afinidade pelo solvente orgânico, pois na forma iônica (protonada) teria mais afinidade pelo meio aquoso, como observado nos resultados das amostras M.C.

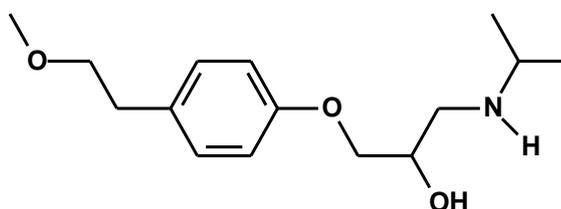


FIGURA 4.1. Fórmula estrutural do Metoprolol.

Os resultados em área, obtidos do planejamento experimental de mistura ternária, para a amostra SMET A, (pH 10 F.O.), referente a banda cromatográfica em

2.65 minutos, estão apresentados na TABELA 4.2. O tratamento dos dados obtidos, foi realizado através da análise de variância (ANOVA), admitindo-se um nível de confiança de 95 %.

TABELA 4.2. Resultados em área da banda cromatográfica em 2,65 min.

| | Mistura | Solvente | Proporção | Resposta (área da banda em 2.65min no HPLC-DAD) |
|---------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------|---|
| pH = 10 | 1 | Éter | 1 | 11307 |
| | 2 | Acetato de Etila | 1 | 21360 |
| | 3 | Diclorometano | 1 | 29823 |
| | 4 | Éter:Acetato de Etila | 1/2:1/2 | 16094 |
| | 5 | Éter:Diclorometano | 1/2:1/2 | 24743 |
| | 6 | Acetato de Etila:Diclorometano | 1/2:1/2 | 30373 |
| | 7 | Éter:Acetato de Etila:Diclorometano | 1/3:1/3:1/3 | 26890 |
| | 7 | Éter:Acetato de Etila:Diclorometano | 1/3:1/3:1/3 | 28160 |
| | 7 | Éter:Acetato de Etila:Diclorometano | 1/3:1/3:1/3 | 26765 |
| | 8 | Éter:Acetato de Etila:Diclorometano | 2/3:1/6:1/6 | 23735 |
| 9 | Éter:Acetato de Etila:Diclorometano | 1/6:2/3:1/6 | 29779 | |
| 10 | Éter:Acetato de Etila:Diclorometano | 1/6:1/6:2/3 | 30571 | |

Os coeficientes de regressão foram calculados através do software Origin (Micronal INC.) e a equação obtida foi $y = 14975,4 * X1 + 25568,8 * X2 + 34357,8 * X3$. A tabela ANOVA para essa equação está apresentada na TABELA 4.3 e foi calculada através do software Microsoft Excel (Microsoft).

TABELA 4.3. Tabela ANOVA.

| Parâmetro | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (MQ) | Teste F | F tabelado (95%) |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|---------|------------------|
| Regressão | 2,83 E+08 | 2 | 1,41 E+08 | 10,44 | 4,26 |
| Resíduo | 1,22 E+08 | 9 | 1,35 E+07 | | |
| Total | 4,04 E+08 | 11 | 3,68 E+07 | | |
| Erro puro | 1,19 E+06 | 2 | 5,96 E+05 | 28,92 | 19,35 |
| Falta de ajuste | 1,21 E+08 | 7 | 1,72 E+07 | | |
| Variância explicada (R ²) | 0,68987 | | | | |

De acordo com os resultados apresentados na TABELA 4.3, a regressão apresentou significância com R² de 0,689 e 68,98 % da variância explicada. O valor

de F calculado ao comparar a MQR e MQres foi de 10,44, ou seja, foi 2,45 vezes maior que o F tabelado, a 95 % de confiança. O desejável é que o F calculado seja cerca de 10 vezes maior que o F tabelado, o que mostraria que o modelo é confiável e poderia ser utilizado para fazer previsões.

Outro teste F analisado foi aquele proveniente da comparação das MQfaj e MQep. O valor de F calculado foi de 28,92 e o F tabelado foi de 19,35 a 95 % de confiança, como o F calculado apresentou um resultado maior que o F tabelado significa que o modelo possui falta de ajuste. Dessa forma, foi possível afirmar que o modelo proposto apresentou falta de ajuste, sendo incapaz de se ajustar aos valores experimentais das respostas.

A variação de uma dada propriedade com a composição da mistura pode ser descrita pela superfície de resposta desenhada acima do triângulo, como na FIGURA 4.2. Esta figura foi feita por interpolação dos valores reais e não pela equação da regressão (a qual não apresenta poder de predição) e é referente à amostra SMET A, pH 10 F.O. para a banda cromatográfica em 2.65 minutos.

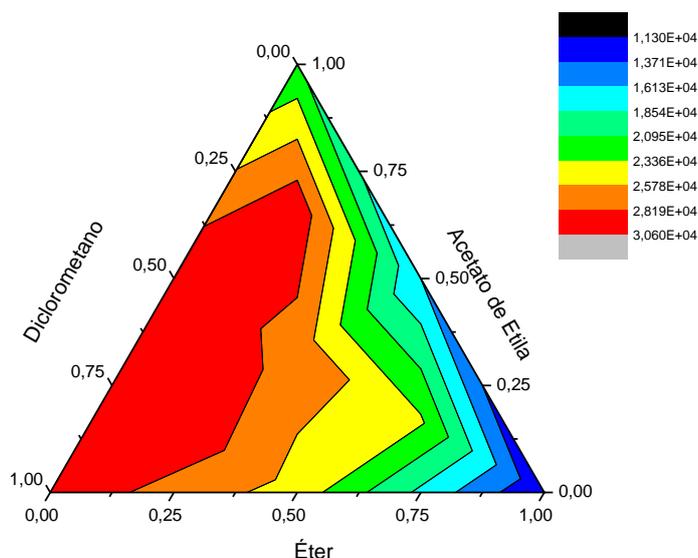


FIGURA 4.2. Gráfico de mistura ternária para a banda em 2.65 min.

Foi possível observar, através do gráfico, que a mistura de solventes que melhor extrai o composto com tempo de retenção em 2.65 minutos, é o diclorometano com acetato de etila com proporções variando entre 1/2:1/2. Porém, na prática, optou-se por continuar o processo de extração com acetato de etila

100%, pois a mistura diclorometano com acetato de etila (50:50) apresentou a formação de micelas dificultando o processo de extração.

4.2. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE FÁRMACOS POR ESPÉCIES DE *Penicillium* E *Aspergillus*

4.2.1. RESULTADOS EXPERIMENTAIS DOS FUNGOS *Penicillium sp* e *Penicillium griseoroseum*

Os cromatogramas obtidos pela técnica de HPLC-DAD, descrita no item 3.4.3, das amostras que apresentaram um perfil maior de biotransformação, estão apresentados na sequência (Figura 4.3 e Figura 4.4). Foi possível observar outras bandas cromatográficas além do Succinato de Metoprolol, indicativos de produtos de biotransformação. Os cromatogramas das amostras nas quais houve pouco produto de biotransformação estão no anexo I.

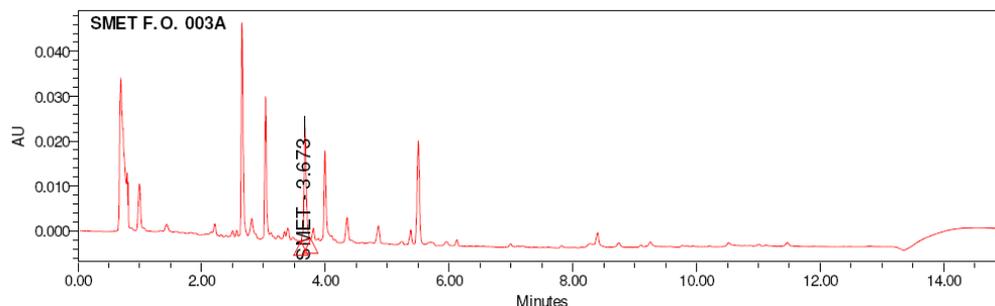


FIGURA 4.3. Cromatograma da amostra SMET A, FO, 003 em 274 nm.

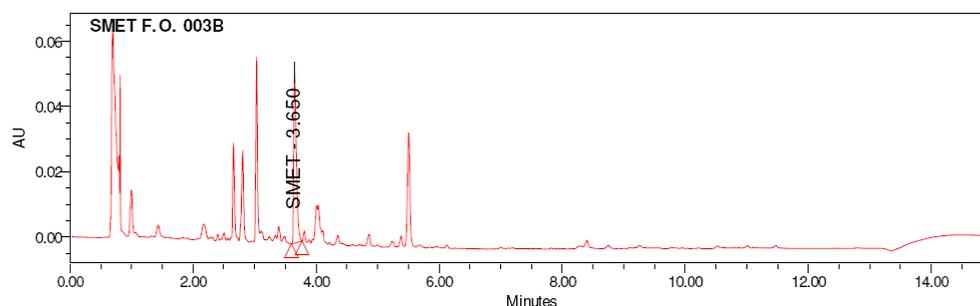


FIGURA 4.4 Cromatograma da amostra SMET B, FO, 003 em 274 nm.

Os extratos de SMET e CPRO 003 e 025 foram analisados também por HPLC-MS e HPLC-MS/MS em modo *Scan* positivo de análises, pois conforme observado nos cromatogramas de ultravioleta (anexo I), apresentaram novas bandas cromatográficas, quando comparadas com o controle, evidenciando o surgimento de moléculas que podem ser produtos de biotransformação. Os Cromatogramas de Ions Totais (TIC) obtidos estão apresentados na Figura 4.5 e Figura 4.6 para SMET 003 A e B, respectivamente, e no anexo I para SMET 025 e CPRO 003 e 025.

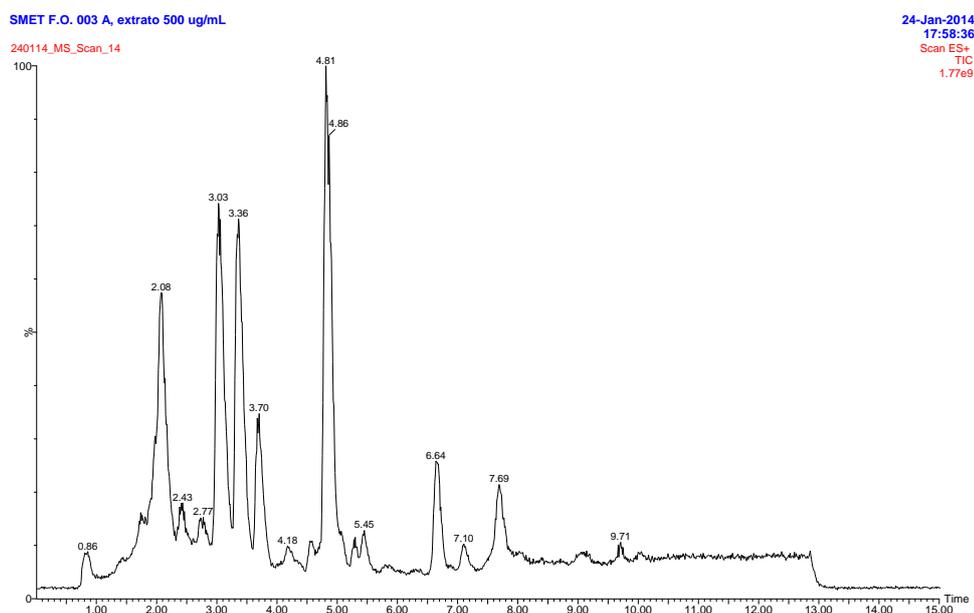


FIGURA 4.5 Cromatograma de íons totais no modo *scan* positivo, amostra SMET F.O. 003 A, extrato 500 µg/mL.

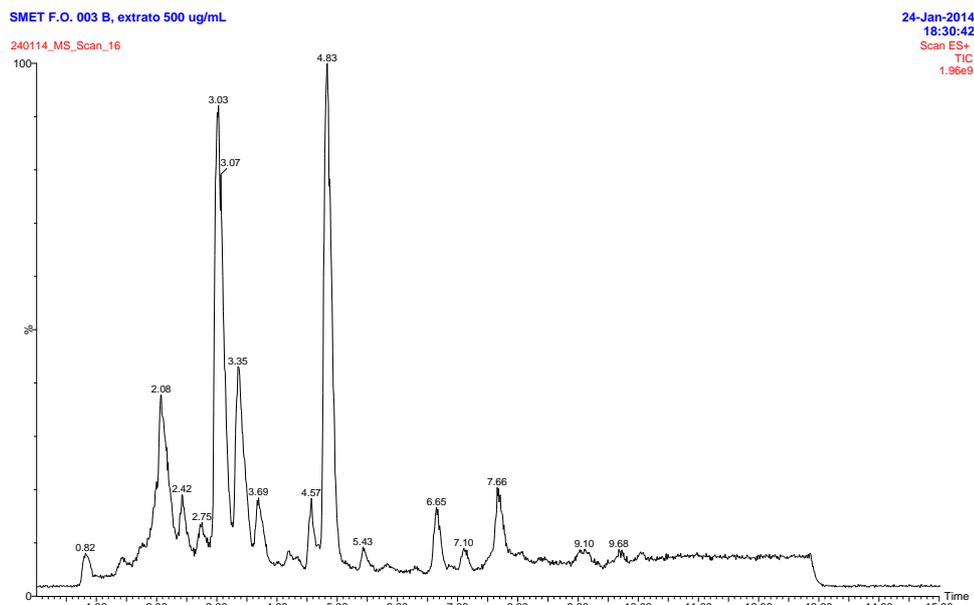


FIGURA 4.6 Cromatograma de íons totais no modo *scan* positivo, amostra SMET F.O. 003 B, extrato 500 µg/mL.

Visando-se a obtenção de dados relativos às massas moleculares das bandas detectadas por HPLC-DAD, experimentos de HPLC-ESI-MS, no modo positivo de análise, foram realizados com base nas mesmas condições cromatográficas aplicadas no HPLC-DAD. Através da análise de solução padrão do fármaco (FIGURA 4.7 e FIGURA 4.8), observou-se que a diferença nos tempos de retenção, entre os ensaios por HPLC-DAD ($t_r = 3,64\text{min}$) e os ensaios por HPLC-ESI-MS ($t_r = 3,08\text{min}$), foi em torno de 0,56 min. Tal variação pode ser associada às diferenças de volume “morto” entre os diferentes equipamentos.

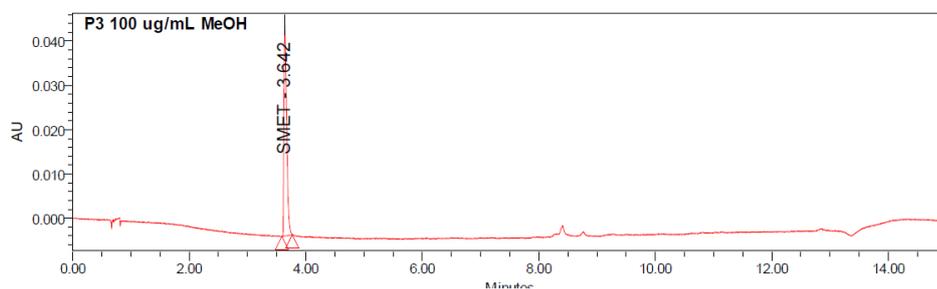


FIGURA 4.7 Cromatograma solução padrão SMET 100 µg/mL em 274 nm.

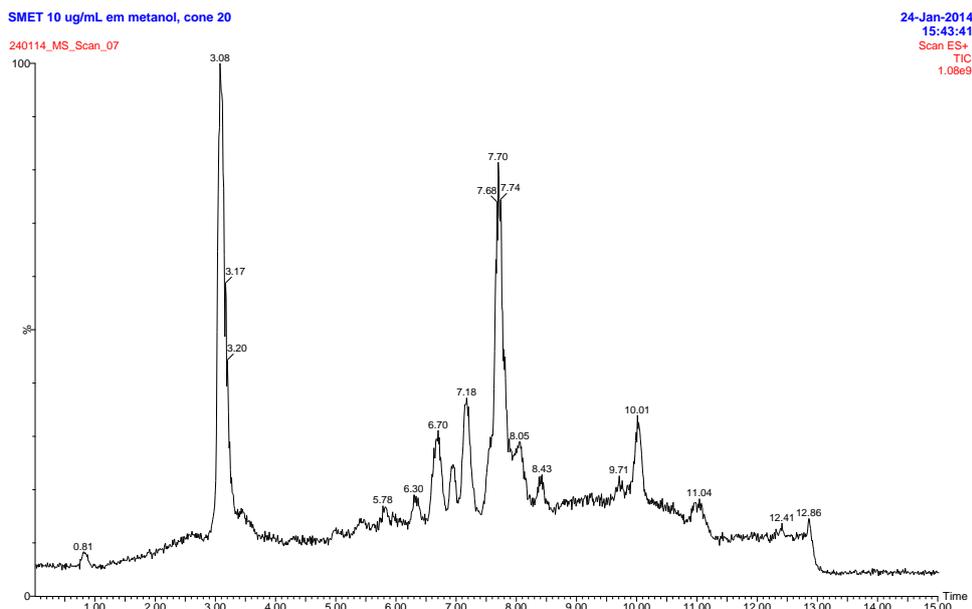


FIGURA 4.8 Cromatograma de íons totais no modo *scan* positivo da solução padrão SMET 10 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, cone 20 V.

O espectro de massas referente à banda cromatográfica em 3,08 min., que corresponde ao metoprolol (SMET), está apresentado na FIGURA 4.9.

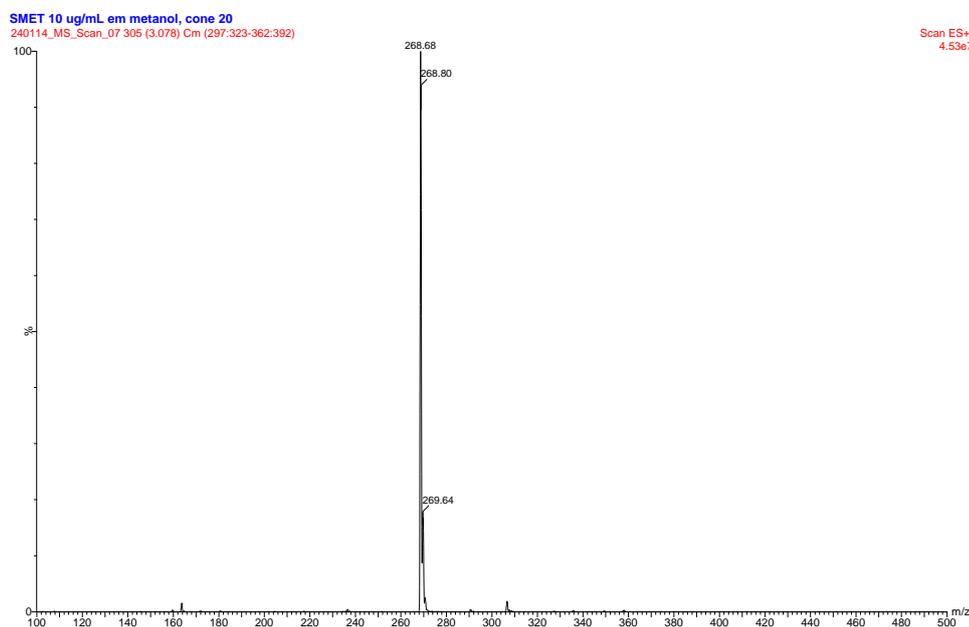


FIGURA 4.9 Espectro de massas da banda em 3.08 minutos da solução SMET 10 $\mu\text{g/mL}$ em metanol.

As amostras SMET 003 A e B foram analisadas por HPLC-MS e HPLC-DAD.

No anexo I (FIGURA 8 até FIGURA 17), encontram-se os espectros de massas e espectros de ultravioleta que correspondem relativamente ao mesmo composto. As análises foram realizadas em dois equipamentos distintos e, como discutido anteriormente, existe uma diferença em torno de 0.56 min. no tempo de retenção correspondente ao mesmo composto. Assim, os tempos de retenção dos compostos avaliados foram de 2,08, 2,77, 3,03, 3,36 e 4,83 min. (Anexo I – FIGURA 6) quando analisados por HPLC-MS e de 2,65, 3,39, 3,67, 3,99 e 5,50 min. (Anexo I – FIGURA 7) quando analisados por HPLC-DAD.

A princípio, a banda cromatográfica de interesse seria aquela referente ao alfa-hidroxi metoprolol. Tal interesse foi dirigido por aspectos mercadológicos e regulatórios. A banda cromatográfica, que supostamente seria referente a molécula alfa-hidroxi metoprolol com m/z 284, poderia ser a com tempo de retenção 2,77 min. no HPLCA-MS/MS e 3,39 min. no HPLCA-DAD. Porém, a referida banda no HPLC-DAD estava com pouca intensidade.

Diante dos resultados encontrados para as amostras dos extratos SMET F.O. 003 A e B, o procedimento de reação de biotransformação com o fungo *Penicillium* sp foi repetido com o intuito de transferir a metodologia analítica para escala preparativa, visando a coleta das bandas cromatográficas de interesse para posterior análise.

4.2.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS DOS FUNGOS *Aspergillus*

Tomando-se como base pesquisas bibliográficas realizadas previamente, optou-se pela utilização dos fungos *Aspergillus* pela capacidade que eles possuem em promover reações de oxidação de Baeyer-Villiger. Portanto, acreditou-se que este sistema de Bayer Villiger poderia ser utilizado para a oxidação dos fármacos e medicamentos de interesse nesta presente proposta de pesquisa.

Quando comparadas as amostras do branco, controle, fármaco e fármaco mais meio de cultura, concluiu-se que não houve biotransformação para os fármacos Succinato de Metoprolol (SMET) e Carbamazepina (CBZ), utilizando os fungos *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*.

Na FIGURA 4.10 até FIGURA 4.13, estão apresentados os cromatogramas do fármaco SMET mais fungo *Aspergillus niger*. Estes cromatogramas foram obtidos pela técnica de HPLC-DAD, descrita no item 3.6.3.

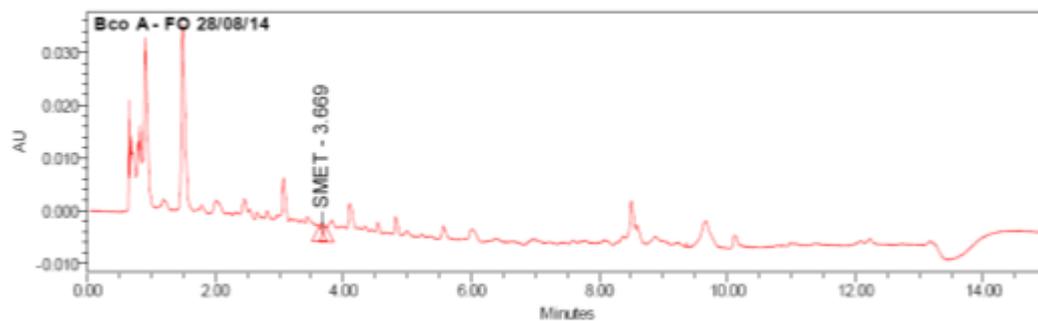


FIGURA 4.10. Cromatograma da amostra Branco A, FO, em 274 nm.

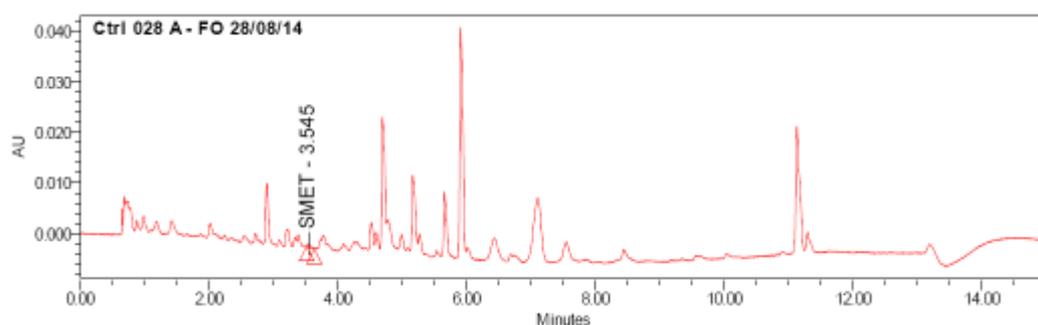


FIGURA 4.11. Cromatograma da amostra Controle A, FO, 028 em 274 nm.

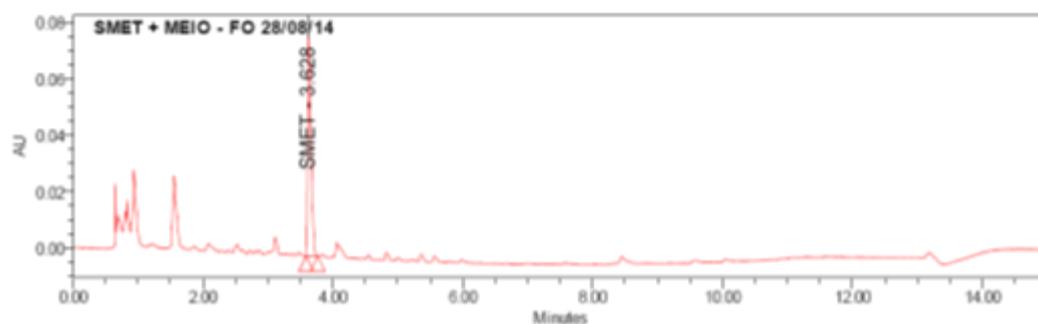


FIGURA 4.12. Cromatograma da amostra SMET + Meio de Cultura, FO, 028 em 274 nm.

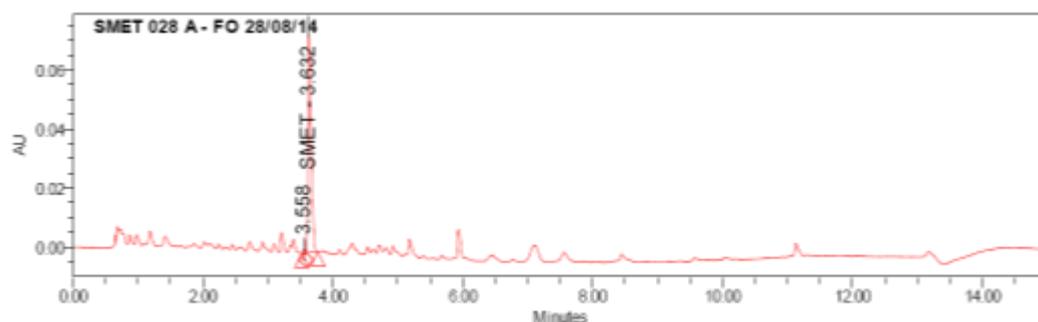


FIGURA 4.13. Cromatograma da amostra SMET A, FO, 028 em 274 nm.

4.3. RESULTADOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE SUCCINATO DE METOPROLOL POR *Penicillium sp* - Repetição

Devido a pouca quantidade de amostra disponível, foi decidido fazer a coleta das bandas cromatográficas de interesse utilizando cromatografia em escala analítica. A FIGURA 4.14 apresenta um cromatograma, obtido através deste procedimento. As áreas hachuradas no cromatograma foram coletadas em sistema automatizado e este processo foi repetido por 20 vezes.

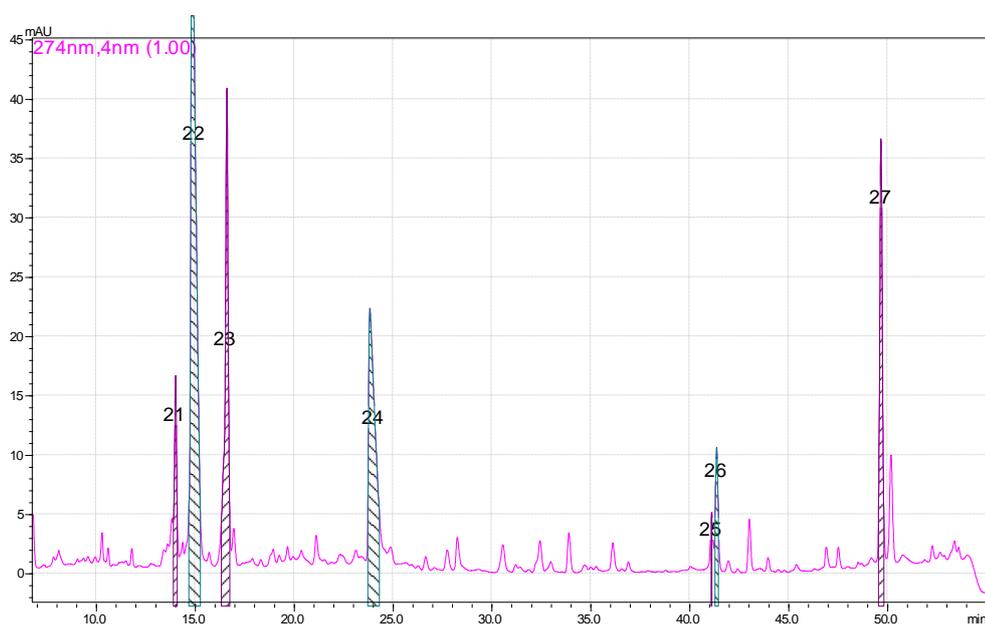


FIGURA 4.14. Cromatograma da amostra SMET A 1 pH 10 FO 3,3 mg/mL HPLC-DAD.

As bandas coletadas das amostras SMET A 1 (pH 10, 3,3 mg/mL) e SMET A 2 (pH 10, 3,8 mg/mL) foram analisadas por HPLC-DAD e HPLC-MS.

A FIGURA 4.15 e FIGURA 4.16 apresentam os espectros de ultravioleta e os espectros de massas, que correspondente ao pico 2, segundo na sequência de eluição (identificado como 22 na Figura 4.14), para a amostra SMET A 1 (pH 10, 3,3 mg/mL); os espectros referentes aos outros picos encontram-se no anexo I.

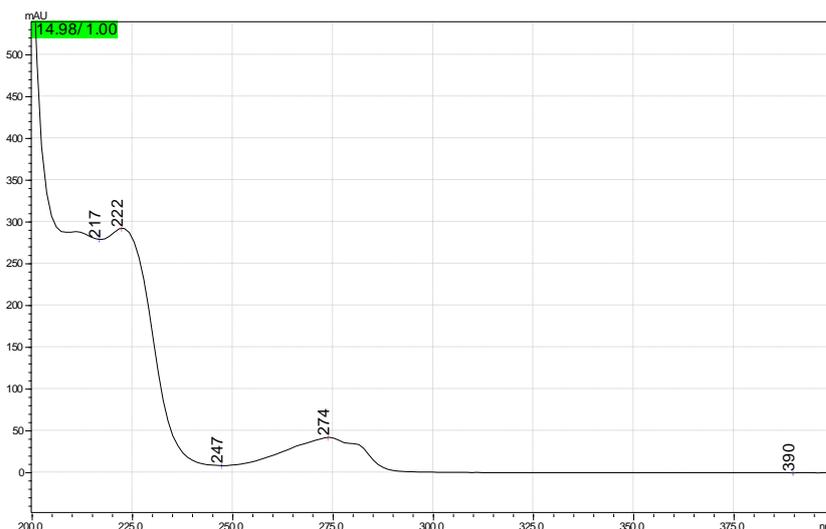


FIGURA 4.15. Espectro de UV do Pico 2, Amostra SMET A 1 pH 10, em 274 nm.

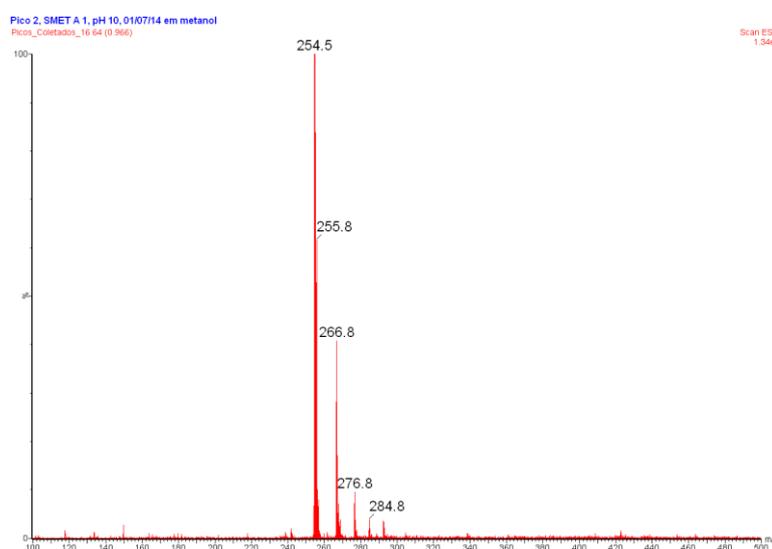


FIGURA 4.16. Espectro de massas obtido para o Pico 2, Amostra SMET A 1 pH 10.

De acordo com os resultados obtidos para as bandas coletadas, conclui-se que alguns picos têm o espectro de UV e espectro de massas muito semelhantes aos da amostra SMET FO 003A discutida anteriormente.

A comprovação da estrutura do metabólito de interesse (Pico 2) poderá ser confirmada através das análises de RMN.

Conforme discutido anteriormente, a princípio, a banda cromatográfica de interesse seria aquela referente à molécula alfa-hidroximetoprolol. Porém, a referida banda no HPLC-DAD estava com pouca intensidade impossibilitando dessa forma a coleta para posterior análise. Portanto, optou-se por escolher a substância de maior

intensidade do cromatograma, a qual foi identificada como Pico 2 e foi considerada a substância ou produto de biotransformação de interesse neste projeto.

4.3.1. RESULTADOS OBTIDOS NAS ANÁLISES POR RMN ¹H

Os resultados obtidos nas análises por RMN para a banda cromatográfica, denominado como Pico 2 e os deslocamentos químicos e as multiplicidades observadas, encontram-se resumidas na TABELA 4.4.

TABELA 4.4. Atribuição dos sinais observados nos experimentos de RMN ¹H.

| Posição | Deslocamento Químico RMN ¹ H (ppm) (multiplicidade, <i>J</i> em Hz) | Estrutura |
|---------|--|-----------|
| 1 | - | |
| 2 | 6,88 (<i>d</i>) <i>J</i> =8,5 Hz, 2H | |
| 3 | 7,14 (<i>d</i>) <i>J</i> =8,5 Hz, 2H | |
| 4 | - | |
| 5 | 7,14 (<i>d</i>) 2H | |
| 6 | 6,88 (<i>d</i>) 2H | |
| 7 | - | |
| 8 | 3,98 (<i>ddd</i>) 2H | |
| 9 | 4,16 (<i>m</i>) 1H | |
| 10 | - | |
| 11 | 2,75 (<i>t</i>) <i>J</i> =14 Hz e 7 Hz, 2H | |
| 12 | 3,70 (<i>t</i>) <i>J</i> =14 Hz e 7 Hz, 2H | |
| 13 | - | |
| 14 | 3,35 (<i>s</i>) 3H | |
| 15 | - | |
| 16 | 3,30 sobreposto | |
| 17 | 1,29 (<i>s</i>) 6H | |
| 18 | 1,29 (<i>s</i>) 6H | |

Os espectros de RMN, obtidos para a banda cromatográfica, denominado como Pico 2, podem ser observados no anexo II (FIGURA 1 à 5). É possível observar um sinal em 1,29 ppm no espectro de RMN ¹H, integrando para 6

hidrogênios. O deslocamento químico deste sinal é característico de hidrogênios metílicos. Uma vez que o sinal em 1,29 ppm no espectro de RMN ^1H integra para 6 hidrogênios, sugere-se a presença de 2 grupos metila de isopropila. Os sinais tripletos em 2,75 ppm e 3,70 ppm integram para 2 hidrogênios cada e foram atribuídos a grupos metilênicos adjacentes, os quais apresentam uma constante de acoplamento geminal ($J=14$ Hz) e outra de acoplamento vicinal ($J=7$ Hz). Observam-se outros sinais de deslocamento químico 6,88 ppm e 7,14 ppm que acoplam em posição orto ($J=8,5$ Hz, 2H cada sinal), no espectro de RMN ^1H , os quais foram atribuídos a hidrogênios quimicamente equivalentes do anel aromático. Em 3,98 ppm, observa-se um sinal (ddd), integrando para 2 hidrogênios, e o seu deslocamento químico pode ser explicado ao fato de estar ligado a um átomo de carbono oximetínico. Em 4,16 ppm, um sinal de multiplete integra para 1 hidrogênio e é característico de hidrogênio oximetínico, sendo mais desblindado por pertencer ao carbono que está ligado a um átomo de oxigênio e outro de nitrogênio. Ao comparar o espectro de RMN ^1H desta substância com o espectro de ressonância do metoprolol (Anexo I - FIGURA 6 à FIGURA 10), percebe-se que há diferença apenas no sinal em 1,92 ppm (FIGURA 10), o qual integra para 2 hidrogênios, enquanto que, no espectro desta substância, integra para menos que 1 hidrogênio.

A análise dos espectros de RMN ^1H e o resultado adquirido por ESI-MS, que apresentou como majoritário o íon de m/z 254, sugerem que a estrutura química em questão seja o 1-(isopropylamino)-2-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]etanol, proveniente da perda de um grupo metilênico (posição 15 do metoprolol), FIGURA 4.17. Porém, biosinteticamente é pouco provável que o fungo faça este tipo de reação nesta posição da molécula. Portanto, para a comprovação dessa proposta estrutural, torna-se necessária a realização de outros experimentos, como por exemplo, a aquisição de espectros de RMN ^1H e ^{13}C em clorofórmio deuterado, uma vez que o sinal do metanol sobrepõe alguns sinais da amostra.

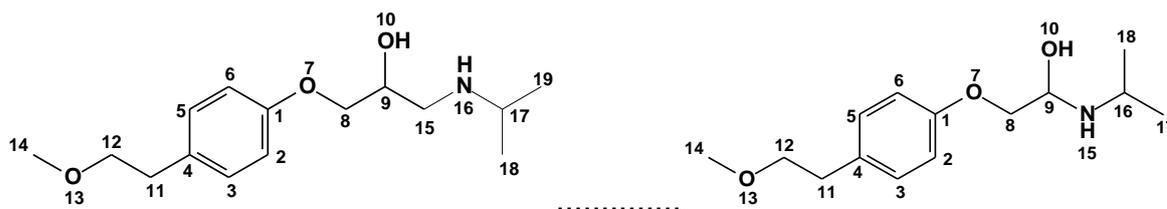


FIGURA 4.17. Estrutura química do metoprolol (à esquerda) e da 1-(isopropylamino)-2-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]etanol (à direita).

4.4. OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO

A TABELA 4.5 apresenta os resultados obtidos após a realização aleatória dos 16 experimentos; os valores reais estão apresentados na TABELA 3.12. A falta de reprodutibilidade observada nas respostas é intrínseca dos sistemas fermentativos, uma vez que são utilizados microorganismos vivos e por isso é difícil controlar o metabolismo e produção das enzimas envolvidas nas reações, o que fica evidenciado na TABELA 4.5.

As condições, utilizadas inicialmente, foram temperatura de fermentação a 27 °C, velocidade de agitação 160 rpm, quantidade de açúcar a 45 g/L e o açúcar glicose.

Devido a alta variabilidade dos resultados de fermentação, optou-se por não executar um planejamento de superfície de resposta, tal como composto central ou fatorial de três níveis, minimizando o número de experimentos.

TABELA 4.5. Resultados obtidos para os 16 experimentos realizados.

| Experi mento | X1 Temperatura Fermentação (°C) | X2 Agitação (rpm) | X3 Quantidade de açúcar (g/L) | X4 Tipo de açúcar | Respostas Área do Pico 2 | | Respostas Área do Pico 2 (Media) |
|-----------------|--|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------|---|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 29344 | 5983 | 17664 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 | 69145 | 138854 | 104000 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 0 | 620765 | 310383 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 662438 | 638350 | 650394 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 | 27650 | 51866 | 39758 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 150970 | 35623 | 93297 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 582820 | 811978 | 697399 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 | 753748 | 1209819 | 981784 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 | 80937 | 110903 | 95920 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1485603 | 317883 | 901743 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 656569 | 698587 | 677578 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 | 0 | 767943 | 383972 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 59176 | 45837 | 52507 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 | 43106 | 55443 | 49275 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1259144 | 3484221 | 2371683 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1037752 | 1138065 | 1087909 |

A TABELA 4.6 mostra a área associada a cada efeito, disposto em ordem crescente, o centro dessa área, o valor de z associado e a % quadrática do efeito. A média das respostas foi utilizada para o cálculo dos efeitos.

Quando analisamos a % quadrática do efeito, foi possível constatar que os resultados que apresentaram maior percentagem do efeito foram 37% e 18%, que correspondem às variáveis 2 (agitação) e à interação 23 (interação de agitação com quantidade de açúcar), respectivamente. Portanto, possuem efeitos significativos sobre o aumento da área do pico 2.

TABELA 4.6. Valores de área e de z para cada uma das regiões associadas aos efeitos dispostos em ordem crescente.

| Identificação do Efeito | Efeito em ordem crescente | Segmento | | Centro | Valor de z | % Quadrática do Efeito |
|-------------------------|---------------------------|----------|-----|--------|------------|------------------------|
| | | Início | Fim | | | |
| 124 | -358062 | 0 | 7 | 3 | -1,83 | 9 |
| 12 | -236931 | 7 | 13 | 10 | -1,28 | 4 |
| 13 | -235956 | 13 | 20 | 17 | -0,97 | 4 |
| 134 | -213850 | 20 | 27 | 23 | -0,73 | 3 |
| 14 | -192383 | 27 | 33 | 30 | -0,52 | 3 |
| 123 | -25493 | 33 | 40 | 37 | -0,34 | 0 |
| 1234 | -19785 | 40 | 47 | 43 | -0,17 | 0 |
| 1 | -1315 | 47 | 53 | 50 | 0,00 | 0 |
| 34 | 96545 | 53 | 60 | 57 | 0,17 | 1 |
| 24 | 129557 | 60 | 67 | 63 | 0,34 | 1 |
| 3 | 278995 | 67 | 73 | 70 | 0,52 | 5 |
| 234 | 323364 | 73 | 80 | 77 | 0,73 | 7 |
| 4 | 340739 | 80 | 87 | 83 | 0,97 | 8 |
| 23 | 500117 | 87 | 93 | 90 | 1,28 | 18 |
| 2 | 725867 | 93 | 100 | 97 | 1,83 | 37 |

Os resultados obtidos foram avaliados também por meio de gráfico de distribuição normal. Através dele, foi possível interpretar visualmente os efeitos, sendo que os não significativos são encontrados em uma linha reta que passa próximo ao zero, enquanto que os efeitos significativos se afastam dessa linha.

A FIGURA 4.18 mostra o gráfico de distribuição normal obtido através dos resultados das médias das áreas do pico 2. Analisando-se o gráfico, foi possível verificar que a interação das variáveis 124 (temperatura de fermentação, agitação e tipo de açúcar) e 12 (temperatura de fermentação e agitação) possuem efeitos significativos sobre o aumento da área do pico 2.

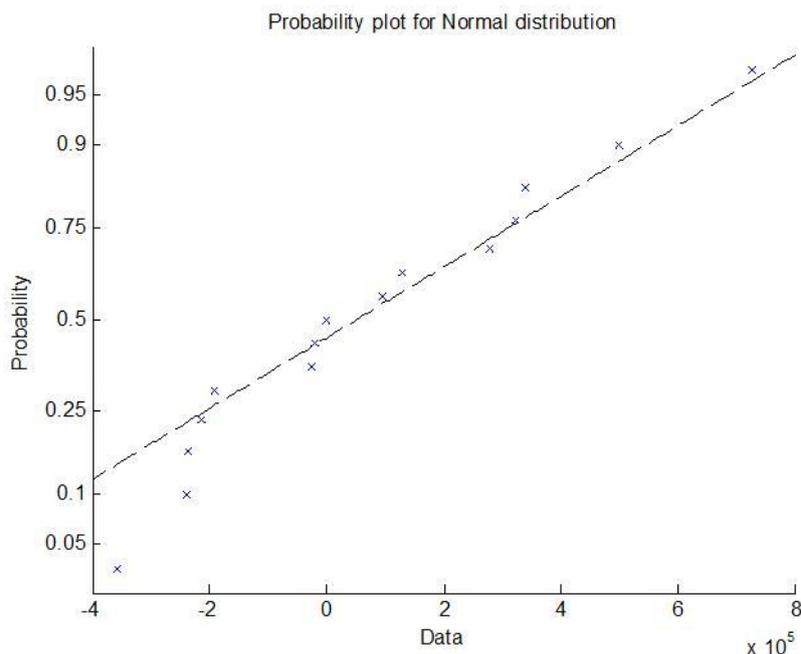


FIGURA 4.18. Gráfico de distribuição normal para o planejamento fatorial completo.

Concluiu-se que, quando os dados foram interpretados pela % quadrática do efeito, os mais significativos foram a variável 2 e a interação 23, porém o gráfico de distribuição normal apontou que os melhores resultados foram a interação das variáveis 124 e 12, ou seja, os resultados não coincidem. Dessa forma, optou-se pela interpretação empírica dos dados.

Ao avaliarmos as médias das respostas (área do pico 2), foi possível verificar que os melhores experimentos foram o 15, 16, 8 e 10, pois apresentaram valor de área maior em relação aos demais experimentos. Estes 4 experimentos apresentam, em comum, o mesmo número de níveis positivos e negativos, ou seja, três níveis positivos e um nível negativo, com exceção do experimento 10, que apresenta dois negativos e dois positivos. Portanto, pode-se concluir de maneira empírica que as variáveis, utilizadas no nível positivo: temperatura de fermentação a 30 °C, velocidade de agitação 150 rpm, quantidade de açúcar a 40 g/L e o açúcar-sacarose, corroboram para o aumento na produção da substância de interesse.

Estão apresentadas, nas FIGURA 4.19 até FIGURA 4.21, as amostras no início do experimento, ou seja, antes da adição do fármaco Succinato de Metoprolol, após a adição do fármaco e as amostras branco, respectivamente.

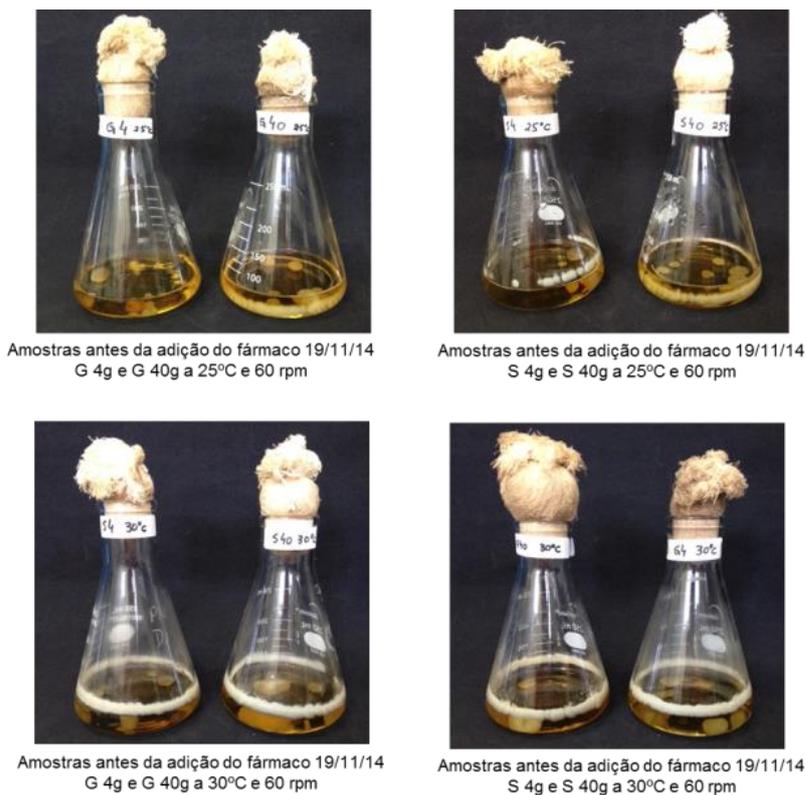


FIGURA 4.19. Amostras antes da adição do fármaco a 25°C e 30 °C e 60 rpm.



FIGURA 4.20. Amostras após adição do fármaco a 25°C e 30 °C e 60 rpm.

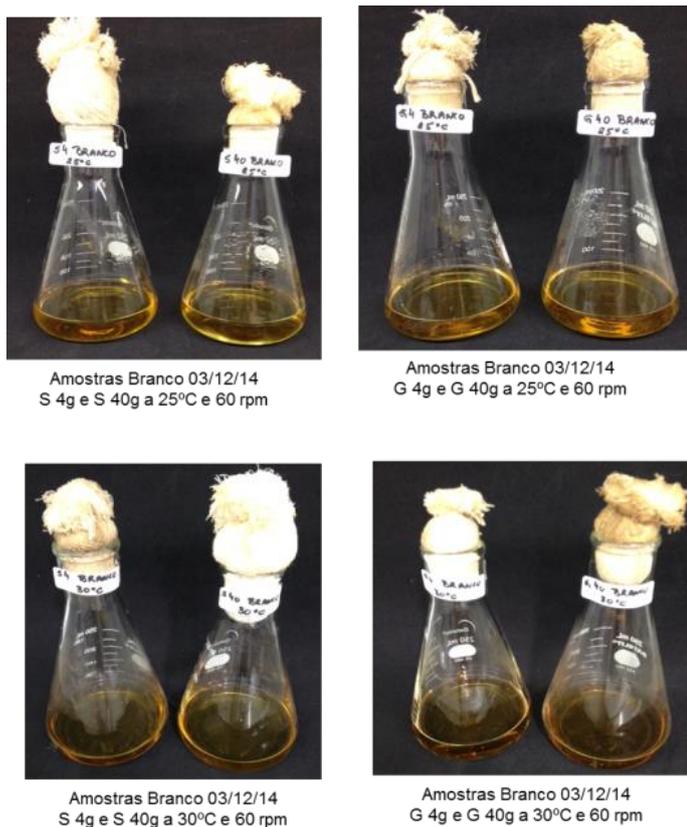


FIGURA 4.21. Amostras Branco a 25°C e 30°C e 60 rpm.

4.5. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Pretende-se utilizar tal método analítico, otimizado por HPLC, para o controle de qualidade dos produtos purificados obtidos.

A TABELA 4.7 apresenta os 27 experimentos, obtidos para as quatro variáveis, cada uma a cinco níveis. O delineamento constituiu-se de 16 pontos fatoriais, 8 pontos axiais e uma triplicata do ponto central.

TABELA 4.7. Planejamento fracionado para desenvolvimento de método HPLC para o metabólito de interesse.

| Experimento | X1 Temperatura | X2 % Ácido Fórmico | X3 Fase B (inicial) | X4 Vazão | Reposta Tempo Retenção pico 2 (min) | Reposta Resolução pico 2 |
|-------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|-------------|--|--------------------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 18,208 | 2,659 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 | 23,954 | 2,116 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 23,773 | 2,269 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 29,023 | 1,872 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 | 13,430 | 1,702 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 13,546 | 1,814 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 17,365 | 1,363 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 | 18,558 | 1,645 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 | 13,375 | 2,932 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 | 10,846 | 3,251 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 19,855 | 2,410 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 | 18,670 | 3,042 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 11,411 | 1,502 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 | 8,715 | 1,987 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 | 12,532 | 1,624 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10,656 | 2,017 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17,211 | 2,044 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17,097 | 2,012 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17,421 | 2,049 |
| 20 | -1,5 | 0 | 0 | 0 | 22,180 | 1,920 |
| 21 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 18,563 | 2,475 |
| 22 | 0 | -1,5 | 0 | 0 | 0,000 | 0,000 |
| 23 | 0 | 1,5 | 0 | 0 | 20,624 | 2,144 |
| 24 | 0 | 0 | -1,5 | 0 | 24,883 | 2,087 |
| 25 | 0 | 0 | 1,5 | 0 | 13,662 | 1,420 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | -1,5 | 31,414 | 1,512 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 1,5 | 14,691 | 2,384 |

O tratamento dos dados obtidos, foi realizado através da análise de variância (ANOVA), admitindo-se um nível de confiança de 95%. Os coeficientes de regressão foram calculados através do software Origin (Micronal), porém o experimento de número 22 não foi utilizado nos cálculos porque apresentou resultado igual a zero

devido algum problema com a detecção. Estão apresentados os coeficientes, calculados na TABELA 4.8, para a resposta resolução.

O limite de controle superior (UCL) e limite inferior (LCL) demonstram quando os coeficientes são significativos. Para avaliar se os coeficientes são significativos ou não, verifica-se o valor zero está contido entre os limites inferior e superior. Se o zero estiver contido dentro deste intervalo, não podemos afirmar, com confiança, que o coeficiente é diferente de zero, dessa forma, ele não é considerado significativo.

TABELA 4.8. Resultados de coeficientes de regressão significativos para o planejamento composto central para resposta resolução

| Coeficiente | Valor | Erro Padrão | LCL | UCL |
|--------------------|--------------|--------------------|------------|--------------|
| Intercepto | 2,08662 | 0,04953 | 1,9836 | 2,18963 |
| X3 | -0,38524 | 0,05578 | -0,50125 | -0,26923 |
| X4 | 0,226 | 0,05578 | 0,10999 | 0,34201 |
| X1X4 | 0,14844 | 0,06314 | 0,01712 | 0,27975 |
| X3X4 | -0,13206 | 0,06314 | -0,26338 | -0,000749326 |

Na avaliação dos coeficientes de regressão, foi observado que os coeficientes significativos foram X1 (Temperatura), X3 (Fase B inicial) e X4 (Vazão).

A equação de regressão linear múltipla para as variáveis, tendo como resposta a resolução, é dada:

$$y = 2,08662 - 0,38524 * X3 + 0,226 * X4 + 0,14844 * X1X4 - 0,13206 * X3X4$$

A tabela ANOVA para essa equação está apresentada na Tabela 4.9 e foi calculada através do software Origin (Micronal) e Excel (Microsoft).

TABELA 4.9. Tabela ANOVA para resposta resolução.

| Parâmetro | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (MQ) | Teste F | F tabelado (95%) |
|--------------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|---------|------------------|
| Regressão | 4,72111 | 4 | 1,18028 | 18,50 | 2,840 |
| Resíduo | 1,33965 | 21 | 0,06379 | | |
| Total | 6,06076 | 25 | 0,24243 | | |
| Erro puro | 0,00081 | 2 | 0,0004 | 174,85 | 19,45 |
| Falta de ajuste | 1,33884 | 19 | 0,07047 | | |
| Variação explicada (R ²) | 0,77896 | | | | |

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.9, a regressão apresentou significância com R² de 0,77896 e 77,89 % da variância explicada. O valor de F calculado ao comparar a MQR e MQres foi de 18,50, ou seja, foi 6,51 vezes maior que o F tabelado, a 95 % de confiança. O desejável é que o F calculado seja cerca de 10 vezes maior que o F tabelado. Isso mostra que o modelo não é confiável e para realizar previsões.

Outro teste F analisado foi aquele proveniente da comparação das MQfaj e MQep. O valor de F calculado foi de 174,85 e o F tabelado foi de 19,45 a 95 % de confiança; como o F calculado apresentou um resultado maior que o F tabelado significa que o modelo possui falta de ajuste. Dessa forma, foi possível afirmar que o modelo proposto apresentou falta de ajuste, sendo incapaz de se ajustar aos valores experimentais das respostas.

Mesmo com a baixa significância do modelo, foram calculadas superfícies de respostas, fixando o valor da variável X1 (temperatura). As figuras FIGURA 4.22, FIGURA 4.23 e FIGURA 4.24 apresentam as superfícies de respostas geradas com X1 fixo em -1, 0 e +1, respectivamente.

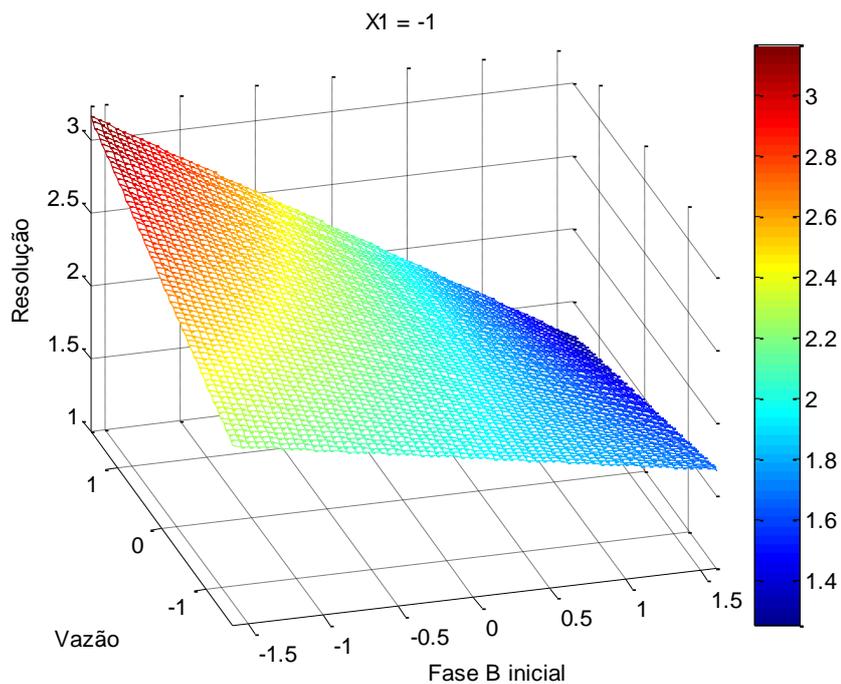


FIGURA 4.22. Superfície de resposta relacionando as variáveis X3 e X4 com X1 fixo em -1.

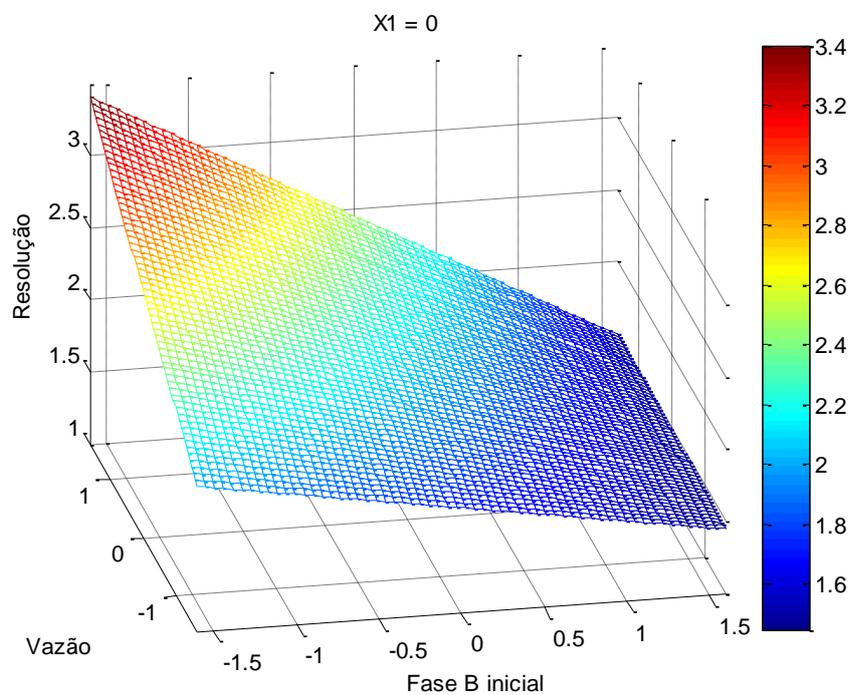


FIGURA 4.23. Superfície de resposta relacionando as variáveis X3 e X4 com X1 fixo em 0.

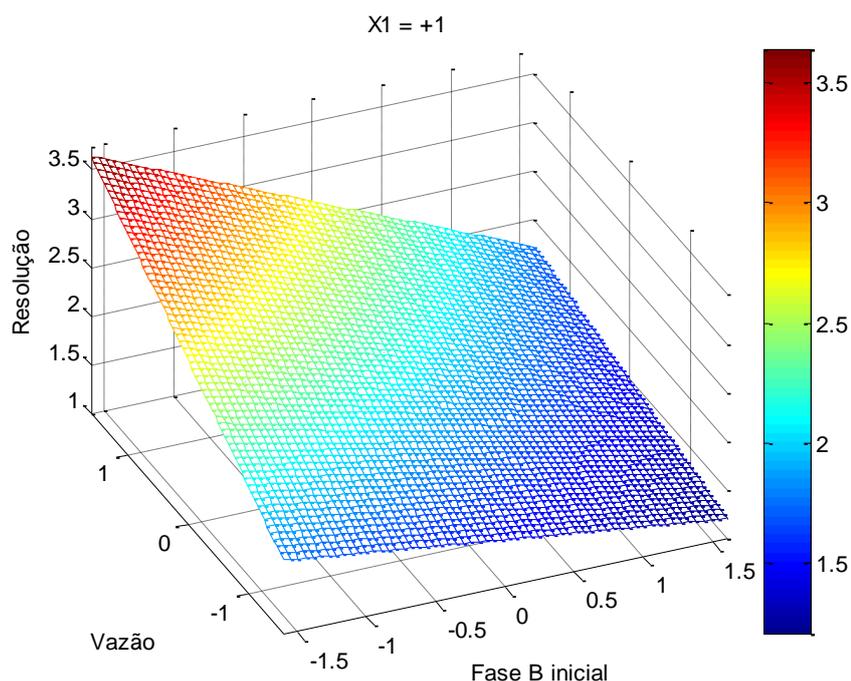


FIGURA 4.24. Superfície de resposta relacionando as variáveis X3 e X4 com X1 fixo em +1.

Interpretando-se as figuras conclui-se que melhores resoluções são obtidas quando utilizada a vazão no nível alto e fase B inicial no nível baixo.

Os coeficientes de regressão, que foram considerados significativos para a resposta tempo de retenção, estão apresentados na TABELA 4.10.

TABELA 4.10. Resultados de coeficientes de regressão significativos para o planejamento composto central para resposta tempo de retenção.

| Coeficiente | Valor | Erro Padrão | LCL | UCL |
|-------------|----------|-------------|----------|----------|
| Intercepto | 19,2844 | 0,83806 | 17,54157 | 21,02724 |
| X2 | 2,57637 | 0,63562 | 1,25452 | 3,89821 |
| X3 | -3,3328 | 0,58744 | -4,55445 | -2,11116 |
| X4 | -3,75032 | 0,58744 | -4,97196 | -2,52867 |
| X2X2 | -2,38882 | 0,94299 | -4,34987 | -0,42777 |

Na avaliação dos coeficientes de regressão, foi observado que os coeficientes significativos foram X2 (% Ácido Fórmico), X3 (Fase B inicial) e X4 (Vazão).

A equação de regressão linear múltipla para as variáveis, tendo como resposta o tempo de retenção, é dada:

$$y = 19,2844 + 2,57637 * X2 - 3,3328 * X3 - 3,75032 * X4 - 2,38882 * X2X2$$

A equação acima foi utilizada para plotar a superfície de resposta para as variáveis X2, X3 e X4. A tabela ANOVA, para essa equação está apresentada na Tabela 4.11.

TABELA 4.11. Tabela ANOVA para resposta tempo de retenção.

| Parâmetro | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (MQ) | Teste F | F tabelado (95%) |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|---------|------------------|
| Regressão | 655,10775 | 4 | 163,77694 | 23,15 | 2,840 |
| Resíduo | 148,55927 | 21 | 7,07425 | | |
| Total | 803,66702 | 25 | 32,1467 | | |
| Erro puro | 0,054024 | 2 | 0,02701 | 289,355 | 19,45 |
| Falta de ajuste | 148,50524 | 19 | 7,81607 | | |
| Varição explicada (R ²) | 0,81515 | | | | |

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.11, a regressão apresentou certa significância com R² de 0,81515 e 81,51 % da variância explicada. O valor de F calculado ao comparar a MQR e MQres foi de 23,15, ou seja, foi 8,15 vezes maior que o F tabelado, a 95 % de confiança. Isso mostra que o modelo está razoavelmente adequado para fazer previsões.

Outro teste F analisado foi aquele proveniente da comparação das MQfaj e MQep. O valor de F calculado foi de 289,355 e o F tabelado foi de 19,45 a 95 % de confiança, como o F calculado apresentou um resultado maior que o F tabelado, significa que o modelo possui falta de ajuste. Dessa forma, foi possível afirmar que o modelo proposto apresentou falta de ajuste.

Com o modelo proposto, foi calculada a superfície de resposta, sendo que se manteve a variável X3 (Fase B inicial) fixa. As figuras FIGURA 4.25, FIGURA 4.26 e FIGURA 4.27 apresentam as superfícies de respostas geradas com X1 fixo em -1, 0 e +1 respectivamente.

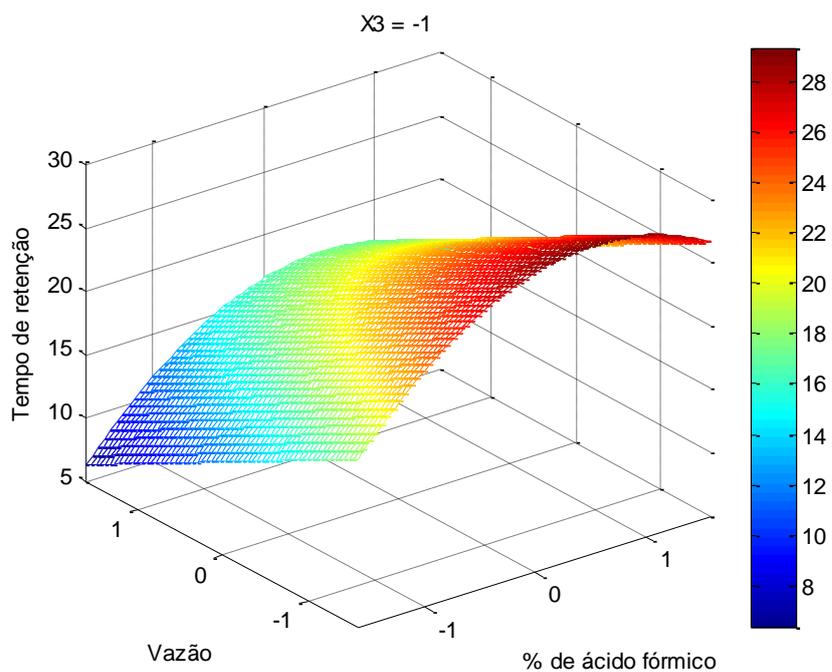


FIGURA 4.25. Superfície de resposta relacionando as variáveis X2 e X4 com X3 fixo em -1.

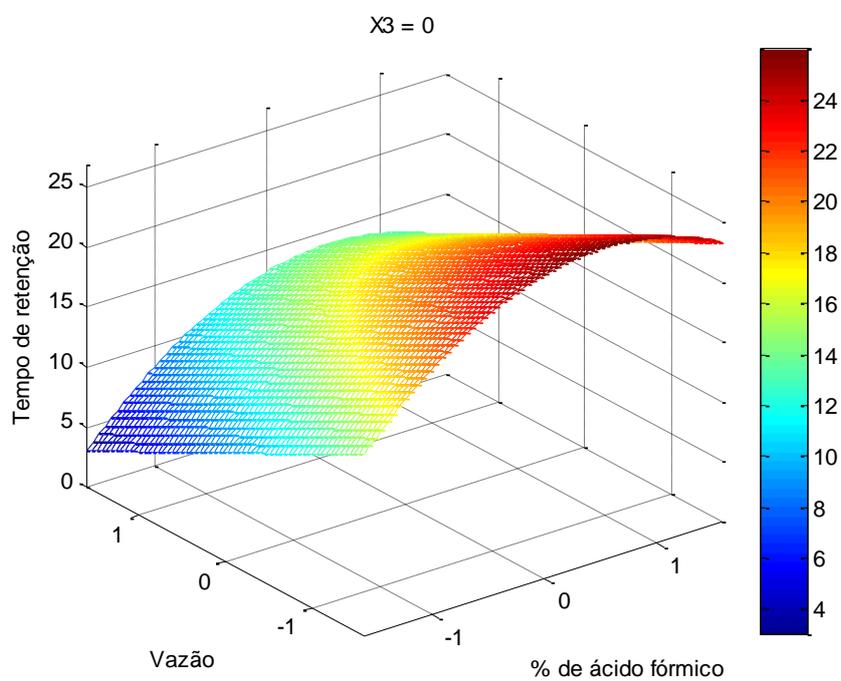


FIGURA 4.26. Superfície de resposta relacionando as variáveis X2 e X4 com X3 fixo em 0.

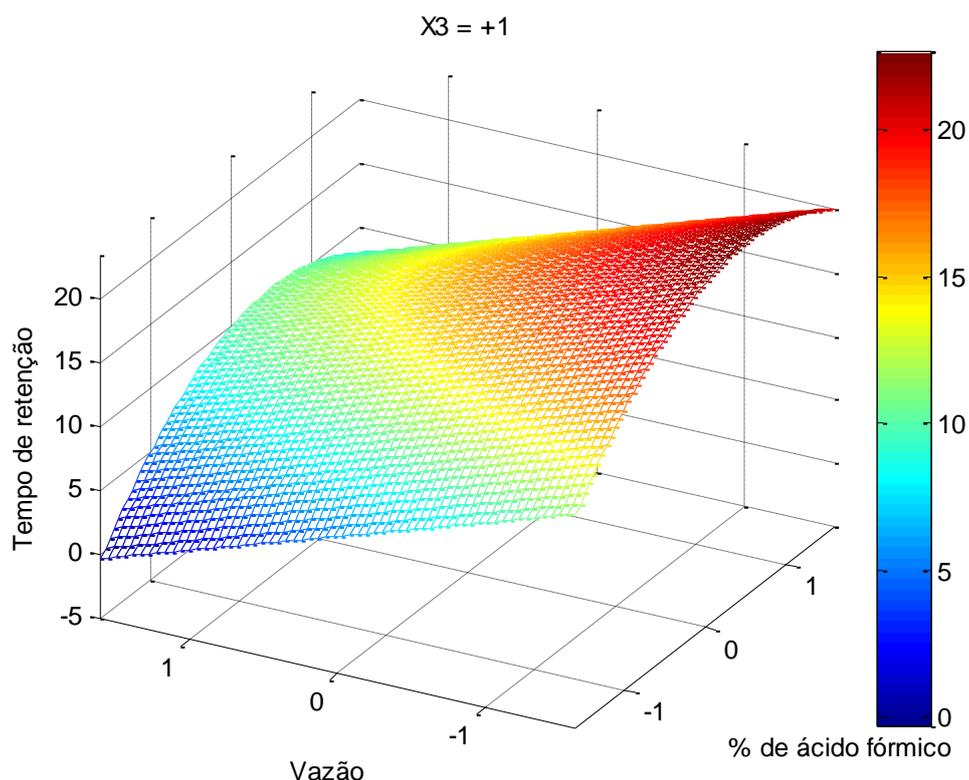


FIGURA 4.27. Superfície de resposta relacionando as variáveis X2 e X4 com X3 fixo em +1.

Interpretando-se as figuras, conclui-se que os melhores resultados para tempo de retenção, são obtidos quando utilizada a vazão no nível alto e % de ácido fórmico no nível baixo.

Ao compararmos as respostas tempo de retenção e resolução, observou-se que, quanto maior X3 (Fase B Inicial), melhor para a resposta tempo de retenção e pior para resolução. Já a vazão alta foi boa para as duas respostas.

4.5.1. Desejabilidade Global

Além da Regressão Linear Múltipla, foi utilizado também, para avaliar as respostas, a função de desejabilidade de Derringer e Suich, a qual permite identificar simultaneamente as condições experimentais ideais para todas as variáveis testadas em um planejamento.

Para realizar o cálculo de desejabilidade individual e desejabilidade global, as respostas foram normalizadas de acordo com a TABELA 4.12

TABELA 4.12. Valores normalizados para as respostas.

| Resposta | $d = 0$ | $0 \leq d \leq 1$ | $d = 1$ |
|------------------------|-----------------------|--|-----------------------|
| Tempo de Retenção (d1) | Se $tr \geq 35$ min. | Se $5 \text{ min} \leq tr \leq 35$ min | Se $tr \leq 5$ min. |
| Resolução (d2) | Se resolução ≤ 2 | Se $2 \leq$ resolução ≤ 3 | Se resolução ≥ 3 |

Os resultados do tempo de retenção e resolução em função da desejabilidade individual e global, estão apresentados na TABELA 4.13. Como pode ser observado na tabela, o experimento de número 10 foi considerado o melhor, pois foi o que apresentou desejabilidade global mais próximo de 1.

TABELA 4.13. Desejabilidades individuais e global obtidas pela aplicação das funções de desejabilidade.

| Experimento | Reposta Experimental | | Reposta Normalizada | | D Global |
|-------------|--------------------------|----------------|---------------------|----------------|----------|
| | Tempo Retenção min. (d1) | Resolução (d2) | Tempo Retenção (d1) | Resolução (d2) | |
| 1 | 18,208 | 2,659 | 0,56 | 0,66 | 0,61 |
| 2 | 23,954 | 2,116 | 0,37 | 0,12 | 0,21 |
| 3 | 23,773 | 2,269 | 0,37 | 0,27 | 0,32 |
| 4 | 29,023 | 1,872 | 0,20 | 0,00 | 0,00 |
| 5 | 13,430 | 1,702 | 0,72 | 0,00 | 0,00 |
| 6 | 13,546 | 1,814 | 0,72 | 0,00 | 0,00 |
| 7 | 17,365 | 1,363 | 0,59 | 0,00 | 0,00 |
| 8 | 18,558 | 1,645 | 0,55 | 0,00 | 0,00 |
| 9 | 13,375 | 2,932 | 0,72 | 0,93 | 0,82 |
| 10 | 10,846 | 3,251 | 0,81 | 1,00 | 0,90 |
| 11 | 19,855 | 2,410 | 0,50 | 0,41 | 0,45 |
| 12 | 18,670 | 3,042 | 0,54 | 1,04 | 0,75 |
| 13 | 11,411 | 1,502 | 0,79 | 0,00 | 0,00 |
| 14 | 8,715 | 1,987 | 0,88 | 0,00 | 0,00 |
| 15 | 12,532 | 1,624 | 0,75 | 0,00 | 0,00 |
| 16 | 10,656 | 2,017 | 0,81 | 0,02 | 0,12 |
| 17 | 17,211 | 2,044 | 0,59 | 0,04 | 0,16 |
| 18 | 17,097 | 2,012 | 0,60 | 0,01 | 0,08 |
| 19 | 17,421 | 2,049 | 0,59 | 0,05 | 0,17 |
| 20 | 22,180 | 1,920 | 0,43 | 0,00 | 0,00 |
| 21 | 18,563 | 2,475 | 0,55 | 0,48 | 0,51 |
| 23 | 20,624 | 2,144 | 0,48 | 0,14 | 0,26 |
| 24 | 24,883 | 2,087 | 0,34 | 0,09 | 0,17 |
| 25 | 13,662 | 1,420 | 0,71 | 0,00 | 0,00 |
| 26 | 31,414 | 1,512 | 0,12 | 0,00 | 0,00 |
| 27 | 14,691 | 2,384 | 0,68 | 0,38 | 0,51 |

O experimento de número 10 foi considerado o melhor, pois apresentou, como resposta, uma resolução de 3,251 e um tempo de eluição baixo (10,846 min). A FIGURA 4.28 apresenta o cromatograma referente a este experimento.

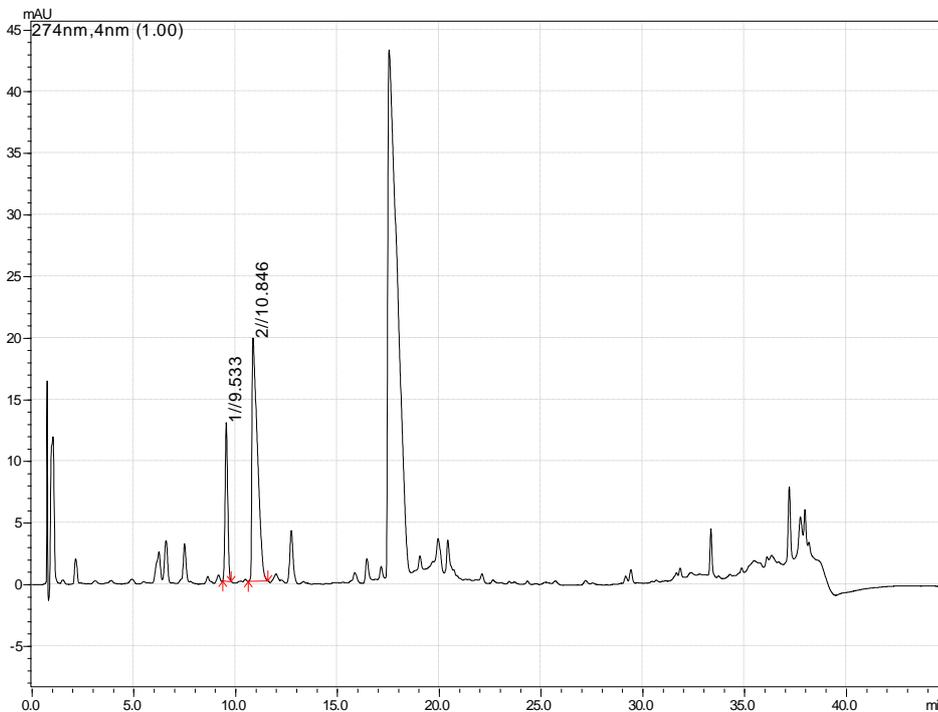


FIGURA 4.28. Cromatograma da amostra SMET 003 A II C I, pH 10 FO HPLC-DAD, em 274 nm.

Com o intuito de diminuir o tempo total de corrida, o método otimizado foi alterado de 45 para 24 minutos, mantendo a mesma inclinação do gradiente anterior nos primeiros 14 minutos do novo método. A FIGURA 4.29 apresenta o cromatograma obtido por HPLC-DAD, em 274 nm para o novo gradiente.

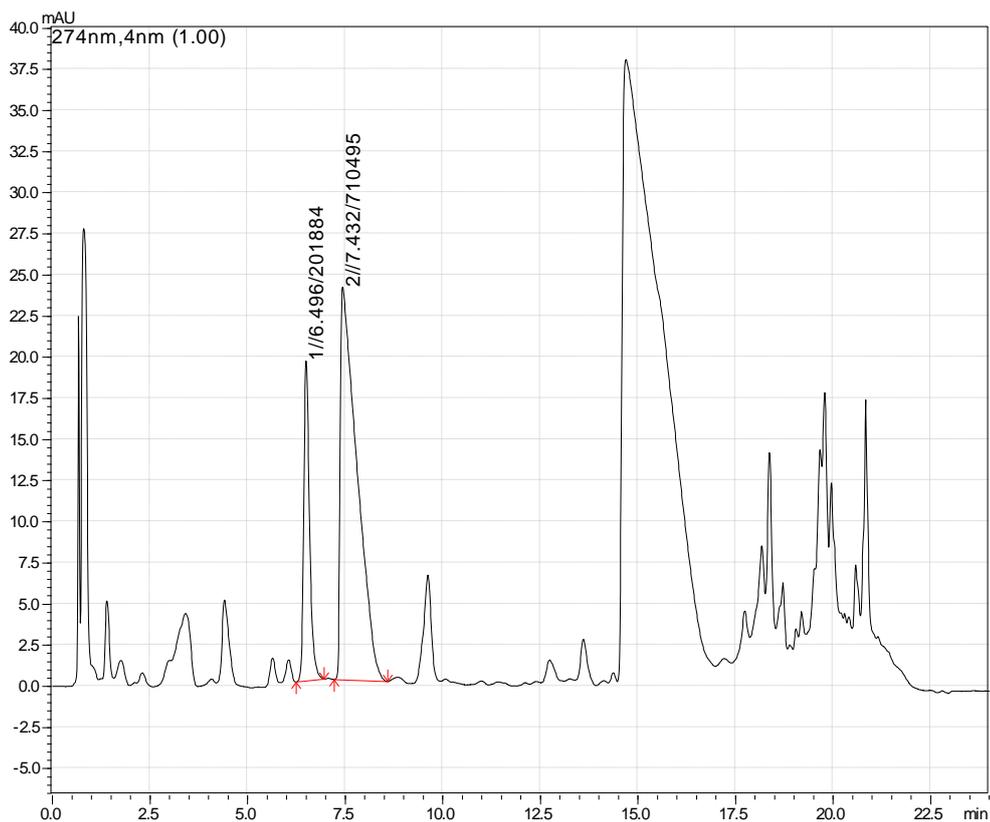


FIGURA 4.29. Cromatograma da amostra SMET 003 A II C I, pH 10 FO HPLC-DAD, em 274 nm e 24 minutos de corrida.

Pode-se observar que o perfil do cromatograma se mantém nos dois métodos. Portanto, o método adotado para o controle de qualidade do metabólito de interesse, denominado no presente trabalho como Pico 2, será o método cromatográfico com 24 minutos, pois o custo de solvente e tempo de máquina será menor.

A mesma amostra foi analisada no HPLC-MS, em modo *Scan* positivo, com o mesmo método cromatográfico de 24 minutos. Porém, houve a necessidade de diluir a amostra 10 vezes; A FIGURA 4.30 apresenta o cromatograma de íons totais (TIC) obtido e a FIGURA 4.31 apresenta o espectro de massas referente ao tempo de retenção 5,37 minutos. Pode-se observar que o espectro de massas da FIGURA 4.31 é muito semelhante ao da FIGURA 4.16, o que sugere tratar-se da mesma substância (pico 2).

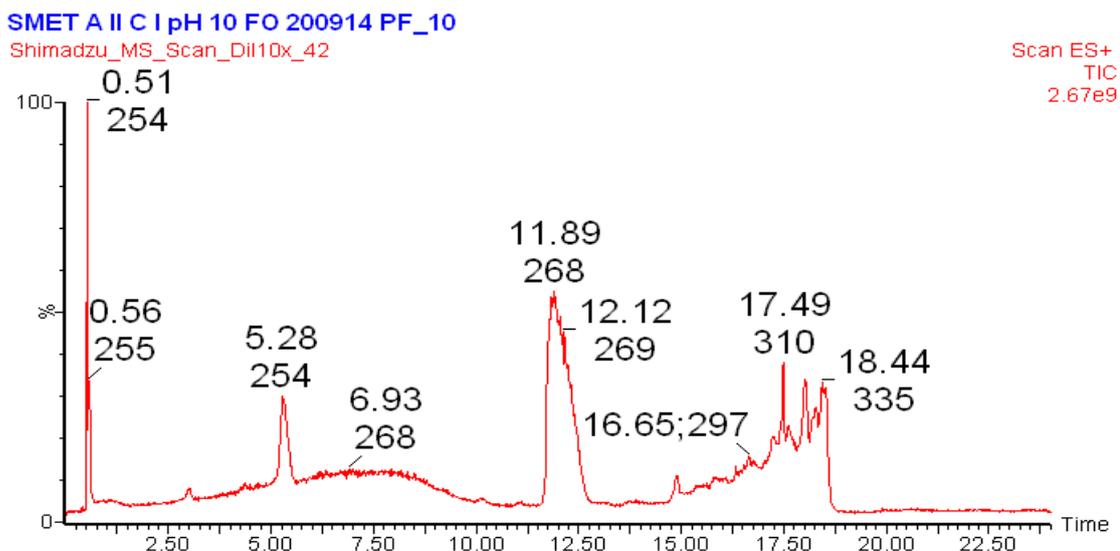


FIGURA 4.30. Cromatograma de íons totais no modo *scan* positivo, amostra SMET 003 A II C I, pH 10 FO (diluída 10 vezes).

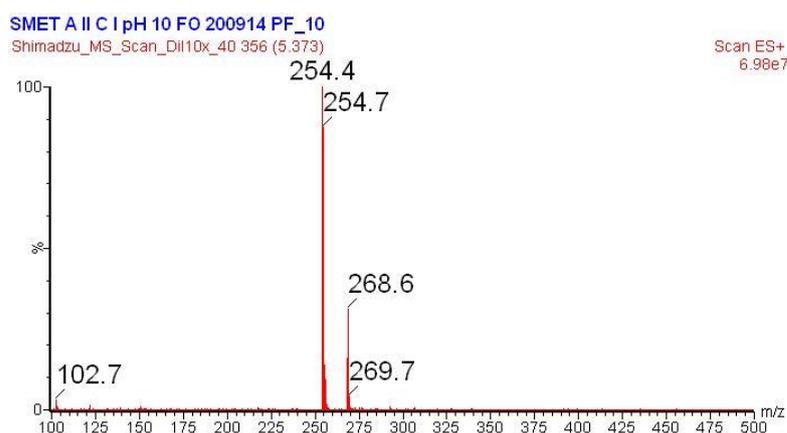


FIGURA 4.31. Espectro de massas obtido em $t_r = 5.37$ min no modo Scan⁺.

4.6. ASPECTOS ECONÔMICOS

Neste subitem, buscou-se abordar os aspectos econômicos que a quimiometria trouxe para o projeto, antes e depois de sua utilização.

Foram avaliados os custos da fermentação, custo da extração, custo da análise, custo total e custo por unidade de metabólito. Os custos foram feitos com base nos valores obtidos em Agosto de 2015.

Os custos iniciais relacionados com vidrarias, padrões, manutenções de equipamentos, água, energia elétrica e aluguel não estão incluídos, pois eles já são contabilizados pela empresa.

Definimos a terminologia de ANTES, como sendo os experimentos, sem a utilização da otimização por quimiometria, e DEPOIS, após a utilização da otimização.

A fermentação é uma etapa determinante do processo de produção do metabólito, visto que tem alto custo e alto consumo de tempo para apresentar os primeiros resultados, que geralmente duram em torno de 25 dias. Com a otimização do processo de fermentação, houve uma redução de 7,13% no custo deste processo. Foram avaliados os itens que compõem o meio líquido Czapek, descrito no item 3.3, sendo que ANTES da otimização foi utilizado 45 g de glicose (R\$ = 25,15) e DEPOIS a glicose foi substituída por 40 g de sacarose (R\$ = 23,32). O custo do meio BDA mais as placas de petri não foram considerados, pois é o mesmo nos dois casos. Sendo de R\$ 9,36 para 10 placas de petri, contendo o meio BDA.

O custo da extração refere-se aos itens utilizados, durante este processo, que são: tubo tipo falcon de 15 mL, acetato de etila, metanol, seringa descartável de 1 mL, filtro de seringa PET 25 mm 0,20 µm, insert descartável e luvas descartáveis. Apesar do planejamento de mistura ternária, apresentado no item 3.5, indicar que o melhor solvente para extrair o metabólito foi o diclorometano com acetato de etila, com proporções variando entre 1/2:1/2, esta mistura não foi utilizada. Durante o processo de extração, foi observado que após as etapas de agitação, seguidas de centrifugação, a mistura promovia a formação de emulsão, dificultando assim a retirada do sobrenadante para posterior evaporação. Então, optou-se pela utilização de 100 % de acetato de etila, e, dessa forma, não foi possível avaliar os custos depois da otimização. Assim, o valor para extrair uma amostra, utilizando acetato de etila, foi de R\$ 7,17.

Estão relacionados, ao custo da análise os seguintes itens: a) Fase Móvel, b) Hora máquina, c) Vida útil da coluna cromatográfica.

A fase móvel utilizada foi um gradiente entre água e metanol, ambos suplementados com 0,1% de ácido fórmico. Para o cálculo dos custos por amostra, considerou-se a maior proporção de metanol utilizado durante o gradiente, que foi de 80% e, em seguida, uma etapa de reequilíbrio com 5% de metanol. O método cromatográfico, ANTES da otimização, foi de 45 minutos com vazão de 0,5 mL/min e, DEPOIS, passou a ser de 24 minutos com vazão de 0,7 mL/min. O aumento da vazão não acarretou no custo da fase móvel, pois o tempo de corrida foi reduzido,

levando a uma economia de 27,86%. Portanto, o valor, ANTES foi de R\$ 0,524 por amostra e, DEPOIS, passou a ser de R\$ 0,378.

O valor de um cromatógrafo líquido, com detector de arranjo de diodos, é em torno de R\$ 500.000,00, considerando que a depreciação do equipamento ocorre em 10 anos, a depreciação anual é de R\$ 50.000,00 por ano (de forma grosseira); se considerarmos que 2015 tem 249 dias úteis, o custo diário de uso do equipamento é de R\$ 200,80, admitindo-se que o equipamento funciona 10 horas por dia, o custo de uma hora de uso do equipamento é de R\$ 2,00. Dessa forma, a redução da corrida cromatográfica, de 45 para 24 minutos, gerou uma economia de 53% na hora de uso da máquina. Portanto, o valor, ANTES, foi de R\$ 1,50 por amostra e, DEPOIS, passou a ser de R\$ 0,80.

Com relação a manutenção das colunas analíticas, deve-se observar a vida útil delas. A coluna Shimpack VP-ODS 15 cm x 2mm x 5 µm possui o custo de R\$ 4.891,75 com impostos, assumindo-se que uma coluna cromatográfica tenha a capacidade de realizar 3000 análises, tem-se o valor de R\$ 1,63 por injeção, ou seja, por amostra. Levando também, em consideração, a redução da corrida cromatográfica de 45 para 24 minutos, gerou-se uma economia de 53% na vida útil. Assim, o valor, ANTES, foi de R\$ 1,63 por amostra e, DEPOIS, passou a ser R\$ 0,87.

Por fim, o custo total do projeto engloba todos os itens discutidos acima e podem ser observados na TABELA 4.14 e no gráfico apresentado na FIGURA 4.32. No gráfico, fica claro que a otimização do processo trouxe um aumento na obtenção do metabólito (concentração do metabólito mg/mL) e uma redução nos custos, tanto da etapa de fermentação quanto no custo total.

TABELA 4.14. Custo Total do Projeto.

| | ANTES (R\$) | DEPOIS (R\$) |
|------------------------|------------------|------------------|
| Fermentação (por lote) | 25,16 | 23,32 |
| Extração | 7,17 por amostra | 7,17 por amostra |
| Análise Cromatográfica | 3,65 por amostra | 2,05 por amostra |

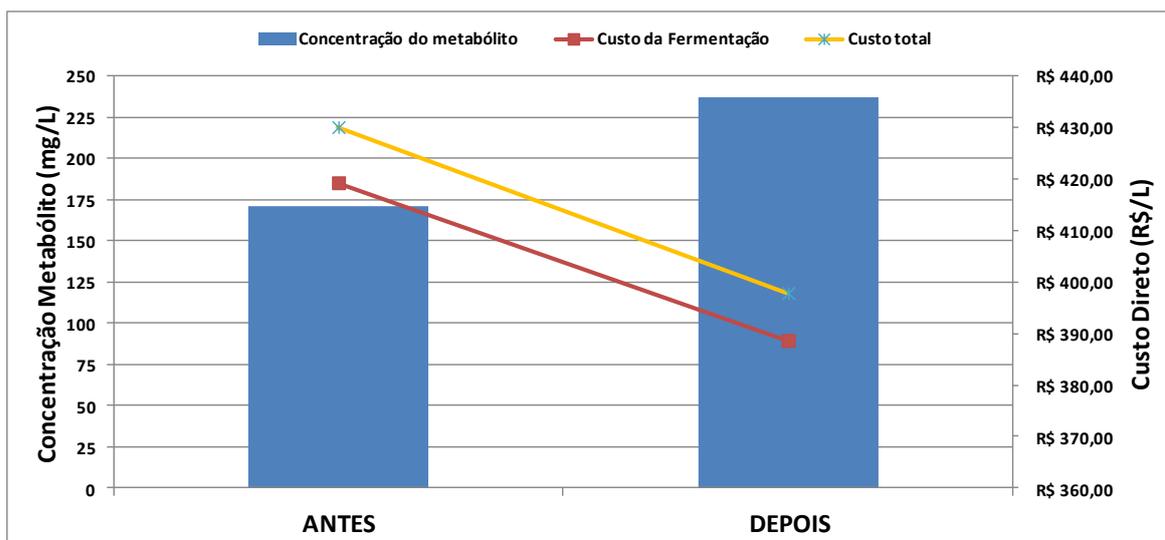


FIGURA 4.32. Gráfico relacionado aos custos da fermentação e custo total, em relação ao período ANTES da otimização do processo e DEPOIS da otimização.

A FIGURA 4.33 apresenta o gráfico, evidenciando também, que a otimização do processo trouxe um aumento na obtenção do metabólito (concentração do metabólito mg/mL) e uma redução nos custos da análise, como já discutido anteriormente. Além disso, demonstra que o custo de produção, por mg de metabólito, passou de R\$ 2,51 para R\$ 1,68 após a otimização.

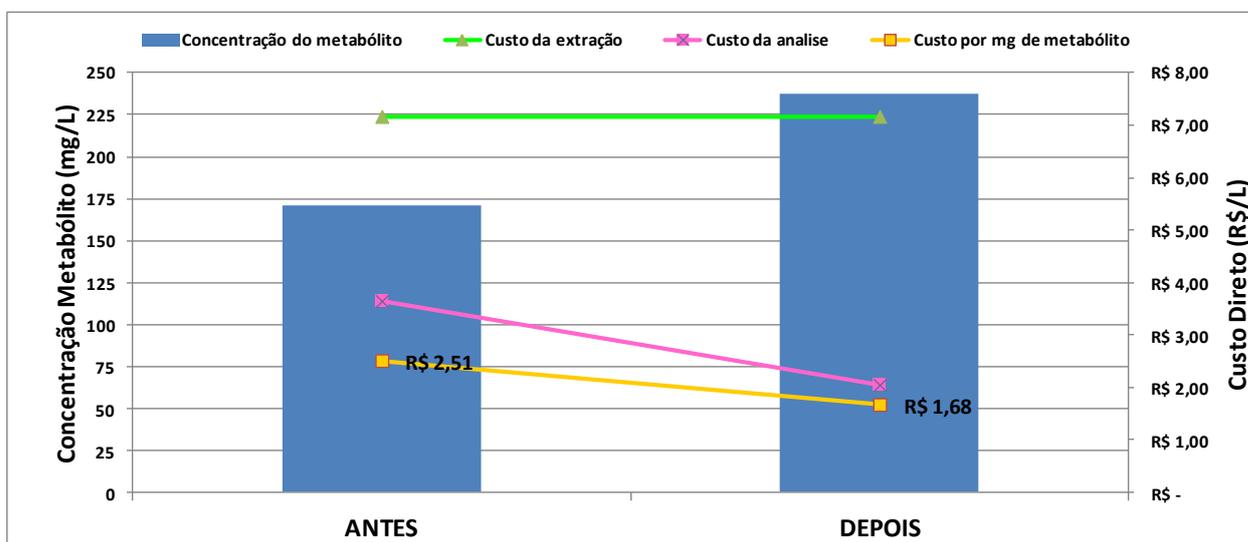


FIGURA 4.33. Gráfico relacionado aos custos da extração, custo da análise e custo por mg de metabólito, em relação ao período ANTES da otimização do processo e DEPOIS da otimização.

5 CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir de maneira empírica na Otimização da Fermentação que as variáveis, utilizadas no nível positivo (+1): temperatura de fermentação a 30 °C, velocidade de agitação 150 rpm, quantidade de açúcar a 40 g/L e o açúcar-sacarose, corroboram para o aumento na produção da substância de interesse.

Além disso, pode-se concluir também que a utilização da quimiometria, na otimização das etapas de fermentação e metodologia analítica por cromatografia líquida com arranjo de diodos, promoveu um aumento de 38,73 %, na produção do metabólito de interesse, de 171,12 mg/L para 237,4 mg/L, e uma redução de 9,56%, nos custos totais, envolvidos para sua obtenção e controle de qualidade.

Dessa forma, todos os experimentos realizados e apresentados, neste trabalho, demonstram que processos, envolvendo a biotransformação de fármacos como o Succinato de Metoprolol via fungos do gênero *Penicillium* sp., podem ser utilizados para a recuperação e reciclagem de fármacos vencidos ou fora de uso.

A geração de novas moléculas, a partir de matéria-prima que seria incinerada, colabora com o programa de Implantação dos Sistemas de Logística Reversa, coordenado pelo Ministério do Meio Ambiente e composto por mais quatro ministérios: Saúde, Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Agricultura e Abastecimento e Fazenda.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFINA. **ABIFINA**. Disponível em: <<http://www.abifina.org.br/saldo.php>>. Acesso em: 14 Novembro 2015.

ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 17, DE 16 DE ABRIL DE 2010**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html>. Acesso em: setembro 2015.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BORZARI, W. . S. W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, v. 1, 2014.

BRASIL. Lei n. 12.305/2010 - Lei que institui a Política Nacional dos Resíduos Sólidos. 2010.

BREITKREITZ, M. C. . S. A. M. . P. R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com alfa-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, p. 564-573, 2014. ISSN 3.

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida Novas Tendências e Aplicações**. 1º edição. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CONTI, R. D. . R. J. A. R. . M. P. J. S. Biocatálise: Avanços Recentes. **Química Nova**, v. 24, p. 672-675, 2001. ISSN 5.

FALQUETO, E. . D. C. . A. R. F. Como realizar o correto descarte de resíduos de medicamentos? **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 3283 - 3293, Outubro 2010.

FULTON, B. . M. A. Mycophenolate Mofetil. **Drugs**, v. 51, p. 278-298, February 1996. ISSN 2.

GIL, E. D. S. **Controle Físico-químico de Qualidade de Medicamentos**. 2º Edição. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

GUENGERICH, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical Research i Toxicology**, v. 44, p. 611-650, June 2001. ISSN 6.

HIRATUKA, C. . V. M. A. . F. P. . R. E. N. . C. R. I. . O. A. L. R. . L. I.
Logística Reversa para o Setor de Medicamentos. Brasília: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial - ABDI, 2013.

KOELLER, K. M. . W. C. H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, p. 232-240, January 2001.

LERESCHE, J. E. . M. H. P. **Org. Proc. Res. Develop.**, v. 10, p. 572, 2006.

LIU, W. . W. P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 369-384, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

OLIVEIRA, L. G. . M. S. M. **Química Nova**, v. 32, p. 742, 2009. ISSN 3.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 742-756, 2009. ISSN 3.

OMORI, A. T. . P. V. B. . O. C. S. Redução enzimática do 4-(dimetilamino)benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): Um experimento simples na compreensão da biocatálise. **Química Nova**, v. 35, p. 435-437, 2012. ISSN 2.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EdUFSCar, 2015.

PUBCHEM. **PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10 Outubro 2015.

RIBEIRO, F. A. L. . B. F. D. . B. M. C. . M. J. A. Quimiometria: inovação no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade na indústria química. **Jornal do Conselho Regional de Química IV Região (SP e MS)**, p. 14-15, Maio/Junho 2007. ISSN 85.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5^o Edição. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1998.

SMEDSGAARD, J. . N. J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 273-286, 2005. ISSN 410.

SOUZA, A. M. . P. R. J. Experimento Didático de Quimiometria para Análise Exploratória de Óleos Vegetais. **Química Nova**, v. 35, p. 223-229, 2012. ISSN 1.

TEÓFILO, R. F. . F. M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006. ISSN 2.

ANEXO I – Cromatogramas, Espectros de Ultravioleta e Espectros de Massas

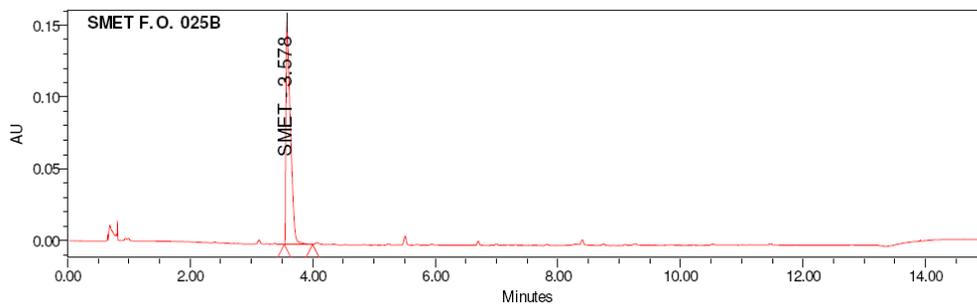


FIGURA 1. Cromatograma da amostra SMET B, FO, 025 em 274 nm.

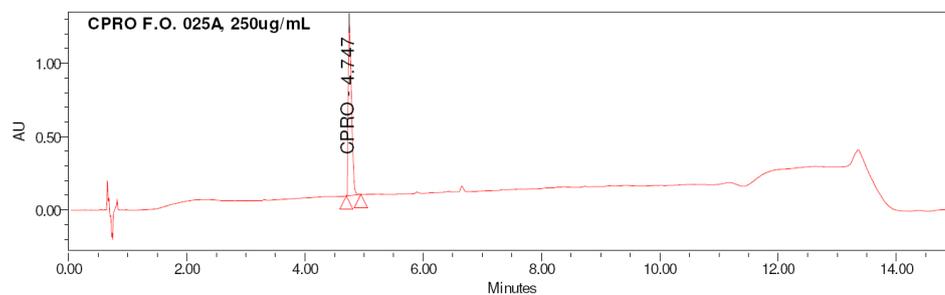


FIGURA 2. Cromatograma da amostra CPRO A, FO, 025 em 220 nm.

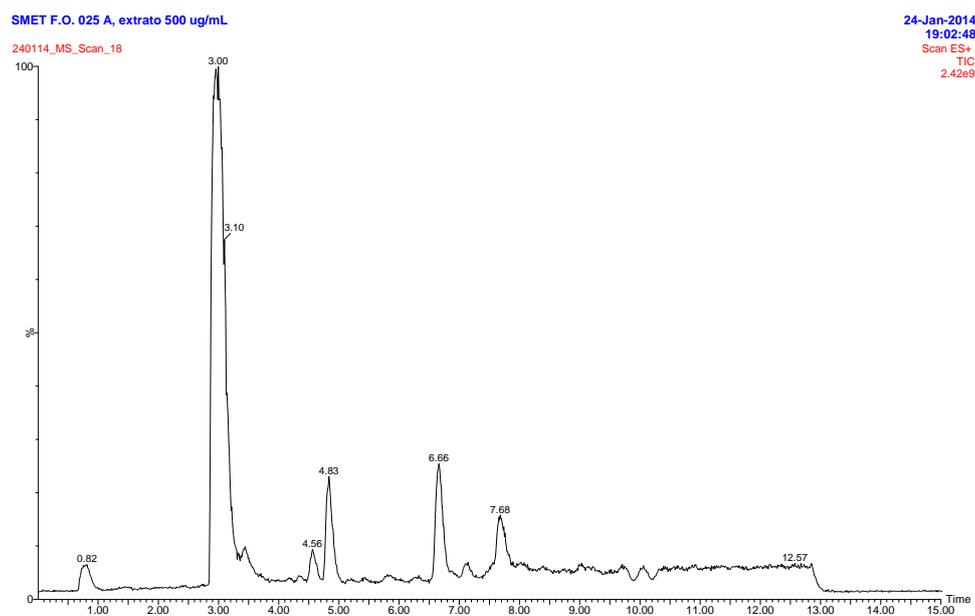


FIGURA 3. Cromatograma de íons totais no modo scan positivo, amostra SMET F.O. 025 A, extrato 500 µg/mL.

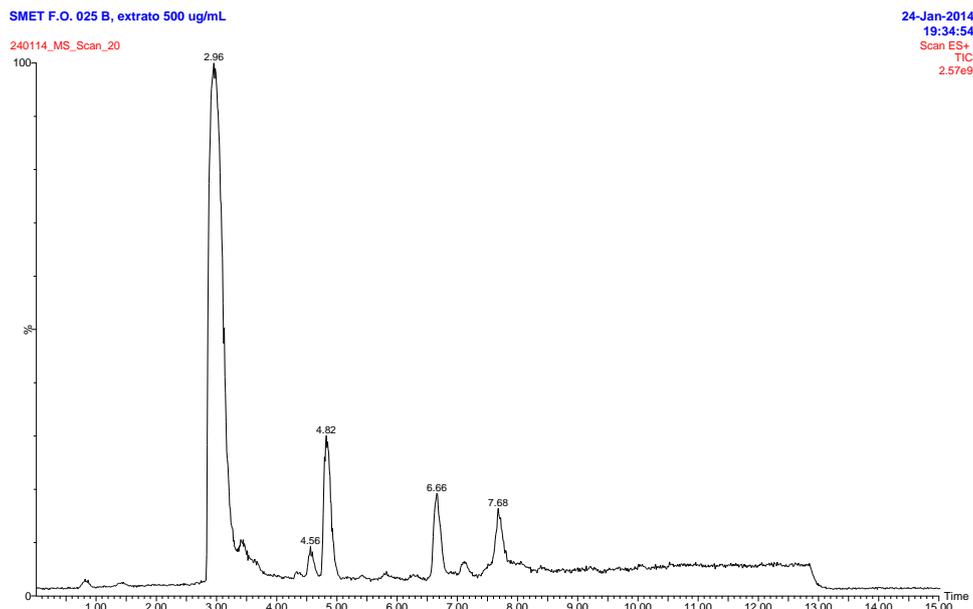


FIGURA 4. Cromatograma de íons totais no modo scan positivo, SMET F.O. 025 B, extrato 500 µg/mL.

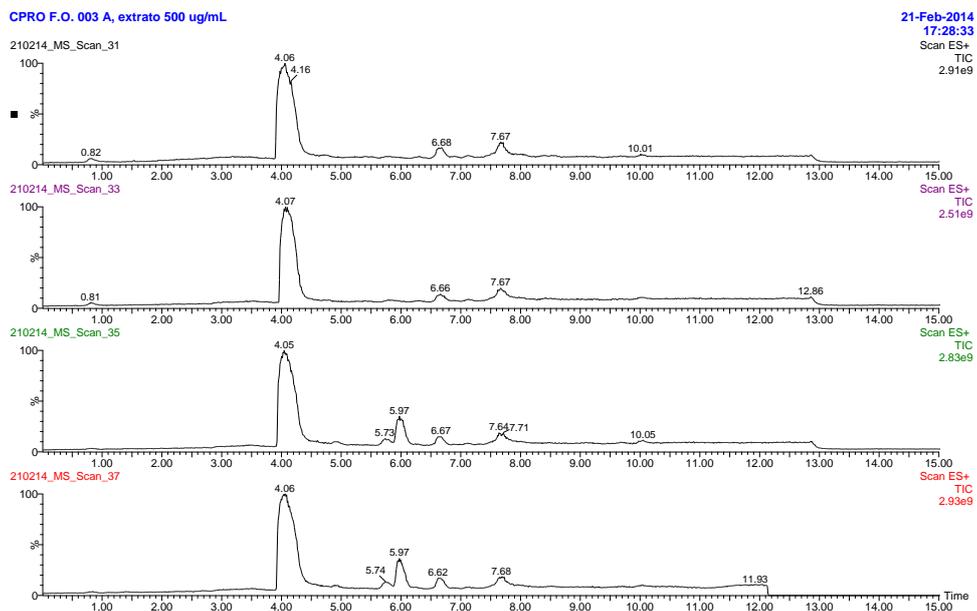


FIGURA 5. Cromatograma de íons totais no modo scan positivo, de cima para baixo CPRO F.O. 003 A, 003 B, 025 A e 025 B extrato 500 µg/mL.

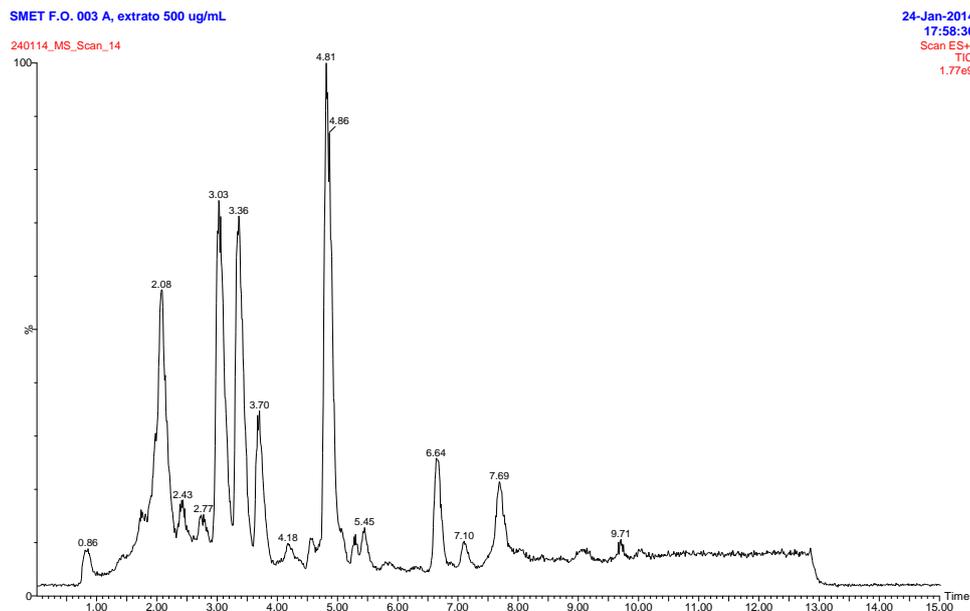


FIGURA 6. Cromatograma de íons totais no modo scan positivo, amostra SMET F.O. 003 A, extrato 500 $\mu\text{g/mL}$.

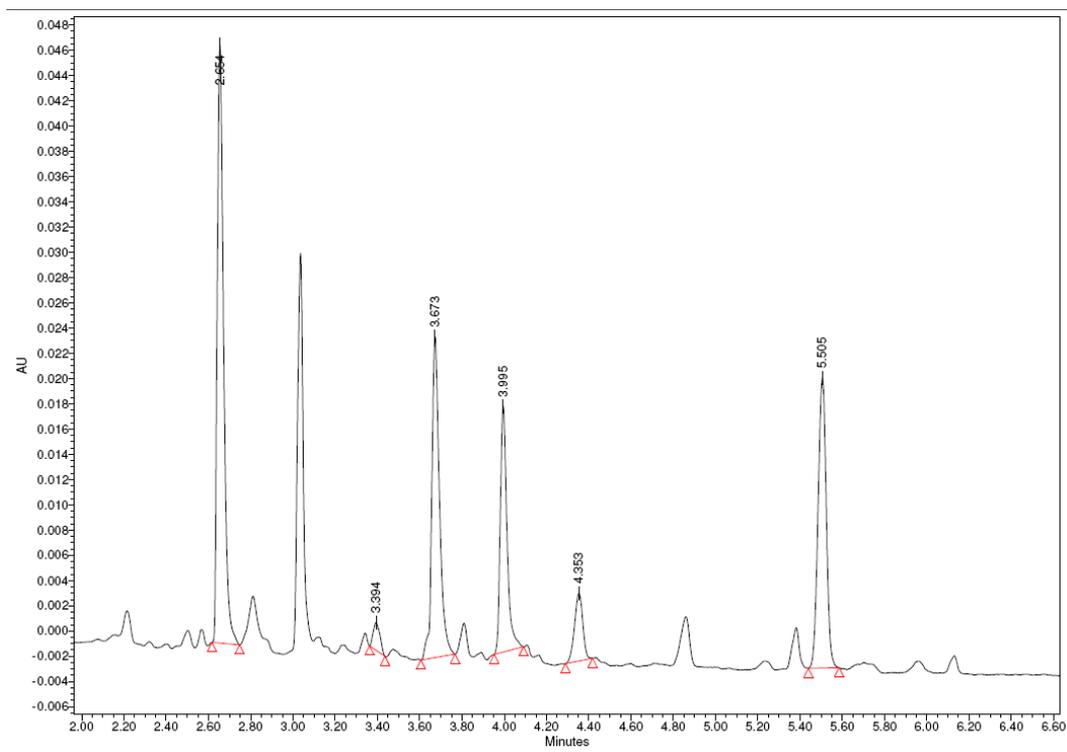


FIGURA 7. Cromatograma em 274nm da amostra SMET F.O. 003 A, extrato 1 mg/mL .

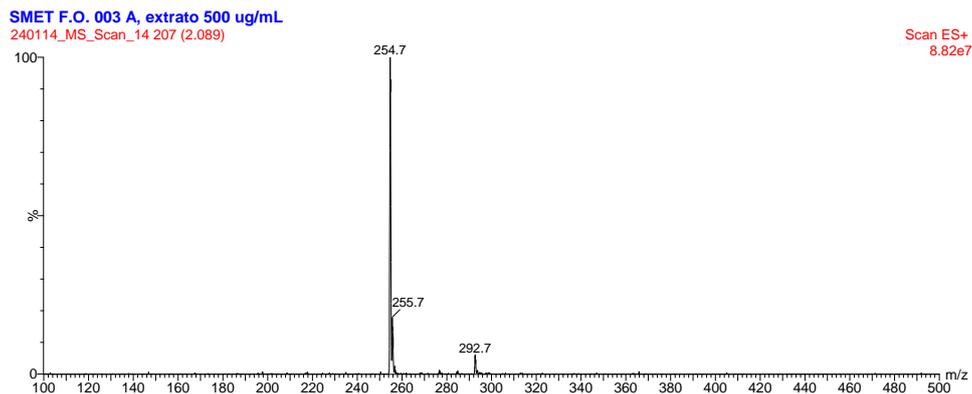


FIGURA 8. Espectro de massas das bandas 2.08 minutos, amostra SMET F.O. 003 A, extrato 500 $\mu\text{g/mL}$.

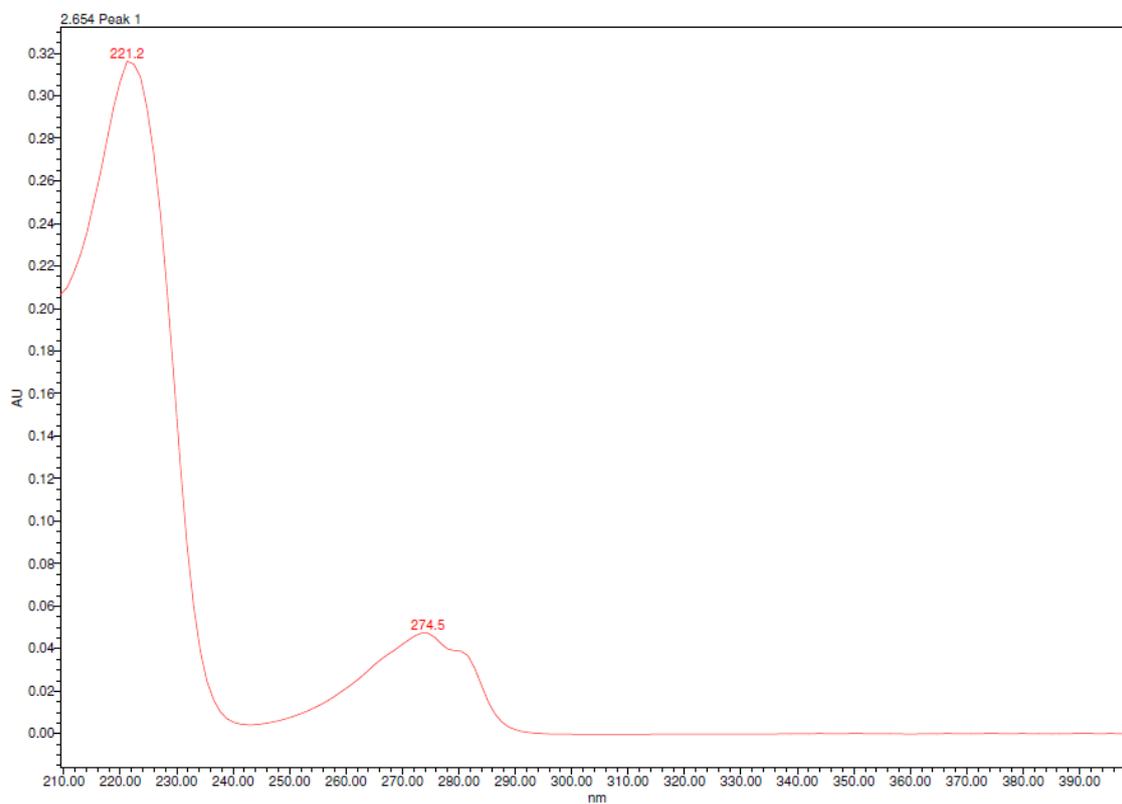


FIGURA 9. Espectro ultravioleta da banda cromatográfica em 2.65 minutos, $\lambda_{\text{máx}}$ 221.2 e 274.5 nm, referente à banda cromatográfica em 2.08 minutos no HPLC-MS/MS.

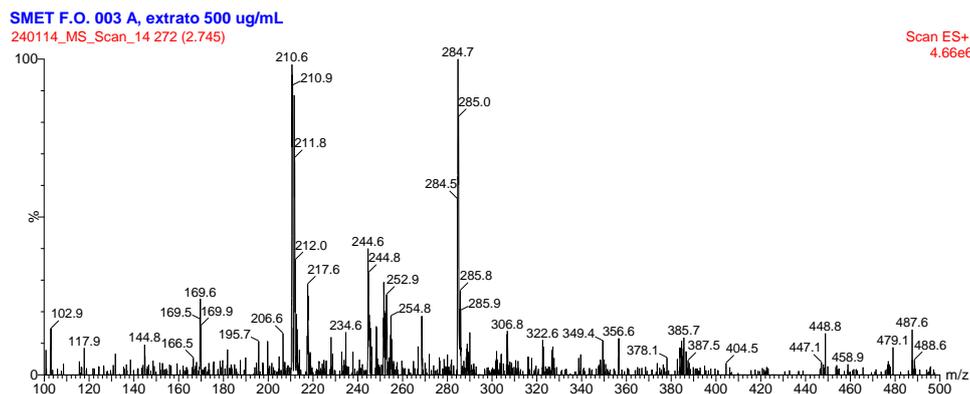


FIGURA 10. Espectro de massas das bandas 2.77 minutos, amostra SMET F.O. 003 A, extrato 500 $\mu\text{g/mL}$.

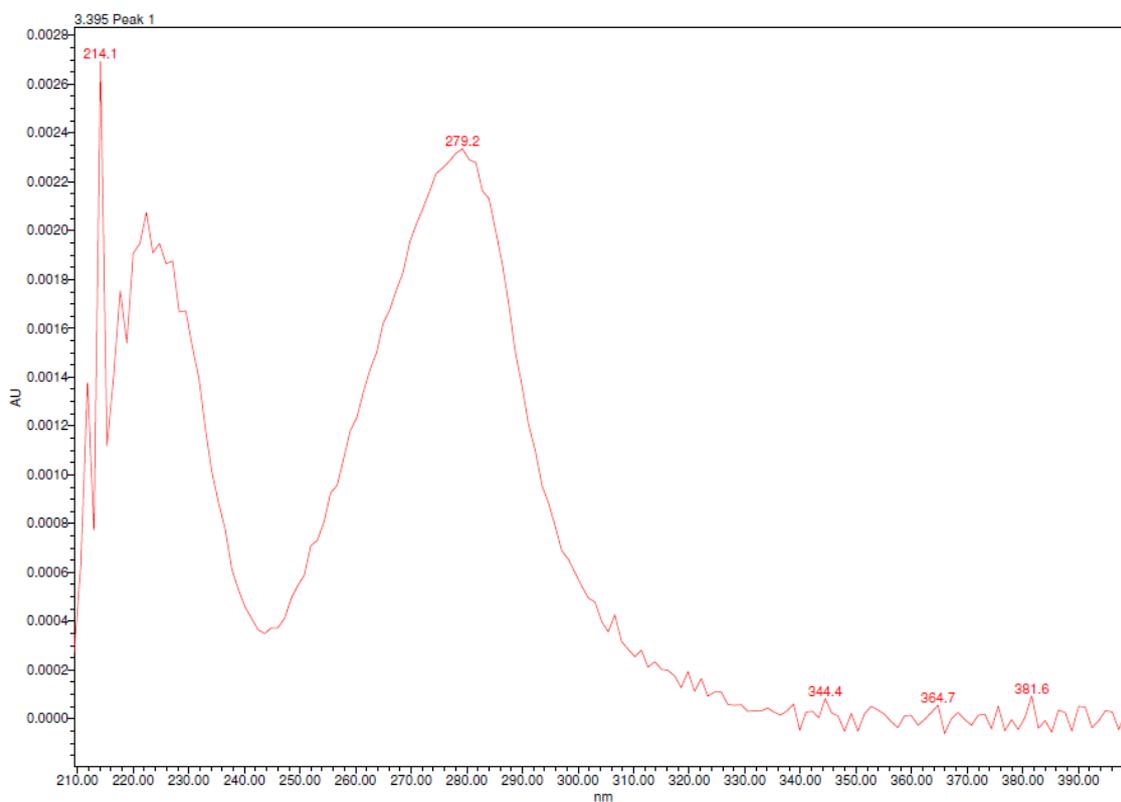


FIGURA 11.. Espectro ultravioleta da banda cromatográfica em 3.39 minutos, $\lambda_{\text{máx}}$ 214.1 e 279.2 nm, referente à banda cromatográfica em 2.77 minutos no HPLC-MS/MS.

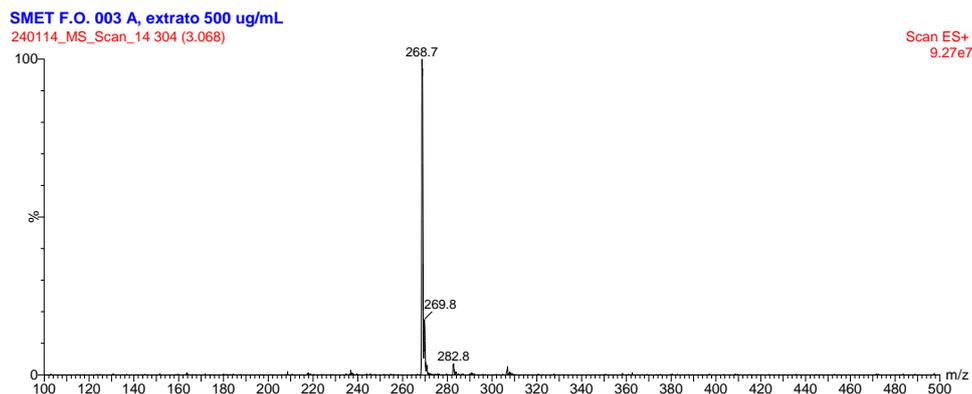


FIGURA 12.. Espectro de massas das bandas 3.03 minutos, amostra SMET F.O. 003 A, extrato 500 $\mu\text{g/mL}$.

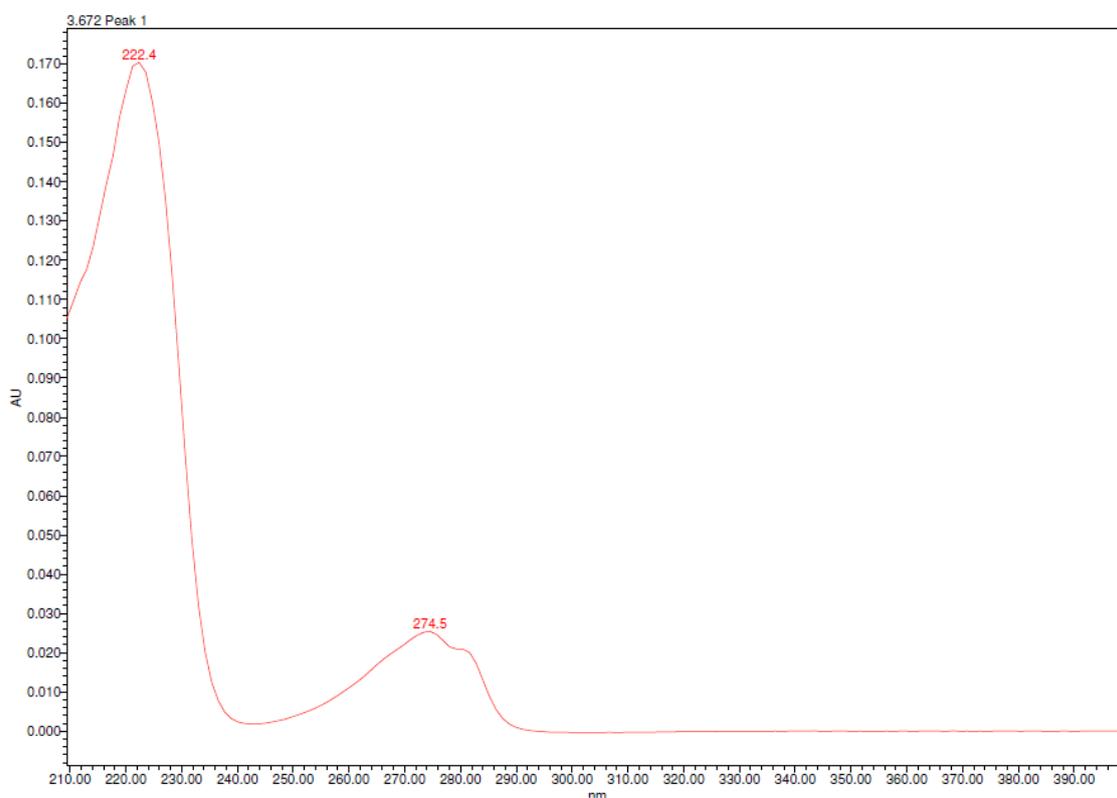


FIGURA 13. Espectro ultravioleta da banda cromatográfica em 3.62 minutos, $\lambda_{\text{máx}}$ 222.4 e 274.5 nm, referente à banda cromatográfica em 3.03 minutos no HPLC-MS/MS.

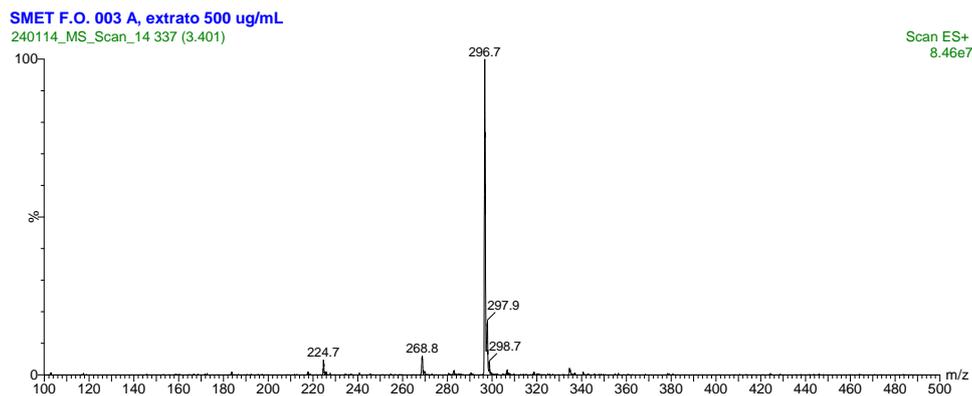


FIGURA 14. Espectro de massas das bandas 3.36 minutos, amostra SMET F.O. 003 A, extrato 500 $\mu\text{g/mL}$.

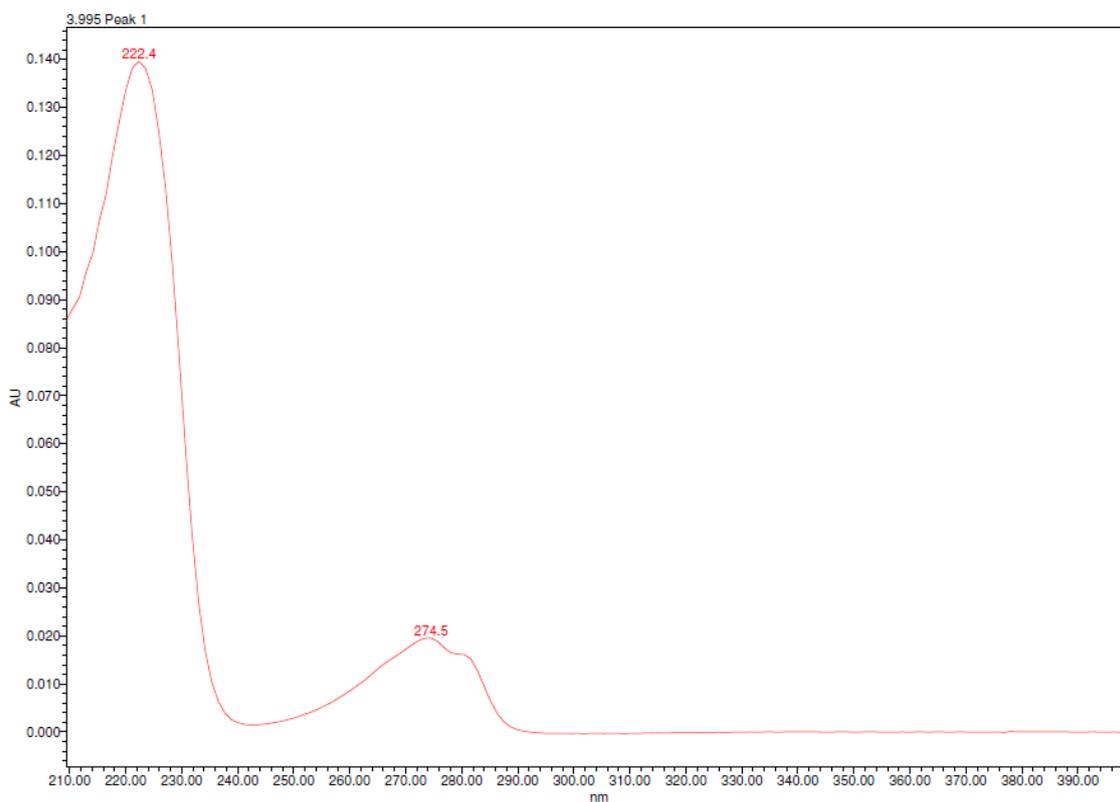


FIGURA 15. Espectro ultravioleta da banda cromatográfica em 3.99 minutos, $\lambda_{\text{máx}}$ 222.4 e 274.5 nm, referente à banda cromatográfica em 3.36 minutos no HPLC-MS/MS.

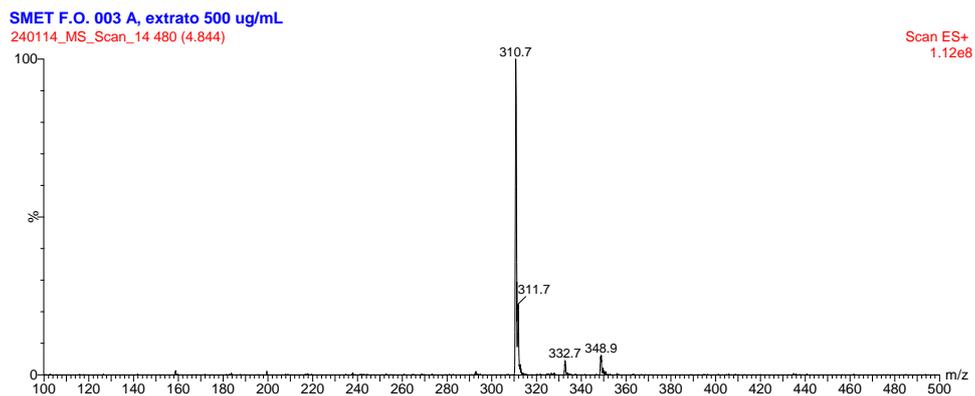


FIGURA 16. Espectro de massas das bandas 4.83 minutos, amostra SMET F.O. 003 A, extrato 500 $\mu\text{g/mL}$.

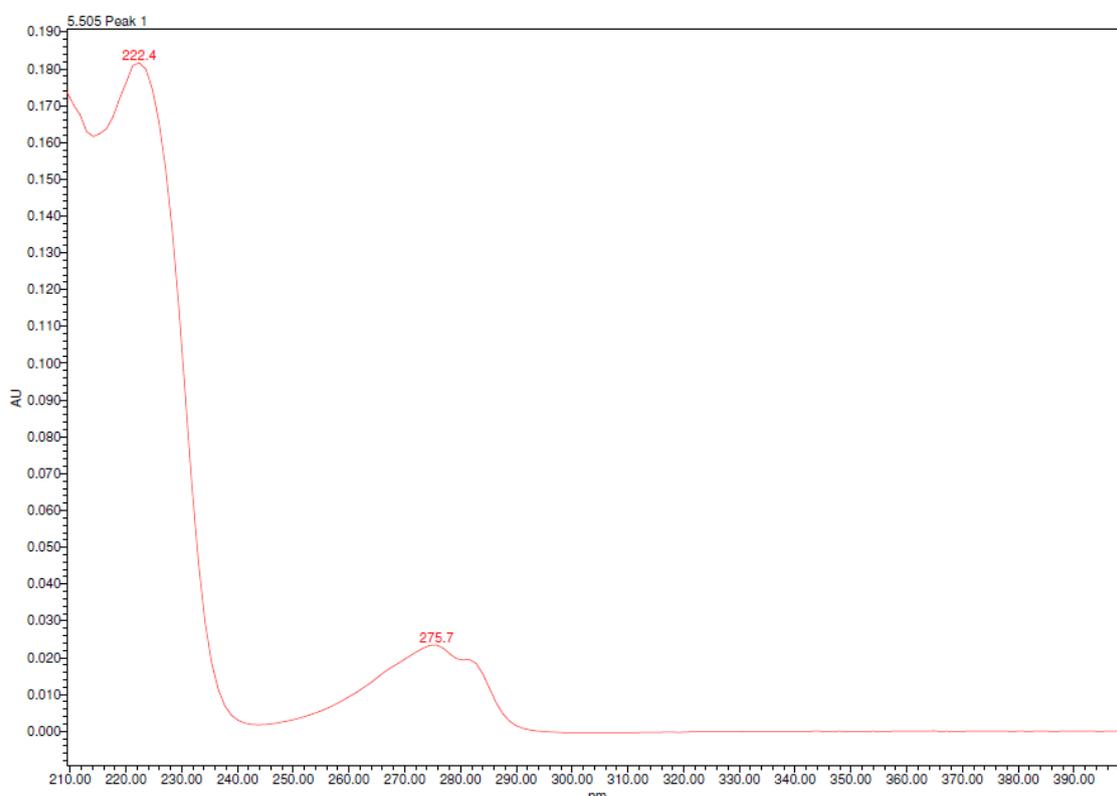


FIGURA 17. Espectro ultravioleta da banda cromatográfica em 5.50 minutos, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ 222.4 e 274.5 nm, referente à banda cromatográfica em 4.83 minutos no HPLC-MS/MS.

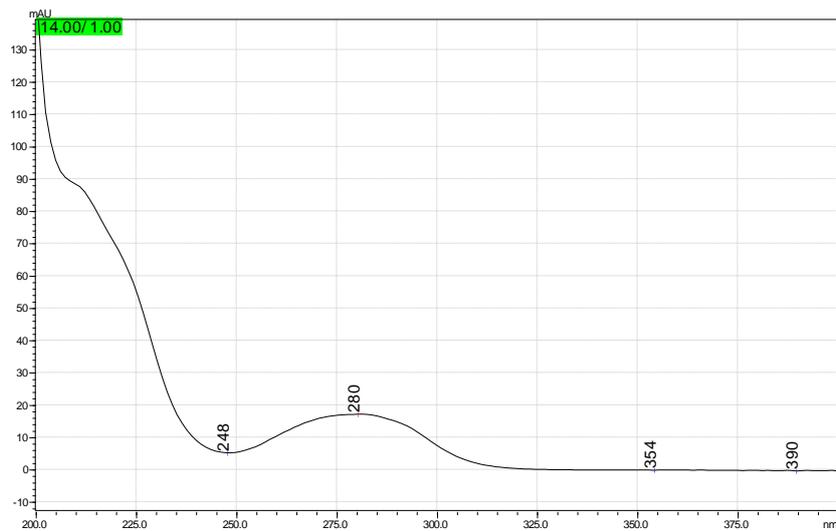


FIGURA 18. Espectro de UV do Pico 1, Amostra SMET A 1 pH 10, em 274 nm.

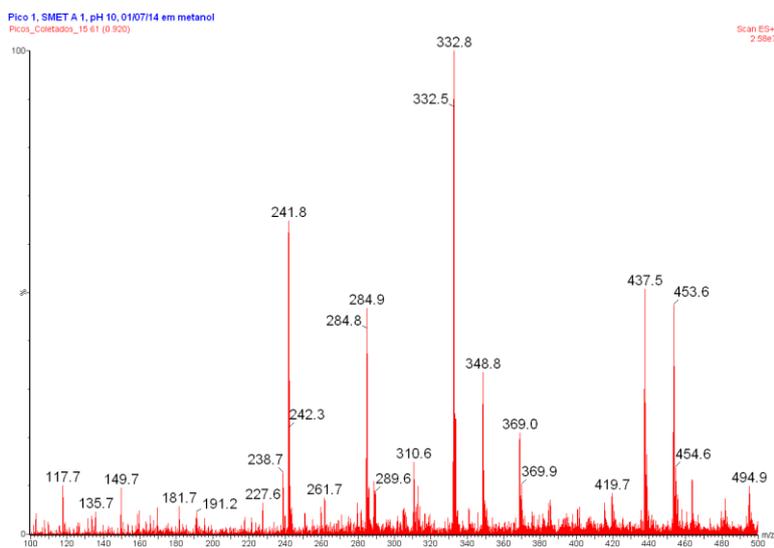


FIGURA 19. Espectro de massas obtido para o Pico 1, Amostra SMET A 1 pH 10.

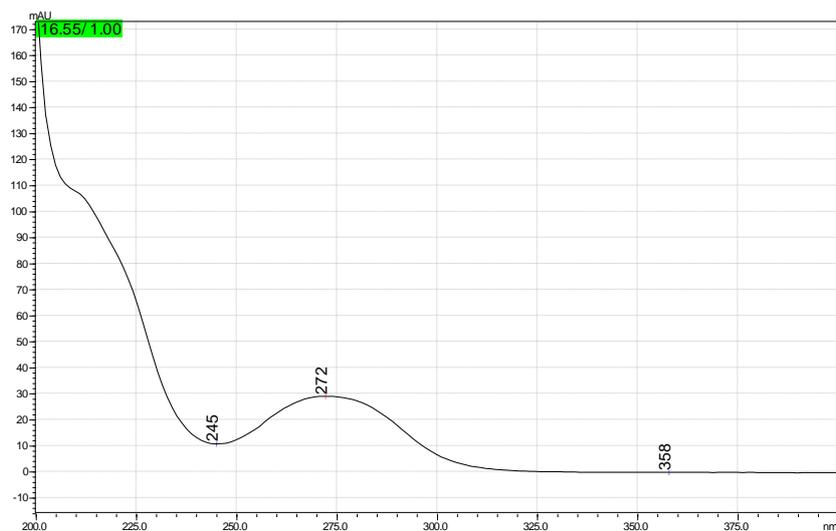


FIGURA 20. Espectro de UV do Pico 3, Amostra SMET A 1 pH 10, em 274 nm.

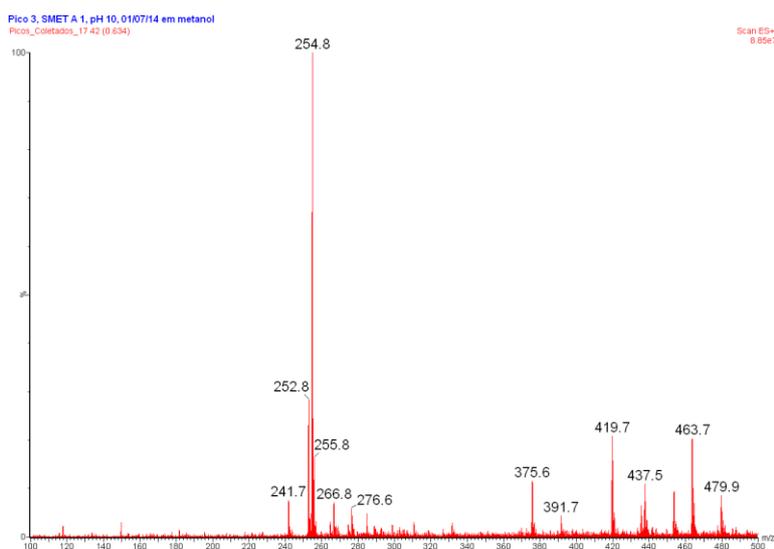


FIGURA 21. Espectro de massas obtido para o Pico 3, Amostra SMET A 1 pH 10.

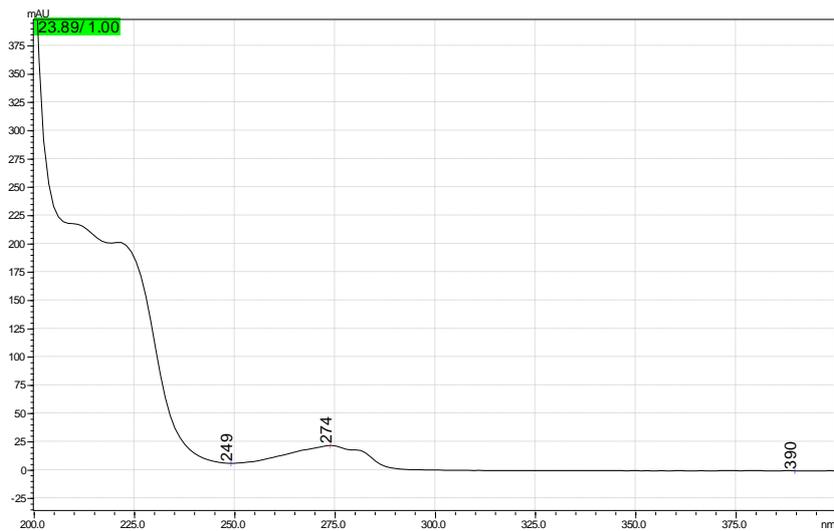


FIGURA 22. Espectro de UV do Pico 5, Amostra SMET A 1 pH 10, em 274 nm.

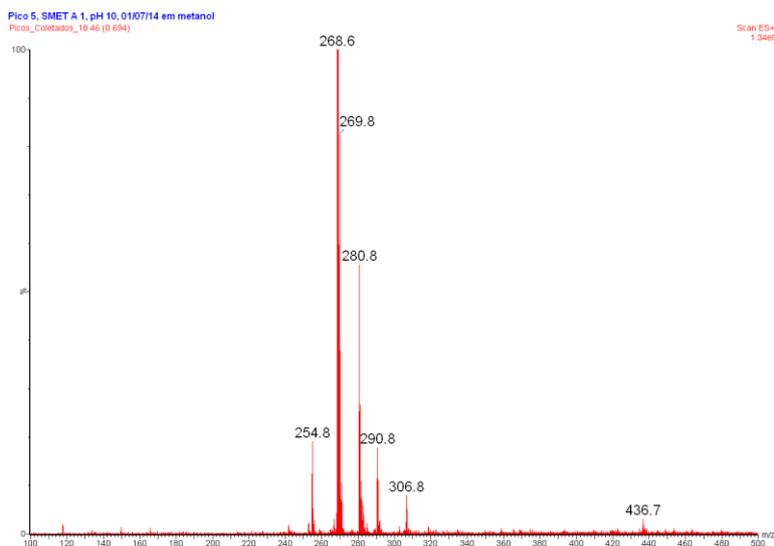


FIGURA 23. Espectro de massas obtido para o Pico 5, Amostra SMET A 1 pH 10.

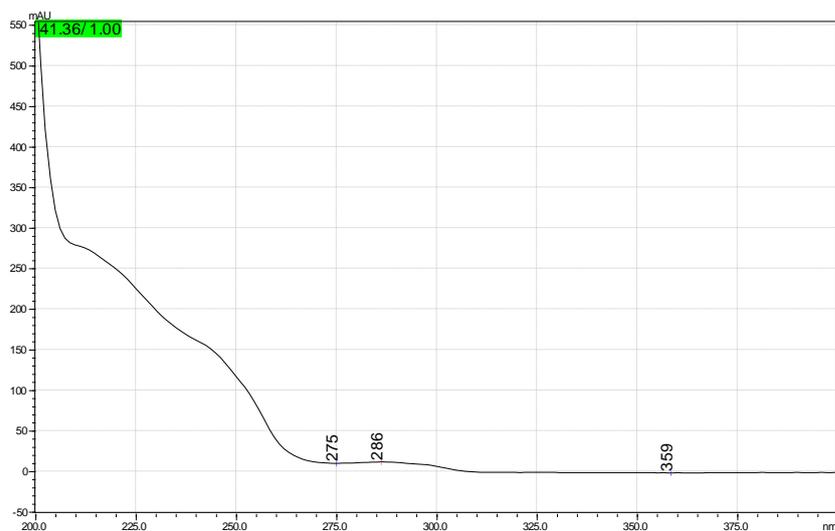


FIGURA 24. Espectro de UV do Pico 6, Amostra SMET A 1 pH 10, em 274 nm.

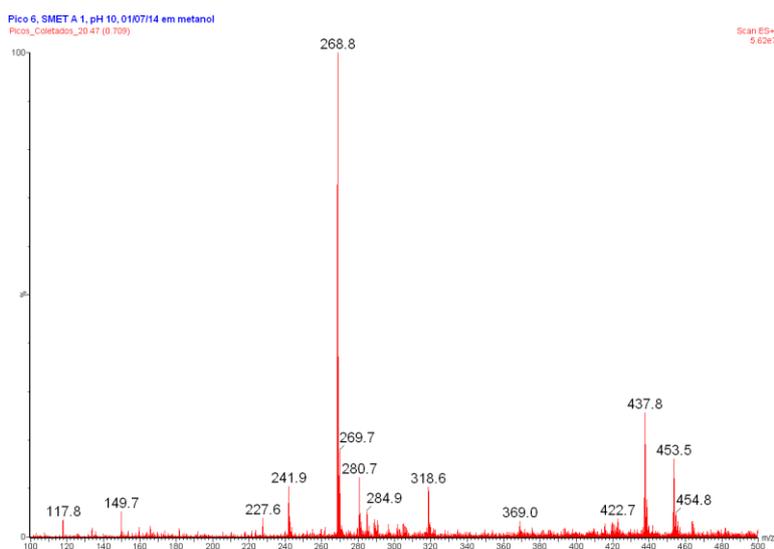


FIGURA 25. Espectro de massas obtido para o Pico 6, Amostra SMET A 1 pH 10.

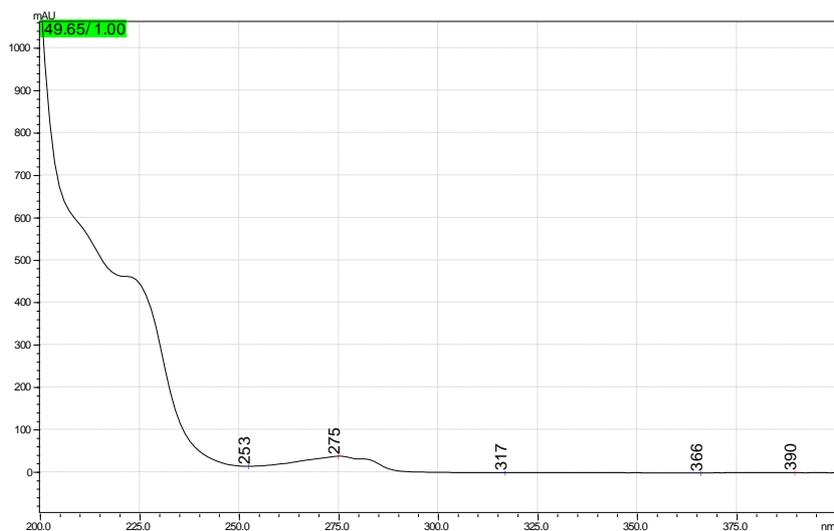


FIGURA 26. Espectro de UV do Pico 7, Amostra SMET A 1 pH 10, em 274 nm.

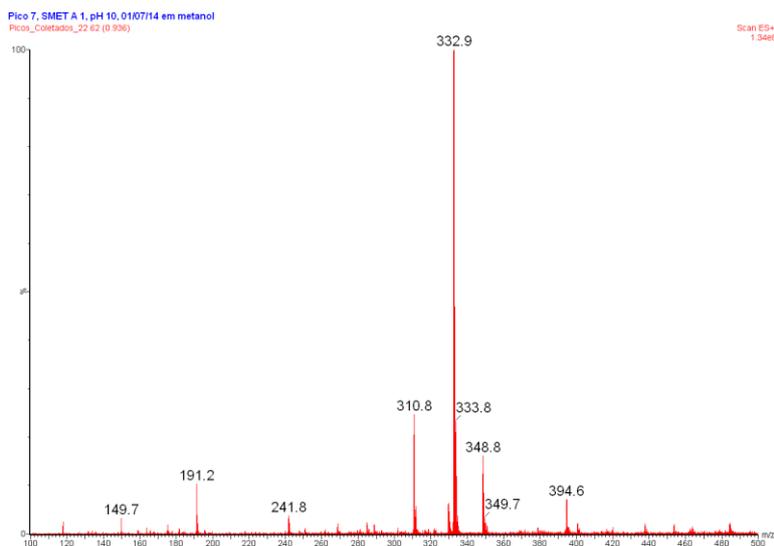


FIGURA 27. Espectro de massas obtido para o Pico 7, Amostra SMET A 1 pH 10.

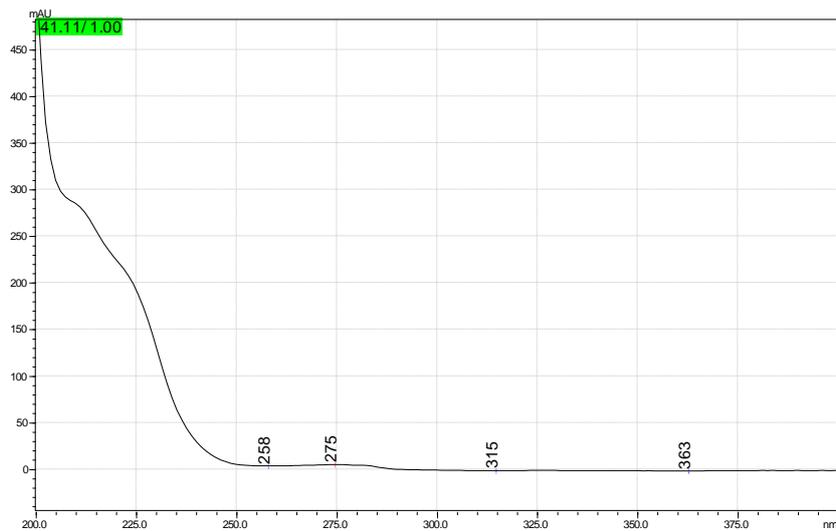


FIGURA 28. Espectro de UV do Pico 8, Amostra SMET A 1 pH 10, em 274 nm.

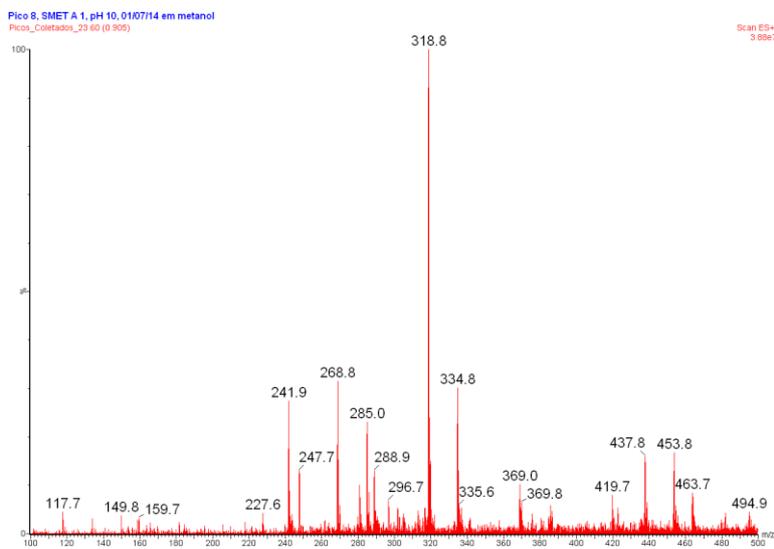
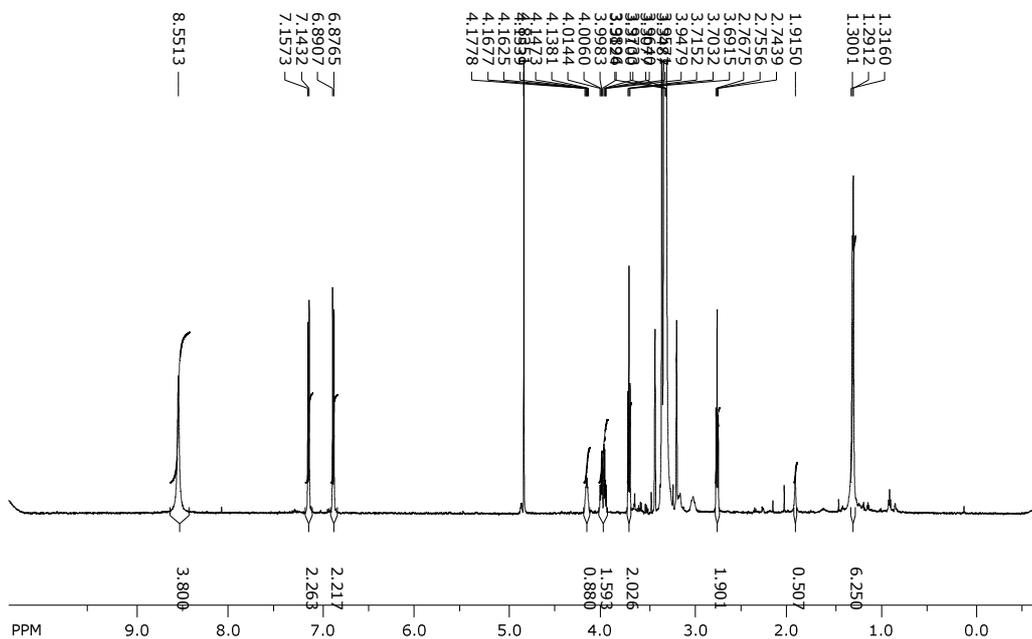


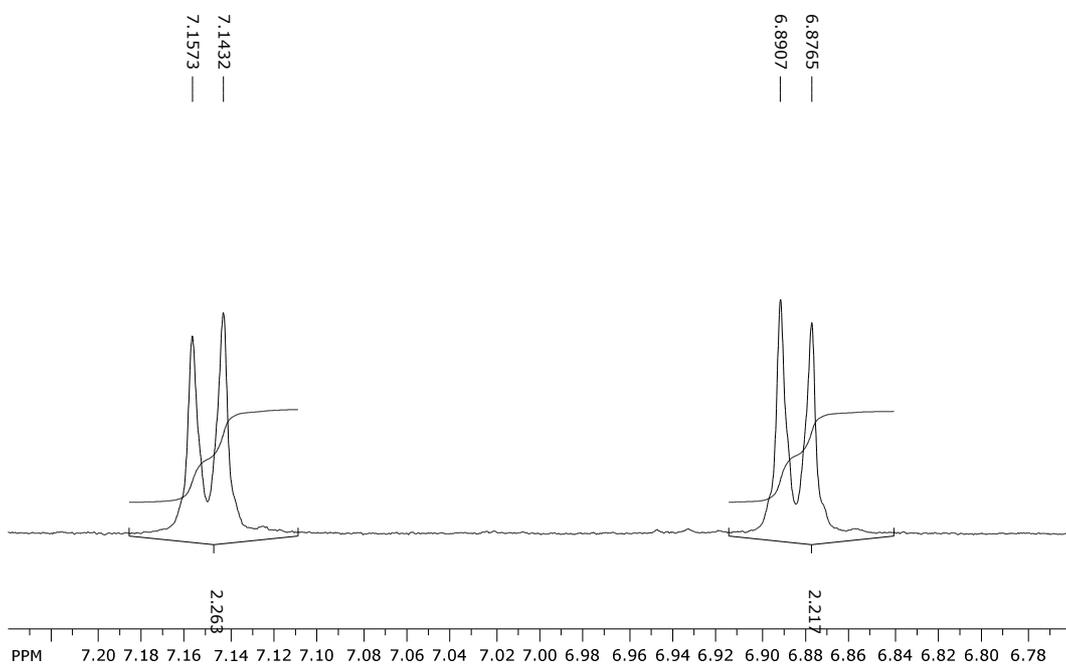
FIGURA 29. Espectro de massas obtido para o Pico 8, Amostra SMET A 1 pH 10.

ANEXO II – RMN

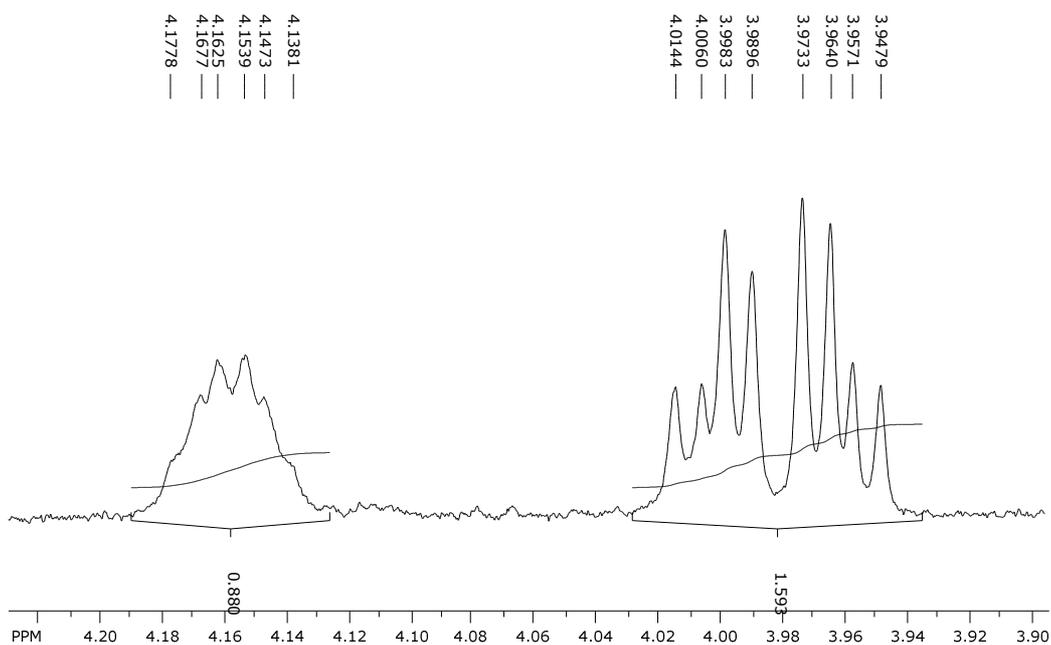
SpinWorks 3: Pico 2 - SMET - 26/09/14

FIGURA 1. Espectro de RMN ^1H (600 MHz).

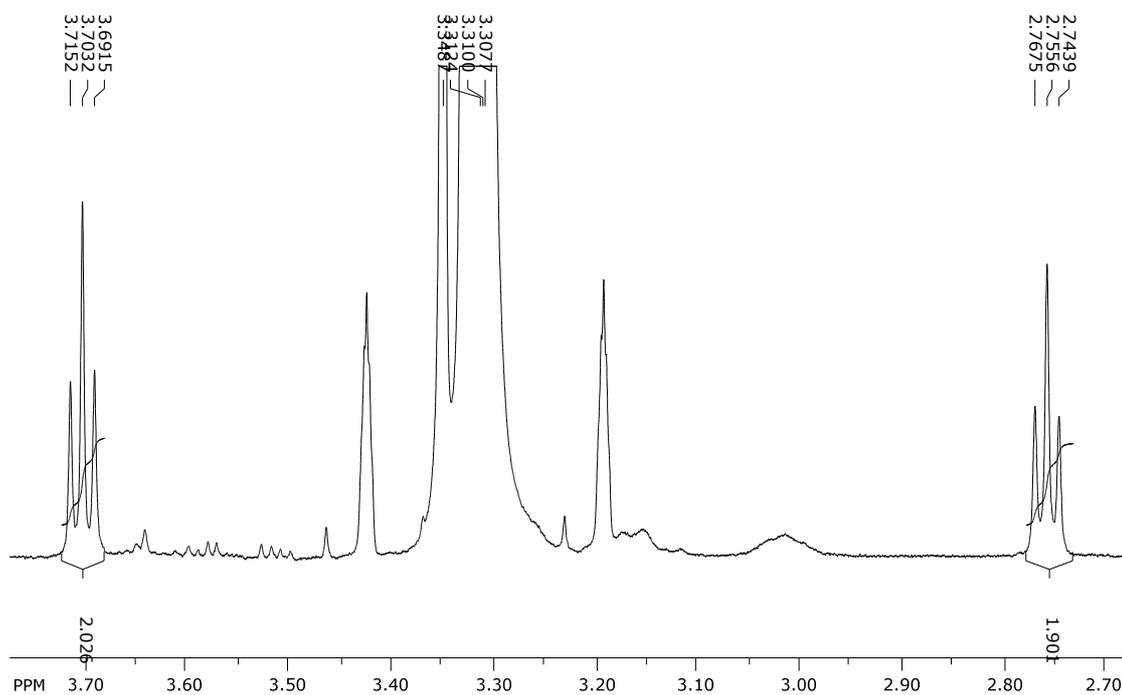
SpinWorks 3: Pico 2 - SMET - 26/09/14

FIGURA 2. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) (ampliações das regiões de interesse).

SpinWorks 3: Pico 2 - SMET - 26/09/14

FIGURA 3. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) (ampliação da região de interesse).

SpinWorks 3: Pico 2 - SMET - 26/09/14

FIGURA 4. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) (ampliação da região de interesse).

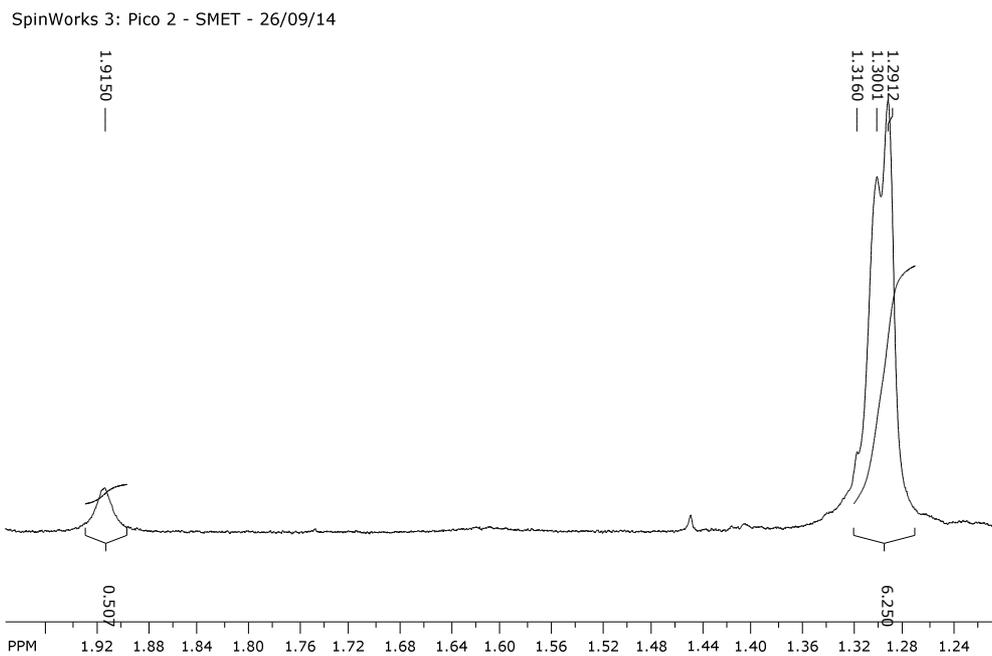


FIGURA 5. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) (ampliação da região de interesse).

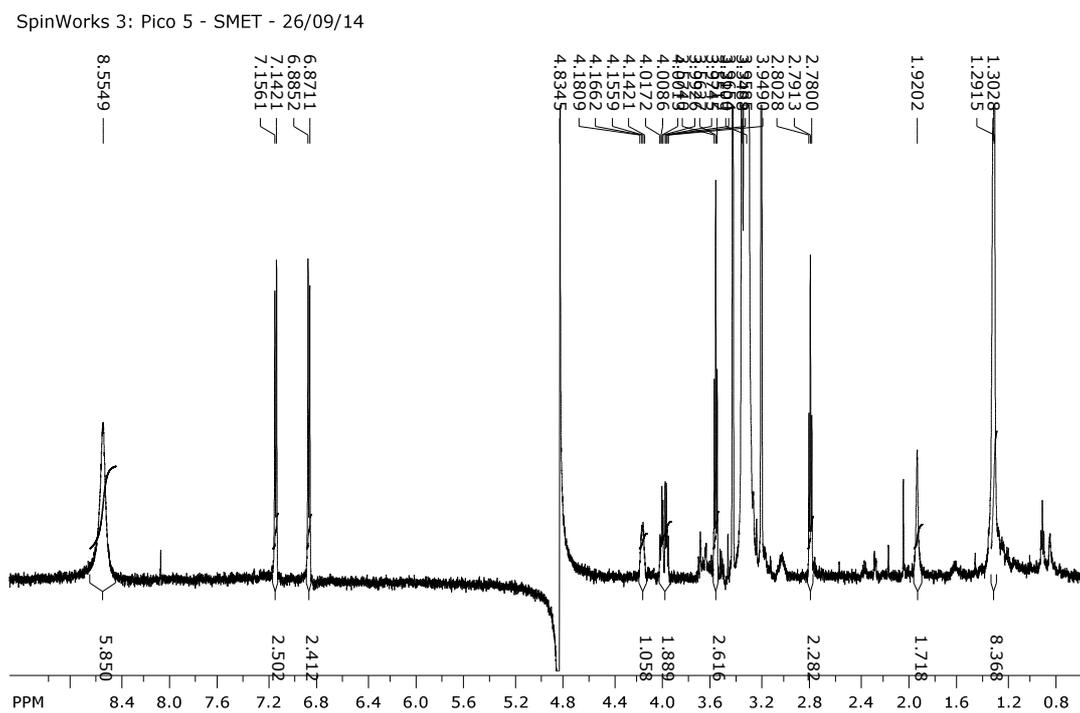


FIGURA 6. Espectro de RMN ^1H (600 MHz).

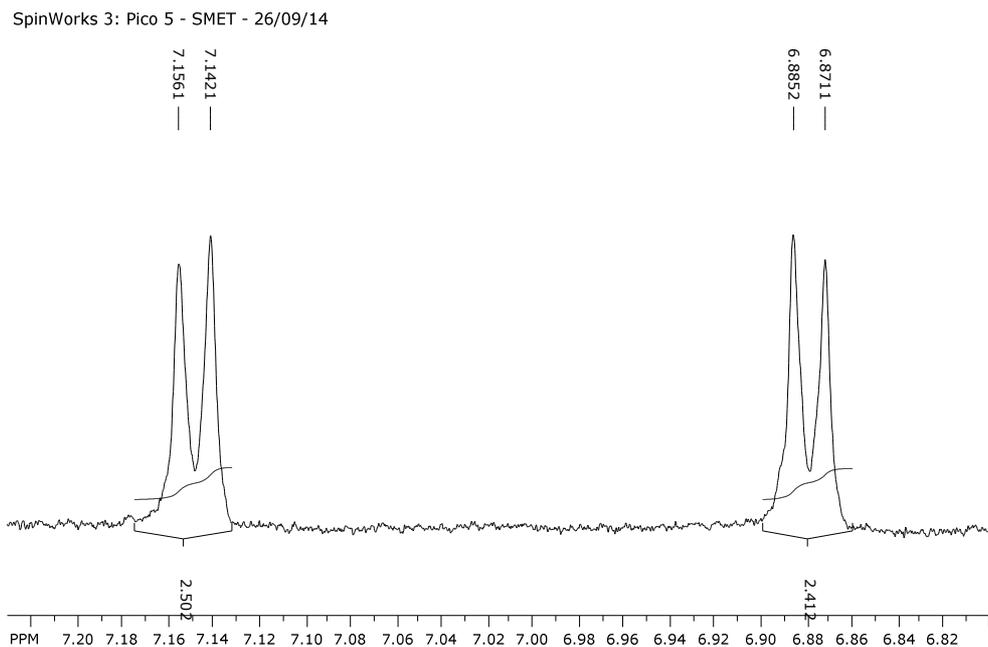


FIGURA 7. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) (ampliação da região de interesse).

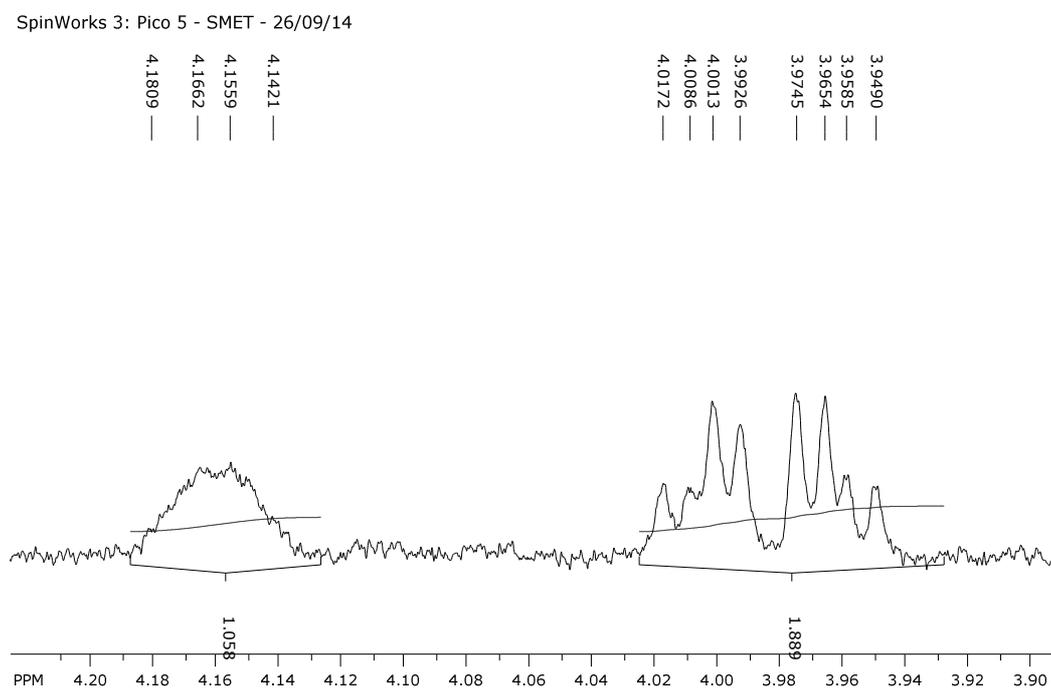


FIGURA 8. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) (ampliação da região de interesse).

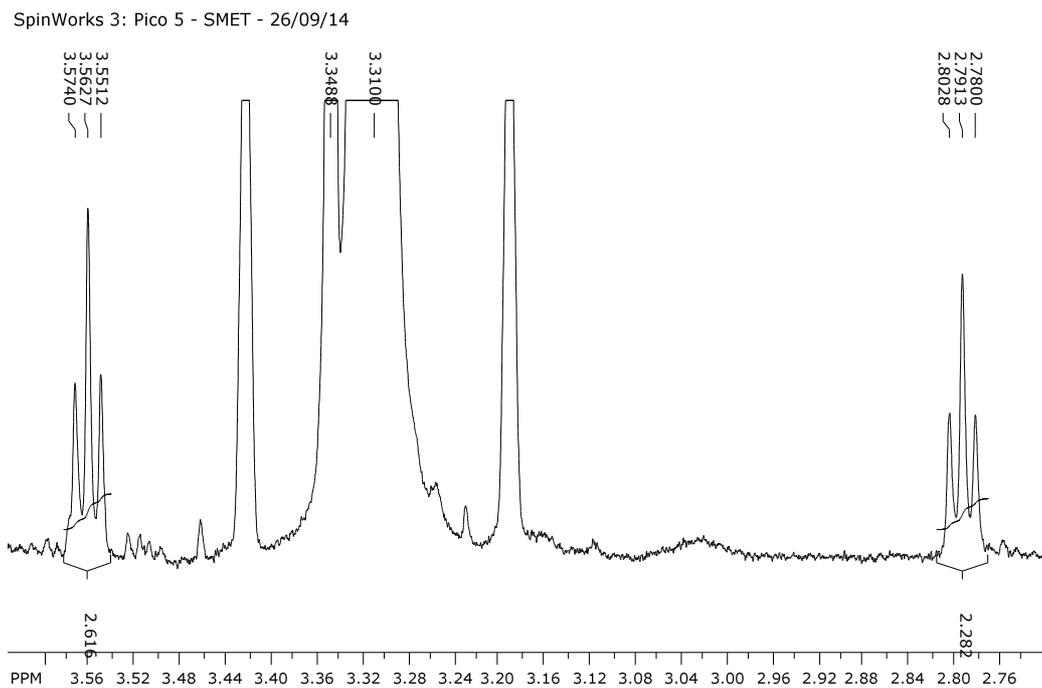


FIGURA 9. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) (ampliação da região de interesse).

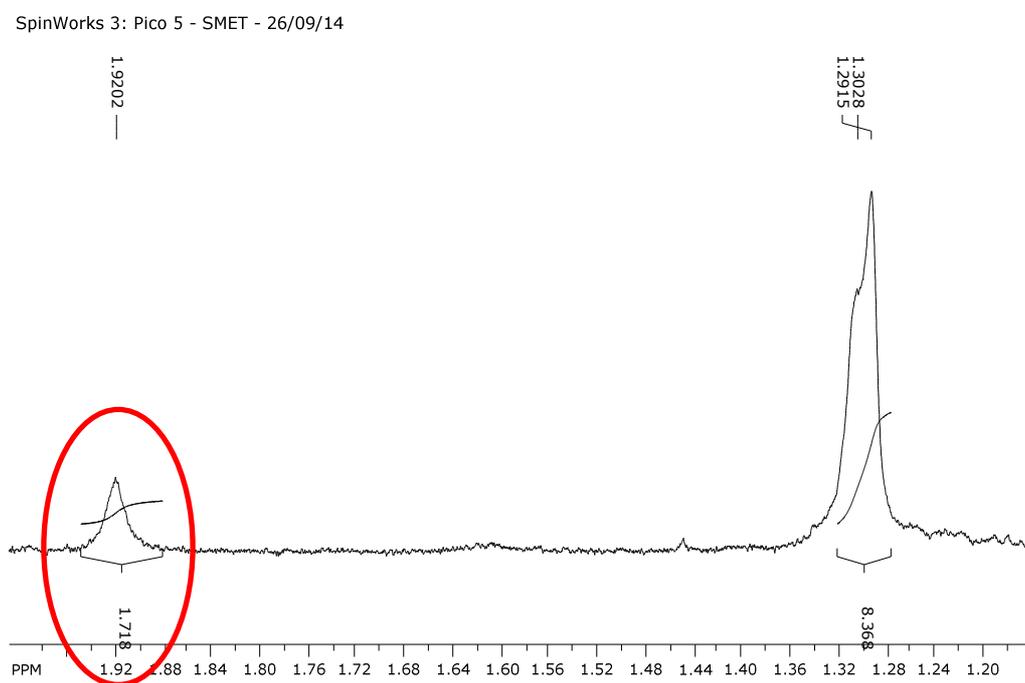


FIGURA 10. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) (ampliação da região de interesse).