

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus
metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com
fungos**

Thiago Barth

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Thiago Barth

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Coorientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-graduação em 27/03/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Barth

Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatórias

**Dedico este trabalho a minha esposa Vanessa e aos meus pais
Renato e Maria.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, pelos momentos difíceis que ensinam e os alegres que revigoram.

À minha amiga e esposa Vanessa pelo carinho e vida compartilhada, não parece, mas passaram-se 11 anos. Agradeço também, pelo desprendimento e coragem ao aceitar minha proposta, abandonando trabalho e a segurança e convívio da família, em busca deste sonho.

Aos meus pais Renato e Maria Dolores pela vida, carinho, incentivo e esforço para me proporcionar a melhor educação possível.

Aos meus sogros Maria Corina e Aristides por haverem gerado minha companheira e pelo incentivo e apoio incondicionais.

Agradeço especialmente a Profa. Pierina, pelo privilégio em ser seu orientado, pelos ensinamentos e convívio com uma das pessoas mais justas e competentes que tive o prazer de conhecer. Desejo muita saúde, paz e alegria para ti e tua família. Muito obrigado!

À Profa. Mônica Tallarico Pupo pela co-orientação e indispensável contribuição ao desenvolvimento deste projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Química e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade de desenvolver este projeto.

Aos colegas pós-graduandos do CROEC, Anderson, Fernando, Igor, Keyller, Leandro, Milena, Patrícia, Rodrigo pelos bons momentos, ajuda e pela troca de experiências e conhecimento.

Aos colegas funcionários do CROEC, Luciana, Roberto e Valquíria pela amizade e suporte para a execução deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Química de micro-organismos da FCFRP pelo auxílio e ensinamentos durante os experimentos de biotransformação, em especial a Cláudia, Denise, Fernanda, Marília, Raphael e Warley.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física e Química.

À Profa. Laura Tiemi Okano pela ajuda com os experimentos de dicroísmo circular.

Ao Prof. Isidro González Collado pela oportunidade de realização e supervisão durante o estágio de Doutorado Sanduíche.

Ao professor, Luiz Fernando Lopes Guimarães pela amizade e ensinamentos.

Aos Profs. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira Cristiane Masetto de Gaitani pela amizade, ensinamentos e disponibilização de seus laboratórios.

Aos Profs. Drs. Antonio José Macías Sanchez, Josefina Aleu Casatejada, Rosa Durán Patrón e Rosário Hernández Galán pelas orientações nos experimentos de microbiologia.

Aos colegas do laboratório de Química Orgânica da Universidad de Cádiz, Ana Ligia, Antonio, Beatriz, Cristina, Eugenia, Javier Moraga, Javier Barúa, José, José Manuel, Maria Jesús, Marraiana, Michelli, Raphael.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro e bolsa de estudos.

À Comissão de aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (Capes) pela bolsa de Doutorado sanduíche.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

BARTH, T. **Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos**. 2012. 242f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O uso de fungos na biotransformação estereosseletiva de fármacos pode constituir-se em uma excelente alternativa à síntese assimétrica para obtenção de metabólitos, bem como aos estudos de biotransformação *in vivo* e *in vitro* convencionais. Neste trabalho foram empregados fungos isolados de órgãos internos de plantas, classificados como endofíticos, fungos fitopatógenos, bem como, fungos adquiridos de coleções de micro-organismos. Esses fungos foram empregados no estudo da biotransformação estereosseletiva dos fármacos midodrina, bufuralol e donepezila. Estes fármacos foram selecionados por produzirem metabólitos ativos nos processos de biotransformação em humanos. Para o monitoramento da formação dos metabólitos dos fármacos foi necessário desenvolver e validar métodos analíticos com características adequadas para essa aplicação. Para determinação enantiosseletiva da midodrina e seu metabólito empregou-se a eletroforese capilar, enquanto que para a determinação aquiral empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência. Para avaliar a biotransformação estereosseletiva do bufuralol e donepezila foram desenvolvidos métodos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência. Os dados referentes ao estudo de cada fármaco são apresentados em quatro capítulos. O primeiro capítulo apresenta os resultados obtidos no desenvolvimento de um método empregando a eletroforese capilar para a determinação enantiosseletiva de midodrina e seu metabólito desglímidodrina (DMAE) em meio de cultura Czapek. As análises foram realizadas em capilar de sílica de 50 μm de diâmetro interno e com comprimento efetivo de 40 cm, utilizando 30 mmol L^{-1} de trimetil- β -ciclodextrina dissolvida em solução de acetato de sódio 70 mmol L^{-1} , pH 5, como tampão de análise. A técnica de preparação das amostras empregada foi a extração líquido-líquido. O método foi validado, mostrando linearidade na faixa de concentração de 100 – 12000 ng mL^{-1} , com coeficientes de correlação linear ≥ 0.9975 . Os resultados de precisão e exatidão foram inferiores a 15% e a robustez do método foi avaliada através de um planejamento fatorial fracionário. O método foi aplicado em um estudo de biotransformação usando fungos endofíticos. Foram avaliados oito fungos com destaque para o fungo *Papulaspora immersa* Hotson (SS13) que biotransformou 21,3% da (+)-midodrina em (+)-DMAE e 2,4% da (-)-midodrina em (-)-DMAE, em 72 h de biotransformação, apresentando um excesso enantiomérico de 79,7%. O segundo capítulo apresenta os resultados obtidos no desenvolvimento de um método cromatográfico para a determinação de midodrina e DMAE em meio de cultura Czapek-Dox. As análises foram realizadas no modo reverso de eluição empregando uma coluna Lichrospher 100 RP 18 e fase móvel composta por acetonitrila:ácido fórmico 40 mmol L^{-1} (60:40, v/v), vazão de 1,4 mL min^{-1} e detecção em 290 nm. O preparo de amostras empregado foi a extração líquido-líquido, usando acetato de etila como solvente extrator. O método foi validado na faixa de concentração de 0,4 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficientes de correlação linear superiores

a 0,9997. Este método foi aplicado em um estudo de biotransformação da midodrina empregando o fungo endofítico *Papulaspora immersa* e duas linhagens do fitopatógeno *Botrytis cinerea* (UCA 992 e 2100). Entre os fungos estudados, o *Botrytis cinerea* 2100, em condição de agitação, apresentou o maior percentual de biotransformação da midodrina em DMAE (42,2% em 48 h). Além disso, nos cromatogramas referentes a biotransformação em condição estática, pelos fungos *Papulaspora immersa* e *Botrytis cinerea* 2100, foi observada a presença de picos adicionais não observados nos controles realizados. Estes fungos foram submetidos à biotransformação em escala ampliada, em condição estática, a partir das quais foram isolados DMAE de ambos os fungos e um derivado desaminado da midodrina (*Botrytis cinerea* 2100). No terceiro capítulo são apresentados os resultados obtidos com o desenvolvimento de um método para a determinação estereosseletiva do bufuralol e seus metabólitos 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol em meio Czapek, usando a coluna Chiralcel OD-H no modo normal de eluição. As demais condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel constituída por hexano:isopropanol:metanol (97,5:2,0:0,5; v/v/v) acrescidos de 0,5% de dietilamina, vazão 1,5 mL min⁻¹ e detecção no UV em 248 e 273 nm. A microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca em três fases foi usada como procedimento de preparação das amostras. As condições empregadas na extração foram: fase doadora em pH 13 ajustado com NaOH 2 mol L⁻¹, *n*-octanol como solvente orgânico, fase aceptora constituída por ácido acético 0,2 mol L⁻¹, tempo de extração de 30 min e velocidade de agitação de 1750 rpm. Os valores de recuperação do método ficaram na faixa de 50 – 69%. O método foi aplicado em um estudo piloto de biotransformação com cinco espécies de fungos endofíticos. Nenhum dos fungos estudados biotransformou o bufuralol em 1'-oxobufuralol e/ou 1'-hidroxibufuralol e, devido a isso, o método desenvolvido não foi validado. O quarto capítulo mostra os resultados obtidos com o desenvolvimento de um método empregando a cromatografia líquida de alta eficiência na determinação enantiosseletiva da donepezila, 5-*O*-desmetil donepezila e 6-*O*-desmetil donepezila em meio de cultura Czapek. As análises foram realizadas na coluna Chiralpak AD-H no modo normal de eluição. As demais condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel constituída por hexano:etanol:metanol (75:20:5, v/v/v) acrescido de 0,3% de trietilamina, vazão 1,5 mL min⁻¹ e detecção no UV em 270 nm. A técnica de preparação das amostras foi a extração líquido-líquido e o solvente extrator foi o acetato de etila. O método descrito foi validado, mostrando linearidade na faixa de concentração de 100 – 10000 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da donepezila ($r \geq 0,9985$) e 100 – 5000 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da 5-*O*-desmetil donepezila e 6-*O*-desmetil donepezila ($r \geq 0,9951$). Os valores de recuperação foram superiores a 90% para todos os analitos. O método foi aplicado em um estudo de biotransformação usando fungos. Foram avaliados cinco fungos endofíticos e os fungos *Cunninghamella elegans* ATCC 10028B e *Beauveria bassiana* ATCC 7159. Os fungos endofíticos não desmetilaram a donepezila nas condições estudadas, entretanto, esta reação foi catalisada pelo fungo *B. bassiana* que biotransformou predominantemente 8,3% da donepezila em (-)-(R)-5-*O*-desmetil donepezila (*ee*, 60,6%), enquanto que o fungo *C. elegans* apresentou biotransformação enantiosseletiva da donepezila em (-)-(R)-6-*O*-desmetil donepezila (*ee*, 100%) com um rendimento de 15,1%. Os dados aqui apresentados demonstram que biotransformações com fungos são uma importante alternativa para mimetizar a biotransformação em mamíferos e para a obtenção de metabólitos de fármacos, especialmente na forma de enantiômeros puros.

Palavras-chave: Análise estereosseletiva, Biotransformação, Bufuralol, Donepezila, Fungos, Midodrina

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

