



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ANA CAROLINA NASCIMENTO

OBTENÇÃO DE PRODUTOS ENANTIOMÉRICOS DO  
SECNIDAZOL

CAMPINAS  
2018

ANA CAROLINA NASCIMENTO

OBTENÇÃO DE PRODUTOS ENANTIOMÉRICOS DO  
SECNIDAZOL

*Tese apresentada à Faculdade de Engenharia  
Química da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do título de Doutora em Engenharia Química.*

Orientador: Professor Doutor Marco Aurélio Cremasco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CAROLINA  
NASCIMENTO E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCO  
AURÉLIO CREMASCO

CAMPINAS  
2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 145497/2012-7

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0532-1503>

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

N17o Nascimento, Ana Carolina, 1985-  
Obtenção de produtos enantioméricos do secnidazol / Ana Carolina  
Nascimento. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Marco Aurélio Cremasco.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Engenharia Química.

1. Enantiômeros. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Atividade  
biológica. I. Cremasco, Marco Aurélio, 1962-. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Obtaining enantiomeric secnidazole products

**Palavras-chave em inglês:**

Enantiomers

High performance liquid chromatography

Biological activity

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Doutora em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Cremasco [Orientador]

Célia Regina Granhen Tavares

Ardson dos Santos Vianna Junior

Juliana Canto Duarte

Edson Tomaz

**Data de defesa:** 26-06-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Tese de doutorado defendida por Ana Carolina Nascimento e aprovada em 26 de junho de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Profa. Dra. Célia Regina Granhen Tavares  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. Ardson dos Santos Vianna Junior  
Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. Juliana Canto Duarte  
Faculdade de Tecnologia de Campinas (FATEC)

Prof. Dr. Edson Tomaz  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Ivonete por sempre estar ao meu lado, me incentivando e apoiando e sendo sempre o meu porto seguro.

Ao meu irmão Claigton que se tornou o meu braço direito, e me fez descobrir que sempre podemos ver o lado positivo das coisas.

Aos meus filhos, Davi e Anabel, por serem o colorido da minha vida e a minha inspiração para sempre buscar o melhor.

À minha tia Bete que foi uma segunda mãe, me amparando nos momentos que mais precisei.

Ao professor Marco Aurélio Cremasco pela oportunidade concedida para realização do doutorado, pela paciência e pela orientação. Obrigada por todo o cuidado e apoio durante todos esses anos!

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial à Fabiane Suassuna pela amizade, paciência e atenção.

Aos meus companheiros de laboratório Wilson Murilo, Jean Moreira, Alex Martins, Sephurah Silva e Caio Roque pela agradável convivência e pelo tempo dispensado na busca de soluções para os problemas que surgiram no decorrer dos experimentos.

Aos meus amigos da Fatec Campinas, em especial à Fabiana Corbi, Juliana Canto, Camila Ortulan, Camila Bedin e Regiane, que me deram o suporte e apoio, indispensáveis para a execução deste trabalho.

Aos meus alunos da Fatec Campinas, em especial à Carol e à Fernanda que se tornaram grandes amigas.

Aos meus amigos do Senai, em especial à Adriane Queji pelo apoio e pela oportunidade que me concedeu.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao longo do doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Por dificuldades de ordem prática nos processos de produção, a maioria dos fármacos quirais obtidos por vias sintéticas é comercializada como racemato, ou seja, mistura contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros. No entanto, existem inúmeros exemplos de fármacos que apresentam atividades biológicas estereosseletivas, consequência de interações com receptores biológicos, que são altamente específicas. As agências reguladoras especificam que um fármaco racêmico para ser comercializado deve ter comprovado o efeito de seus enantiômeros puros. O secnidazol possui espectro de atividade contra microrganismos aeróbios e anaeróbios e é comercializado na forma racêmica. O objetivo do presente trabalho é a obtenção e caracterização dos enantiômeros do secnidazol obtidos por técnicas semipreparativas de cromatografia líquida de alta eficiência bem como a avaliação da atividade biológica contra a ação de microrganismos. Para a obtenção dos enantiômeros foram empregadas técnicas de injeção sequencial e injeção empilhada. Essas técnicas permitiram a obtenção de quantidade significativa em massa de cada enantiômero sendo que a injeção sequencial garantiu a pureza necessária, 99,79% para o R-secnidazol e 99,68% para o S-secnidazol. A caracterização dos enantiômeros foi realizada através de diversas técnicas comprovando que os enantiômeros apresentam formas distintas de cristais, esse fenômeno é definido como polimorfismo. Os enantiômeros purificados foram testados quanto a sua atividade biológica frente a duas bactérias distintas, uma gram-negativa e outra gram-positiva. O enantiômero R-secnidazol mostrou maior atividade biológica frente à bactéria gram-positiva – *Bacillus subtilis*, enquanto que o enantiômero S-secnidazol possui maior atividade biológica frente à bactéria gram-negativa – *Escherichia coli*, e ambos apresentam eficiência superior frente ao fármaco racêmico. Portanto verifica-se que a partir do secnidazol racêmico foram obtidos enantiômeros com atividades biológicas distintas.

**Palavras-Chave:** Secnidazol, Enantiômeros, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Injeção Sequencial, Injeção Empilhada, Chiralpak AD<sup>®</sup>, Atividade Biológica, Bactérias gram-positiva e gram-negativa.

## ABSTRACT

Due to practical difficulties in the production processes, most chiral drugs obtained by synthetic routes are marketed as racemate or mixture containing equal amounts of the two enantiomers. However, there are numerous examples of drugs that have stereoselective biological activities as consequence of interactions with biological receptors, which are highly specific. Regulatory agencies specify that a racemic drug to be marketed must have proven the effect of its pure enantiomers. Secnidazole has activity spectrum against aerobic and anaerobic microorganisms and is marketed in racemic form. The aim of the present work is to obtain and characterize the secnidazole enantiomers obtained by semi preparative techniques of high performance liquid chromatography as well as the evaluation of the biological activity against the action of microorganisms. In order to obtain the enantiomers, techniques of sequential injection and boxcar injection were used. These techniques allowed to obtainment a significant amount in mass of each enantiomer and the sequential injection secured the necessary purity, 99.79% for R-secnidazole and 99.68% for S-secnidazole. The characterization of the enantiomers was performed through several techniques proving that the enantiomers present distinct crystal forms; this phenomenon is defined as polymorphism. The purified enantiomers were tested for their biological activity against two distinct bacteria, one gram-negative and one gram-positive. The enantiomer R-secnidazole showed higher efficiency against gram-positive bacteria- *Bacillus subtilis* whereas the S-secnidazole enantiomer is more efficient against gram-negative bacteria- *Escherechia coli* and both have superior efficiency against the racemic drug. Therefore, we verified that from racemic secnidazole we obtained enantiomers with different activities.

**Key words:** Secnidazole, Enantiomers, High Performance Liquid Chromatography, Sequential Injection, Boxcar Injection, Chiralpak AD®, Biological Activity, Gram-positive and Gram-negative bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 Estrutura química do secnidazol
- Figura 2.2 Estrutura química dos enantiômeros do secnidazol
- Figura 2.3 Distribuição anual de fármacos aprovados pelo FDA
- Figura 2.4 Representação da diferença de interação de dois enantiômeros com um receptor quiral devido às suas configurações absolutas
- Figura 2.5 Representação esquemática do mecanismo de reconhecimento quiral
- Figura 2.6 Elementos do sistema cromatográfico
- Figura 2.7 Distribuição de FEQs para CLAE usadas para a determinação de excesso enantiomérico
- Figura 2.8 Determinação gráfica da constante de Henry
- Figura 2.9 Cromatograma teórico para determinar os parâmetros cromatográficos
- Figura 2.10 Tipos de Isotermas
- Figura 2.11 Esquema de SIC para a separação cromatográfica
- Figura 2.12 Representação de separação por injeção empilhada
- Figura 3.1 Estrutura química da fase estacionária quiral tris-(3-5-dimetilfenilcarbamato) de amilose
- Figura 3.2 Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência
- Figura 3.3 Fluxograma dos experimentos realizados
- Figura 3.4 Perfil cromatográfico esperado para a obtenção dos enantiômeros – R-secnidazol e – S-secnidazol
- Figura 3.5 Obtenção do tempo de ciclo ( $t_c$ ) e do tempo de coleta ( $t_{co}$ )
- Figura 3.6 Perfil cromatográfico esperado para a obtenção dos enantiômeros – R-secnidazol e – S-secnidazol
- Figura 3.7 Comparação das técnicas de Injeção Sequencial e Injeção Empilhada
- Figura 4.1 Espectro de absorção da solução de secnidazol racêmico
- Figura 4.2 Cromatograma do secnidazol racêmico
- Figura 4.3 Perfil de eluição dos enantiômeros do secnidazol
- Figura 4.4 Cromatograma do composto inerte TTBB

- Figura 4.5 Cromatograma do secnidazol racêmico
- Figura 4.6 Porosidade total da coluna semipreparativa Chiralpak AD (100 x 10 mm)
- Figura 4.7 Isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub>
- Figura 4.8 Obtenção das constantes de Henry para os enantiômeros do Secnidazol
- Figura 4.9 Curva de van Deemter para os enantiômeros R-(-)-sec e S-(+)-sec a 25°C
- Figura 4.10 Injeção Sequencial do Secnidazol
- Figura 4.11 Comparação entre os dados calculados e a Injeção Sequencial obtida
- Figura 4.12 Dispersão no sinal cromatográfico do enantiômero S-secnidazol
- Figura 4.13 Coleta dos enantiômeros do secnidazol
- Figura 4.14 Pureza Enantiomérica do R-Secnidazol
- Figura 4.15 Pureza Enantiomérica do S-Secnidazol
- Figura 4.16 Gráfico de Scatchard dos enantiômeros do secnidazol
- Figura 4.17 Isotermas de adsorção dos enantiômeros do secnidazol obtidas pelo método da análise frontal
- Figura 4.18 Injeção Empilhada do Secnidazol
- Figura 4.19 Comparação entre os dados calculados e a Injeção Sequencial obtida
- Figura 4.20 Pureza enantiomérica do R-Secnidazol
- Figura 4.21 Pureza enantiomérica do S-Secnidazol
- Figura 4.22 Análise de dicroísmo circular do refinado
- Figura 4.23 Análise de dicroísmo circular do extrato
- Figura 4.24 Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico do secnidazol racêmico em temperatura ambiente
- Figura 4.25 Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico do enantiômero R-secnidazol em temperatura ambiente
- Figura 4.26 Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico do enantiômero S-secnidazol em temperatura ambiente
- Figura 4.27 Fotomicrografias obtidas em microscópio óptico do secnidazol racêmico em temperatura ambiente
- Figura 4.28 Fotomicrografias obtidas em microscópio óptico do enantiômero R-

- secnidazol em temperatura ambiente
- Figura 4.29 Fotomicrografias obtidas em microscópio óptico do enantiômero S-secnidazol em temperatura ambiente
- Figura 4.30 Espectro de difração de raios X do secnidazol racêmico comparando com o padrão (biblioteca do equipamento)
- Figura 4.31 Espectro de difração de raios X dos enantiômeros R e S-secnidazol comparando com o secnidazol racêmico
- Figura 4.32 Espectro de FT-IR do secnidazol racêmico
- Figura 4.33 Espectro de FT-IR dos enantiômeros R e S-secnidazol
- Figura 4.34 Curva termogravimétrica (TG) e curva termogravimétrica derivada (DTG) do secnidazol e dos enantiômeros R e S-secnidazol
- Figura 4.35 DTA e DSC do secnidazol racêmico e seus enantiômeros
- Figura 4.36 Teste com cepa CCT 0089 *B. subtilis*
- Figura 4.37 Teste com cepa CCT 1457, *E. coli*
- Figura 4.38 Halo formado frente aos microrganismos testados

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Seletores quirais e principais interações com analitos quirais
Tabela 2.2	Classificação dos poros segundo seu diâmetro
Tabela 3.1	Parâmetros utilizados para obtenção dos tempos de injeção e coleta
Tabela 4.1	Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada vazão estudada na temperatura de 25°C
Tabela 4.2	Análise picnometria por gás hélio
Tabela 4.3	Resultados da análise de adsorção/dessorção de N <sub>2</sub>
Tabela 4.4	Caracterização da coluna
Tabela 4.5	Valores de K e da Constante de Henry
Tabela 4.6	Número de pratos em diferentes vazões
Tabela 4.7	Parâmetros A e C da equação de van Deemter para os enantiômeros do secnidazol
Tabela 4.8	Valores de $D_L/\nu$ e $k_m$ obtidos a partir da análise dos momentos para os enantiômeros do secnidazol
Tabela 4.9	Tempos de injeção do racêmico e coleta dos enantiômeros
Tabela 4.10	Concentração dos contaminantes e limites de detecção e quantificação dos enantiômeros
Tabela 4.11	Parâmetros do modelo de Langmuir
Tabela 4.12	Tempos de injeção do racêmico e coleta dos enantiômeros
Tabela 4.13	Concentração dos contaminantes e limites de detecção e quantificação dos enantiômeros
Tabela 4.14	Eventos endotérmicos de DTA e DSC da Figura 4.35
Tabela 4.15	Halo formado frente aos microrganismos testados
Tabela 4.16	CIM e CBM frente ao microrganismo <i>Bacillus subtilis</i>
Tabela 4.17	CIM e CBM frente ao microrganismo <i>Escherichia coli</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CD	Do inglês <i>Circular Dichroism</i>
CDER	Centro de Avaliação e Pesquisa de Medicamentos
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência
DRX	Do inglês <i>X-ray powder diffraction</i>
DSC	Do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Do inglês <i>Food And Drug Administration</i>
FEQ	Fase Estacionária Quiral
FM	Fase Móvel
FT-IR	Do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
FT-Raman	Do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy Raman</i>
HETP	Do inglês <i>Height Of An Equivalent Theoretical Plate</i>
IPA	Isopropanol
LRAC	Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Óptica
RMN	Do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
SIA	Injeção Sequencial Aplicada
SIC	Cromatografia Líquida por Injeção Sequencial
SNZ	Secnidazol
TGA	Do inglês <i>Thermogravimetry Analysis</i>
TTBB	1,3,5-tri-terc-butilbenzeno
UV-Vis	Ultravioleta-visível

# LISTA DE SÍMBOLOS

## Símbolos Latinos

$a$	Área superficial de transferência de massa	$[L^2]$
$A$	Parâmetro da equação de Van Deemter	$[L]$
$b$	Constante de equilíbrio de adsorção	$[ML^{-3}]$
$B$	Parâmetro da equação de Van Deemter	$[L^2T^{-1}]$
$c$	Concentração do soluto na fase móvel	$[ML^{-3}]$
$C$	Parâmetro da equação de Van Deemter	$[T]$
$d_C$	Diâmetro do leito	$[L]$
$D_L$	Coeficiente de dispersão axial	$[L^2T^{-1}]$
$D_m$	Coeficiente de difusividade molecular	$[L^2T^{-1}]$
$d_p$	Diâmetro de partícula do adsorvente	$[L]$
$D_p$	Difusividade nos poros	$[L^2T^{-1}]$
$He$	Constante de Henry	Adimensional
$HETP$	Altura equivalente a um prato	$[L]$
$k_i$	Fator de retenção	Adimensional
$k_j$	Fator de retenção	Adimensional
$k_m$	Coeficiente de transferência de massa global	$[L^2T^{-1}]$
$K$	Equilíbrio de adsorção	$[ML^{-3}]$
$L$	Comprimento do leito	$[L]$
$N$	Número de pratos teóricos	Adimensional
$q$	Concentração do soluto na fase estacionária	$[MM^{-1}]$
$Q$	Vazão	$[L^3T^{-1}]$
$R_S$	Resolução	Adimensional

$T$	Temperatura	$[\theta]$
$t_{\text{ciclo}}$	Tempo de ciclo	$[T]$
$t_{\text{co}}$	Tempo de coleta	$[T]$
$t_{\text{inj}}$	Tempo de injeção	$[T]$
$t_M$	Tempo morto	$[T]$
$t_{\text{plan}}$	Tempo morto	$[T]$
$t_R$	Tempo de retenção total	$[T]$
$t'_R$	Tempo de retenção corrigido	$[T]$
$u$	Velocidade superficial	$[LT^{-1}]$
$v$	Velocidade intersticial	$[LT^{-1}]$
$V_C$	Volume total coluna	$[L^3]$
$w_h$	Largura do pico à meia altura	$[L]$

### Símbolos Gregos

$\alpha$	Seletividade	Adimensional
$\gamma_1$	Constante geométrica da equação de Van Deemter	Adimensional
$\gamma_2$	Constante geométrica da equação de Van Deemter	Adimensional
$\varepsilon$	Porosidade do leito	Adimensional
$\varepsilon_p$	Porosidade partícula	Adimensional
$\varepsilon_T$	Porosidade total	Adimensional
$\mu_1$	Primeiro momento absoluto	$[T]$
$\bar{\mu}_2$	Segundo momento central	Adimensional
$\sigma$	Desvio padrão	Adimensional
$\sigma^2$	Variância	Adimensional

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA</b>	<b>20</b>
<b>1.2 OBJETIVO</b>	<b>22</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>23</b>
<b>2.1 SECNIDAZOL</b>	<b>23</b>
2.1.1 Fármacos nitro-heterocíclicos	24
2.1.2 Fármacos quirais	26
2.1.3 Atividade biológica de fármacos quirais	29
2.1.4 Separação de enantiômeros	31
<b>2.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS</b>	<b>32</b>
2.2.1 Cromatografia preparativa	33
2.2.2 Seleção do sistema cromatográfico	35
2.2.3 Fase móvel em escala preparativa	36
2.2.4 Fase estacionária para cromatografia preparativa	37
2.2.5 Características da coluna cromatográfica quiral	39
2.2.6 Parâmetros cromatográficos	42
2.2.7 Equilíbrio de adsorção	48
2.2.8 Classificação das isotermas de adsorção	50
2.2.9 Separação cromatográfica por injeção sequencial	52
2.2.10 Separação cromatográfica com injeção empilhada	53
<b>2.3 CARACTERIZAÇÃO DE FÁRMACOS</b>	<b>55</b>
2.3.1 Polimorfismo	55
<b>2.4 Inovação e busca de anterioridades</b>	<b>56</b>

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> -----	<b>59</b>
<b>3.1 MATERIAIS</b> -----	<b>59</b>
3.1.1 Secnidazol -----	59
3.1.2 Fase estacionária -----	60
3.1.3 Traçador-----	61
3.1.4 Fase móvel-----	61
3.1.5 Obtenção dos enantiômeros -----	62
3.1.6 Caracterização da coluna cromatográfica quiral -----	62
3.1.7 Caracterização dos enantiômeros-----	63
<b>3.2 MÉTODOS</b> -----	<b>64</b>
3.2.1 Desenvolvimento da separação cromatográfica -----	65
3.2.2 Experimentos com soluções diluídas -----	66
3.2.3 Experimentos com soluções concentradas -----	70
3.2.4 Caracterização dos enantiômeros e do fármaco racêmico -----	74
3.2.5 Atividade biológica-----	76
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> -----	<b>78</b>
<b>4.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA A SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA</b> ---	<b>78</b>
4.1.1 Determinação do espectro de absorção do secnidazol-----	78
4.1.2 Seleção da fase móvel e da fase estacionária -----	79
4.1.3 Ordem de eluição -----	79
<b>4.2 PARÂMETROS DA SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA - SOLUÇÕES DILUÍDAS</b> -----	<b>81</b>
4.2.1 Cromatogramas -----	81
4.2.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos de separação-----	82
4.2.3 Determinação da porosidade total, do leito e das partículas-----	83

4.2.4	Determinação das constantes de Henry (constante de adsorção) -----	86
4.2.5	Determinação da eficiência e parâmetros de transferência de massa -----	87
4.2.6	Obtenção dos enantiômeros por meio da técnica de injeção sequencial -----	90
<b>4.3</b>	<b>PARÂMETROS DA SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA - SOLUÇÕES CONCENTRADAS -----</b>	<b>95</b>
4.3.1	Isotermas de adsorção -----	95
4.3.2	Obtenção dos enantiômeros por meio do método adaptado de injeção empilhada 97	
<b>4.4</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS -----</b>	<b>102</b>
4.4.1	Espectroscopia de dicroísmo circular dos enantiômeros -----	102
4.4.2	Microscopia eletrônica de varredura -----	103
4.4.3	Microscopia óptica -----	105
4.4.4	Difração de raios-X -----	107
4.4.5	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier -----	110
4.4.6	Termogravimetria -----	111
4.4.7	Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial -----	113
<b>4.5</b>	<b>Atividade biológica -----</b>	<b>114</b>
4.5.1	Teste de halo de inibição -----	114
4.5.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) -----	117
<b>4.6</b>	<b>INOVAÇÕES ALCANÇADAS PELA PRESENTE TESE -----</b>	<b>119</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES -----</b>	<b>123</b>
<b>5.1</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS -----</b>	<b>124</b>
5.1.1	Obtenção dos enantiômeros -----	124
5.1.2	Caracterização dos enantiômeros -----	124
5.1.3	Atividade biológica -----	124

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO</b>	<b>137</b>

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

Os microrganismos estão quase em toda parte na natureza e as infecções causadas por alguns microrganismos patogênicos podem ocasionar doenças fatais. Embora várias classes de agentes antibacterianos estejam disponíveis para o tratamento clínico, os avanços nos cuidados médicos são ameaçados por um fenômeno natural conhecido como "resistência microbiana". As incidências de resistência a fármacos por microrganismos foram constantemente relatadas nos últimos anos. Devido às atividades biológicas variadas, os derivados nitroimidazóis ganharam interesse na investigação de fármacos para agentes quimioterapêuticos antimicrobianos (LI et al., 2013). O secnidazol é um dos derivados nitroimidazólicos e possui espectro de atividade contra microrganismos aeróbios e anaeróbios e eficácia no tratamento de amebíase, giardíase, tricomoníase e vaginose bacteriana (GILLIS e WISEMAN, 1996). Por ser rapidamente e completamente absorvido após administração oral, o tratamento com secnidazol é mais eficaz que o tratamento com outros fármacos imidazólicos, além de apresentar eficácia contra uma variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas, mas com efeitos colaterais significativos porque precisa ser utilizado numa concentração muito elevada. Ele é comercializado na forma racêmica, isto é, na proporção 1:1 dos seus enantiômeros R e S. Estudos recentes mostram que o fármaco é quiral, ou seja, é constituído por (+)-secnidazol e por (-)-secnidazol. (KHAN et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2012; RIVERA et al., 2000).

Os enantiômeros são estereoisômeros que são imagens especulares não sobreponíveis. Possuem seus átomos constituintes conectados na mesma sequência,

diferindo apenas no rearranjo de seus átomos no espaço. Eles são designados por notações clássicas como D ou L, R ou S, ou (+) ou (-). Nos sistemas vivos, a quiralidade é um fator crítico. Ainda não há uma resposta final à questão de o porquê a vida é essencialmente construída usando L-aminoácidos como blocos de construção. Este problema fascinante e não resolvido continua a estimular grande espectro de investigação. Existe enorme interesse na produção de enantiômeros puros para as indústrias alimentícias e agroquímicas e, em particular, para a indústria farmacêutica (OKAMOTO, 1998 SEIDEL-MORGENSTERN e LORENZ, 2014). A quiralidade dos fármacos é um tema importante na concepção, descoberta, desenvolvimento, lançamento e comercialização de novos fármacos (CARNER et al., 2004). Por isso, é essencial a obtenção do par de enantiômeros puros, pois muitas vezes eles apresentam diferenças marcantes na atividade biológica. Os órgãos reguladores exigem cada vez mais que os fármacos quirais sejam administrados numa forma opticamente pura. Assim, os enantiômeros individuais têm de ser submetidos à avaliação completa das propriedades farmacocinéticas, metabólicas, fisiológicas e toxicológicas, a fim de identificar o enantiômero mais adequado para o desenvolvimento de um fármaco terapêutico. Isto intensificou esforços na pesquisa industrial e acadêmica para desenvolver técnicas que são capazes de produzir enantiômeros com elevado teor de pureza (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002; RENTSCH, 2002).

A separação enantiomérica de fármacos é ainda algo problemático uma vez que a cromatografia tradicional não possui seletividade suficiente para diferenciar enantiômeros de um mesmo composto. O desenvolvimento de métodos robustos para a separação de enantiômeros de fármacos quirais é um desafio. Por outro lado, ao longo das últimas décadas, tem ocorrido o desenvolvimento extensivo de análises enantiosseletivas em resposta à demanda no campo de desenvolvimento de fármacos e compostos enantiomericamente puros bem como o controle de qualidade desses processos. Entre as técnicas de separação mais populares usadas para análises enantioméricas está a cromatografia líquida, seguida por eletroforese capilar e cromatografia gasosa. É importante ressaltar que a cromatografia enantiosseletiva em fase estacionária quiral (FEQ) é considerada a rota mais eficiente e geral para a obtenção de enantiômeros de alta pureza óptica, e tornou-se uma ferramenta eficiente na pesquisa farmacêutica e desenvolvimento inicial de fármacos. A maioria dos racematos podem ser resolvidos por cromatografia

líquida com fases estacionárias quirais comercialmente disponíveis. Entre elas, as fases à base de polissacarídeos, tais como ésteres de celulose, bem como fenilcarbamatos de celulose e amilose são algumas das mais populares e podem ser utilizadas para resolver uma gama de racematos e muitos fármacos de uma escala analítica a uma escala preparativa (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002, KASPRZYK-HORDERN, 2010, OKAMOTO, 1998).

Dentro desse contexto, a proposta deste trabalho é a obtenção de enantiômeros com elevado teor de pureza do fármaco secnidazol para avaliação da atividade biológica.

## **1.2 OBJETIVO**

O objetivo central desta Tese de Doutorado é o estudo da separação cromatográfica do fármaco secnidazol em seus enantiômeros com elevado teor de pureza e avaliar a atividade biológica dos enantiômeros. Para atingir o objetivo geral traçaram-se as seguintes metas:

- Caracterização da fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose;
- Utilização das técnicas de injeção sequencial e injeção empilhada para obtenção de massa significativa dos enantiômeros puros;
- Caracterização dos enantiômeros através de técnicas de dicroísmo circular, difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica;
- Avaliação da atividade biológica dos enantiômeros.

# CAPÍTULO 2

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 SECNIDAZOL

O secnidazol (SNZ) é um princípio ativo pertencente à classe dos 5-nitroimidazóis, esses fármacos mostram um espectro comum de atividade agindo contra microrganismos aeróbios e anaeróbios, sendo que parecem ser particularmente mais eficazes no tratamento da amebíase, giardíase, tricomoníase e infecções bacterianas. Sua atividade está baseada em interações de DNA (inibição da redutase da ferredoxina). É provável que a formação de radicais livres envolvendo o grupo nitro rompam a estrutura helicoidal do DNA, resultando na inibição da síntese do ácido nucleico. É metabolizado principalmente pelas enzimas oxidativas para gerar metabólitos hidroxila e ácido acético. Acredita-se que esse caminho também seja uma característica importante em seu mecanismo de ação. O secnidazol é significativamente mais eficaz que outros fármacos imidazólicos (BETANZOS-LARA, 2013; HUANG, 2011).

É um fármaco altamente eficaz contra uma variedade de bactérias gram-positiva e gram-negativa, mas com efeitos colaterais significativos, porque precisa ser usado em concentração muito alta. Possui significativa degradação em condições alcalinas e na presença de luz, sendo mais suave em meio ácido e neutro. Vários procedimentos analíticos têm sido relatados para a determinação do SNZ em preparações farmacêuticas, tanto isoladamente como em combinação com outros fármacos. Duas formas cristalinas são atribuídas ao SNZ: uma anidra e um hemi-hidrato, contudo apenas o hidrato é estável à temperatura ambiente (KHAN et al., 2015; TANDON, 2009).

### 2.1.1 Fármacos nitro-heterocíclicos

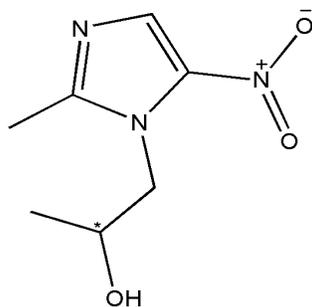
A introdução de fármacos nitro-heterocíclicos no início dos anos 1960 anunciou nova era no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas e gram-positivas e de uma variedade de protozoários patogênicos. O antibiótico azomicina (2-nitroimidazol), isolado no Japão a partir de um estreptomiceto em 1955, foi o primeiro nitroimidazol ativo a ser descoberto e atuou como principal impulso para a busca sistemática de fármacos com atividade contra protozoários anaeróbios e aeróbios. Isto levou à síntese do 5-nitroimidazol metronidazol (1- $\beta$ -hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol) e da demonstração de sua atividade contra tricomoníase (NOTOWICZ et al., 1978; UPCROFT et al., 1999).

Compostos nitro-heterocíclicos têm uma variedade de aplicações, que abrange desde conservantes de alimentos a antibióticos. Os nitroimidazóis têm usos terapêuticos como agentes antibacterianos anaeróbios e aeróbios e antiprotozoários. A atividade antimicrobiana destes agentes quimioterápicos inibe o crescimento de bactérias anaeróbias e aeróbias e alguns protozoários anaeróbios. Eles apresentam outras atividades biológicas interessantes do potencial terapêutico, tais como radiosensibilizadores no tratamento do câncer, controle da fertilidade e na terapia antituberculose. Além disso, são amplamente utilizados como aditivos para estimular o crescimento, prevenir e controlar doenças. No entanto, devido as suas propriedades potenciais carcinogênicas e mutagênicas aos seres humanos, suas aplicações em animais produtores de alimentos têm sido proibidas em muitos países para assegurar a proteção eficaz dos consumidores (LIAO et al., 2010; MITAL, 2009).

O secnidazol é um derivado nitroimidazólico e possui espectro de atividade contra microrganismos anaeróbios e aeróbios. As evidências disponíveis sugerem que o secnidazol é tão eficaz quanto os outros fármacos 5-nitroimidazóis no tratamento de infecções causadas por protozoários. Vários estudos demonstram a atividade biológica destes compostos, dentre os microrganismos destacam-se *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus subtilis* com bom efeito de supressão. A conveniência e facilidade de administração associadas com a terapia de dose única, combinada com bom perfil de tolerabilidade, fazem do secnidazol uma opção adequada a outros tratamentos de dose única e uma alternativa atraente para os regimentos de doses

múltiplas com outros fármacos desta classe (GILLIS e WISEMAN, 1996; VERMA, 2010). O secnidazol, cujo nome oficial é 1-(2-metil-5-nitroimidazol-1-il) propano-2-ol (Figura 2.1) com fórmula molecular  $C_7H_{11}N_3O_3$  e massa molar de 185,18 g/mol.

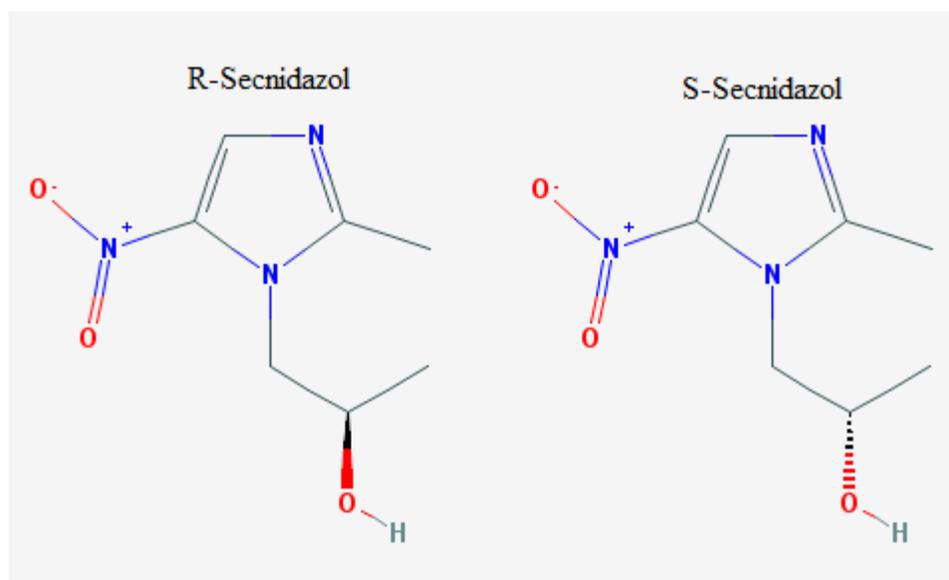
**Figura 2.1** - Estrutura química do secnidazol. (\*) indica o estereocentro



Fonte: Elaborada pela autora

O estereocentro também denominado de centro de quiralidade corresponde a um átomo de carbono contendo grupos de tal natureza que uma interconversão de quaisquer dois grupos produzirá um estereoisômero. Um par de enantiômeros é sempre possível para moléculas que apresentam um átomo tetraédrico com quatro grupos diferentes ligados a ele, como podemos verificar na Figura 2.2.

**Figura 2.2** - Estrutura química dos enantiômeros do secnidazol



Fonte: Pub Chem

Em estudos de caracterização do secnidazol, Rivera et al. (2000) verificaram que este apresenta elevada solubilidade em água devido à presença dos grupos polares em sua estrutura química. Duas formas cristalinas são atribuídas ao secnidazol: uma anidra e um hemi-hidrato. Como tem alto poder de hidratação, sua forma mais estável é a forma hidratada, sendo que em ambientes mais expostos, é praticamente a forma mais abundante. Ele é comercializado na forma racêmica, isto é, na proporção 1:1 dos seus enantiômeros R e S. Nascimento et al. (2012) desenvolveram um método para a separação dos enantiômeros do secnidazol, onde através de técnicas cromatográficas puderam comprovar que o fármaco é constituído por R-(-)-secnidazol e por S-(+)-secnidazol.

### 2.1.2 Fármacos quirais

Em meados de 1992, um documento simples de quatro páginas publicado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA abalou a comunidade mundial de desenvolvimento de fármacos. Nesse documento, o Centro de Avaliação e Pesquisa de Medicamentos (CDER) da FDA enumerou, pela primeira vez, as diretrizes de desenvolvimento adequadas para os medicamentos estereoisoméricos. As diretrizes do CDER concluíram que, embora as substâncias medicamentosas tenham sido previamente desenvolvidas e implementadas com sucesso e com segurança como misturas racêmicas, houveram vários casos em que os enantiômeros tiveram diferentes efeitos farmacológicos e toxicológicos, produzindo problemas terapêuticos. Talvez, o exemplo mais bem documentado seja o da talidomida. Inicialmente comercializado por uma empresa farmacêutica alemã em 1956 para infecções respiratórias, foi mais tarde prescrito em conjunto com outros produtos químicos como um sedativo e para o tratamento do enjoo matinal. Embora o enantiômero R tenha sido mais tarde provado que efetivamente produz efeitos terapêuticos, o enantiômero S foi confirmado como sendo um teratogênico e subsequentemente ligado a defeitos congênitos físicos (REKOSKE, 2001). A quiralidade dos fármacos é tema importante na concepção, descoberta, desenvolvimento, lançamento e comercialização de novos fármacos. A estereoquímica é uma dimensão essencial na farmacologia, uma vez que cerca de 56% dos fármacos atualmente em uso são compostos

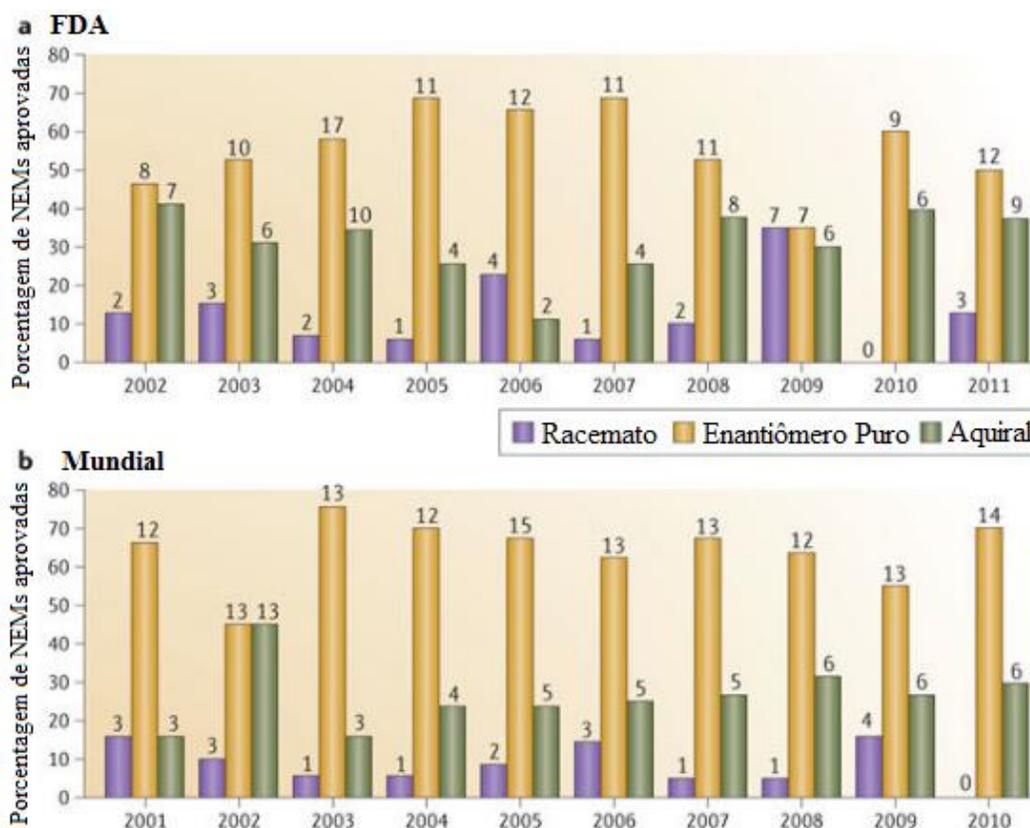
quirais, e 88% desses fármacos quirais sintéticos são usados terapêuticamente como racematos. Anteriormente a farmacopeia foi dominada por racematos, mas desde o surgimento de novas tecnologias na década de 1980, que permitiu a preparação dos enantiômeros puros em quantidades significativas, aumentou a consciência e o interesse na estereoquímica de ação dos fármacos (CARNER et al., 2004). Dessa forma, é essencial a geração do par de enantiômeros puros, uma vez que muitas vezes eles apresentam diferenças marcantes na atividade biológica. Assim, os enantiômeros individuais têm de ser submetidos à avaliação completa das propriedades farmacocinéticas, metabólicas, fisiológicas e toxicológicas, a fim de identificar qual o enantiômero mais adequado para o desenvolvimento de um fármaco terapêutico. Além disso, esses dados também são exigidos por diferentes agências reguladoras (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002).

Antes de 1990, a questão da pureza quiral em fármacos era questão acadêmica. As informações obtidas nessas pesquisas foram cruciais para compreender e classificar a biotransformação do fármaco, mas de pouca importância para o lançamento do produto, uma vez que os métodos para a produção de enantiômeros individuais foram limitados em aplicabilidade. As diretrizes do FDA tiveram dois efeitos imediatos. O primeiro foi o de mudar o panorama de desenvolvimento de fármacos para a implementação de enantiômeros puros, como ilustrado na Figura 2.3. O segundo efeito foi o de estimular o desenvolvimento de novas técnicas para síntese assimétrica e separações enantioméricas. Como ocorre frequentemente na indústria química, a regulamentação governamental produziu uma necessidade tecnológica e, essencialmente, criou novas oportunidades de pesquisa e desenvolvimento para engenheiros e cientistas. Foram imediatamente necessárias técnicas eficientes em termos de tempo, que pudessem fornecer as quantidades de material necessárias para os ensaios toxicológicos e, potencialmente, para a produção comercial. Entre 1992 e 2000, o mercado mundial de compostos químicos opticamente puros aumentou de U\$ 30 bilhões para U\$ 100 bilhões, com quase duas dúzias de empresas especializadas em separações quirais. Desde então, a obtenção de um fármaco enantiomericamente puro tem sido acompanhada pelo crescimento de métodos assimétricos, tanto na síntese como na separação, que podem fornecer os enantiômeros requeridos. Embora as técnicas de síntese assimétrica tenham melhorado para permitir que uma variedade de compostos seja diretamente sintetizada com elevada pureza quiral, os

rendimentos destes processos são frequentemente baixos ou moderados na melhor das hipóteses. Inversamente, as técnicas de separação quiral podem proporcionar rendimentos quase quantitativos de cada enantiômero (REKOSKE, 2001).

Como era esperado, de acordo com tendências anteriores, no desenvolvimento de medicamentos quirais de 195 novas entidades moleculares (NEMs) aprovadas pelo FDA e 205 NEMs aprovadas mundialmente durante o período de 2001-2010, os enantiômeros individuais foram o componente principal, representando 55% das NEMs aprovadas pelo FDA e 63% das NEMs aprovadas em todo o mundo. Os aquirais alcançaram o segundo lugar, totalizando 32% das NEMs aprovadas pelo FDA e 27% das NEMs aprovadas em todo o mundo. Surpreendentemente, no entanto, os racematos não desapareceram da lista de aprovações das NEMs totalizando 13% dos aprovados pelo FDA e 9% dos aprovados mundialmente. Não houve aprovações de NEMs racêmicas em 2010 (pelo FDA e mundialmente) e, em 2011, foram aprovadas três (pelo FDA) (AGRANAT et al., 2012).

**Figura 2.3** - Distribuição anual de fármacos aprovados pelo FDA



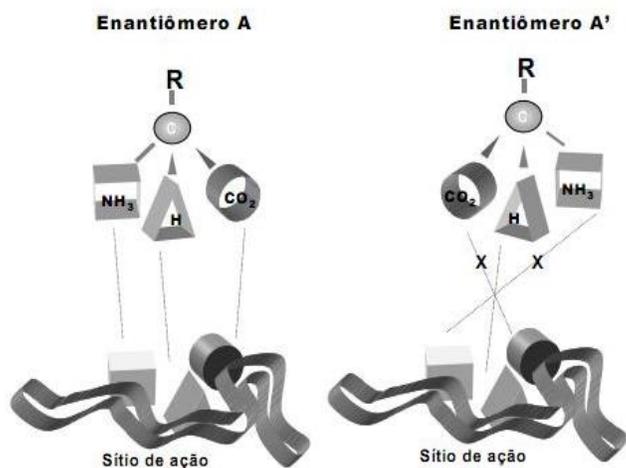
Fonte: Agranat et al., 2012

Duas diretrizes foram estabelecidas pelo FDA para as empresas farmacêuticas. A primeira foi a alteração do desenvolvimento do fármaco para a obtenção de enantiômeros puros, e a segunda, o estímulo no desenvolvimento de novos métodos para síntese assimétrica e separações enantioméricas. Assim, o enantiômero com as características preferidas tem de ser recuperado subsequentemente na forma pura. Com base nas crescentes exigências de fármacos individuais, surgiu a necessidade de técnicas eficientes para separar os racematos que são o produto regular da síntese química (SEIDEL-MORGENSTERN et al., 2010).

### 2.1.3 Atividade biológica de fármacos quirais

Os fármacos quirais recebem maior atenção em estudos farmacológicos, pois suas vias sintéticas, em geral, não são estereosseletivas levando à formação de ambos os enantiômeros e, também, devido às dificuldades técnicas e econômicas em separá-los, o que é possível somente em ambientes quirais. A discriminação dos enantiômeros por receptores biológicos deve-se à interação espacial-específica fármaco-receptor, explicada pela teoria dos três pontos, segundo a qual, somente um dos enantiômeros é capaz de apresentar três pontos de interação complementares, dispostos espacialmente de tal maneira que possam se ligar ao receptor, promovendo o efeito máximo (Figura 2.4) (ORLANDO et al., 2007).

**Figura 2.4** - Representação da diferença de interação de dois enantiômeros com um receptor quiral devido às suas configurações absolutas



Fonte: Orlando et al., 2007

Essas interações altamente específicas fármaco-receptor podem levar também a diferenças farmacocinéticas. Depois da tragédia ocorrida com a talidomida, em razão do (S)-(-)-enantiômero apresentar efeitos teratogênicos, levando, por falta de conhecimento das diferenças toxicológicas entre os enantiômeros, à má formação de milhares de fetos, novos modelos de estudos para fármacos quirais foram desenvolvidos (CALDWELL, 1995). A partir de então, passou-se a estudar a influência do arranjo espacial dos átomos nas moléculas na interação com macromoléculas biológicas e o quanto isso influenciava os processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos.

Hoje, sabe-se que muitos fármacos quirais apresentam diferenças estereosseletivas significativas quanto à potência, toxicidade, absorção e metabolismo. Dessa forma, as agências mundiais regulamentadoras de saúde exigem o estudo dos enantiômeros isolados, incluindo a avaliação de racemização do centro quiral além de preconizar a comercialização de fármacos quirais na forma de enantiômeros puros (SHINDO e CALDWELL, 1995).

Dentro deste contexto, existe uma série de vantagens da comercialização de enantiômeros puros sobre a comercialização da mistura racêmica, dentre elas:

- redução da dose e da carga no metabolismo;
- restrições menos rígidas na dosagem, ampliação do uso do fármaco;
- melhor controle da cinética da dosagem;
- redução da variabilidade da resposta dos pacientes;
- maior confiança na padronização da dosagem;
- redução nas interações com outros fármacos de uso comum;
- aumento da atividade e redução na dosagem;
- aumento de especificidade e redução de efeitos colaterais (SILVA JR et al.,

2006).

O uso de uma mistura racêmica para novos fármacos só é permitido se todos os ensaios clínicos e toxicológicos forem realizados com cada enantiômero isoladamente e comparados com aqueles envolvendo a mistura racêmica (BARREIRO et al., 1997). A atividade de um fármaco é função de interações físico-químicas estabelecidas entre a estrutura molecular do fármaco e seu receptor no sistema biológico. As alterações na estrutura química do fármaco levam a modificações das propriedades físico-químicas e, por extensão, da atividade biológica. Dessa forma, com interesse no perfil farmacológico do

secnidazol, serão realizados estudos quanto à atividade antibacteriana dos seus enantiômeros e dos possíveis alvos no sistema biológico.

#### **2.1.4 Separação de enantiômeros**

Enantiômeros possuem propriedades físicas semelhantes tais como: pontos de fusão e ebulição, índice de refração, solubilidade, espectros de infravermelho e demais propriedades físicas (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). Portanto não podem ser analisados pelos métodos comuns, necessitando de técnicas analíticas especiais (LIMA, 1997).

Na pesquisa e desenvolvimento inicial de fármacos quirais, o tempo é uma questão-chave, o que significa que o processo para a obtenção de enantiômeros puros tem que ser rápido e aplicável à compostos quirais representando uma grande diversidade na estrutura química. A separação de enantiômeros de fármacos é ainda algo problemático, pois a cromatografia tradicional não fornece seletividade alta o suficiente para diferenciar enantiômeros de um mesmo composto. O desenvolvimento de métodos robustos para a separação de enantiômeros de compostos quirais é um desafio. Por outro lado, o desenvolvimento extensivo de análise enantiosseletiva tem ocorrido ao longo das últimas duas décadas em resposta à demanda no campo de desenvolvimento de fármacos para as tecnologias eficientes utilizadas na preparação de compostos enantiomericamente puros e controle de qualidade desses processos. Atualmente, os métodos cromatográficos, eletroforéticos, espectroscópicos, biossensores e de membrana são os mais comumente aplicados (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003; KASPRZYK-HORDERN, 2010).

Cromatografia enantiosseletiva em fase estacionária quiral é considerada a rota mais eficiente e geral para a obtenção de enantiômeros de alta pureza óptica, e tornou-se uma ferramenta eficiente na pesquisa farmacêutica e desenvolvimento inicial de fármacos (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002). As fases estacionárias quirais são, obviamente, um elemento chave na cromatografia enantiosseletiva. Uma FEQ ideal deve apresentar as seguintes características: ser universal (alta capacidade de reconhecimento) deve ser robusta e duradoura (estabilidade química e física), deve tolerar uma grande variedade de fases móveis e deve estar disponível em grandes quantidades e a um preço razoável (FRANCOTTE, 2005).

## 2.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A cromatografia é um processo de separação em que a mistura da amostra é distribuída entre duas fases no leito cromatográfico (coluna ou planar). Uma fase é estacionária enquanto a outra passa através do leito cromatográfico. A fase estacionária ou é um sólido, poroso, material de superfície ativa na forma de partículas pequenas ou uma fina película de revestimento líquido sobre um suporte sólido ou parede de coluna (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

A cromatografia em coluna sobre fases sólidas estacionárias é uma das mais poderosas técnicas de separação enantiosseletiva. Isto é principalmente devido ao amplo espectro de possibilidades oferecidas ajustando tanto a fase móvel como a fase estacionária às exigências do problema de separação. Gases, líquidos e fluidos supercríticos podem ser aplicados como a fase móvel, dependendo das propriedades da mistura de alimentação. No caso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) convencional, muitas vezes podem ser aplicados vários métodos alternativos para resolver um problema de separação, isto é, diferentes combinações de fases móveis e estacionárias. Este estado avançado ainda não foi atingido para a separação de enantiômeros. Métodos cromatográficos adequados são ainda frequentemente desenvolvidos empiricamente para resolver tais problemas de separação complicados. Contudo, nos últimos anos, foram alcançados progressos consideráveis na compreensão de importantes princípios de reconhecimento quiral. O desenvolvimento de conceitos de processos específicos e altamente produtivos e a provisão das ferramentas de *design* correspondentes hoje em dia, permitem que qualquer mistura de enantiômeros seja separada por técnicas cromatográficas (SEIDEL-MORGENSTERN e LORENZ, 2014).

As principais vantagens das técnicas cromatográficas são: aplicação à gama de estruturas racêmicas, obtenção dos enantiômeros com elevado grau de pureza óptica, facilidade de operação, rápida realização e a possibilidade de separação de enantiômeros de misturas racêmicas com características especiais tais como compostos de difícil derivação, facilmente racemizáveis, ou que tenham um tipo incomum de quiralidade. Entretanto, como ocorre em alguns métodos, apresenta as seguintes desvantagens: alto custo da fase estacionária, indisponibilidade de uma FEQ que separa uma ampla classe de compostos racêmicos, analito coletado em grandes volumes sendo necessária à concentração do

mesmo, consumo de uma grande quantidade de fase móvel e dificuldades associadas ao reciclo da fase móvel (SILVA JR et al., 2006).

### **2.2.1 Cromatografia preparativa**

A cromatografia preparativa teve impacto significativo na separação de produtos farmacêuticos, alimentícios, petroquímicos e açúcares. Embora tenha sido tradicionalmente utilizada, em grandes escalas, para a separação de isômeros e açúcares, o único desenvolvimento mais importante nos últimos 20 anos tem sido a sua redução de escala para a separação de ingredientes farmacêuticos. A adição de valor obtida por purificação cromatográfica, particularmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica, justificou o uso de processos complexos e fases estacionárias caras. Naturalmente, a disponibilidade de uma grande variedade de combinações de fases estacionárias e móveis, a facilidade de escalonamento e a robustez do equipamento contribuíram para a rápida aceitação da tecnologia. Vale ressaltar que a cromatografia é uma das poucas unidades de operação que tem sido comercialmente utilizada para purificações que vão de alguns microgramas, por exemplo, em produtos biofarmacêuticos, a centenas de toneladas por dia, em produtos petroquímicos. No entanto, as técnicas cromatográficas são dispendiosas e requerem em escala industrial um aperfeiçoamento cuidadoso das condições de operação com respeito às taxas de produção, às recuperações e aos custos de separação. A técnica mais comum utilizada na cromatografia preparativa é ainda a eluição isocrática em batelada (RAJENDRAN, 2013; SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Em aplicações analíticas de separação cromatográfica, são injetados volumes de amostra relativamente pequenos numa única coluna. Isto causa formas mais ou menos gaussianas dos sinais cromatográficos. Dessa forma, a eficiência da coluna (isto é, o número de pratos), o tempo de retenção e a seletividade entre os componentes a separar são os principais parâmetros que devem ser ajustados. Os objetivos são diferentes na cromatografia preparativa. Aqui as colunas têm de ser fortemente sobrecarregadas para atingir produtividades elevadas. Isto é feito injetando concentrações maiores, frequentemente perto dos limites de solubilidade, e/ou volumes de amostra maiores. Como consequência, as regiões não-lineares dos equilíbrios de distribuição controlam a separação

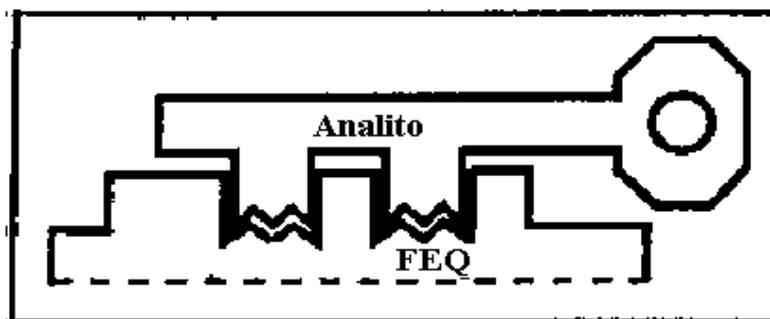
e conduzem tipicamente a formas de sinais cromatográficos altamente assimétricos e distorcidos. Além das seletividades, as cargas das fases estacionárias passam a ser muito importantes. Para aumentar as produtividades e as recuperações, bem como para reduzir os consumos de solventes, várias alternativas à cromatografia em batelada foram desenvolvidas e são utilizadas na indústria. Para conceber e aperfeiçoar a cromatografia líquida preparativa, o conhecimento das funções termodinâmicas, isto é, as isotermas de adsorção, é de grande importância. Normalmente estas funções não podem ser previstas e várias técnicas têm sido sugeridas para determiná-las experimentalmente. Deste modo, as características importantes da cromatografia de sobrecarga não linear, tais como, por exemplo, os efeitos de deslocamento e de cauda e as distorções de sinais cromatográficos, podem ser entendidos (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; SEIDEL-MORGENSTERN e LORENZ, 2014).

Como consequência da disponibilidade de FEQs de alta capacidade e seletividade, bem como ferramentas matemáticas que permitem a concepção de vários modos de funcionamento, a separação de misturas racêmicas por cromatografia líquida preparativa é, em muitos casos, a via mais rápida para produzir pequenas quantidades de enantiômeros puros. Nos últimos anos, um processo específico envolvendo várias colunas conectadas melhorou o potencial de enantioseparação cromatográfica e levou a várias aplicações em larga escala (SEIDEL-MORGENSTERN e LORENZ, 2014).

No entanto, não existe uma única FEQ que possa ser considerada universal, isto é, ter a capacidade de separar todas as classes de compostos racêmicos. Escolher a coluna certa para a enantioseparação de um composto racêmico é difícil. A decisão baseia-se principalmente em dados empíricos e na experiência. A compreensão dos mecanismos de reconhecimento dos seletores quirais com os enantiômeros pode ajudar a resolver alguns problemas de resolução e a economizar tempo. Todos os seletores quirais fornecem uma superfície quiral a enantiômeros, que formam com os seletores complexos temporários, tendo diferentes energias de ligação. Os enantiômeros diferem nas suas energias de ligação porque se encaixam de forma diferente nas estruturas seletoras quirais. Consequentemente, os dois enantiômeros podem ser eluídos em momentos diferentes pela fase móvel e depois recolhidos separadamente. Em geral, o mecanismo de reconhecimento em um seletor quiral é baseado em um arranjo chave-e-fechadura (Figura 2.5). No entanto, muitos outros fatores,

tais como a composição da fase móvel (pH, eletrólitos, natureza do solvente), tamanho e comprimento da coluna e temperatura também desempenham um papel chave para a resolução quiral (NGUYEN et al., 2006).

**Figura 2.5-** Representação esquemática do mecanismo de reconhecimento quiral



Fonte: Nguyen et al., 2006

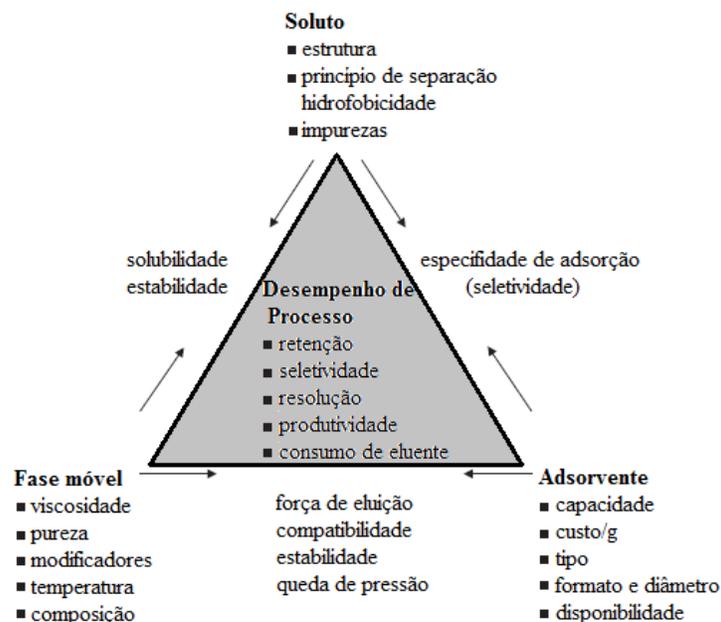
### 2.2.2 Seleção do sistema cromatográfico

A seleção do sistema cromatográfico é uma etapa crítica para a produtividade e para a economia do processo. Embora essa seleção deva ser considerada como tendo o maior potencial para aperfeiçoar um processo de separação, é também fonte de erros graves. A escolha do sistema cromatográfico inclui a seleção do adsorvente e dos solventes utilizados na fase móvel para dada amostra. Além disso, as condições do material a ser separado assim como o estado final do produto não devem ser negligenciados.

Uma fonte de erro grave e comum no desenvolvimento do sistema é a abordagem sobre cromatografia preparativa. A diferenciação entre cromatografia clássica analítica e preparativa é baseada no diâmetro da coluna, no tamanho das partículas adsorventes ou na quantidade de amostra a separar. O objetivo das separações analíticas é gerar informações enquanto que as aplicações preparativas visam isolar certa quantidade de produtos purificados. Por estas razões, a cromatografia preparativa e analítica devem ser diferenciadas com base na meta da separação e não no tamanho geométrico do sistema.

Um sistema cromatográfico consiste no adsorvente (fase estacionária), fase móvel (eluente, solvente) e solutos (amostras, analito). A Figura 2.6 ilustra a inter-relação destes três constituintes (SCHULTE et al., 2005).

**Figura 2.6-** Elementos do sistema cromatográfico



Fonte: Schulte et al., 2005

### 2.2.3 Fase móvel em escala preparativa

A determinação da fase móvel (FM) é o primeiro passo experimental, pois sua composição quase sempre é fundamental no processo de separação. A seleção deve levar em consideração o tipo de interação que ocorre entre o soluto e as fases móvel e estacionária, estabilidade física e química dos solventes nas condições de operação, segurança inerente à inflamabilidade e toxicidade do solvente e condições de funcionamento, como por exemplo, fácil recuperação, alto grau de pureza e compatibilidade com o detector. Portanto, a FM exerce duas funções, arrasta os componentes da amostra através do sistema cromatográfico e participa do processo de separação (COLLINS et al., 2006; SCHULTE et al., 2005).

A escolha da fase móvel é um ponto crítico para separações de enantiômeros. De fato, a seletividade da separação, tempo de retenção e solubilidade do racemato muitas

vezes são muito sensíveis às mudanças da composição da fase móvel (FRANCOTTE, 2001).

#### **2.2.4 Fase estacionária para cromatografia preparativa**

A concepção e desenvolvimento de uma fase estacionária capaz de reconhecimento quiral eficaz de vasta gama de enantiômeros é o ponto chave da cromatografia líquida de alta eficiência. As FEQs para uso preparativo desenvolveram-se significativamente na última década e tornaram possível desenvolver uma separação de qualquer mistura racêmica, assim, a seletividade não é, geralmente, um problema. As FEQs geralmente consistem em pequenas moléculas quirais ou polímeros quirais immobilizados num suporte tal como sílica gel. No entanto, o número de FEQs que são de uso prático no desenvolvimento de uma separação preparativa eficiente de enantiômeros são restritas devido às questões da capacidade de carga química ou estabilidade mecânica, disponibilidade em grandes quantidades a um custo razoável, bem como limitações do solvente que pode ter um grande impacto tanto na solubilidade quanto na retenção do composto quiral e, portanto, sobre a produtividade (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002; YASHIMA, 2001).

Se, por um lado, o crescente número de fases estacionárias quirais desenvolvidas e comercialmente disponíveis possibilita a separação dos enantiômeros de uma ampla variedade de compostos, ao mesmo tempo dificulta a escolha da fase estacionária mais apropriada para cada tipo de separação. Em vista disto, as fases estacionárias foram classificadas em cinco diferentes grupos, de acordo com as interações analito/FEQ e posteriormente, reclassificadas de acordo com o tipo de seletor quiral, natural ou sintético, da fase estacionária (Tabela 2.1) (LOURENÇO et al., 2010).

A escolha da fase estacionária e das condições cromatográficas é determinada por fatores como a seletividade e capacidade de carga de uma FEQ, a concentração desejada e a velocidade de operação, a solubilidade do racemato, bem como as propriedades físicas da FEQ (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002). Mais de 90% das resoluções enantioméricas em cromatografia líquida de alta eficiência, são realizadas utilizando FEQs baseadas em polissacarídeos. Entre elas, fenilcarbamatos de celulose e amilose parecem ser algumas das

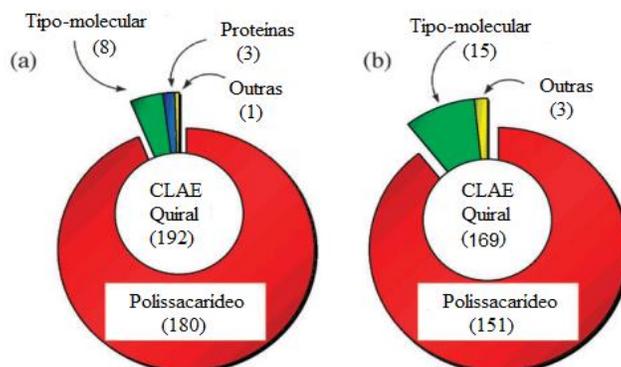
FEQs mais úteis. A Figura 2.7 mostra a proporção das FEQs para CLAE utilizadas para a determinação do excesso enantiomérico publicadas no Journal of the American Chemical Society em 2005 e 2007 (ABOUL-ENEIN e ALI, 2002; OKAMOTO e IKAI, 2008; SILVA JR et al., 2006; SHEN et al., 2010).

**Tabela 2.1-** Seletores quirais e principais interações com analitos quirais

Seletor quiral	Fases estacionárias quirais	Principais interações
Natural	Proteínas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas
	Ciclodextrinas	Complexo de inclusão e ligação de hidrogênio
	Polissacarídeos	Complexo de inclusão e interações atrativas
	Glicopeptídeos macrocíclicos	Complexo de inclusão e interações iônicas
	Cinchona	Interações eletrostáticas
Sintético	Tipo Pirkle	Interação $\pi$ - $\pi$ e ligação de hidrogênio
	Troca de ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo
	Éteres de coroa	Complexo de inclusão e íon-dipolo
	Polímeros sintéticos	Interação $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo
	Polímeros impressos molecularmente (MIPs)	Específico para cada analito

Fonte: Lourenço, et al., 2010

**Figura 2.7-** Distribuição de FEQs para CLAE usadas para a determinação de excesso enantiomérico. Journal of American Chemical Society em 2005 (a) e 2007 (b)



Fonte: Okamoto e Ikai, 2008

A Figura 2.7 nos mostra o quanto as fases estacionárias baseadas em polissacarídeos são eficientes para a resolução de compostos quirais. No ano de 2005, dos 192 documentos que relataram resolução quiral, publicados pela *Journal of American Chemical Society*, 180 dessas resoluções foram realizadas com FEQ baseada em polissacarídeos. Já em 2007, das 169 pesquisas com compostos quirais, 151 utilizaram FEQ baseada em polissacarídeos.

As fases estacionárias baseadas em derivados de polissacarídeos podem ser empregadas em três modos de eluição:

- a) fase normal: caracterizado pelo uso de fases móveis compostas de hexano-álcool; podendo adicionar pequenas quantidades de uma base orgânica (dietilamina) ou um ácido orgânico (ácido trifluoracético). O emprego desses aditivos tem por finalidade principal reduzir a interação de analitos básicos e ácidos, respectivamente, com os grupos silanóis residuais presentes na sílica empregada como suporte para essas fases estacionárias.
- b) fase reversa: as colunas são empregadas com fases móveis compostas por uma solução aquosa e um solvente orgânico miscível, normalmente acetonitrila ou metanol.
- c) polar orgânico: caracterizado pelo uso de fases móveis contendo 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, propanol, ou ainda misturas desses solventes. O uso desse tipo de fase móvel representa uma alternativa adicional para obter a separação desejada, inclusive com possibilidade de inversão na ordem de retenção, maior solubilidade de alguns compostos e, por serem mais facilmente removidas e reutilizadas, essas fases são bastante atrativas para separações em escalas preparativas. O comportamento da separação nesse sistema depende não apenas da fase móvel e fase estacionária, mas também da natureza dos compostos a serem separados (BONATO e JABOR, 2005).

### **2.2.5 Características da coluna cromatográfica quiral**

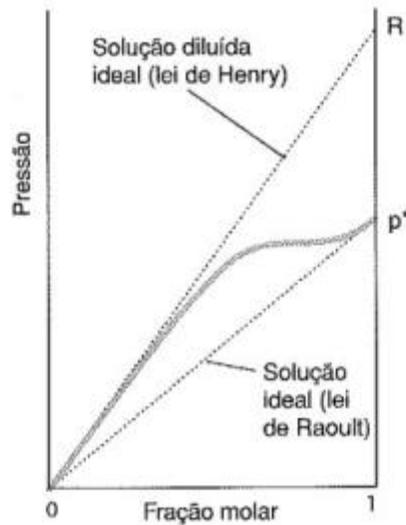
Uma coluna cromatográfica quiral ideal deve apresentar boa estabilidade química frente à maioria dos solventes utilizados na fase móvel. O tamanho reduzido da partícula auxilia em separações difíceis, possibilitando a obtenção de sinais cromatográficos

melhores resolvidos e simétricos. Em cromatografia quiral é de grande importância a utilização de partículas de sílica de menores diâmetros para obter um processo de separação de alta eficiência e com reduzida pressão. A coluna cromatográfica quiral deve apresentar estabilidade mecânica e química e baixa queda de pressão, além de conter alta capacidade de carga da fase, geralmente atribuída à extensa área de superfície disponível e a alta densidade do ligante quiral (NASCIMENTO, 2012; ROSA, 2005).

### **2.2.5.1 Método dos momentos**

A análise dos momentos é uma ferramenta útil para determinação dos coeficientes de difusão axial e difusividade efetiva nos poros através de experimentos de pulsos cromatográficos (injeções no cromatógrafo) bem como para caracterização do leito e das partículas. Permite a possibilidade de obtenção das constantes de Henry para soluções diluídas. O método fundamenta-se na análise da distribuição de concentração formado pelo soluto na saída de um leito fixo em resposta a um pulso retangular de concentração na entrada da coluna (GUIOCHON et al., 2006). A análise de pulsos tem sido usada para estudar uma variedade de sistemas cromatográficos (ARNOLD et al., 1985a), baseada na teoria dos momentos estatísticos de Kubin (KUBIN, 1965). Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta conforme a lei de Henry (Figura 2.8).

**Figura 2.8-** Determinação gráfica da constante de Henry



Fonte: Atkins, 2003

A inclinação dessa reta pode ser determinada a partir do primeiro momento de um pulso do soluto, que se associa ao tempo de retenção do mesmo. O estudo da distribuição de concentração em cromatografia está relacionado com a condição de linearidade da isoterma de adsorção (MIYABE et al., 2003). Os parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos a partir do segundo momento (MIYABE e SUZUKI, 1992; CREMASCO et al., 2001).

O primeiro momento absoluto ( $\mu_1$ ) está relacionado ao tempo de retenção do sinal cromatográfico, e então com a força de adsorção (constante de equilíbrio). O segundo momento central ( $\mu_2$ ) fornece informações sobre a difusão e está relacionado ao alargamento da banda cromatográfica. O primeiro momento ( $\mu_1$ ) e o segundo momento ( $\mu_2$ ) advêm das Equações 2.1 e 2.2 (ARNOLD et al., 1985b; RUTHVEN, 1984), em que  $L$  é o comprimento da coluna,  $v$  a velocidade intersticial da fase móvel,  $\varepsilon$  a porosidade do leito,  $\varepsilon_p$  a porosidade da partícula,  $He$  a constante modificada de Henry ou constante de adsorção,  $D_L$  e  $k_m$  os coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa,

respectivamente,  $t_{inj}$  é o tempo de injeção e  $K$  é dado pela Equação 2.3 (RUTHVEN, 1984).

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{v} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) (1-\varepsilon_p) He \right] + \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{v} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right] + \frac{t_{inj}}{2} \quad (2.1)$$

$$\sigma^2 = \frac{2\mu_1^2}{L} \left[ \frac{D_L}{v} + \frac{v}{k_m K} \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \left( 1 + \frac{\varepsilon}{(1-\varepsilon)K} \right)^{-2} \right] + \frac{t_{inj}^2}{12} \quad (2.2)$$

com

$$K = \varepsilon_p + (1-\varepsilon_p) He \quad (2.3)$$

### 2.2.5.2 Porosidade

A porosidade total ( $\varepsilon_T$ ) da coluna cromatográfica corresponde a todos os volumes disponíveis internos das partículas constituintes do material recheado. Em princípio a porosidade total ( $\varepsilon_T$ ) pode ser obtida a partir da análise do primeiro momento do composto inerte pela variação da velocidade superficial da fase móvel conforme a Equação 2.4, em que  $\mu$  representa o primeiro momento,  $L$  o comprimento da coluna,  $u$  a velocidade superficial da fase móvel,  $t_{inj}$  o tempo gasto para realizar a injeção,  $\varepsilon$  a porosidade do leito e  $\varepsilon_p$  a porosidade das partículas.

$$\mu = \frac{L}{u} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p \right] + \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{u} \varepsilon_T + \frac{t_{inj}}{2} \quad (2.4)$$

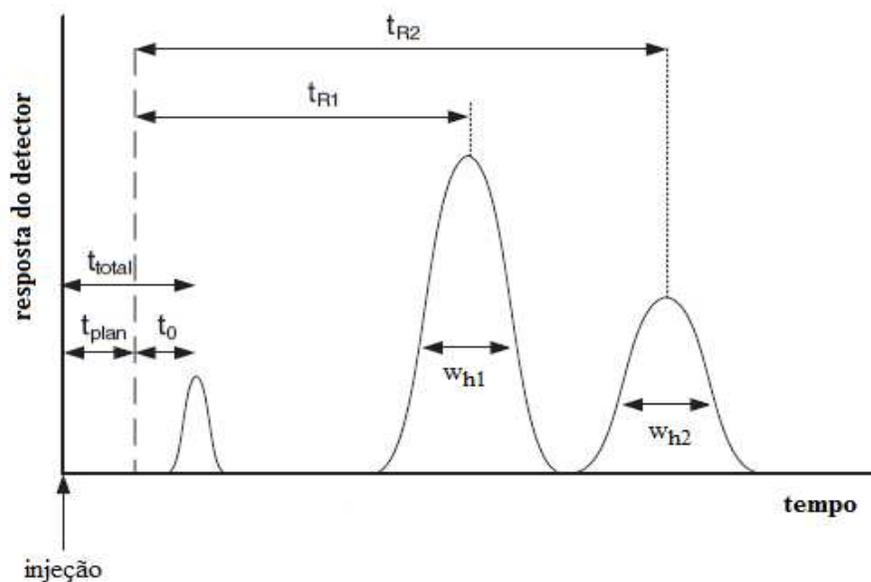
### 2.2.6 Parâmetros cromatográficos

A informação básica para o desenvolvimento de um processo de separação cromatográfica é obtida a partir do cromatograma, que corresponde ao registro gráfico da eluição dos solutos pelo leito ao longo do tempo. Picos com concentração da região linear na isoterma de adsorção apresentam comportamento gaussiano. Um cromatograma típico

resultante da injeção de três componentes diferentes em quantidades analíticas é mostrado na Figura 2.9. As variáveis observadas são:

- tempo da planta ( $t_{\text{plan}}$ ): tempo que o analito e a fase móvel percorrem o sistema cromatográfico (sem a fase estacionária). Corresponde ao volume das tubulações;
- tempo zero ( $t_0$ ): tempo que o composto inerte percorre o sistema cromatográfico com a fase estacionária. Corresponde ao volume morto da coluna (fase estacionária);
- tempo morto ( $t_{\text{total}}$ ): tempo correspondente às tubulações e o volume morto da coluna;
- tempo de retenção dos analitos ( $t_{R1}$  e  $t_{R2}$ ): tempo em que cada enantiômero fica adsorvido na fase estacionária,
- largura do sinal cromatográfico dos analitos à meia altura ( $w_{h1}$  e  $w_{h2}$ ): é um parâmetro de uma curva ou função referente ao seu "abaulamento", tal largura é dada pela diferença entre dois valores extremos de uma variável independente no qual ela, a função, atinge metade de seu valor máximo (MEYER, 2013; SCHULTE e EPPING, 2005).

**Figura 2.9** – Cromatograma teórico para determinar os parâmetros cromatográficos



Fonte: Schulte e Epping, 2005

A força de interação de cada componente com a fase estacionária é proporcional ao seu tempo de retenção ( $t'_R$ ), ou seja o tempo em que cada composto permanece retido na coluna. O  $t'_R$  é determinado pela Equação 2.5 (COLLINS et al., 2006).

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2.5)$$

em que  $t_R$  é o tempo de retenção total e  $t_M$  é o tempo morto do sistema. O  $t_R$  é o tempo decorrido entre a injeção da amostra e o instante em que o sinal cromatográfico máximo é atingido. O  $t_M$  é o tempo que um composto inerte leva para percorrer a coluna de modo a não interagir com a fase estacionária (MEYER, 2013).

### 2.2.6.1 Fator de retenção

O fator de retenção ( $k_i$ ) é uma medida adimensional e de fundamental importância em separações cromatográficas. A abordagem mais comum é por meio da Equação 2.6, na qual o  $k_i$  pode ser obtido diretamente do cromatograma (CASS e DEGANI, 2001; MEYER, 2013):

$$k_i = \frac{t'_{Ri} - t_M}{t_M - t_{plan}} \quad (2.6)$$

em que  $t_{plan}$  é o tempo da planta definido como o tempo que o soluto percorre a partir do injetor até o detector sem passar pela coluna.

Os valores de  $k_i$  auxiliam na interpretação e melhoria da qualidade de uma separação. Seu valor não deve ser muito grande, por causar alargamento dos picos, e nem muito pequeno, pois significa que o composto interage pouco com a fase estacionária (MEYER, 2013; SNYDER et al., 2011).

### 2.2.6.2 Seletividade

O fator de separação ( $\alpha$ ) avalia a seletividade da separação para dois sinais cromatográficos adjacentes, sendo definido como uma razão entre os fatores de retenção do composto mais retido e do menos retido, calculado pela Equação 2.7 (CASS e DEGANI, 2001).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2.7)$$

### 2.2.6.3 Resolução

A resolução ( $R_s$ ) avalia a qualidade da separação. Está associada ao tempo de retenção e a largura dos sinais cromatográficos dos dois compostos adjacentes. O valor de  $R_s$  pode ser determinado por meio da Equação 2.8, em que  $t_{R2}$  e  $t_{R1}$  são os tempos de retenção para os dois compostos e  $w_{h1}$  e  $w_{h2}$  são as larguras dos picos a meia altura (CASS e DEGANI, 2001).

$$R_s = 1,177 \frac{(t'_{R2} - t'_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (2.8)$$

Valores de resoluções iguais a 1,0 indicam que os sinais cromatográficos estão separados com 3% de superposição das bandas. Quando  $R_s=1,25$  há separação suficiente para fins quantitativos e  $R_s > 1,50$  indica separação completa (SCHULTE e EPPING, 2005; COLLINS, 2006).

### 2.2.6.4 Número de pratos teóricos

O número de pratos teóricos ( $N$ ) é uma medida da eficiência da separação. Um prato ideal equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Para avaliação da eficiência da coluna cromatográfica são aceitos valores de número de pratos acima de 2000 na separação de fármacos. É o parâmetro que mais precisamente define a qualidade de um sistema cromatográfico (DANTUS e WELLS, 2004). O valor de

$N$  pode ser determinado por meio da Equação 2.9, em que  $t_R$  é o tempo de retenção, e  $w_{hi}$  a largura do sinal cromatográfico a meia altura (CASS e DEGANI, 2001).

$$N = 5,545 \left( \frac{t'_{R_i}}{w_{hi}} \right)^2 \quad (2.9)$$

### 2.2.6.5 Altura equivalente do prato teórico

A altura equivalente a um prato teórico (*HETP*) avalia a eficiência de uma coluna cromatográfica. O desempenho da coluna é medido por meio dos tempos de retenção e do alargamento dos sinais cromatográficos obtidos (CASS e DEGANI, 2001). A *HETP* pode ser determinada por meio da Equação 2.10, em que  $N$  corresponde ao número de pratos e  $L$  é o comprimento da coluna (GUIOCHON et al., 1994, RUTHVEN, 1984).

$$HETP = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \quad (2.10)$$

Quanto menores os valores de *HETP* significa maior eficiência da coluna e altos valores de número de pratos teóricos ( $N$ ). A análise da dependência de *HETP* com a velocidade superficial da fase móvel ( $u$ ) fornece informações relevantes a respeito do fenômeno de transferência de massa no sistema cromatográfico. Geralmente são assumidos quatro principais processos do fenômeno em colunas cromatográficas: (i) dispersão axial; (ii) transferência de massa do fluido para a partícula; (iii) difusão intraparticular; e (iv) adsorção/dessorção (MIYABE e GUIOCHON, 1999). O valor de *HETP* para uma coluna cromatográfica pode ser calculado por meio da equação de van Deemter (Equação 2.11). Nessa equação,  $u$  representa a velocidade superficial da fase móvel e  $A$ ,  $B$  e  $C$  são constantes cinéticas determinadas experimentalmente, que incluem os efeitos de difusão turbilhonar, difusão longitudinal e transferência de massa fluido-sólido, respectivamente.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + uC \quad (2.11)$$

Os dois principais mecanismos que contribuem para a dispersão axial são a difusão molecular e difusão turbilhonar. Desta forma, a equação de van Deemter pode ser

representada pela equação modificada que possui a forma apresentada pela Equação 2.12, em que  $k_m$  é o coeficiente de transferência de massa global e  $K$  corresponde ao termo relativo ao equilíbrio de adsorção,  $D_L$  é o coeficiente de dispersão axial e  $\varepsilon$  é a porosidade do leito (DUAN et al., 1998).

$$HETP = \frac{2D_L}{u} + 2u \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.12)$$

em que

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (2.13)$$

$D_m$  corresponde ao coeficiente de difusão molecular,  $d_p$  ao diâmetro da partícula e  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$  são constantes que possuem normalmente valores 0,7 e 0,5, respectivamente (RUTHVEN, 1984). A contribuição da difusão molecular axial (o primeiro termo da Equação 2.13) para o coeficiente de dispersão axial geralmente é desprezível perante o segundo termo. Portanto, a seguinte equação modificada de van Deemter pode ser derivada da Equação 2.11 (MIYABE e GUIOCHON, 1999):

$$HETP = A + Cu \quad (2.14)$$

em que os parâmetros A e C são representados por:

$$A = 2 \left( \frac{D_L}{u} \right) \quad (2.15)$$

$$C = 2 \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.16)$$

## 2.2.7 Equilíbrio de adsorção

O estudo de equilíbrio de fases é a parte da termodinâmica que se preocupa com a distribuição dos solutos em equilíbrio entre duas fases e a influência de parâmetros nesta distribuição. O equilíbrio de adsorção ocorre quando os potenciais químicos dos solutos são os mesmos para ambas as fases. A isoterma de adsorção é a informação mais importante para modelar processos de separação em cromatografia líquida e pode ser representada pela distribuição de solutos entre as fases líquida ( $c_i$ ) e sólida ( $q_i$ ) no equilíbrio à temperatura constante. Em cromatografia, o conhecimento prévio da isoterma de adsorção é necessário para resolver os balanços de massa diferenciais e determinar o perfil das bandas cromatográficas em concentrações elevadas (RUTHVEN, 1984; GUIOCHON et al., 2006).

Em cromatografia linear, efeitos de dispersão axial e os processos de transferência de massa são os principais responsáveis pelo grande alargamento dos picos cromatográficos (MIYABE e GUIOCHON, 1999). Em cromatografia preparativa, os efeitos de transferência de massa e dispersão são analisados pelo modelo clássico de equilíbrio (ou ideal) de cromatografia que permite estudar mais diretamente o efeito das funções de equilíbrio e fornece a base para vários métodos experimentais para medir isotermas de adsorção (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Assim, o conhecimento da isoterma frequentemente contribui para explicar o mecanismo de retenção e pode ajudar a propor rotas visando melhorar a separação, prever a taxa de produção e, até mesmo, a extensão da purificação, sendo de interesse particular para separações enantioméricas (MIHLBACHLER et al., 2002).

### 2.2.7.1 Isotermas de adsorção

Nos processos de separação cromatográfica, o comportamento no equilíbrio das espécies adsorvidas na fase estacionária é avaliado pela sua isoterma de adsorção que representa todas as forças de interações possíveis, atração ou repulsão, entre as moléculas do soluto e a fase estacionária (CAVAZZINI et al., 2001). Quanto maior a complexidade da isoterma de adsorção maior deve ser a quantidade de dados e mais ampla a faixa de concentração para o modelo ser significativo. O modelo mais simples é o linear, no qual descreve o equilíbrio em condição de baixa concentração. A isoterma de Langmuir é um

modelo de apenas dois parâmetros que descreve boa parte dos sistemas de separação (GUIOCHON et al., 2006).

### 2.2.7.2 Isoterma de Langmuir

A isoterma de Langmuir é a mais usada como modelo de adsorção, em que típicos efeitos de competição sob condições de sobrecarga em cromatografia não-linear podem ser ilustrados. Considera que o processo acontece em uma superfície composta de um número fixo de sítios de adsorção de igual energia, uma a uma as moléculas vão sendo adsorvidas por sítio até que a cobertura da monocamada seja atingida (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; JAMES et al., 1999). As principais considerações do modelo são: superfície homogênea, o sítio ativo interage apenas com uma molécula por vez, a adsorção ocorre em monocamada, não há interferências laterais entre as moléculas adsorvidas. A isoterma de Langmuir é representada pela Equação 2.17:

$$q_i = \frac{ac_i}{1+bc_i} = q_{sat} \frac{bc_i}{1+bc_i} \quad (2.17)$$

em que  $q_i$  é a quantidade adsorvida de componente  $i$  na fase sólida,  $c_i$  é a concentração do componente  $i$  na fase líquida,  $b$  é a constante de equilíbrio de adsorção, relacionada à energia de adsorção,  $q_s = (a/b)$  é a capacidade de saturação do adsorvente e  $a = (q_s b)$  é o coeficiente de distribuição, também chamado de constante de Henry em baixas concentrações de soluto. A grande vantagem desse modelo é o pequeno número de parâmetros requeridos e a simplicidade de sua dedução. De fato, somente três parâmetros são necessários para descrever a adsorção competitiva: duas constantes de equilíbrio e a capacidade de saturação (FELINGER et al., 2003).

Diversos métodos experimentais para a determinação de isotermas de adsorção para um único componente e para multicomponentes - isotermas competitivas - têm sido reportados na literatura (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Esses métodos podem ser classificados em estáticos ou dinâmicos (GUIOCHON et al., 1994; JAMES et al., 1999; RUTHVEN, 1984). Os métodos estáticos para determinação de isotermas não analisam a

curva concentração-tempo, apenas utilizam informações no estado de equilíbrio. Os métodos dinâmicos são baseados na análise matemática das curvas resposta que correspondem às mudanças bem definidas na alimentação da coluna cromatográfica ao longo do tempo (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

### 2.2.8 Classificação das isotermas de adsorção

A maioria das isotermas de van der Waals pode ser agrupada nos seis tipos mostrados na Figura 2.10. Na maioria dos casos, em uma cobertura superficial suficientemente baixa, a isoterma reduz-se a uma forma linear, que é frequentemente referida como a região da Lei de Henry.

A isoterma reversível de *Tipo I* é côncava para o eixo  $P/P_0$  e aproxima-se de um valor limitante como  $P/P_0 \rightarrow 1$ . As isotermas de Tipo I são fornecidas por sólidos microporosos com superfícies externas relativamente pequenas (por exemplo, carvões ativados, zeólitas e certos óxidos porosos), sendo o mecanismo limitante governado pelo volume de microporos acessível em vez da área de superfície interna.

A isoterma reversível do *Tipo II* é a forma normal de isoterma obtida com um adsorvente não poroso ou macroporoso. O ponto B, o início da seção média quase linear da isoterma, geralmente é tomado para indicar o estágio em que a cobertura monocamada está completa e a adsorção multicamada está prestes a começar.

A isoterma reversível do *Tipo III* é convexa para o eixo  $P/P_0$  em toda a sua área e, portanto, não exibe um ponto B. As isotermas deste tipo são comuns, mas existe um número de sistemas (por exemplo, nitrogênio em polietileno) que dão isotermas com curvatura gradual e um ponto indistinto B. Nesses casos, as interações adsorvente-adsorvente desempenham um papel importante.

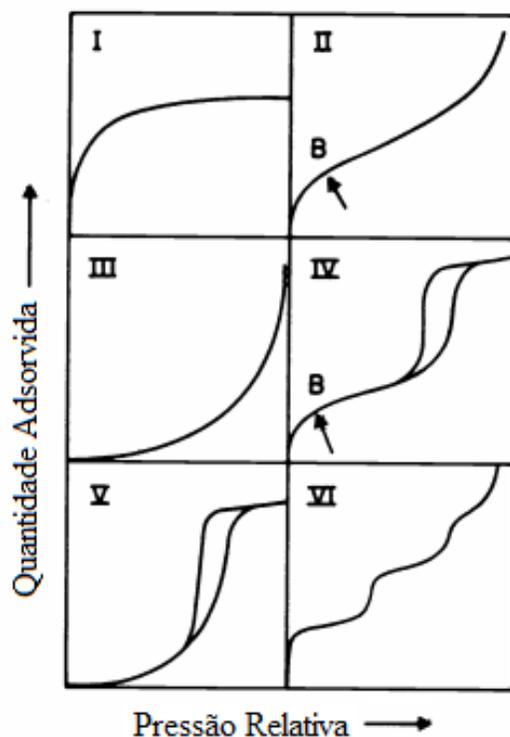
As características da isoterma do *Tipo IV* são o circuito de histerese, que está associado à condensação capilar ocorrendo em mesoporos e o mecanismo limitante em uma faixa de alta  $P/P_0$ . A parte inicial da isoterma é atribuída à adsorção monocamada e multicamada, uma vez que segue o mesmo caminho que a parte correspondente de uma isoterma de *Tipo II* obtida com a adsorção dada na mesma área superficial do adsorvente

numa forma não porosa. As isotermas do *Tipo IV* são características de muitos adsorventes mesoporosos industriais.

A isoterma do *Tipo V* é incomum; está relacionada à isoterma do *Tipo III*, na medida em que a interação adsorvente-adsorvente é fraca, mas é obtida com certos adsorventes porosos.

A isoterma do *Tipo VI* na qual a nitidez das etapas depende do sistema e da temperatura, representa a adsorção multicamada gradual em uma superfície uniforme não porosa. A altura do passo representa a capacidade de monocamada para cada camada adsorvida e, no caso mais simples, permanece quase constante para duas ou três camadas adsorvidas (SING et al., 1985).

**Figura 2.10** – Tipos de Isotermas



Fonte: Sing et al., 1985

O tipo de isoterma é função do efeito do tamanho do poro sobre o fenômeno de adsorção. De acordo com as curvas conhecidas, foi estabelecida uma classificação dos

poros em função de seu diâmetro (Tabela 2.2), uma vez que este é seu principal parâmetro dimensional (GREG e SING, 1982).

**Tabela 2.2** – Classificação dos poros segundo seu diâmetro

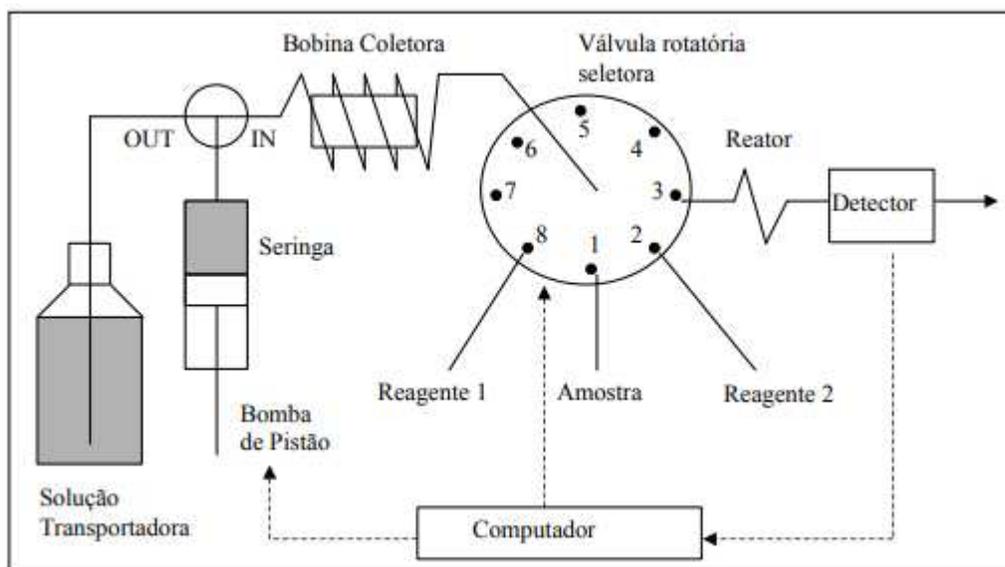
<b>Classificação</b>	<b>Diâmetro (Å)</b>
Microporo	$\Phi < 20$
Mesoporo	$20 < \Phi < 500$
Macroporo	$\Phi > 500$

Fonte: Greg e Sing, 1982

### 2.2.9 Separação cromatográfica por injeção sequencial

A cromatografia líquida por injeção sequencial (SIC) consiste em uma técnica analítica que evoluiu da injeção sequencial aplicada (SIA) na determinação de vários compostos através das separações cromatográficas. A SIC apresenta principalmente como diferencial a rapidez e o custo reduzido em relação aos equipamentos para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso permite realizar análises em vazões elevadas, sem perdas significativas da eficiência de separação, o que é uma das principais vantagens oferecidas por essas fases, implicando em redução do tempo de análise sem comprometimento da resolução cromatográfica (FARIA et al., 2006).

A cromatografia por injeção sequencial foi desenvolvida por Satinsky et al. (2003) (Figura 2.11), que propuseram a utilização das colunas monolíticas em sistemas SIA, permitindo separações cromatográficas com perfil similar a de CLAE e tem sido aplicada, com sucesso principalmente em análise de amostras de componentes múltiplos relativamente simples - principalmente no campo da análise farmacêutica (CHOCHOLOUS et al., 2007).

**Figura 2.11** – Esquema de SIC para a separação cromatográfica

Fonte: GARCIA, 2011

### 2.2.10 Separação cromatográfica com injeção empilhada

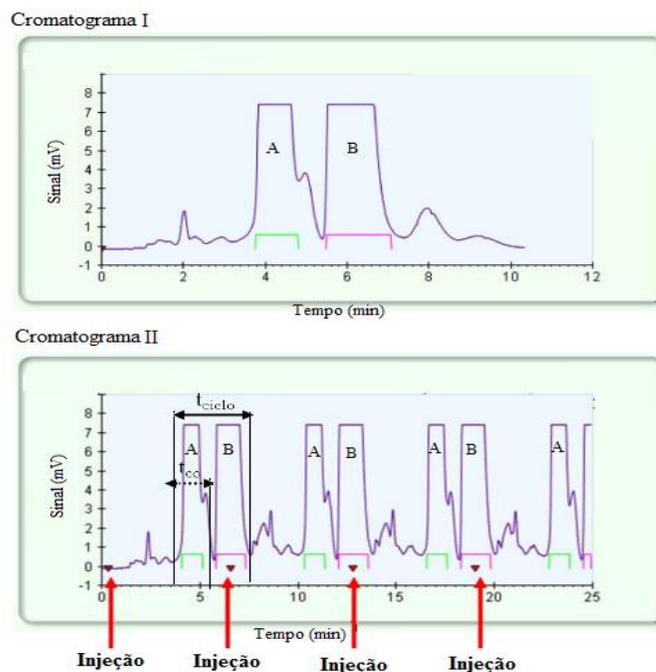
Em 1981 Snyder et al. apresentaram uma nova técnica para melhorar a detecção de substâncias simples em matrizes complexas. Essa técnica foi denominada cromatografia “boxcar” e o seu princípio é a separação parcial de um ou alguns compostos de interesse em uma primeira coluna, com o desvio da fração resultante para uma segunda coluna (SNYDER et al., 1981).

Visando aumentar a produtividade na cromatografia preparativa, o conceito desta técnica foi empregado para as injeções cromatográficas. Surgiu então a injeção “boxcar”, ou injeções sobrepostas, em que uma segunda injeção é feita antes de todos os compostos da primeira injeção se eluírem da coluna. Essa técnica também é conhecida como injeção empilhada. A separação por injeção empilhada tem como base a eluição, objetivando a coleta preferencial de um dos componentes presentes na mistura. Um exemplo de injeção empilhada é mostrado na Figura 2.12. O cromatograma I mostra a separação de linha de base dos enantiômeros, bem como as impurezas que eluem antes e depois dos enantiômeros; o tempo de ciclo para esta injeção é de 10 minutos. O cromatograma II mostra o impacto das injeções empilhadas na separação com injeções feitas

aproximadamente a cada 6 minutos, no meio do enantiômero B. Isso resulta em impurezas de eluição tardia da injeção 1 que co-elui com impurezas de eluição precoce da injeção 2. O resultado final é o tempo de ciclo reduzido de 10 para 6 minutos e aumento na produtividade de 66%.

De acordo com a Figura 2.13 a injeção 1 ocorre no tempo  $t_0$  e antes que todos os analitos dessa injeção tenham eluído da coluna é feita a injeção 2. Essas injeções vão se repetindo dentro de determinados ciclos de tempo (injeções 3 e 4), fazendo-se surgir bandas cromatográficas, uma após as outras, formando empilhamentos, que deram origem ao conceito de injeção empilhada. O cromatograma II descreve quatro eventos de injeção empilhada e três ciclos na resolução de uma mistura hipotética. São essenciais neste tipo de separação as definições do tempo de coleta da espécie alvo ( $t_{co}$ ) e do tempo de ciclo da resolução ( $t_{ciclo}$ ). O número de ciclos depende da produção (em massa) da espécie alvo. Para efeito de análise, supõe-se que a adsorção é regida por isothermas lineares tanto para A quanto para B e que ocorre a chamada resolução de linha de base, ou seja, a separação completa entre dois picos adjacentes ( $R_S > 1,5$ ) (MILLER et al., 1994; MILLER, 2012; RAMOS, 2014).

**Figura 2.12** – Representação de separação por injeção empilhada



Fonte: Miller, 2012

## **2.3 CARACTERIZAÇÃO DE FÁRMACOS**

Na caracterização de fármacos e produtos farmacêuticos é possível identificar e quantificar os eventos térmicos a partir das curvas de termogravimetria-TG (eventos de perda de massas) e calorimetria exploratória diferencial-DSC (identificar os processos endotérmicos ou exotérmicos) (OLIVEIRA et al., 2011).

A análise térmica tem se destacado como um método para analisar fármacos e insumos farmacêuticos. Foi comprovada a importância das técnicas termoanalíticas para realizar a caracterização, identificação de polimorfismo, avaliação de pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre fármaco e excipientes, estabilidade do ingrediente ativo farmacêutico e do produto e estudar a cinética das reações de estado sólido (BÖER et al, 2013, GUIMARÃES et al, 2010; LIMA, 2014).

### **2.3.1 Polimorfismo**

Os fármacos, na sua grande maioria, são disponibilizados comercialmente na forma sólida devido a uma série de vantagens que esta forma apresenta, no entanto algumas características do estado sólido podem causar sérios inconvenientes tanto para a indústria farmacêutica quanto para as pessoas que se utilizam do tratamento. Um dos principais problemas associado aos insumos farmacêuticos ativos é o chamado polimorfismo, um fenômeno comumente observado em fármacos (MONOSSETTE et al., 2004).

O termo polimorfismo pode ser definido como a possibilidade de uma substância existir em duas ou mais formas cristalinas, com diferentes arranjos e conformações de moléculas no estado sólido. Os polimorfos apresentam retículos cristalinos diferentes e, conseqüentemente, sua energia pode ser suficientemente diferente para influenciar sua estabilidade ou propriedades biológicas. Polimorfos são relativamente comuns em sólidos farmacêuticos, uma vez que muitos fármacos podem cristalizar em diferentes formas cristalinas. Assim, o controle da forma do cristal é importante durante os vários estágios de desenvolvimento dos novos fármacos, pois como resultado do polimorfismo eles podem apresentar significantes diferenças em suas propriedades físicas como: entalpia de fusão, pressão de vapor, capacidade calorífica, condutividade, volume, densidade, viscosidade, formato do cristal, dureza do cristal, cor, índice de refração, solubilidade, dissolução,

estabilidade, higroscopicidade e reações em estado sólido (GIRON, 1995, VIPPAGUNTA et al., 2001).

Para assegurar o desempenho consistente do produto farmacêutico, vários métodos analíticos são empregados para a caracterização das formas cristalinas dos fármacos. Os polimorfos podem ser caracterizados e diferenciados através de suas propriedades físico-químicas. A informação mais valiosa sobre o sólido cristalino é a estrutura molecular e cristalina, que é determinada pela Difração de raios-X (DRX). Essa técnica fornece uma "impressão digital" da fase sólida e, às vezes, pode ser usada para determinar a estrutura do cristal. Uma vez que a existência de polimorfismo é definitivamente estabelecida pela Difração de raios-X de um único cristal e em pó, métodos espectrais, como Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de dispersão de Raman (FT Raman), Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), Espectroscopia no ultravioleta e visível (UV-Vis) podem ser utilizadas para caracterização adicional. Os métodos térmicos como Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Análise termogravimétrica (TGA) e Microscopia óptica usando um estágio quente são sempre empregados para uma maior caracterização e são os métodos quantitativos mais utilizados nos últimos 10 anos (BOTTOM, 1999; GIRON, 1999; MA et al., 2011; SYKULA-ZAJAC et al., 2011; VIPPAGUNTA et al., 2001; WANG et al., 2014).

## **2.4 INOVAÇÃO E BUSCA DE ANTERIORIDADES**

Na revisão bibliográfica foi apresentada as diretrizes e a necessidade da obtenção e comprovação da atividade biológica dos enantiômeros do fármaco para que o mesmo possa ser comercializado na forma racêmica. Contudo a presente Tese refere-se ao primeiro estudo sobre o comportamento dos enantiômeros do secnidazol frente a microrganismos distintos. Para comprovar a inovação e ineditismo foi realizada uma pesquisa tecnológica com o objetivo de localizar possíveis documentos do estado da técnica (literatura patentária e não patentária).

A presente pesquisa compreendeu documentos que se iguallassem, em parte ou por completo, com a matéria de interesse e teve, como fonte, bancos de dados internacionais (Espacenet, USPTO, WIPO, SIPO e JPO) e o banco de dados do INPI, bem como o software PatBase.

Na busca realizada, foram selecionados quatro documentos que se enquadram no objetivo acima descrito. A matéria tratada nestes documentos é resumidamente descrita e avaliada quanto à sua relevância.

1. “Enantioseparation of Secnidazole by High-Performance Liquid Chromatography using Amylose-based Stationary Phase”

NASCIMENTO, A. *et al.* Enantioseparation of Secnidazole by High-Performance Liquid Chromatography using Amylose-based Stationary Phase. **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n. 8-9, p. 739-750, 2012. ISSN 0263-6174.

Data de Publicação: 23/10/2012

O documento descreve um processo de obtenção de enantiômeros do fármaco secnidazol utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ainda, foi utilizado como fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e como fase móvel uma mistura binária de isopropanol (60%, em volume) e acetonitrila (40%, em volume), em que o sistema foi alimentado manualmente com mistura racêmica (equimolar) do fármaco secnidazol na concentração que varia de 20 a 200 µl com o auxílio de uma seringa de vidro de 250 µL, à temperatura que varia de 20 a 35 °C.

2. “Resolução enantiomérica do secnidazol”

NASCIMENTO, A. C. **Resolução enantiomérica do secnidazol**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. p. 144. Dissertação (Mestrado).

Data de Publicação: 29/06/2012

A dissertação descreve um processo de obtenção de enantiômeros do fármaco secnidazol pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna recheada com fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, variando a vazão de fase móvel de 1,0 a 2,5 mL min<sup>-1</sup> e as temperaturas de 20 a 35°C.

3. US2006086667A:

Título: “Methods for the separation of enantiomeric sulfinylacetamides”

HAUCK, W., LUDEMANN-HOMBOURGER, O., RULAND, Y., LANDMESSER, N., MALLAMO, J. **Methods for the separation of enantiomeric sulfinylacetamides**. U.S. Patent Application n. 11/224,250, 27 abr. 2006

Data de Publicação: 27/04/2006

O documento refere-se a um processo para o isolamento de enantiômeros do fármaco modafinil com elevada pureza e elevados rendimentos globais. Os processos da presente invenção podem utilizar qualquer método cromatográfico para separar modafinil racêmico para produzir modafinil opticamente puro. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a: cromatografia em lote de coluna única tradicional, cromatografia contínua ou um processo de injeção sequencial em estado estacionário.

4. “Enantioselective HPLC determination and pharmacokinetic study of secnidazole enantiomers in rats”

DU, J., ZHANG, Y., CHEN, Y., LIU, D., CHEN, X., ZHONG, D. Enantioselective HPLC determination and pharmacokinetic study of secnidazole enantiomers in rats. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 224-230, 2014.

Data de Publicação: 05/07/2014

O documento revela resultados farmacocinéticos que indicam que a disposição dos enantiômeros do secnidazol não é estereosseletiva e que a inversão quiral e a interação enantiômero-enantiômero não ocorre em ratos. Estas descobertas fornecem informações adicionais sobre a disposição do secnidazol in vivo e podem facilitar o desenvolvimento de enantiômeros individuais de secnidazol no futuro.

Com os resultados obtidos será possível comprovar a inovação e as vantagens da presente Tese em relação aos documentos apresentados.

# CAPÍTULO 3

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

A presente Tese de Doutorado foi desenvolvida no Laboratório de Processos de Transferência de Massa (LPTM) do programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Departamento de Engenharia de Processos (DEPro) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados direta e indiretamente em todo o processo de obtenção e purificação dos enantiômeros do secnidazol.

### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 Secnidazol

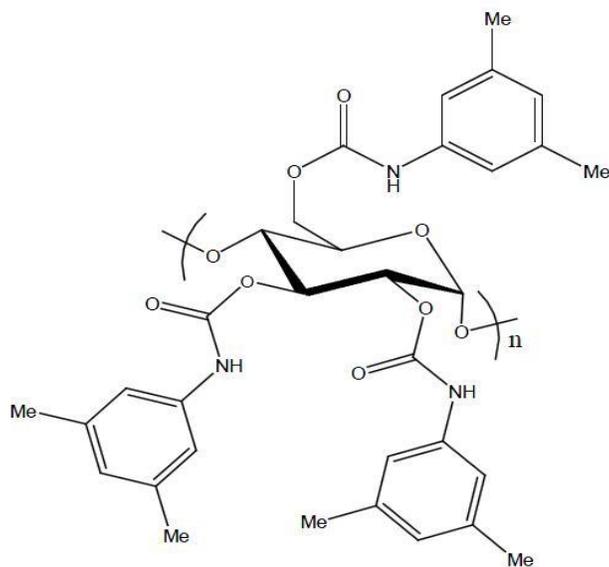
O secnidazol racêmico foi adquirido da empresa EMS® (Hortolândia, SP). Apresenta massa molar de  $185,18 \text{ g mol}^{-1}$ , sendo constituído pelos enantiômeros R e S conforme já apresentado na Figura 2.2 da página 25.

### 3.1.2 Fase estacionária

Grande parte das separações enantioméricas em escalas preparativas e semipreparativas vem sendo executadas em FEQ baseadas em polissacarídeos, tais como celulose e amilose. Isso se deve a capacidade de saturação deste tipo de FEQ que possibilita a obtenção de elevados valores de produtividade. Em virtude disso, no presente trabalho, foi utilizada coluna cromatográfica em aço inoxidável recheada com a fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (Figura 3.1). Foi utilizada uma coluna semipreparativa denominada comercialmente como Chiralpak® AD (100 x 10 mm) com diâmetro médio de partícula de 20 µm, adquirida da empresa Chiral Technologies® (Tóquio, Japão) para estudos de separação de misturas racêmicas de secnidazol diluídas e concentradas.

Dentre as FEQs baseadas em tris-fenilcarbamatos as fases tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e amilose são as mais utilizadas, devido à elevada estabilidade e grande capacidade de discriminação e resolução de uma ampla variedade de compostos. Nestes derivados, os enantiômeros podem interagir com os grupos -NH e C=O da fase estacionária, além de interações dipolo-dipolo com os grupos C=O (LOURENÇO et al., 2010).

**Figura 3.1** – Estrutura química da fase estacionária quiral tris-(3-5-dimetilfenilcarbamato) de amilose



Fonte: Elaborada pela autora

### 3.1.3 Traçador

O composto 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB) foi adquirido da Sigma-Aldrich® (EUA). O TTBB é uma molécula relativamente pequena, apresenta massa molar de 264,44 g/gmol e não é retida na FEQ, sendo capaz de se difundir não somente através do leito, mas também nos interstícios das partículas do sólido poroso.

### 3.1.4 Fase móvel

Os solventes utilizados para a composição da fase móvel e preparo das amostras foram: isopropanol 100% (Tedia, EUA) e acetonitrila 99,5% (J.T.Backer, EUA), ambos de grau cromatográfico.

### **3.1.5 Obtenção dos enantiômeros**

#### **3.1.5.1 Cromatógrafo líquido**

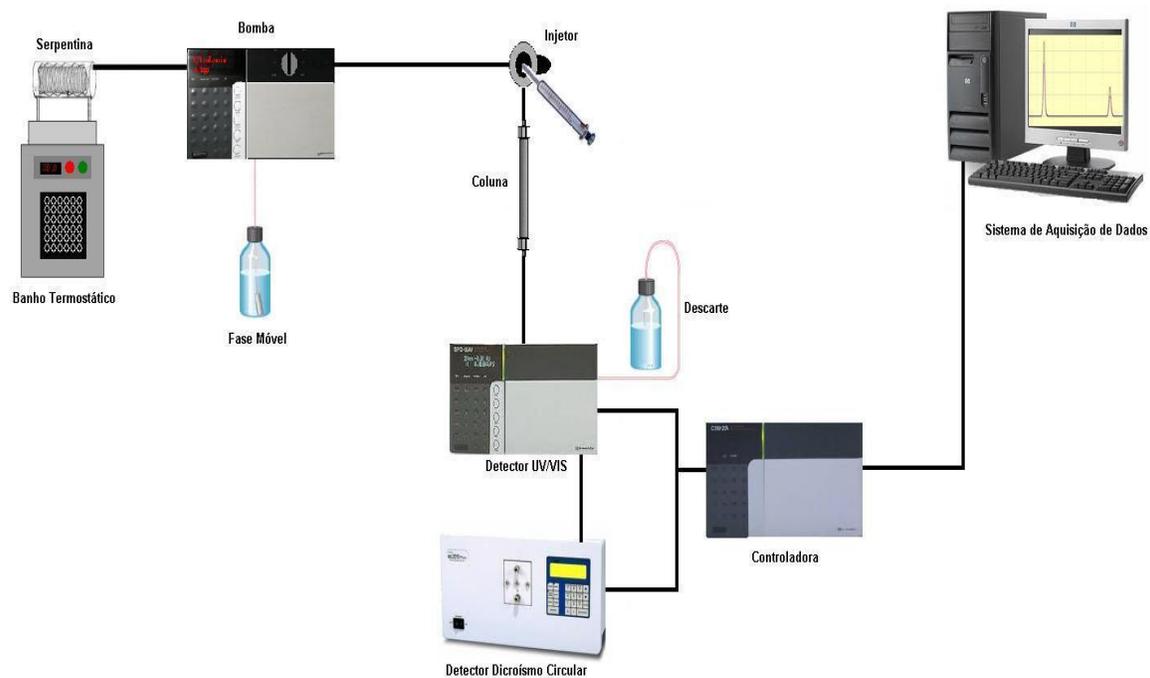
O sistema CLAE (Figura 3.2) é constituído por uma bomba da marca Shimadzu Corporation<sup>®</sup>/ modelo LC-20 AT (Japão) e por dois detectores: um da Shimadzu Corporation<sup>®</sup>/ modelo SPD- 20A (Japão) com detecção UV-Vis e outro da Jasco<sup>®</sup>/ modelo CD-2095 Plus (Japão), com detecção UV-Vis acoplado em série a um equipamento de dicroísmo circular. Os equipamentos são integrados a um sistema de aquisição de dados utilizando o software LCsolution<sup>®</sup> para a obtenção dos sinais cromatográficos e quantificação dos enantiômeros do secnidazol. A temperatura da coluna cromatográfica foi controlada com o auxílio de um banho termostaticado da marca Solab<sup>®</sup>/ modelo SL 152 (Brasil) e as amostras foram injetadas manualmente com o auxílio de uma seringa de vidro de 250 µL modelo Microliter<sup>TM</sup> 725 (Hamilton Co., EUA).

### **3.1.6 Caracterização da coluna cromatográfica quiral**

#### **3.1.6.1 Picnometria a gás**

A análise de picnometria a gás hélio foi realizada em aparelho da marca Micromeritics, modelo AccuPyc 1330. As análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC, da Faculdade de Engenharia Química na Universidade Estadual de Campinas.

**Figura 3.2-** Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência



Fonte: Nascimento, 2012

### 3.1.6.2 Analisador de área superficial por adsorção física (AF) - (ASAP)

A análise de área superficial por adsorção física foi realizada em aparelho da marca Micromeritics, modelo ASAP 2010. As análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC, da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

## 3.1.7 Caracterização dos enantiômeros

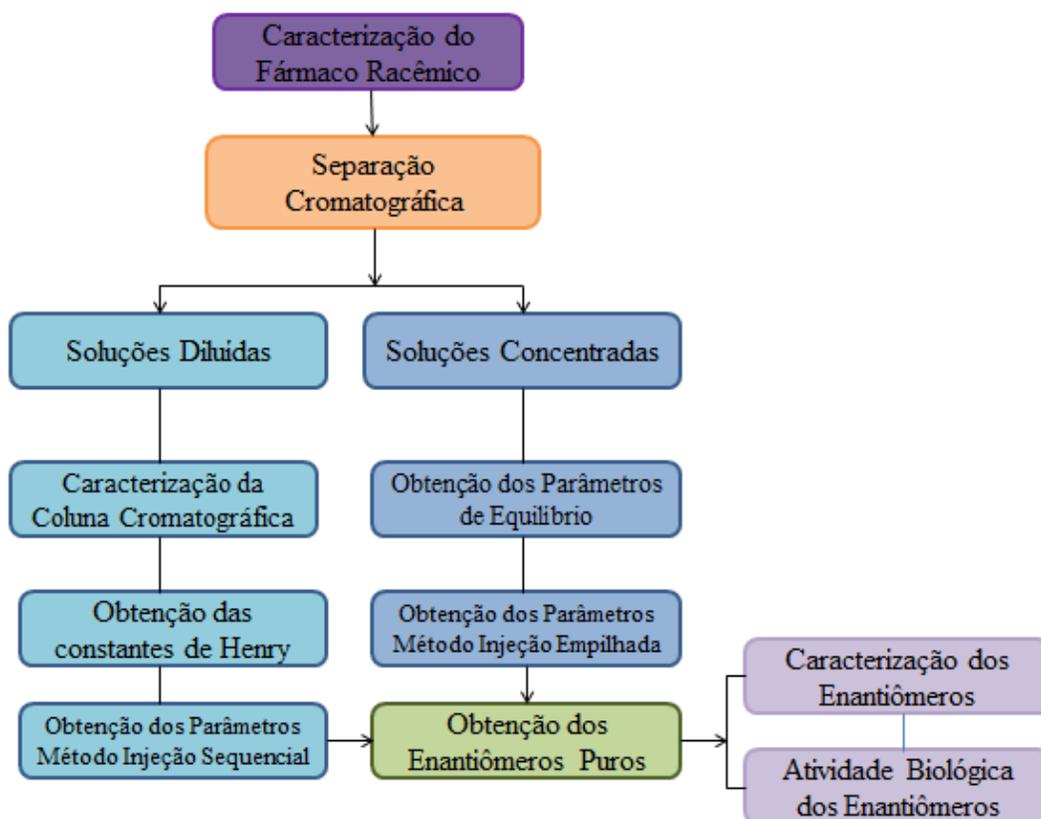
### 3.1.7.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

As análises de dicroísmo circular foram efetuadas num espectropolarímetro Jasco-720, equipamento do Laboratório de Espectroscopia do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Nos experimentos utilizou-se temperatura controlada de 20°C e intervalo de comprimento de onda de 220 a 350 nm. As amostras foram medidas numa cubeta de quartzo de 1 mm de espessura, com uma velocidade de 20 nm min<sup>-1</sup> e caminho óptico de 0,5 mm.

### 3.2 MÉTODOS

A Figura 3.3 mostra o fluxograma esquemático da sequência de experimentos realizados. Os experimentos foram divididos nas seguintes etapas: análises com soluções diluídas, análises com soluções concentradas, caracterização morfológica e térmica dos enantiômeros e do fármaco racêmico e análise da atividade biológica dos enantiômeros e do fármaco racêmico. As análises com soluções diluídas forneceram os parâmetros necessários para as análises com soluções concentradas. A partir dos parâmetros obtidos com soluções concentradas foi possível adaptar o Método das Injeções Empilhadas para a obtenção dos enantiômeros puros.

**Figura 3.3** – Fluxograma dos experimentos realizados



Fonte: Elaborado pela autora

### 3.2.1 Desenvolvimento da separação cromatográfica

O estudo da separação cromatográfica do secnidazol racêmico foi realizado com injeções da solução de secnidazol racêmico a  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  na fase móvel. A fase móvel utilizada foi uma proporção de 60% de isopropanol e 40% de acetonitrila. Volumes de 20  $\mu\text{L}$  foram injetados no sistema CLAE com coluna semipreparativa Chiralpak AD<sup>®</sup> de 100 x 10 mm, sob condições isocráticas, à vazão de fase móvel de 1,0; 1,5; 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, e 5,0  $\text{mL min}^{-1}$  na temperatura de 25°C. É necessária a utilização de diferentes vazões para a obtenção dos parâmetros cromatográficos. As respostas das injeções foram monitoradas no detector de UV a 280 nm e os experimentos foram conduzidos em triplicata. A fase móvel, a fase estacionária bem como os parâmetros de vazão e temperatura foram selecionados a partir dos estudos realizados por Nascimento (2012).

Com os valores de tempos de retenção obtidos para os enantiômeros, foi possível determinar os parâmetros cromatográficos de fator de retenção ( $k_i$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), resolução ( $R_s$ ) e número de pratos teóricos ( $N$ ) que foram determinados a partir das Equações 2.6 a 2.9, respectivamente. O TTBB, como não interage com a fase estacionária, foi utilizado para a obtenção dos tempos de retenção  $t_M$ , indispensável para cálculos dos parâmetros cromatográficos, nas diferentes vazões estudadas.

$$k_i = \frac{t_{r,i} - t_M}{t_M} \quad (2.6)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2.7)$$

$$R_s = 1,177 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (2.8)$$

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (2.9)$$

### 3.2.1.1 Ordem de eluição dos constituintes da mistura racêmica

A ordem de eluição dos enantiômeros foi definida por meio da injeção de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de secnidazol na forma racêmica em concentrações de 0,15  $\text{mg mL}^{-1}$ , vazão de eluição 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  de fase móvel composta por isopropanol/acetonitrila (60/40%, v/v) e temperatura de 25°C. A ordem de eluição foi avaliada por meio de um sistema de detecção baseado em dicroísmo circular (CD) e UV-Vis, com o comprimento de onda previamente ajustado em 365 nm. Na aplicação do dicroísmo circular, cada enantiômero fornece uma resposta característica, sendo esta com sinal positivo ou negativo.

## 3.2.2 Experimentos com soluções diluídas

### 3.2.2.1 Caracterização da coluna cromatográfica

A caracterização da coluna cromatográfica foi obtida por meio da realização de experimentos de injeções no sistema cromatográfico do composto 1,3,5-tri-terc-butil benzeno (TTBB). Estes experimentos foram realizados com o intuito de verificar a homogeneidade do recheio e determinar a porosidade total da coluna ( $\varepsilon_T$ ). O TTBB é uma molécula relativamente pequena e não é retida pela fase estacionária, sendo capaz, portanto, de se difundir não somente através do leito, mas também nos interstícios das partículas do sólido poroso.

O TTBB preparado em solução contendo 60% de isopropanol e 40% de acetonitrila. Pequenos pulsos cromatográficos (20  $\mu\text{L}$ ) de soluções com concentração de 0,7  $\text{mg mL}^{-1}$  foram injetadas na coluna sob condições isocráticas, após um período de tempo necessário para a estabilização do sistema, a diferentes vazões da fase móvel (1,0; 1,5; 2,0 e 2,5  $\text{mL min}^{-1}$ ). A temperatura do sistema foi mantida constante e igual a 25°C. As respostas dos pulsos foram monitoradas pelo detector UV no comprimento de onda a 280 nm.

A determinação da porosidade total é baseada no método dos momentos. O tempo de retenção do TTBB permitiu a construção das curvas do primeiro momento ( $\mu$ ) por  $L/u$ , cujas inclinações fornecem os valores da porosidade total da coluna, como apresentado pela Equação 2.4.

$$\mu = \frac{L}{u} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p \right] + \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{u} \varepsilon_T + \frac{t_{inj}}{2} \quad (2.4)$$

A porosidade da partícula ( $\varepsilon_p$ ) foi calculada a partir dos valores de massa específica do sólido e do volume total de poros. A massa específica foi determinada por picnometria a gás e o volume total de poros pela técnica de adsorção de nitrogênio a 77 K. A análise de picnometria a gás hélio consiste na obtenção do volume de um sólido pela redução de gás em uma câmara de medida, causada pela presença de um sólido. O gás hélio penetra nas superfícies irregulares e nos poros, o volume obtido e massa determinada permitem o cálculo da densidade real de um sólido.

Por meio da Equação 3.1, que provém das definições das porosidades, estima-se o valor da porosidade do leito ( $\varepsilon$ ).

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1-\varepsilon)\varepsilon_p \quad (3.1)$$

### 3.2.2.2 Determinação das constantes de Henry (constante de adsorção)

Para projetar as condições operacionais do método adaptado de injeções empilhadas, é necessário conhecer os parâmetros das isotermas do sistema. Como uma primeira aproximação, pode medir os parâmetros das isotermas lineares, válidas para sistemas diluídos. Estes parâmetros consistem nas constantes de Henry, que podem ser obtidas pelo método do primeiro momento central (PEDEFERRI et al., 1999): As constantes de adsorção foram determinadas utilizando o secnidazol racêmico e as seguintes vazões utilizadas 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 3,5; 4,0 e 5,0 mL min<sup>-1</sup>, utilizando-se as Equações 2.1 e 2.3. Os cálculos são efetuados levando-se em consideração os dados experimentais dos tempos de retenção dos enantiômeros obtidos na determinação dos parâmetros cromatográficos e os valores das porosidades do leito e da partícula.

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{v} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) (1-\varepsilon_p) He \right] + \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{v} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right] + \frac{t_{inj}}{2} \quad (2.1)$$

em que

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)He \quad (2.3)$$

### 3.2.2.3 Determinação da eficiência e parâmetros de transferência de massa

Os coeficientes de dispersão axial ( $D_L$ ) e os parâmetros de transferência de massa global ( $k_m$ ) são determinados a partir da solução racêmica de secnidazol em diferentes vazões de fase móvel.

Tomando-se dados experimentais obtidos, são calculados o número de pratos teóricos ( $N_p$ ) e os valores de altura equivalente a um prato teórico ( $HETP$ ) através das Equações 2.9 e 2.10, respectivamente. Então, são construídos gráficos de  $HETP$  em função de  $u$  (velocidade superficial) para ambos os enantiômeros e são realizados ajustes dos dados tendo como base a equação de van Deemter (Equação 2.11). A partir dos ajustes, são determinados os valores dos coeficientes  $A$ ,  $B$  e  $C$  da curva de van Deemter, podendo-se, finalmente calcular os valores de  $D_L$  e  $k_m$  recorrendo-se às Equações 2.15 e 2.16, respectivamente. O coeficiente  $B$  da equação de van Deemter é dado pela expressão:

$$B = 2\gamma_1 D_m \quad (3.2)$$

cujos parâmetros ( $\gamma_1$  e  $D_m$ ) já foram definidos anteriormente.

### 3.2.2.4 Obtenção dos parâmetros para a técnica de injeção sequencial

A obtenção dos enantiômeros foi realizada por meio de uma adaptação da técnica de Injeção Sequencial. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência com injeções manuais cujos tempos de coleta e injeção foram obtidos a partir dos parâmetros cromatográficos. Como o próprio nome sugere foram realizadas injeções em sequência visando a maior obtenção de enantiômeros.

Para determinar os tempos em que seriam injetados o racêmico e coletados os enantiômeros foi construído um algoritmo a partir dos dados de vazão, constante de Henry, porosidades (total, leito e partícula), comprimento e diâmetro da coluna. O único parâmetro que precisa ser fixado é o tempo que dura à injeção. Com esses dados é possível prever o comportamento dos enantiômeros durante a interação com a fase estacionária. A Tabela 3.1 apresenta os parâmetros utilizados para a determinação dos tempos de injeção e de coleta.

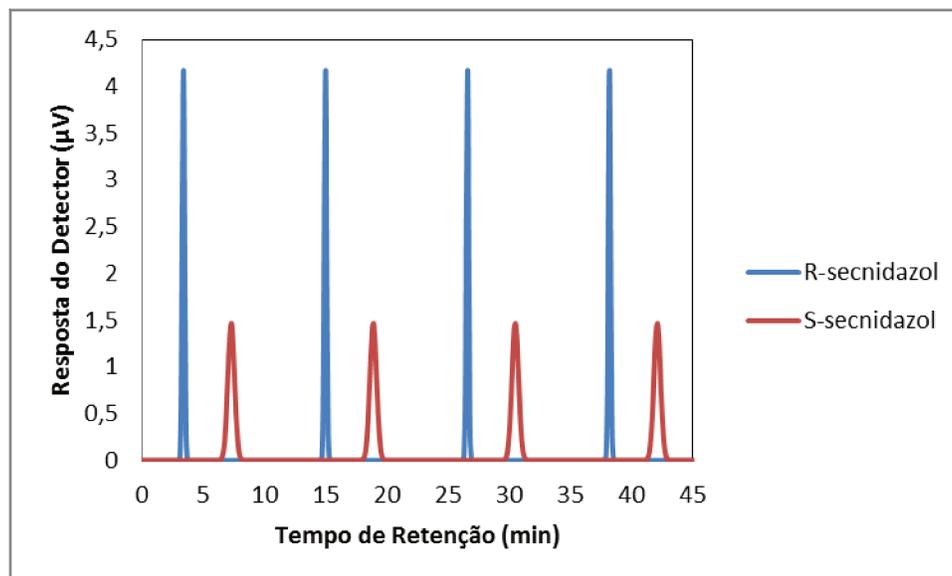
**Tabela 3.1** – Parâmetros utilizados para obtenção dos tempos de injeção e coleta

	<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
<i>Q</i>	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0
<i>He</i>	Constante de Henry	R= 0,768 e S= 4,484
<i>ε<sub>T</sub></i>	Porosidade total	0,706
<i>ε</i>	Porosidade do leito	0,435
<i>ε<sub>p</sub></i>	Porosidade da partícula	0,479
<i>L</i>	Comprimento da coluna (cm)	10
<i>D</i>	Diâmetro da coluna (cm)	1
<i>t</i>	Tempo de operação (s)	15

Fonte: Valores calculados pela autora

Com os tempos de injeção obtidos foi possível simular o perfil cromatográfico do secnidazol por meio da injeção sequencial (Figura 3.4).

**Figura 3.4** – Perfil cromatográfico esperado para a obtenção dos enantiômeros do secnidazol



Fonte: Elaborado pela autora

Os dados simulados sugerem uma separação eficiente sem contaminação dos enantiômeros. Isso pode ser visto através da distância entre os sinais cromatográficos.

### 3.2.3 Experimentos com soluções concentradas

#### 3.2.3.1 Determinação das isotermas de equilíbrio pelo método de análise frontal

As isotermas de equilíbrio dos enantiômeros do secnidazol foram determinadas a partir das curvas de ruptura obtidas com soluções da mistura racêmica de concentrações iguais a 0,02; 0,05; 0,10; 0,15 e 0,20 mg mL<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas utilizadas nos experimentos, como o comprimento de onda, temperatura e vazão da fase móvel, foram 398 nm, 25°C e 2,0 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. A princípio, a coluna foi equilibrada com a fase móvel sendo alimentada por uma das bombas do sistema de CLAE e o estado de equilíbrio foi observado quando a resposta do sistema de detecção se manteve invariável. Neste momento foi programada uma repentina troca na alimentação do sistema, de forma que, a segunda bomba veio a substituir a alimentação da fase móvel pela solução de concentração conhecida de secnidazol. Um volume contínuo foi alimentado até a saturação da coluna,

situação na qual a concentração na saída era a mesma da alimentação (etapa de adsorção). Houve então mudança para a bomba inicial de alimentação de fase móvel e assim se manteve o experimento até a completa remoção do secnidazol da coluna (etapa de dessorção). Este procedimento foi seguido para as diferentes concentrações e a análise da resposta do sistema de detecção possibilitou o cálculo dos pontos da isoterma competitiva. Curvas analíticas possibilitam a determinação das concentrações a partir da resposta do detector. Os dados experimentais de equilíbrio foram obtidos da frente de adsorção de cada curva de ruptura de acordo com a Equação 3.3.

$$q_i = \frac{(V_{1+2} - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_{1+2} - V_1)(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_{ads}} \quad (3.3)$$

### 3.2.3.2 Obtenção dos parâmetros para o método adaptado de injeção empilhada

A partir do cromatograma apresentado na Figura 3.5, obteve-se o tempo de ciclo ( $t_{ciclo}$ ) bem como o tempo de coleta ( $t_{co}$ ) dos enantiômeros, o tempo inicial ( $t_i$ ) foi marcado na linha de base antes de começar a surgir o sinal do primeiro enantiômero, já o tempo final ( $t_f$ ) foi marcado após o sinal do segundo enantiômero atingir a linha de base. A diferença entre o tempo final e o tempo inicial é o tempo de ciclo. O tempo de coleta do componente de interesse inicia no tempo inicial e vai até ao tempo em que o sinal da fração coletada aproxima-se da linha de base, evitando-se sempre coletar próximo ao surgimento do sinal do próximo componente para não ocorrer contaminações.

O tempo de ciclo e o tempo de coleta dos componentes da solução de síntese foram calculados pelas Equações 3.3 e 3.4. Para isso, é necessária a obtenção dos parâmetros de transferência de massa e das constantes de equilíbrios.

$$t_c = t_f - t_i \quad (3.3)$$

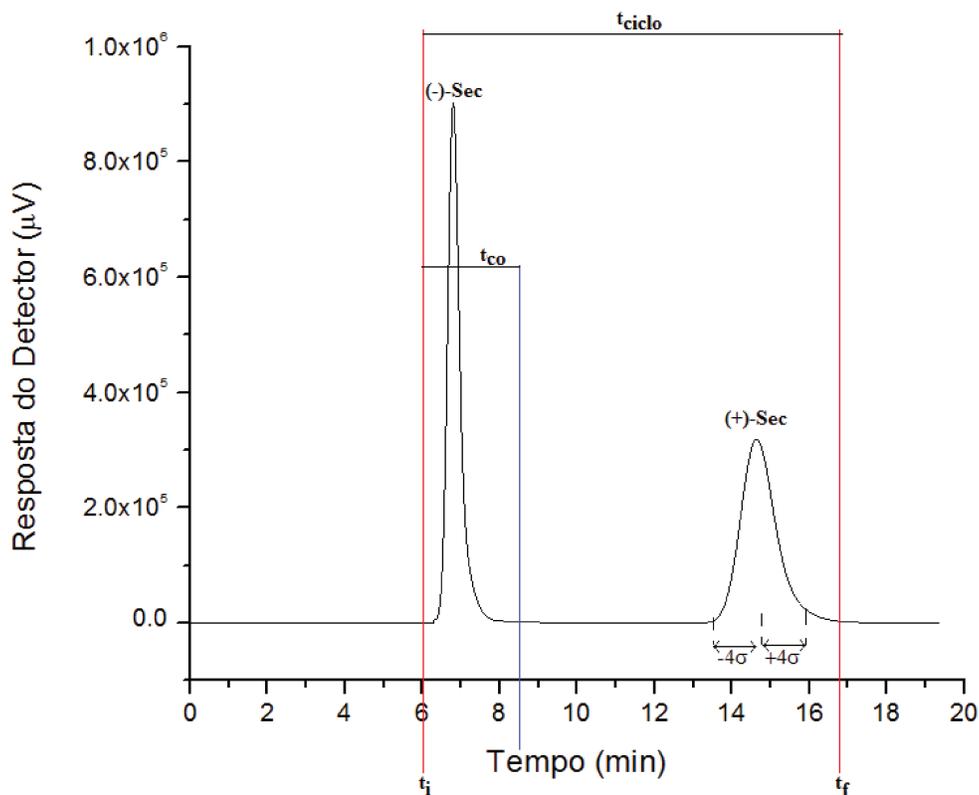
$$t_r - 4\sigma \leq t_{co} \leq t_r + 4\sigma \quad (3.4)$$

em que:

$$t_i = t_{r1} - 4\sigma_1 \quad (3.5)$$

$$t_f = t_{r2} + 4\sigma_1 \quad (3.6)$$

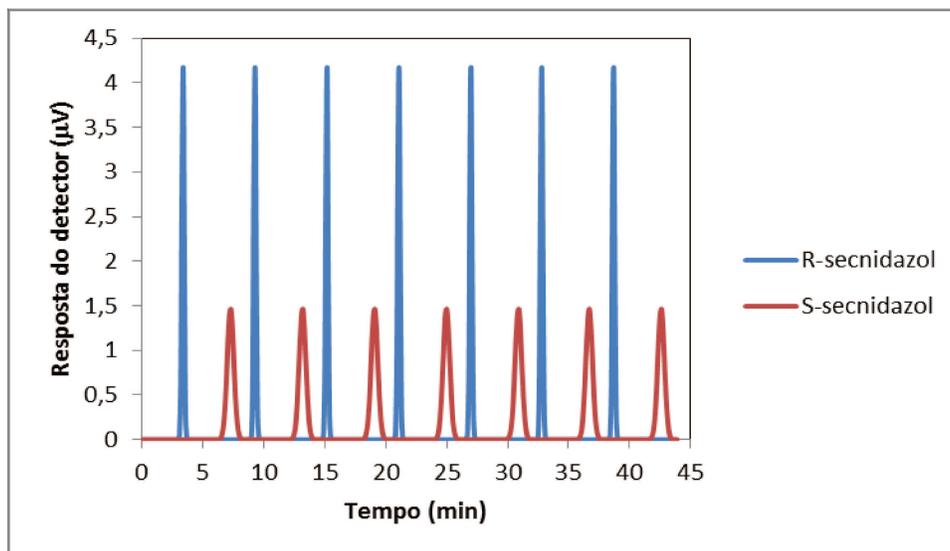
**Figura 3.5** – Obtenção do tempo de ciclo ( $t_c$ ) e do tempo de coleta ( $t_{co}$ )



Fonte: Elaborada pela autora

Com esses tempos, foi possível estabelecer uma programação dos eventos de injeção empilhada. A concentração total da solução de trabalho empregada nesses experimentos foi de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Esse valor foi utilizado para garantir que as bandas cromatográficas fossem tão parecidas quanto possível a uma curva gaussiana. Nessa abordagem, foram realizados experimentos com 14 injeções empilhadas. Com os tempos de ciclo e de coleta obtidos foi possível simular o perfil cromatográfico do secnidazol por meio da injeção empilhada (Figura 3.6).

**Figura 3.6** – Perfil cromatográfico esperado para a obtenção dos enantiômeros do secnidazol

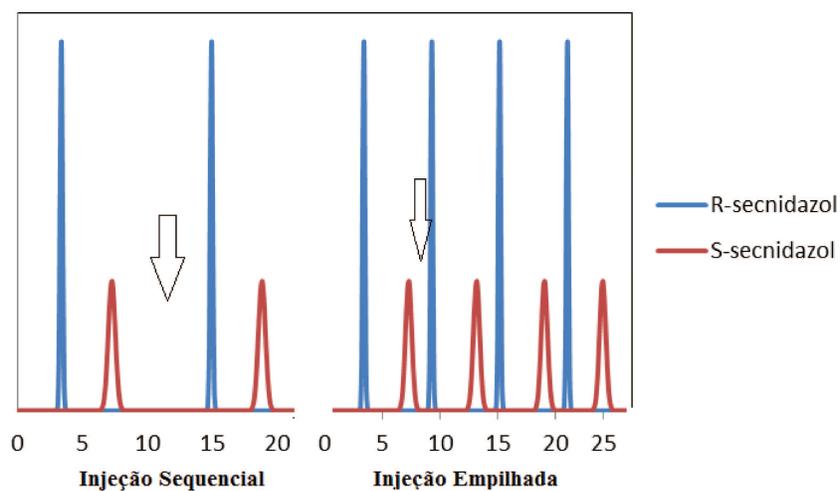


Fonte: Elaborada pela autora

De acordo com os dados simulados é possível identificar a aproximação dos sinais cromatográficos. Isso caracteriza numa possível contaminação dos enantiômeros, comprometendo a pureza a ser alcançada.

Para comparar as técnicas de Injeção Sequencial e Injeção Empilhada foi selecionado o tempo de 20 minutos conforme mostra a Figura 3.7.

**Figura 3.7** – Comparação das técnicas de Injeção Sequencial e Injeção Empilhada



Fonte: Elaborada pela autora

Ao aumentar a concentração ocorre a saturação da fase estacionária, isso explica a eluição de mais pontos na Injeção Empilhada para um mesmo período de tempo. Com a maior eluição há uma aproximação dos sinais cromatográficos o que pode comprometer a pureza dos enantiômeros obtidos.

### **3.2.4 Caracterização dos enantiômeros e do fármaco racêmico**

A caracterização morfológica, estrutural e térmica dos enantiômeros e do fármaco racêmico foi desenvolvida nas instalações do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC, da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

#### **3.2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura**

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilita a interpretação da morfologia das partículas e o Espectrômetro de raios-X por energia dispersiva (EDS), acoplado ao MEV, possibilita o mapeamento de elementos químicos. Para a análise de MEV/EDS foi utilizado o equipamento Leo 440i Modelo EDS: 6070, da LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra). As análises foram realizadas nas seguintes condições experimentais: voltagem de aceleração de 20 kV, corrente do feixe igual a 100 pA, e ampliações da superfície em 250, 500 e 1500 vezes. Previamente, as partículas foram submetidas ao recobrimento com ouro pelo equipamento Sputter Coater EMITECH, modelo K450 (Kent, Reino Unido).

#### **3.2.4.2 Microscopia óptica**

Para obtenção das micrografias foi utilizado um microscópio óptico, modelo DMLM, da Leica (Cambridge, Inglaterra). As amostras dos enantiômeros e do fármaco racêmico foram analisadas com aumento da superfície em 50, 100 e 200 vezes.

#### **3.2.4.3 Difração de raios X**

A DRX é uma técnica versátil e não destrutiva que revela informação detalhada acerca da composição química e da estrutura cristalográfica de compostos naturais ou sintetizados. O método de DRX foi usado para avaliar a estrutura cristalina das partículas

dos enantiômeros e do fármaco racêmico, com o emprego do equipamento da Philips Analytical X Ray, modelo X'Pert-MPD com radiação  $K\alpha$  do cobre  $\lambda=1,54056 \text{ \AA}$  (Almelo, Holanda). A faixa de varredura foi de  $5-40^\circ$ , passo de  $0,2^\circ$ , velocidade de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$ , voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA.

#### **3.2.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier**

A identificação de grupos funcionais e interações moleculares foi feita por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Foi utilizado o equipamento Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700 (Madison, Estados Unidos), no modo transmitância, faixa  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ , resolução  $4 \text{ cm}^{-1}$ , SCAN 32.

#### **3.2.4.5 Termogravimetria**

A análise termogravimétrica é uma técnica que consiste em monitorar a massa de uma substância em função da temperatura. O experimento é realizado com atmosfera controlada e com rampa de aquecimento previamente determinada. De acordo com Oliveira et al. (2011) tal análise pode ser empregada na caracterização de fármacos para a determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação. As análises termogravimétricas (TGA) das amostras foram realizadas em um sistema de analisador termogravimétrico TGA da Mettler-Toledo, modelo TGA/DSC1 (Schwerzenbach, Suíça), na faixa de  $25 \text{ a } 900^\circ\text{C}$ , segundo uma taxa de aquecimento de  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  em atmosfera de nitrogênio com vazão de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### **3.2.4.6 Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**

Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) são técnicas capazes de caracterizar os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra. As curvas de DSC foram obtidas através de um sistema analisador calorimétrico DSC da Mettler-Toledo, modelo DSC1 (Schwerzenbach, Suíça), na faixa de  $25 \text{ a } 300^\circ\text{C}$ , segundo uma taxa de aquecimento de  $20^\circ\text{C min}^{-1}$  em atmosfera de nitrogênio com vazão de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . Já curva de DTA foi realizada em atmosfera de nitrogênio e rampa de aquecimento de  $25-900^\circ\text{C}$  a uma taxa de aquecimento de  $20^\circ\text{C min}^{-1}$ .

### 3.2.5 Atividade biológica

A análise de atividade biológica dos enantiômeros e do fármaco racêmico foi desenvolvida nas instalações do Laboratório Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello.

#### 3.2.5.1 Microrganismos

Para a verificação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de bactérias gram-positiva *Bacillus subtilis* (CCT 0089 / ATCC 6633) e gram-negativa *Escherichia coli* (CCT 1457 / ATCC 9027).

#### 3.2.5.2 Teste de halo de inibição

A avaliação de sensibilidade antimicrobiana do fármaco racêmico e dos enantiômeros contra as cepas de bactérias selecionadas para este estudo foi determinada usando método de difusão em ágar. Placas de petri descartáveis (90 x15 mm) contendo o meio de cultura Muller Hinton (Difco®) foram preparadas, nas quais 0,1 mL dos inóculos de *B. subtilis* e *E. coli* foram espalhados sobre a superfície do meio com o auxílio de alça esterilizada. Poços de 8 mm de diâmetro foram confeccionados no ágar. Três soluções foram testadas em cada placa. As placas foram incubadas por 24 h a 30 e 35°C, para os microrganismos *B. subtilis* e *E. coli*, respectivamente. Para cada amostra e cada microrganismo, foram obtidos três valores (triplicada de resultados) e destes, obtidos a média de resultado para o teste. Geralmente, o agente antimicrobiano difunde-se no ágar e inibe a germinação e o crescimento do microrganismo de teste e, em seguida, os diâmetros das zonas de crescimento de inibição são medidos. O diâmetro do halo de inibição foi mensurado com auxílio de um escalímetro.

#### 3.2.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada por meio da técnica da microdiluição de acordo com a Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico do Nacional Committee for Clinical Laboratory

Standards (WIKLER, 2006). Para tanto foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços, com fundo em forma de “U”.

#### **3.2.5.4 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)**

A CBM foi definida como a menor concentração do fármaco que impediu o crescimento visível do subcultivo, ou seja, que foi capaz de eliminar o microrganismo.

# CAPÍTULO 4

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

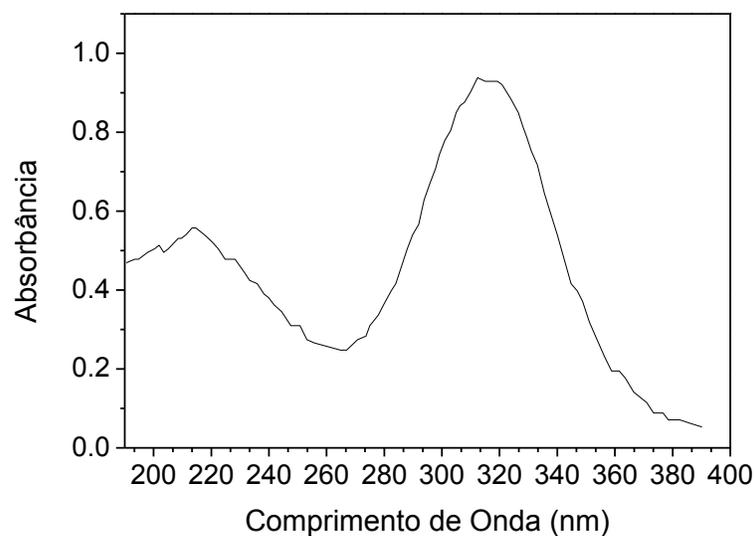
---

### 4.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA A SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

#### 4.1.1 Determinação do espectro de absorção do secnidazol

O desenvolvimento da metodologia de separação foi iniciado com a realização de uma varredura no espectro UV-Vis de uma solução da mistura racêmica de secnidazol, para verificação do comprimento de onda de máxima absorção. O valor de 320 nm foi encontrado como máximo de absorção para o secnidazol (Figura 4.1).

**Figura 4.1** – Espectro de absorção da solução de secnidazol racêmico. (Concentração secnidazol 2,0 mg/L, fase móvel isopropanol:acetonitrila, 60:40% v/v a 25°C)

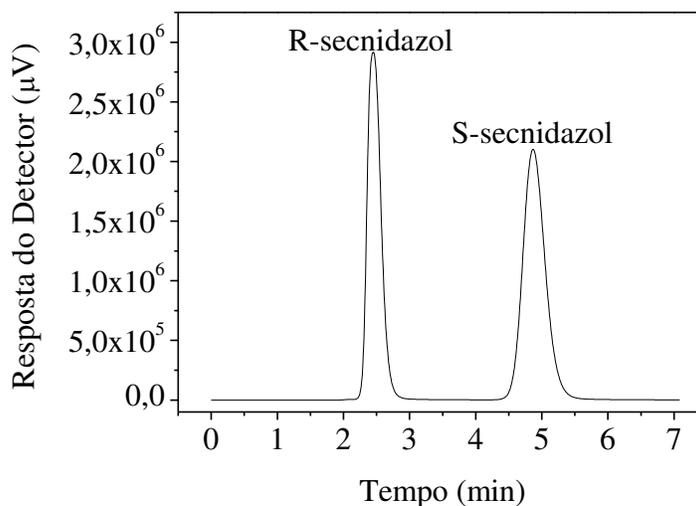


Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados comprimento de onda na faixa de 280 a 370 nm, que é a faixa de identificação do fármaco.

#### 4.1.2 Seleção da fase móvel e da fase estacionária

A fase estacionária quiral tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e a fase móvel composta de 60% de isopropanol e 40% de acetonitrila foram selecionadas com base nos estudos realizados por Nascimento (2012). O cromatograma da separação está ilustrado na Figura 4.2.

**Figura 4.2** – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna analítica Chiralpak<sup>®</sup> AD (150 x 4,6 mm, 10  $\mu$ m).  $C_{\text{mistura}} = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $Q = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^{\circ}\text{C}$ ; Volume injeção =  $20 \mu\text{L}$  e  $\lambda = 320 \text{ nm}$

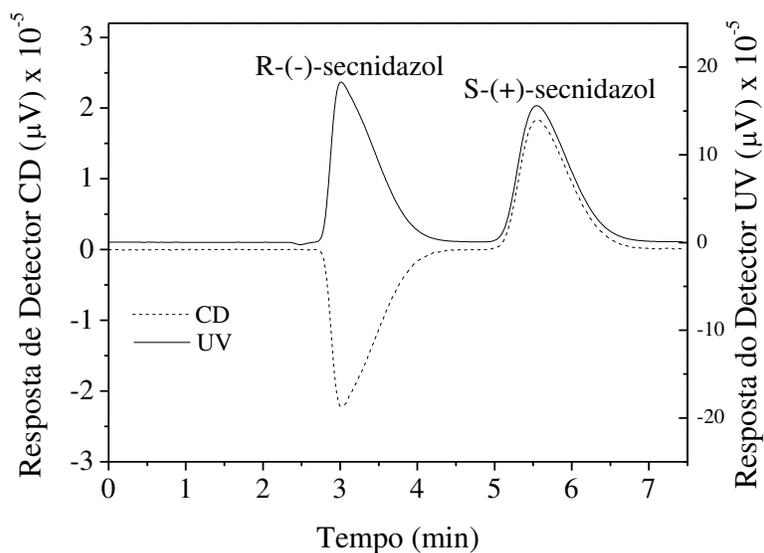


#### 4.1.3 Ordem de eluição

A determinação da ordem de eluição foi realizada num detector de dicroísmo circular (CD) em série com um detector UV-Vis. Foi possível detectar os dois sinais dos picos formados pelo CD e UV-Vis, onde se verificou que o primeiro e o segundo pico correspondem aos enantiômeros (-)-secnidazol e (+)-secnidazol, respectivamente. Essa verificação foi realizada por meio da disposição dos pulsos cromatográficos obtidos. Dessa

forma, de acordo com as análises da configuração absoluta reportadas por Tian et al. (2003) podemos concluir que se tratam do R-(-)-Secnidazol e S-(+)-Secnidazol.

**Figura 4.3-** Perfil de eluição dos enantiômeros do secnidazol em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna analítica Chiralpak<sup>®</sup> AD (150 x 4,6 mm, 10  $\mu$ m).  $C_{\text{mistura}} = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $Q = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; Temperatura = 25°C; Volume injeção = 20  $\mu$ L e Comprimento de onda ( $\lambda$ ) = 365 nm



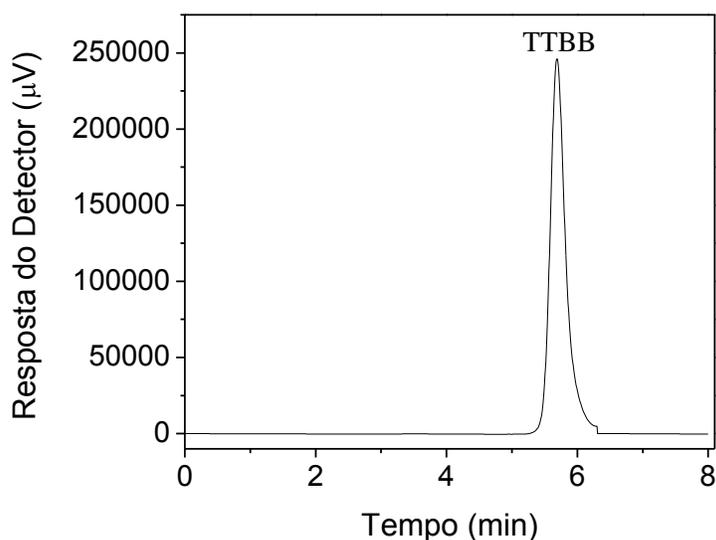
O comprimento de onda foi selecionado para melhor resolução no detector CD, por isso utilizou-se 365 nm. Quando um composto tem cromatograma de absorvância UV semelhante ao CD a divisão forma uma linha plana confirmando que no sinal em questão há somente um isômero e a separação por coluna quiral foi eficiente. Desta forma, podemos concluir que a separação do secnidazol nas condições propostas obteve excelente eficiência haja vista que o cromatograma de absorvância UV é idêntico ao CD.

## 4.2 PARÂMETROS DA SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA - SOLUÇÕES DILUÍDAS

### 4.2.1 Cromatogramas

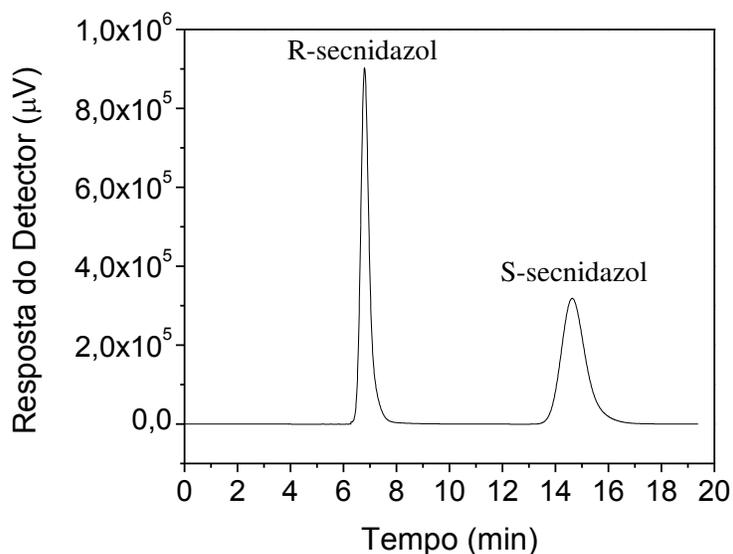
As resoluções do composto não retido TTBB e da mistura racêmica do secnidazol foram determinadas a diferentes vazões de fase móvel. A Figura 4.4 apresenta o perfil de eluição do composto inerte TTBB. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

**Figura 4.4** – Cromatograma do composto inerte TTBB em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD (100 x 10 mm, 20 μm).  $C_{TTBB} = 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $Q = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; Temperatura = 25°C; Volume injeção = 20 μL e  $\lambda = 280 \text{ nm}$



A Figura 4.5 apresenta o perfil de eluição do secnidazol racêmico.

**Figura 4.5** – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD (100 x 10 mm, 20 μm).  $C_{mistura} = 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $Q = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; Temperatura = 25°C; Volume injeção = 20 μL e  $\lambda = 280 \text{ nm}$



O cromatograma apresentado corresponde a uma injeção do fármaco racêmico no cromatógrafo. Essa injeção também pode ser denominada como pulso cromatográfico. A partir dessas injeções, com vazões de fase móvel distintas, são obtidos os parâmetros cromatográficos. O comprimento de onda com máximo de absorção no UV-Vis encontrado para o secnidazol é de 320 nm. Dessa forma os experimentos foram conduzidos em um comprimento de onda menor para evitar que, ao utilizar concentrações maiores do fármaco, houvesse um “estouro” no sinal cromatográfico.

#### 4.2.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos de separação

Os parâmetros cromatográficos foram determinados a partir de injeções de solução do secnidazol racêmico para a faixa de vazão da fase móvel estudadas. Foram determinados os fatores de retenção, fatores de separação, resolução e número de pratos.

A Tabela 4.1 apresenta os valores dos parâmetros cromatográficos para a mistura racêmica do secnidazol a diferentes vazões de fase móvel a  $25^\circ\text{C}$ . Os fatores de retenção e de separação e a resolução foram calculados a partir das Equações 3.1, 3.2 e 3.3, respectivamente.

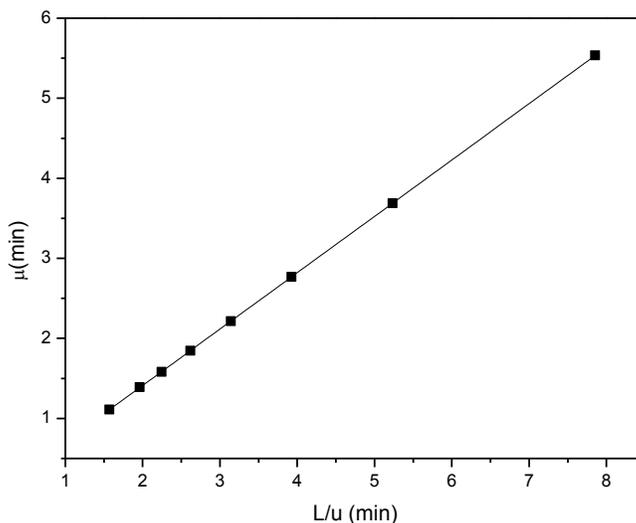
**Tabela 4.1** – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada vazão estudada na temperatura de 25°C

Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	k <sub>R-sec</sub>	k <sub>S-sec</sub>	$\alpha$	R <sub>s</sub>
1,0	0,1995±0,0003	1,6146±0,0003	8,093±0,014	6,994±0,010
1,5	0,2000±0,0003	1,6137±0,0043	8,068±0,016	6,079±0,010
2,0	0,2003±0,0004	1,6138±0,0034	8,058±0,018	5,446±0,010
2,5	0,2004±0,0003	1,6122±0,0020	8,044±0,022	4,968±0,006
3,0	0,2006±0,0001	1,6121±0,0050	8,035±0,027	4,603±0,006
3,5	0,2003±0,0003	1,6104±0,0034	8,040±0,016	4,308±0,005
4,0	0,1993±0,0005	1,6021±0,0032	8,038±0,030	4,057±0,009
5,0	0,1991±0,0007	1,5986±0,0054	8,030±0,030	3,668±0,007

A seletividade ou fator de separação ( $\alpha$ ) apresentou valores em torno de 8,00 o que segundo OKAMOTO e IKAI (2008), retrata uma completa separação dos enantiômeros em colunas quirais baseadas em polissacarídeos, visto que o valor mínimo exigido é de 1,20. Pode-se observar que a resolução (R<sub>s</sub>) diminuiu com o aumento da vazão de fase móvel e apresentou valores entre 6,99 e 3,66. Segundo Collins et al. (2006), quando R<sub>s</sub>=1, as duas bandas são razoavelmente separadas com somente 2% de superposição. Maiores valores de resolução indicam melhor separação: R<sub>s</sub>=1,25 é suficiente para fins quantitativos e R<sub>s</sub>>1,5 indica separação completa.

#### 4.2.3 Determinação da porosidade total, do leito e das partículas

A porosidade total da coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD foi determinada por meio do método dos momentos de acordo com a Equação 3.1. O composto inerte utilizado foi o TTBB. A Figura 4.6 apresenta a relação linear para a determinação da porosidade total.

**Figura 4.6** – Porosidade total da coluna semipreparativa Chiralpak AD (100 x 10 mm)

O coeficiente angular da Figura 4.6 forneceu a valor de 0,704 para a porosidade total. O coeficiente de correlação da reta resultou em 0,9999, esse coeficiente normalmente é elevado na determinação da porosidade total uma vez que não há efeitos da adsorção no tempo de retenção do inerte.

A porosidade da partícula ( $\varepsilon_p$ ) foi calculada a partir dos valores de densidade do sólido e do volume total de poros. A densidade foi determinada pelo método de picnometria a gás e o volume total de poros pela técnica de adsorção de nitrogênio a 77 K.

A Tabela 4.2 apresenta o valor da densidade real obtido na análise por picnometria a gás hélio.

**Tabela 4.2** – Análise por picnometria a gás hélio

<b>Dados</b>	
Número de Corridas	10
Massa de amostra (g)	4,3865
<b>Massa específica da amostra (média) (<math>\text{g (cm}^3\text{)}^{-1}</math>)</b>	<b>1,8541</b>
Desvio padrão da densidade ( $\text{g (cm}^3\text{)}^{-1}$ )	0,0008

A análise de adsorção/dessorção de  $N_2$  para a fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foi realizada pelo método BET e BJH. Os resultados estão ilustrados na Tabela 4.3:

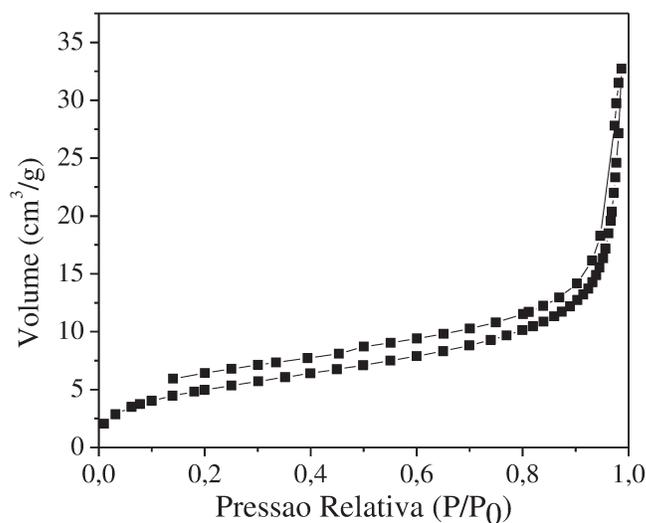
**Tabela 4.3** – Resultados da análise de adsorção/dessorção de  $N_2$ .

$S_{\text{microporos}}$ ( $m^2 g^{-1}$ )	$V_{\text{microporos}}$ ( $cm^3 g^{-1}$ )	$D_{\text{total}}$ ( $\text{Å}$ )
12,9669	0,4623	142,5941

De acordo com a Tabela 2.2, a fase estacionária analisada enquadra-se em materiais de mesoporos. Esta classificação determina o nível de acessibilidade de interpenetração do adsorbato na superfície interna do adsorvente, portanto quanto maior a acessibilidade nos poros da fase estacionária maior também as áreas com sítios ativos.

As isotermas obtidas por meio da análise de adsorção/dessorção de  $N_2$  estão representadas na Figura 4.7.

**Figura 4.7** – Isotermas de adsorção e dessorção de  $N_2$



A isoterma é função do efeito do tamanho do poro sobre o fenômeno de adsorção. De acordo com a classificação, as isotermas ilustradas correlacionam com a isoterma do *Tipo III* (Figura 2.9), cuja característica é a adsorção em multicamadas.

De posse dos dados analisados foi possível calcular a porosidade da partícula de acordo com a equação:

$$\varepsilon_p = \frac{V_p}{V_T} \quad (4.1)$$

O valor calculado da porosidade da partícula ( $\varepsilon_p$ ) foi de 0,479. Por meio da Equação 3.1, que provém das definições das porosidades, estima-se o valor da porosidade do leito ( $\varepsilon$ ).

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (3.1)$$

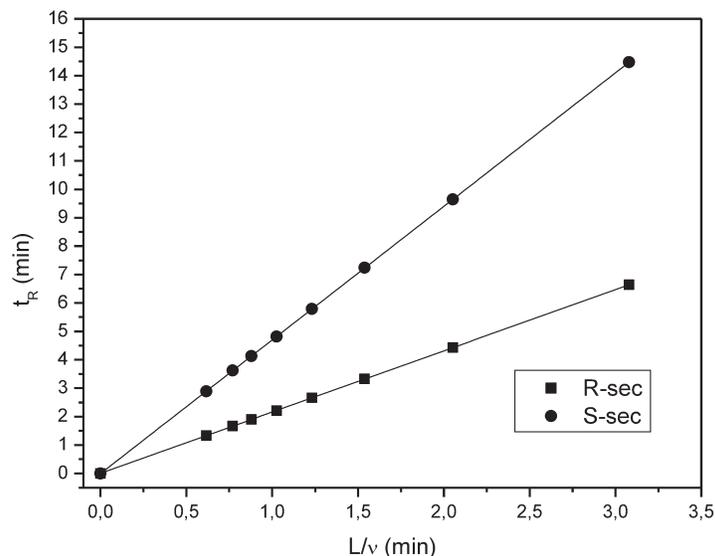
A Tabela 4.4 apresenta os valores das porosidades obtidas:

**Tabela 4.4** – Caracterização da coluna

Porosidade Total ( $\varepsilon_T$ )	0,704
Porosidade da Partícula ( $\varepsilon_p$ )	0,479
Porosidade de Leito ( $\varepsilon$ )	0,432

#### 4.2.4 Determinação das constantes de Henry (constante de adsorção)

As constantes de Henry ( $H_e$ ) para os enantiômeros do secnidazol foram obtidos pelo método do primeiro momento central. Os valores encontrados de acordo com a Figura 4.8 e Tabela 4.5, comprovam que o R-secnidazol possui baixa afinidade pela fase estacionária, uma vez que apresenta valores de  $H_e$  seis vezes menores que o S-secnidazol.

**Figura 4.8** – Obtenção das constantes de Henry para os enantiômeros do secnidazol**Tabela 4.5** – Valores de  $K$ , da constante de Henry e de  $R^2$ 

	<b>R-Sec</b>	<b>S-Sec</b>
<b><i>K</i></b>	0,879	2,815
<b><i>He</i></b>	<b>0,768</b>	<b>4,484</b>
<b><math>R^2</math></b>	0,999	0,999

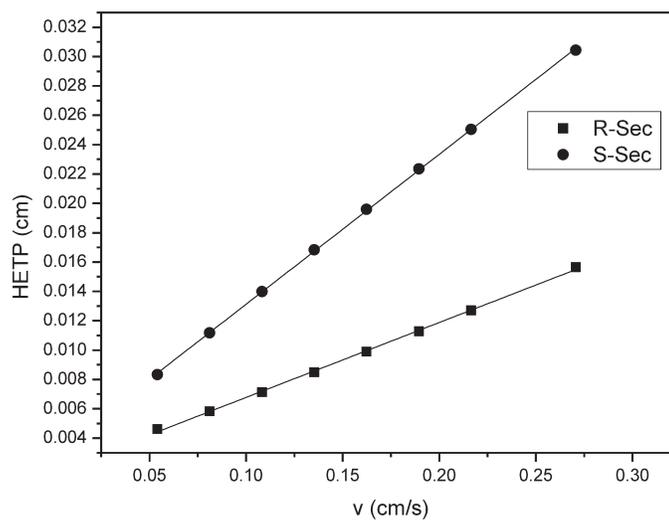
#### 4.2.5 Determinação da eficiência e parâmetros de transferência de massa

A eficiência da separação da coluna cromatográfica pode ser avaliada a partir de uma análise detalhada da *HETP*, que é determinada a partir do número de pratos ( $N$ ). A Tabela 4.6 expõe os valores de  $N$  nas faixas de vazões estudadas. Os valores de  $N$  alcançados revelam alta eficiência de separação da coluna, destacando os valores superiores a 2100 (R-sec) e 1200 (S-sec) para a vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>. Segundo Snyder e Kirkland (2010), geralmente, baixos valores de *HETP* (consequentemente altos valores de  $N$ ) são alcançados em colunas empacotadas com partículas relativamente pequenas sob baixa vazão de fase móvel e altas temperaturas de separação.

**Tabela 4.6** – Número de pratos em diferentes vazões

$Q$ (mL min <sup>-1</sup> )	$N_{R-sec}$	$N_{S-sec}$
1,0	2171	1201
1,5	1716	896
2,0	1403	715
2,5	1179	594
3,0	1011	511
3,5	887	448
4,0	788	399
5,0	639	329

A partir dos valores apresentados na Tabela 4.6, a Equação 2.10 foi utilizada para o cálculo dos valores de *HETP*. A Figura 4.9 mostra a dependência da *HETP* com a velocidade superficial de escoamento da fase móvel ( $v$ ) (gráfico de van Deemter) para os enantiômeros R-(-) e S-(+), respectivamente.

**Figura 4.9** - Curva de van Deemter para os enantiômeros R-(-)-sec e S-(+)-sec a 25°C

Os coeficientes linear e angular das retas apresentadas na Figura 4.9 representam os parâmetros  $A$  e  $C$  da equação de van Deemter (Equação 2.14), respectivamente. Seus valores para os dois enantiômeros, juntamente com os respectivos coeficientes de correlação das retas, estão indicados na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7** – Parâmetros  $A$  e  $C$  da equação de van Deemter para os enantiômeros do secnidazol

R-(-)-secnidazol			S-(+)-secnidazol		
$A \times 10^3$ (cm)	$C \times 10^2$ (min)	$R^2$	$A \times 10^3$ (cm)	$C \times 10^1$ (min)	$R^2$
1,67	5,11	0,99	2,91	1,02	0,99

A partir dos dados dos parâmetros de van Deemter,  $A$  e  $C$ , apresentados na Tabela 4.7 foram calculados os valores dos coeficientes de dispersão axial ( $D_L/v$ ) e de transferência de massa global ( $k_m$ ), por meio das Equações 2.15 e 2.16 que são mostrados na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8** – Valores de  $D_L/v$  e  $k_m$  obtidos a partir da análise dos momentos para os enantiômeros do secnidazol

$D_L/v$ (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )		$k_m$ (s <sup>-1</sup> )	
R-(-)-secnidazol	S-(+)-secnidazol	R-(-)-secnidazol	S-(+)-secnidazol
$1,670 \times 10^{-3}$	$2,910 \times 10^{-3}$	9,741	3,278

Os valores de  $D_L/v$  estimados para os enantiômeros apresentam valores próximos, mostrando que não há distinção entre os mecanismos de dispersão sofridos por cada enantiômeros na direção axial. O valor de  $k_m$  é maior para o R-(-)-secnidazol sugerindo que a resistência à transferência de massa é menor para esse enantiômero.

#### 4.2.6 Obtenção dos enantiômeros por meio da técnica de injeção sequencial

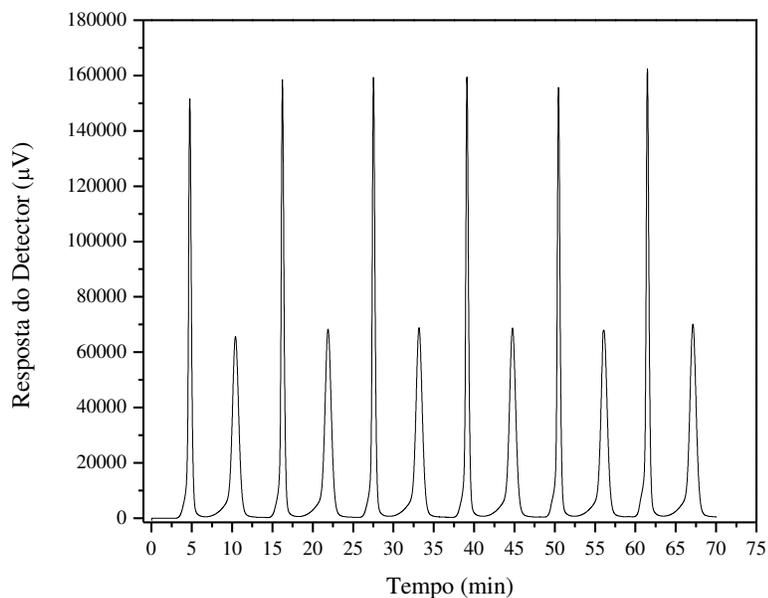
A partir dos parâmetros cromatográficos e com o tempo de operação fixado em 15 segundos, foram obtidos os tempos de injeção do racêmico e coleta dos enantiômeros R e S-secnidazol.

**Tabela 4.9**–Tempos de injeção do racêmico e coleta dos enantiômeros

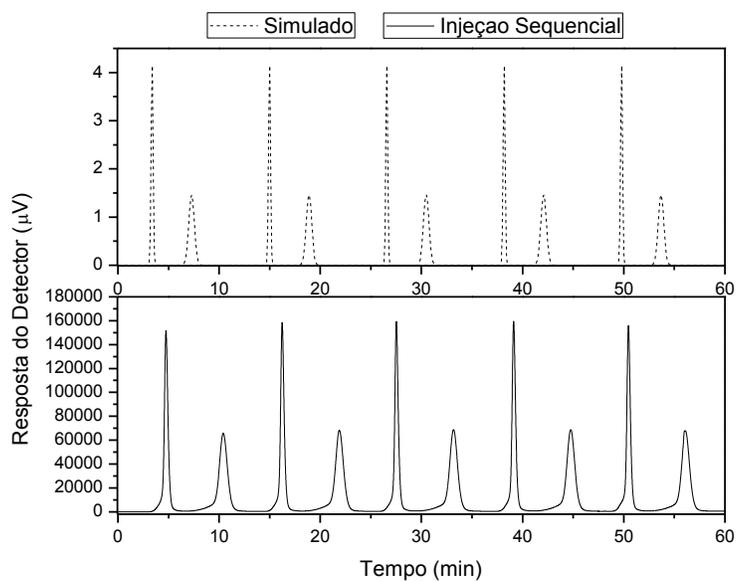
<b>R-Secnidazol</b>		<b>S-Secnidazol</b>	
<b>t<sub>0</sub> (min)</b>	<b>t<sub>f</sub> (min)</b>	<b>t<sub>0</sub> (min)</b>	<b>t<sub>f</sub> (min)</b>
04:00	05:00	08:06	11:18
11:36	16:36	19:42	22:54
23:12	28:18	31:18	34:30
34:48	39:54	42:54	46:12
46:24	51:30	54:36	57:48
58:00	1:03:06	1:06:12	1:09:24
1:09:36	1:14:42	1:17:48	1:21:00

Para obtenção dos enantiômeros foram realizadas dez corridas de 81 minutos com seis injeções sequenciais. A Figura 4.10 apresenta o perfil cromatográfico do secnidazol por meio da injeção empilhada. A Figura 4.11 compara o resultado simulado com o cromatograma obtido.

**Figura 4.10** – Injeção sequencial do secnidazol em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD (100 x 10 mm, 20  $\mu$ m). C= 0,70 mg mL<sup>-1</sup>; Q= 1,5 mL min<sup>-1</sup>; Temperatura= 25°C; Volume injeção = 20  $\mu$ L e  $\lambda$  = 280 nm

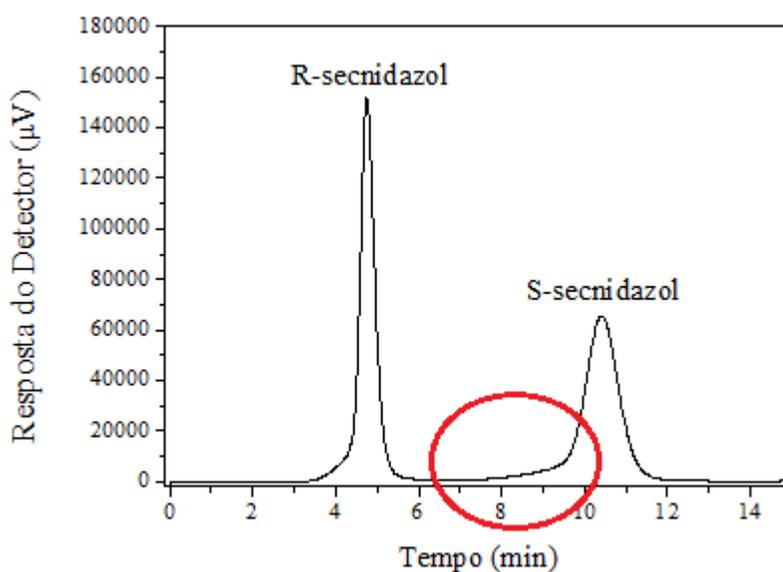


**Figura 4.11** – Comparação entre os dados calculados e a injeção sequencial obtida

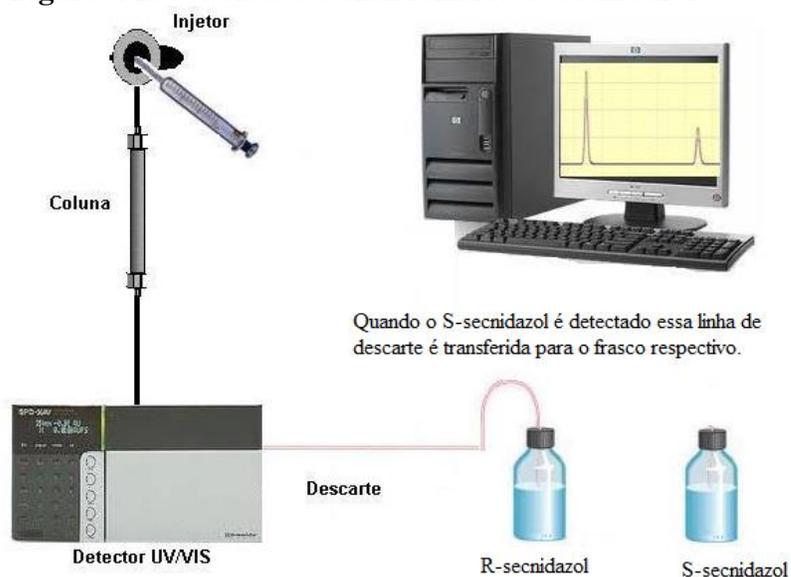


Como esperado, por se tratar de soluções diluídas, a injeção empilhada do secnidazol seguiu o comportamento esperado pelos dados simulados. O R-secnidazol por não ter muita afinidade com a fase estacionária apresenta um comportamento mais próximo com o simulado. É possível observar que o sinal cromatográfico do S-secnidazol apresenta uma pequena dispersão no início da adsorção com a fase estacionária (Figura 4.12). Essa dispersão provavelmente pode comprometer a pureza dos enantiômeros mesmo com a eficiente separação obtida.

**Figura 4.12** – Dispersão no sinal cromatográfico do enantiômero S-secnidazol



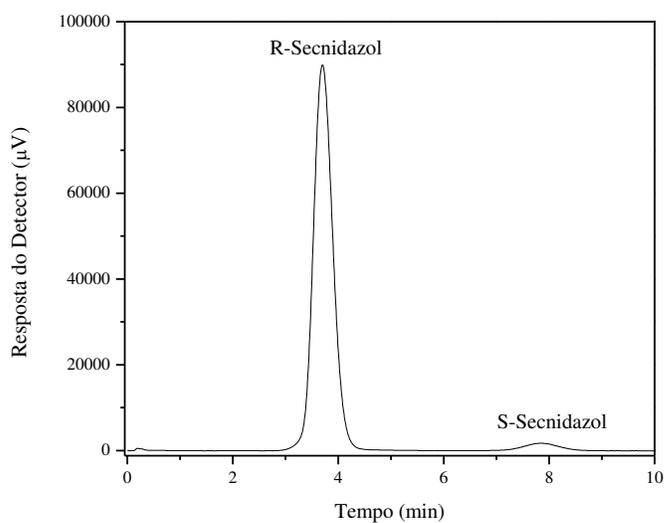
Por se tratar de um método adaptado a obtenção dos enantiômeros é realizada manualmente. Assim que o detector sinaliza a passagem do enantiômeros pelo sistema começa a coleta na linha de descarte (Figura 4.13).

**Figura 4.13** – Coleta dos enantiômeros do secnidazol

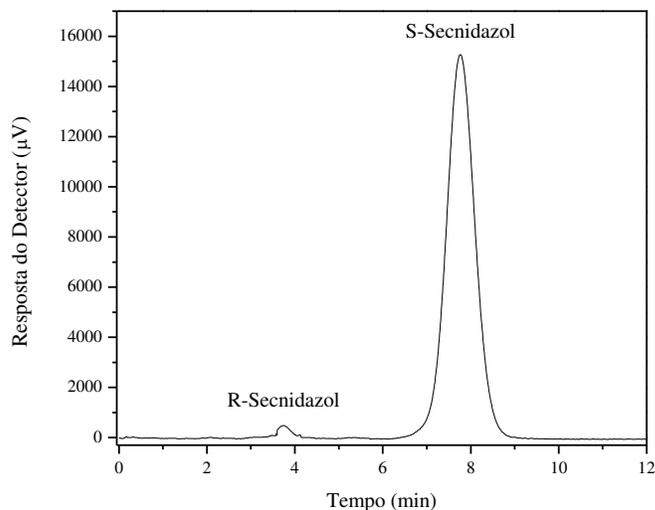
Fonte: Elaborado pela autora

As purzas dos enantiômeros coletados foram avaliadas através da análise cromatográfica, sendo considerada a área do sinal cromatográfico. Foram alcançadas purzas de 99,79% para o R-secnidazol e 99,68% para o S-secnidazol (Figuras 4.14 e 4.15).

**Figura 4.14** – Pureza enantiomérica do R-secnidazol em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD (100 x 10 mm, 20  $\mu$ m). Q= 2,0 mL min<sup>-1</sup>; Temperatura= 25°C; Volume injeção = 600  $\mu$ L e  $\lambda$  = 320 nm



**Figura 4.15** – Pureza enantiomérica do S-secnidazol em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD (100 x 10 mm, 20  $\mu$ m). Q= 2,0 mL min<sup>-1</sup>; Temperatura= 25°C; Volume injeção = 600  $\mu$ L e  $\lambda$  = 320 nm



Por se tratar de soluções muito diluídas, as análises de pureza foram realizadas com volume maior de injeção (600  $\mu$ L) e maior comprimento de onda (320 nm). A injeção sequencial mostrou-se uma técnica bastante eficiente para a obtenção de enantiômeros do secnidazol com elevado grau de pureza. O comportamento do fármaco seguiu o modelo proposto, e como era esperado houve contaminação desprezível dos enantiômeros, que mantiveram pureza acima de 99%. É importante ressaltar que a eficiência da técnica se deve ao fator de separação alcançado na separação. Para fármacos com tempos de retenção muito próximos essa técnica não é recomendada, pois mesmo se tratando de soluções diluídas, haveria grande possibilidade de maior contaminação dos enantiômeros.

Para verificar o impacto dessa contaminação foram determinados os limites de detecção e quantificação, dispostos no Apêndice A.

A Tabela 4.10 apresenta a concentração dos contaminantes bem como os limites de detecção e quantificação dos enantiômeros.

**Tabela 4.10**–Concentração dos contaminantes e limites de detecção e quantificação dos enantiômeros

R-secnidazol			S-secnidazol		
Concentração contaminante	Limite detecção	Limite quantificação	Concentração contaminante	Limite detecção	Limite quantificação
0,00033 mg mL <sup>-1</sup>	0,0088 mg mL <sup>-1</sup>	0,0293 mg mL <sup>-1</sup>	0,00021 mg mL <sup>-1</sup>	0,0113 mg mL <sup>-1</sup>	0,0378 mg mL <sup>-1</sup>

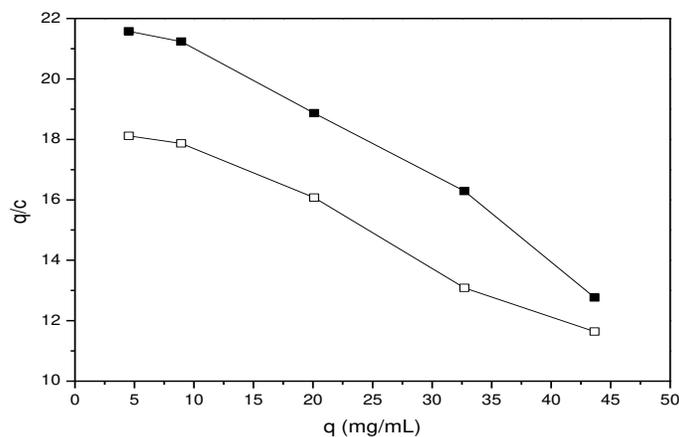
Como demonstrado a concentração dos contaminantes está bem abaixo do limite de detecção, portanto a pureza obtida está dentro do esperado para produtos farmacêuticos, comprovando a eficiência da técnica empregada.

### 4.3 PARÂMETROS DA SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA - SOLUÇÕES CONCENTRADAS

#### 4.3.1 Isotermas de adsorção

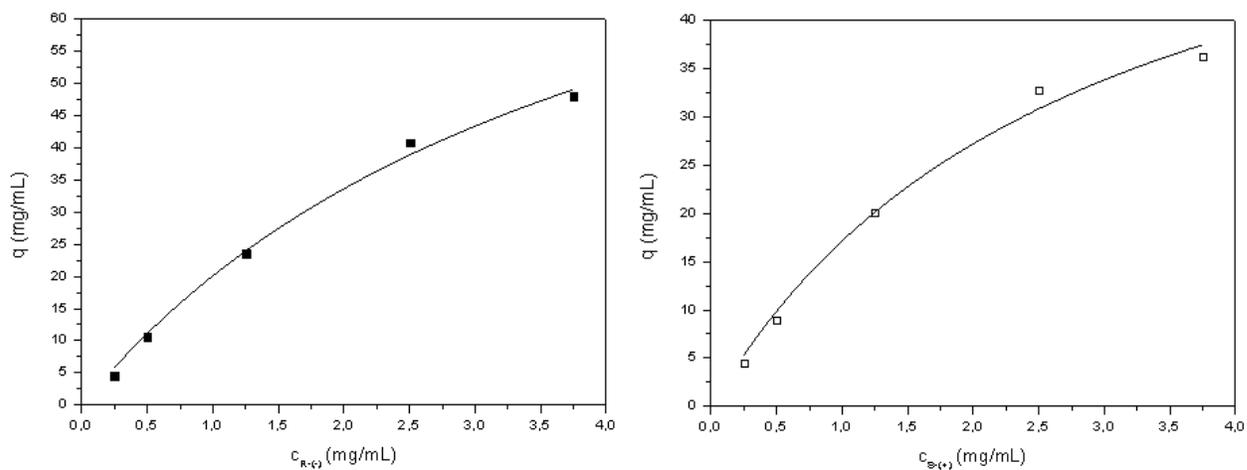
A partir das curvas de isotermas de adsorção, pode-se obter informação a respeito do equilíbrio que se estabelece para os enantiômeros, entre as fases móvel e estacionária, durante a passagem pelo leito recheado. Os experimentos para obtenção das isotermas foram realizados utilizando-se o método da análise frontal, na temperatura de 25°C e vazão de 2,00 mL min<sup>-1</sup> com as concentrações de 0,50; 2,50; 5,00 e 7,50 mg mL<sup>-1</sup>. A Figura 4.16 mostra o gráfico de Scatchard ( $q/c$  versus  $q$ ) dos enantiômeros do secnidazol. Dado a sua linearidade, o modelo de Langmuir foi diretamente correlacionado aos dados experimentais.

**Figura 4.16-** Gráfico de Scatchard dos enantiômeros do secnidazol. FEQ Chiralpak® AD, FM= 60% IPA e 40% ACN, T = 25°C,  $\lambda = 380$  nm e  $Q = 1,00$  mL min<sup>-1</sup>. (■) R-(-) e (□) S-(+)



As isotermas de Langmuir obtidas para os enantiômeros do secnidazol são apresentadas na Figura 4.17.

**Figura 4.17-** Isotermas de adsorção dos enantiômeros do secnidazol obtidas pelo método da análise frontal. FEQ Chiralpak® AD, FM= 60% IPA e 40% ACN, T = 25°C,  $\lambda = 380$  nm e  $Q = 1,00$  mL min<sup>-1</sup>. (■) R-(-) e (□) S-(+)



A concentração de soluto adsorvida na fase estacionária ( $q$ ) em equilíbrio com a concentração de soluto na fase móvel ( $c$ ) foi calculada pela Equação 2.17. Os parâmetros do modelo de Langmuir, constantes de equilíbrio ( $a$  e  $b$ ) e capacidade de saturação da fase estacionária ( $q_s$ ), estão apresentados na Tabela 4.11.

**Tabela 4.11**– Parâmetros do modelo de Langmuir

	$a$	$b$ (mL mg <sup>-1</sup> )	$q_s$ (mg mL <sup>-1</sup> )	$R^2$
R-(-)-secnidazol	24,956±2,340	0,243±0,055	102,659±2,340	0,9933
S-(+)-secnidazol	23,180±2,748	0,353±0,085	65,684±2,748	0,9887

Os resultados obtidos para o valor da capacidade de saturação da FEQ comercial Chiralpak® AD estão de acordo com os dados reportados na literatura (23,60 – 177,90 mg mL<sup>-1</sup>) (MIHLBACHLER et al., 2002).

#### **4.3.2 Obtenção dos enantiômeros por meio do método adaptado de injeção empilhada**

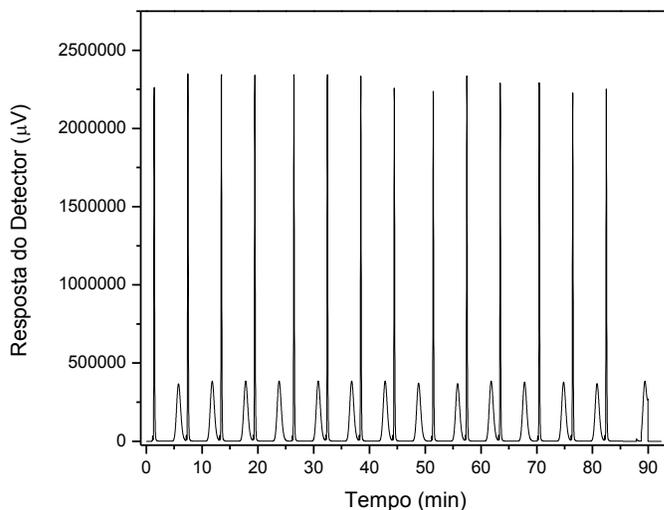
A partir dos parâmetros cromatográficos foram obtidos os tempos de injeção do racêmico e coleta dos enantiômeros R e S-secnidazol.

**Tabela 4.12**–Tempos de injeção do racêmico e coleta dos enantiômeros

<b>R-secnidazol</b>		<b>Injeção</b>	<b>S-secnidazol</b>	
<b>t<sub>0</sub> (min)</b>	<b>t<sub>f</sub> (min)</b>	<b>t (min)</b>	<b>t<sub>0</sub> (min)</b>	<b>t<sub>f</sub> (min)</b>
2:56	4:00	<b>5:56</b>	6:04	8:38
8:49	9:53	<b>11:49</b>	11:56	14:31
14:41	15:46	<b>17:41</b>	17:49	20:23
20:34	21:38	<b>23:34</b>	24:42	26:16
26:27	27:31	<b>29:26</b>	30:35	32:08
32:19	33:24	<b>35:19</b>	36:27	38:01
38:12	39:16	<b>41:12</b>	41:20	43:53
44:06	45:12	<b>47:06</b>	47:12	49:48
50:00	51:00	<b>53:00</b>	53:06	55:42
55:48	56:54	<b>58:08</b>	59:00	61:30
61:42	62:48	<b>64:42</b>	64:48	67:24
67:36	68:42	<b>70:36</b>	70:42	73:18
73:30	74:30	<b>76:30</b>	76:36	79:12
79:18	80:24	<b>82:18</b>	82:30	85:00
85:12	86:18	<b>88:12</b>	88:24	90:54
91:06	92:12	<b>94:06</b>	94:12	96:48

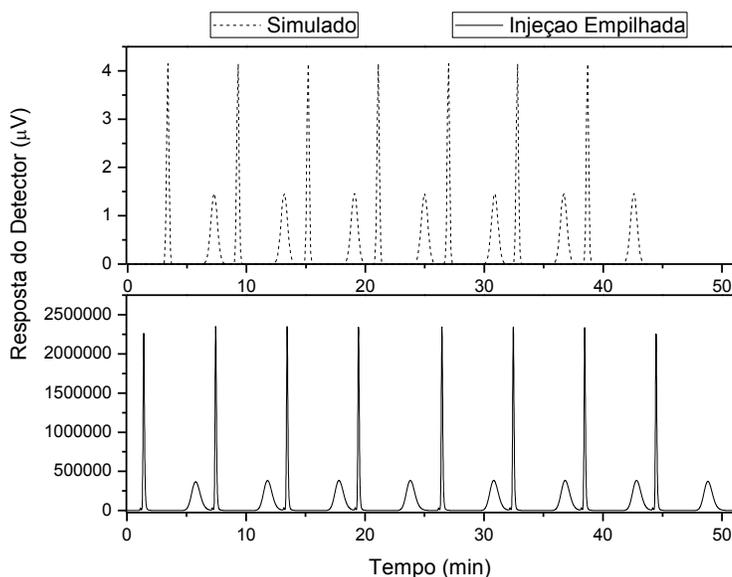
Para obtenção dos enantiômeros foram realizadas 10 corridas de 97 minutos com 14 injeções empilhadas. A Figura 4.18 apresenta o perfil cromatográfico do secnidazol por meio da injeção empilhada.

**Figura 4.18** – Injeção empilhada do secnidazol em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD (100 x 10 mm, 20  $\mu$ m). C= 1,00 mg mL<sup>-1</sup>; Q= 2,0 mL min<sup>-1</sup>; Temperatura= 25°C; Volume injeção = 50  $\mu$ L e  $\lambda$  = 320 nm



A Figura 4.19 compara o resultado simulado com o cromatograma obtido.

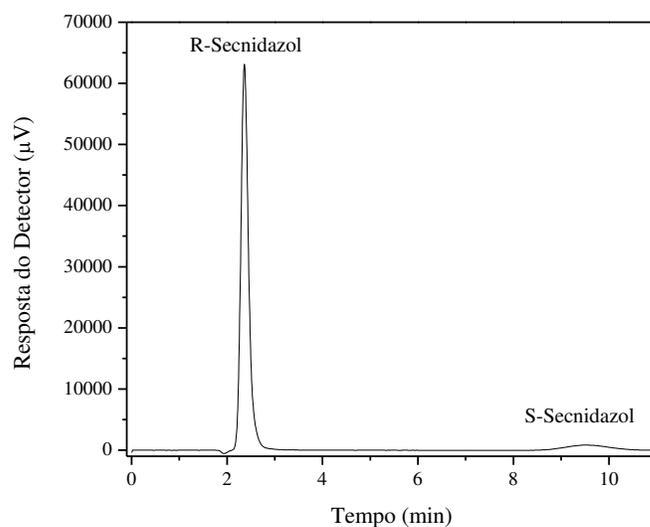
**Figura 4.19** – Comparação entre os dados calculados e a injeção sequencial obtida



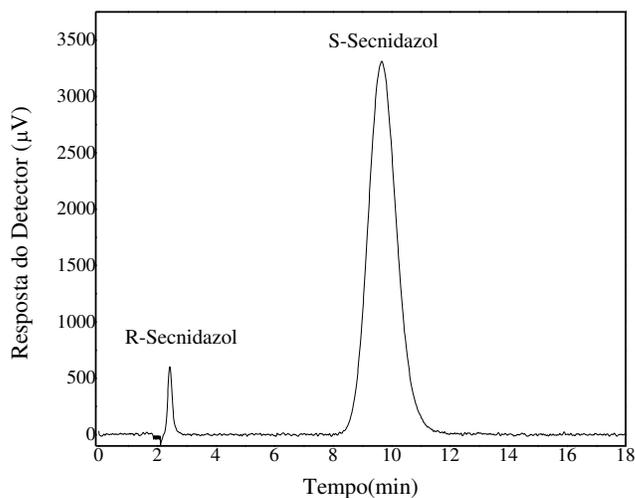
A injeção empilhada também reproduziu o comportamento esperado com os dados simulados. Diferente da injeção sequencial, os sinais cromatográficos dos enantiômeros

ficaram muito próximos, o que com certeza irá comprometer a pureza dos mesmos. Apesar de trabalhar com soluções concentradas os sinais cromatográficos não apresentaram a dispersão ocorrida na injeção sequencial. As purezas dos enantiômeros coletados foram avaliadas, como sendo de, aproximadamente, 96,31% para o R-secnidazol e 85,44% para o S-secnidazol (Figuras 4.20 e 4.21). A pureza obtida é considerada baixa por se tratar de insumos farmacêuticos.

**Figura 4.20** – Pureza enantiomérica do R-Secnidazol em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD (100 x 10 mm, 20  $\mu$ m). Q= 2,0 mL min<sup>-1</sup>; Temperatura= 25°C; Volume injeção = 600  $\mu$ L e  $\lambda$  = 320 nm



**Figura 4.21** – Pureza enantiomérica do S-secnidazol em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila e coluna semipreparativa Chiralpak<sup>®</sup> AD (100 x 10 mm, 20  $\mu$ m). Q= 2,0 mL min<sup>-1</sup>; Temperatura= 25°C; Volume injeção = 600  $\mu$ L e  $\lambda$  = 320 nm



Conforme já havia sido previsto nos modelos simulados, a aproximação dos sinais cromatográficos comprometeu a pureza dos enantiômeros obtidos pela técnica de Injeção Empilhada. Dessa forma, pode-se afirmar que a Injeção Sequencial é a técnica recomendada para a obtenção dos enantiômeros do secnidazol com elevado teor de pureza.

A Tabela 4.13 apresenta a concentração dos contaminantes bem como os limites de detecção e quantificação dos enantiômeros.

**Tabela 4.13**–Concentração dos contaminantes e limites de detecção e quantificação dos enantiômeros

R-secnidazol			S-secnidazol		
Concentração contaminante	Limite detecção	Limite quantificação	Concentração contaminante	Limite detecção	Limite quantificação
0,0030 mg mL <sup>-1</sup>	0,0088 mg mL <sup>-1</sup>	0,0293 mg mL <sup>-1</sup>	0,005 mg mL <sup>-1</sup>	0,0113 mg mL <sup>-1</sup>	0,0378 mg mL <sup>-1</sup>

Apesar da concentração dos contaminantes ser bem maior do que na técnica de Injeção Sequencial, ela ainda está abaixo do limite de detecção.

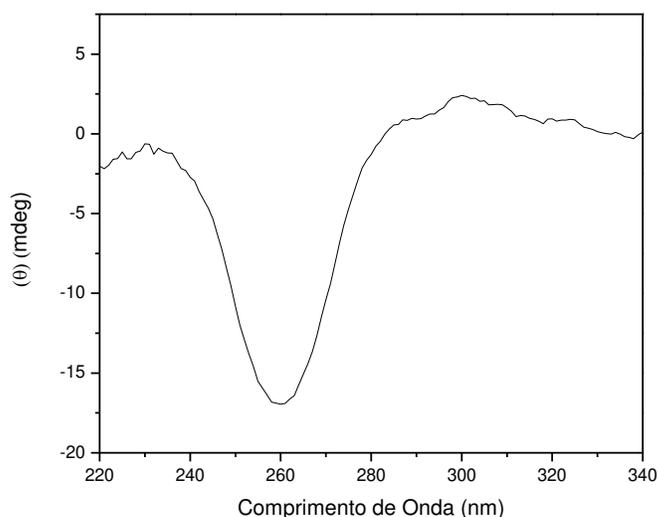
## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS

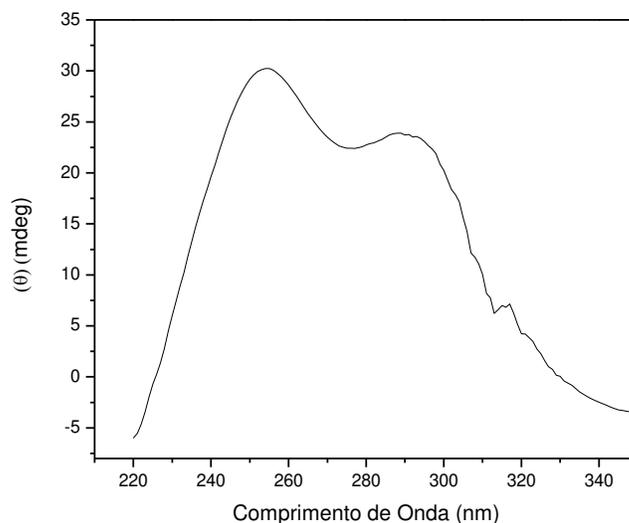
### 4.4.1 Espectroscopia de dicroísmo circular dos enantiômeros

As correntes de R-secnidazol e S-secnidazol foram coletadas durante todos os ciclos das injeções sequencial e empilhada. Todo o volume coletado foi evaporado em um rotaevaporador. Os enantiômeros obtidos foram então diluídos em isopropanol para a determinação da espectroscopia de dicroísmo circular.

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica particularmente útil para o estudo de moléculas quirais, tais como proteínas e carboidratos, que possuem unidades opticamente ativas. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração na luz incidente. O fenômeno do dicroísmo circular consiste da absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por essas moléculas quirais. Os resultados da atividade óptica dos enantiômeros foram colocados em um gráfico em função do comprimento de onda (Figuras 4.22 e 4.23). Os dados obtidos pelos espectrômetros são em termos de elipcidade ( $\theta$ ), expressos em milidegrees (mdeg).

**Figura 4.22-** Análise de dicroísmo circular do R-secnidazol



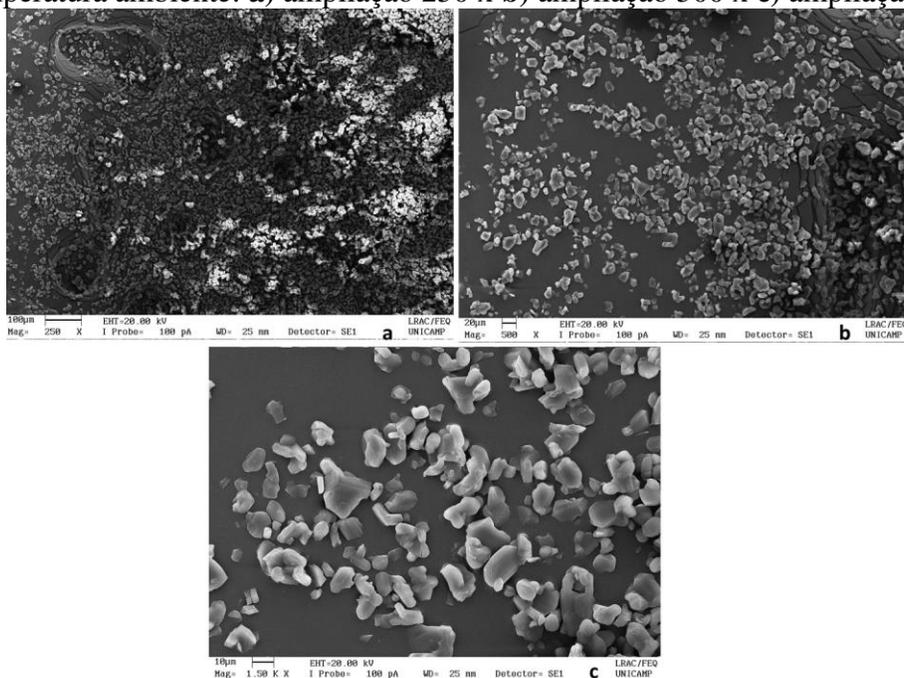
**Figura 4.23-** Análise de dicroísmo circular do S-secnidazol

O CD é a mais sofisticada das técnicas quiróticas, pois realiza medidas de rotação e absorvância simultaneamente. A técnica é baseada na diferença apresentada pelos enantiômeros na absorção de ondas eletromagnéticas circularmente polarizadas. Como ambos enantiômeros apresentam um espectro bem definido podemos afirmar que o R trata-se do (-)-secnidazol e o S do (+)-secnidazol. Por meio dos resultados obtidos podemos afirmar que os produtos obtidos são realmente o par enantiomérico do secnidazol.

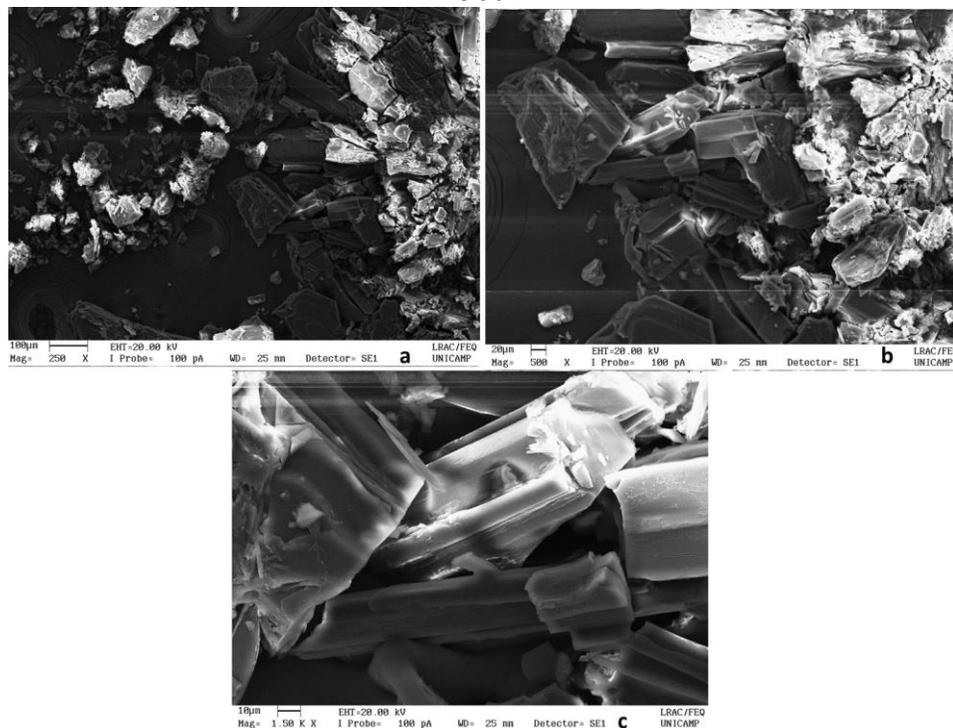
#### 4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra. Dessa forma fornece informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida (DEAVID, 2007). As fotomicrografias do secnidazol racêmico e seus enantiômeros estão ilustradas nas Figuras 4.24, 4.25 e 4.26.

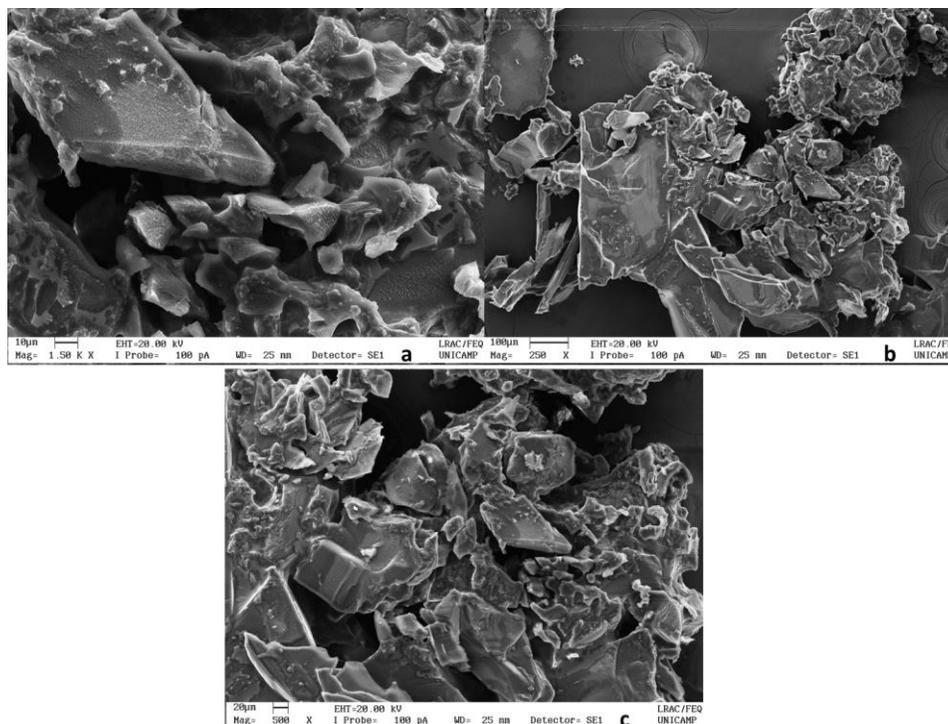
**Figura 4.24-** Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico do secnidazol racêmico em temperatura ambiente: a) ampliação 250 x b) ampliação 500 x c) ampliação 1500x



**Figura 4.25-** Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico do enantiômero R-secnidazol em temperatura ambiente: a) ampliação 250 x b) ampliação 500 x c) ampliação 1500x



**Figura 4.26-** Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico do enantiômero S-secnidazol em temperatura ambiente: **a)** ampliação 250 x **b)** ampliação 500 x **c)** ampliação 1500x

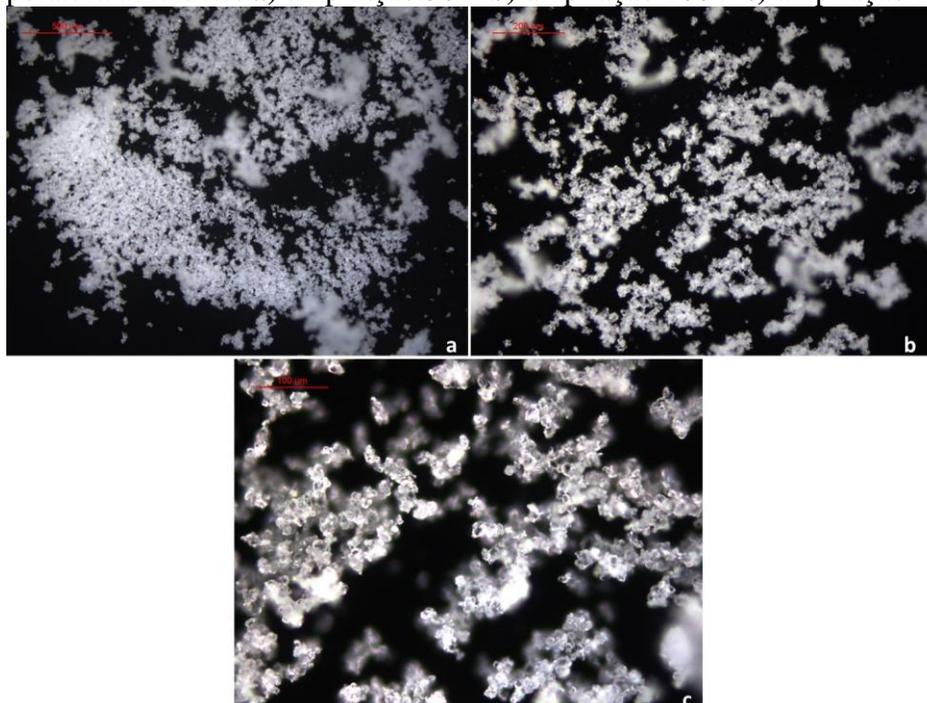


Por meio das fotomicrografias é possível verificar que os enantiômeros apresentam diferenças em suas estruturas morfológicas. Os cristais formados pelo R-secnidazol parecem ser “mais longos” e com forma mais definida que os do S-secnidazol. É reconhecido que a morfologia pode influenciar a atividade biológica dos fármacos, pois afeta os arranjos e conformações de moléculas no estado sólido. Contudo é preciso um estudo mais aprofundado para essa influência o que não está na competência de pesquisa desta Tese.

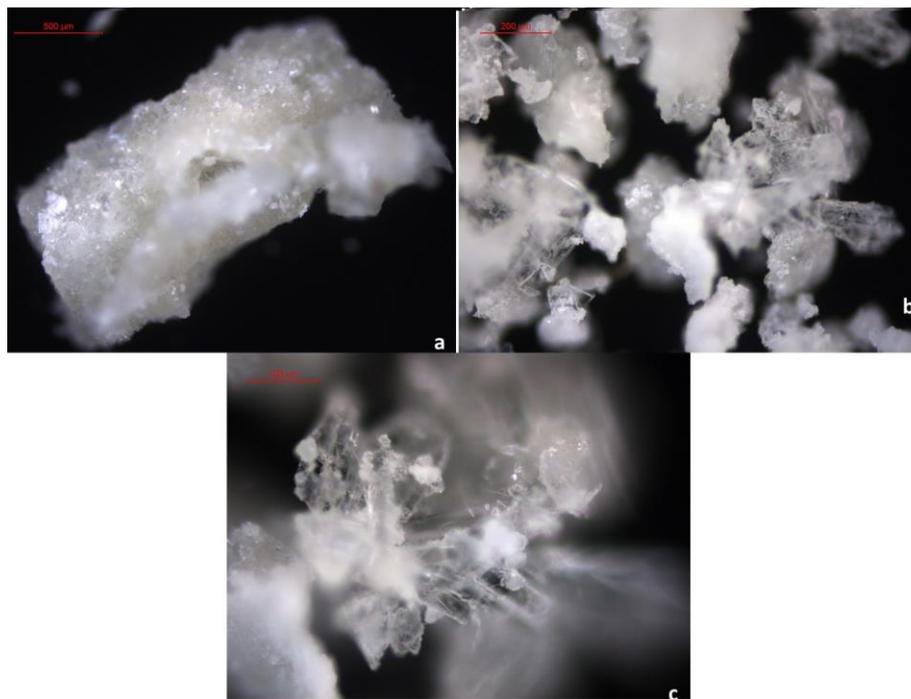
#### 4.4.3 Microscopia óptica

Um microscópio óptico, também conhecido como fotomicroscópio, emprega uma ou uma série de lentes para ampliar imagens de amostras pequenas com luz visível. As fotomicrografias do secnidazol racêmico e seus enantiômeros estão ilustradas nas Figuras 4.27, 4.28 e 4.29.

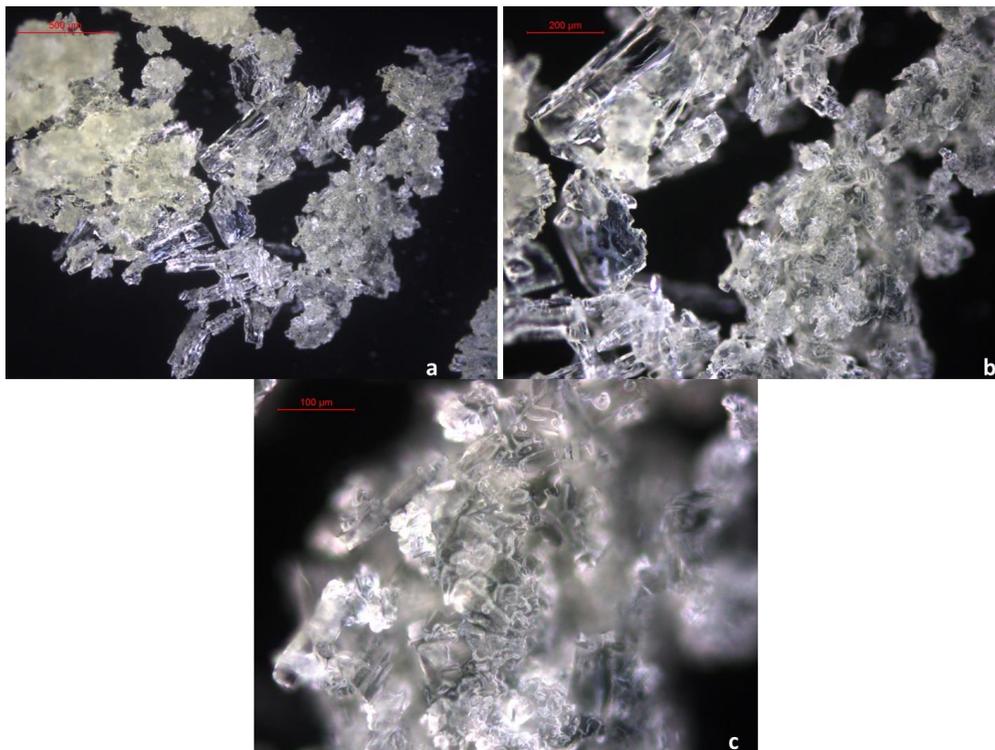
**Figura 4.27-** Fotomicrografias obtidas em microscópio óptico do secnidazol racêmico em temperatura ambiente: **a)** ampliação 50 x **b)** ampliação 100 x **c)** ampliação 200 x



**Figura 4.28-** Fotomicrografias obtidas em microscópio óptico do enantiômero R-secnidazol em temperatura ambiente: **a)** ampliação 50 x **b)** ampliação 100 x **c)** ampliação 200 x



**Figura 4.29-** Fotomicrografias obtidas em microscópio óptico do enantiômero S-secnidazol em temperatura ambiente: **a)** ampliação 50 x **b)** ampliação 100 x **c)** ampliação 200 x

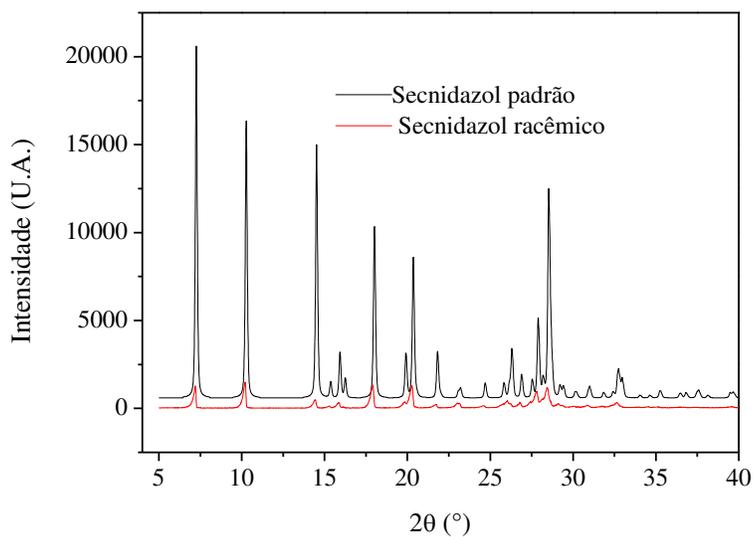


Com as análises de microscopia óptica pode-se confirmar as diferenças morfológicas dos enantiômeros, que já haviam sido vistas nas análises de MEV. Novamente visualizamos cristais maiores e com uma estrutura definida (retangular) para o R-secnidazol.

#### 4.4.4 Difração de raios-X

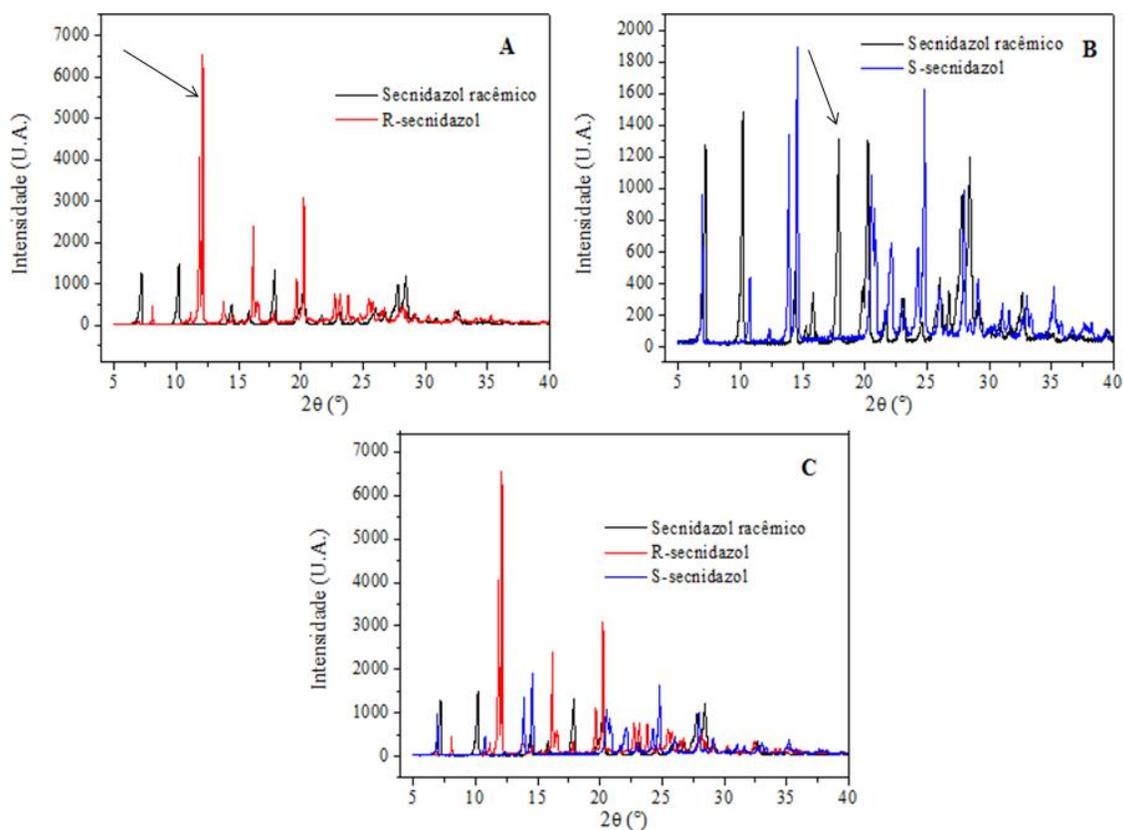
Dentre as várias técnicas de caracterização de substâncias farmacêuticas, a técnica de DRX é a mais indicada na determinação de fases cristalinas presentes em fármacos (BERNARDI et al., 2013). Isto é possível porque na maior parte dos sólidos (cristais), os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios-X (ALBERS et al., 2002). A Figura 4.30 apresenta a comparação do secnidazol racêmico com os dados de secnidazol padrão da biblioteca do equipamento de DRX.

**Figura 4.30-** Espectro de difração de raios-X do secnidazol racêmico comparando com o padrão (biblioteca do equipamento)



É possível afirmar que o fármaco racêmico em análise é o secnidazol, pois apresenta espectro idêntico ao do padrão. A Figura 4.31 apresenta os padrões de difração dos enantiômeros R e S-secnidazol em comparação ao secnidazol racêmico.

**Figura 4.31-** Espectro de difração de raios X dos enantiômeros R e S-secnidazol comparando com o secnidazol racêmico

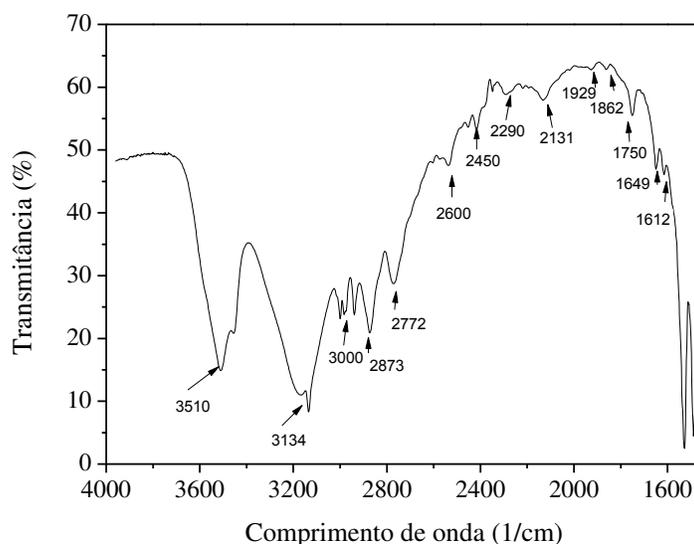


Tanto para o R quanto para o S-secnidazol podem ser identificadas diferenças que os caracterizam como uma nova forma cristalina. Para o R-secnidazol (Figura 4.31 A) observam-se pequenos deslocamentos em várias reflexões, porém a evidência mais relevante da mudança estrutural está no aparecimento da reflexão bem intensa em  $\sim 14,0^\circ$ . Para o S-secnidazol (Figura 4.31 B) além dos pequenos deslocamentos observados em várias reflexões, a evidência mais relevante da mudança estrutural está no desaparecimento da reflexão em  $\sim 17,5^\circ$ . Estes resultados demonstram que após a separação enantiomérica, os enantiômeros se recristalizam numa nova forma, confirmando o caráter polimórfico desse composto. Dessa forma podemos concluir que os espectros de difração apresentados na Figura 4.31 C se referem a três estruturas distintas.

#### 4.4.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é uma das técnicas que permitem obter informações sobre a estrutura molecular e ligações químicas das substâncias. A radiação no infravermelho atravessa a amostra a ser analisada, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrômetro registra o resultado na forma de uma banda de absorção, fornecendo evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam (SILVERSTEIN, 2000). A análise de FT-IR do secnidazol racêmico está apresentado na Figura 4.32.

**Figura 4.32-** Espectro de FT-IR do secnidazol racêmico

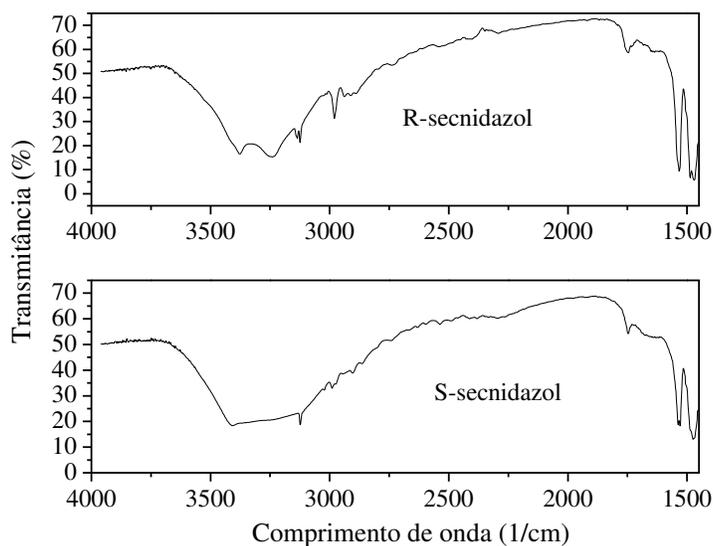


Tendo como referência os dados da literatura em relação à Figura 4.32 pode-se observar que a primeira banda do espectro em 3510 1/cm se trata do estiramento O-H. A banda 2872 é característica do estiramento C-H. A molécula contém um grupo CH<sub>2</sub> conectado ao anel e seu modo de estiramento simétrico é atribuído à banda em 2939 1/cm.

A vibração de estiramento C-H do anel é geralmente forte nos espectros de IR. O número de onda do anel é previsto em 3134 1/cm, a molécula de secnidazol possui somente um grupo NO<sub>2</sub>, onde o estiramento aparece em 1527 1/cm (TANDON et al., 2009).

A Figura 4.33 apresenta os espectros de FT-IR para os enantiômeros R e S-secnidazol.

**Figura 4.33-** Espectro de FT-IR dos enantiômeros R e S-secnidazol



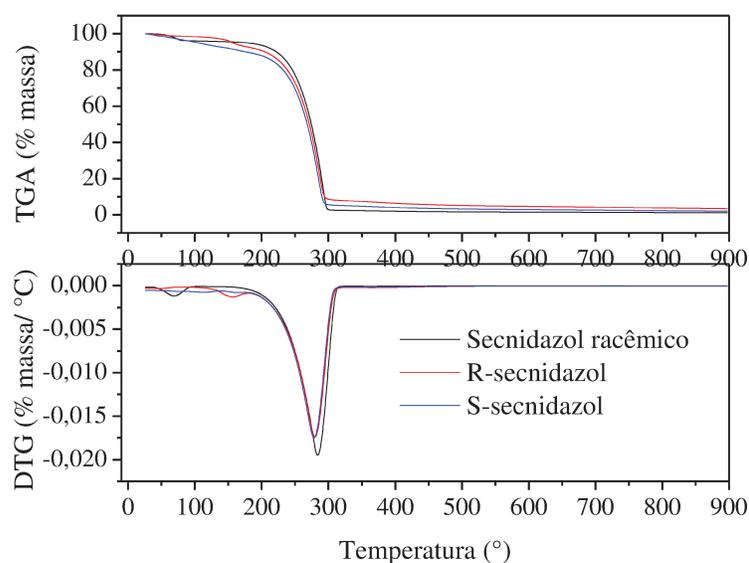
É possível observar que ambos os enantiômeros apresentam estiramentos coincidentes, ou seja, fica claro se tratar do mesmo composto. Portanto a separação enantiomérica não afeta a estrutura dos enantiômeros obtidos.

#### 4.4.6 Termogravimetria

A TG é a técnica em que a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. A primeira derivada da curva TG, a curva DTG, leva às mesmas informações que a TG, porém com um acréscimo na resolução (PINHO, 1999). Enquanto na curva TG observa-se degraus correspondentes às variações de massa em função do tempo e/ou temperatura, na curva DTG os degraus equivalem a picos que

delimitam áreas proporcionais às alterações de massa com aquecimento da amostra. Os resultados da variação da massa ( $\Delta m$ ), a partir da DTG aparecem de uma forma mais visualmente acessível, uma vez que as inflexões sutis da TG são enfatizadas e possibilitam a separação de reações sobrepostas e a determinação com maior exatidão das temperaturas correspondentes ao início e quando os processos de decomposição atingem velocidade máxima (CARVALHO FILHO, 2000). A curva termogravimétrica (TGA) e curva termogravimétrica derivada (DTG) do secnidazol e dos enantiômeros estão representadas na Figura 4.34.

**Figura 4.34-** Curva termogravimétrica (TG) e curva termogravimétrica derivada (DTG) do secnidazol racêmico e seus enantiômeros

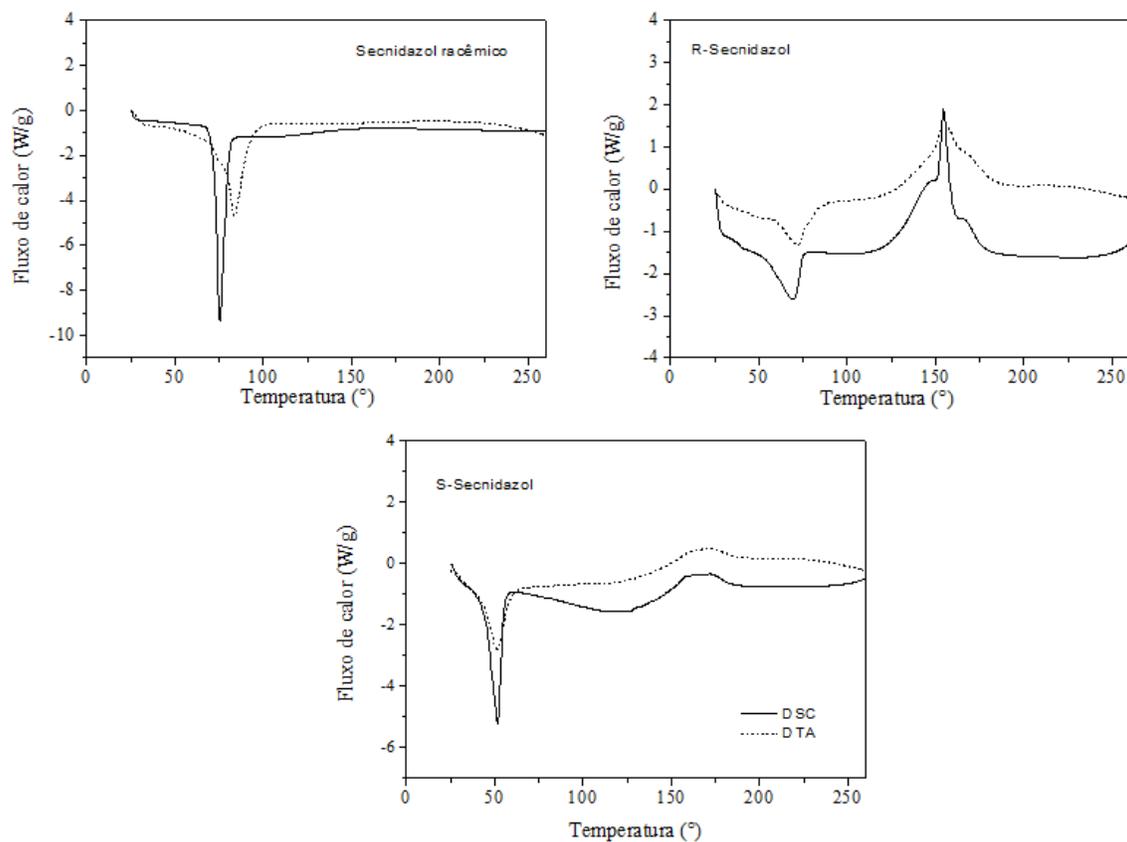


Podemos afirmar que os enantiômeros têm comportamento idêntico ao racêmico. A curva TGA mostra um processo de perda de massa ocorrendo entre 283 e 289°C, correspondendo a um decréscimo de 98%.

#### 4.4.7 Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial

Na Figura 4.35 são apresentados os perfis obtidos da DTA e do DSC para o secnidazol racêmico e seus enantiômeros.

**Figura 4.35-** DTA e DSC do secnidazol racêmico e seus enantiômeros



Observamos que o S-secnidazol apresenta um comportamento semelhante ao secnidazol racêmico. O evento que ocorre é endotérmico e está associado ao ponto de fusão do material. O racêmico e seus enantiômeros apresentaram temperatura de fusão bem próxima. Já o R-secnidazol apresentou um 2<sup>a</sup> evento em 155,18°C. Trata-se de um evento exotérmico com entalpia de decomposição de 172,75 mJ. A Tabela 4.14 apresenta os eventos endotérmicos da Figura 4.35.

**Tabela 4.14**– Eventos endotérmicos de DTA e DSC da Figura 4.35

Análise	Secnidazol racêmico		R-secnidazol				S-secnidazol	
			1º evento		2º evento			
	Temperatura (°C)	$\Delta H$ (mJ)						
<b>DSC</b>	75,42	681,68	68,82	280,16	155,18	172,75	50,21	901,22
<b>DTA</b>	78,69	1612,62	69,04	316,85	152,47	1262,88	49,27	474,19

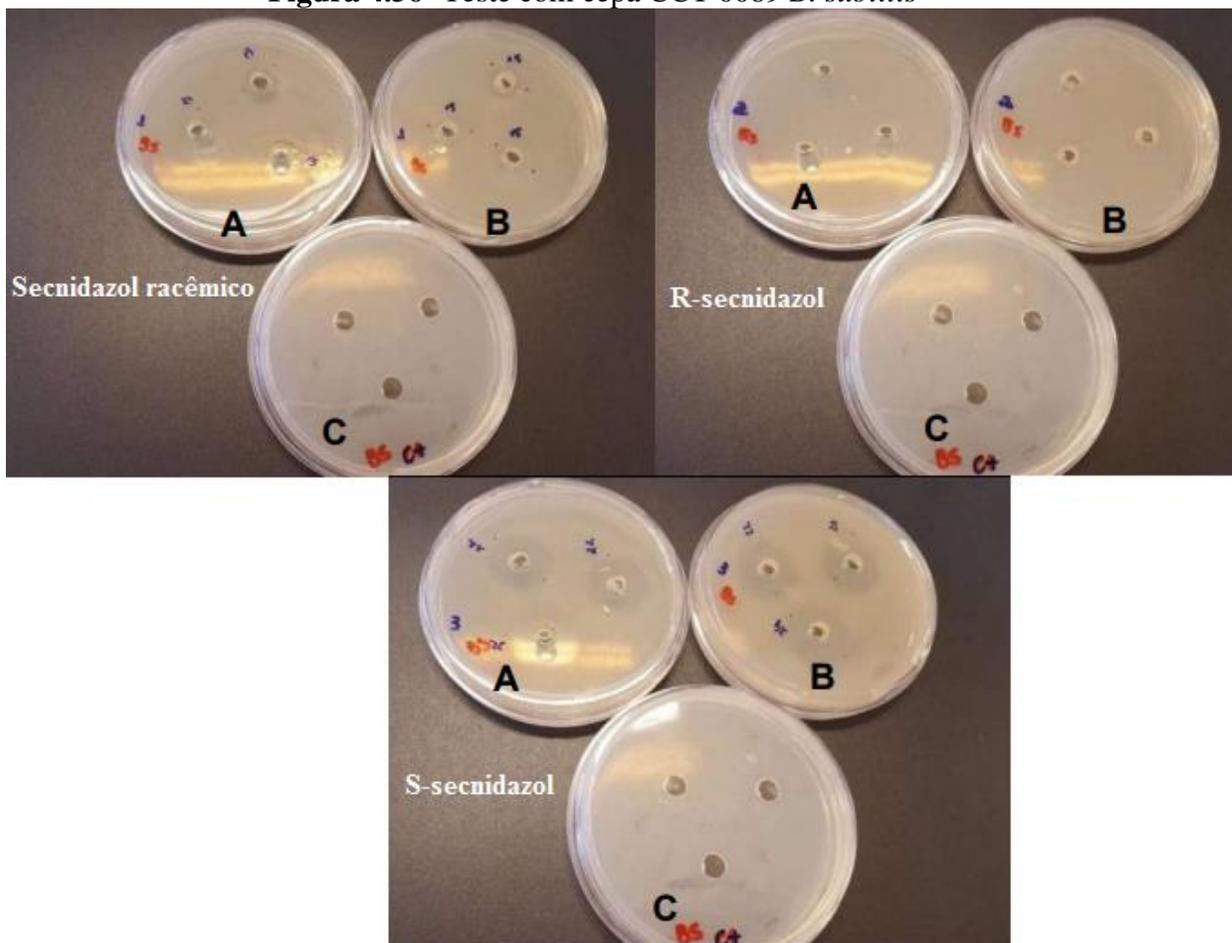
## 4.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.5.1 Teste de halo de inibição

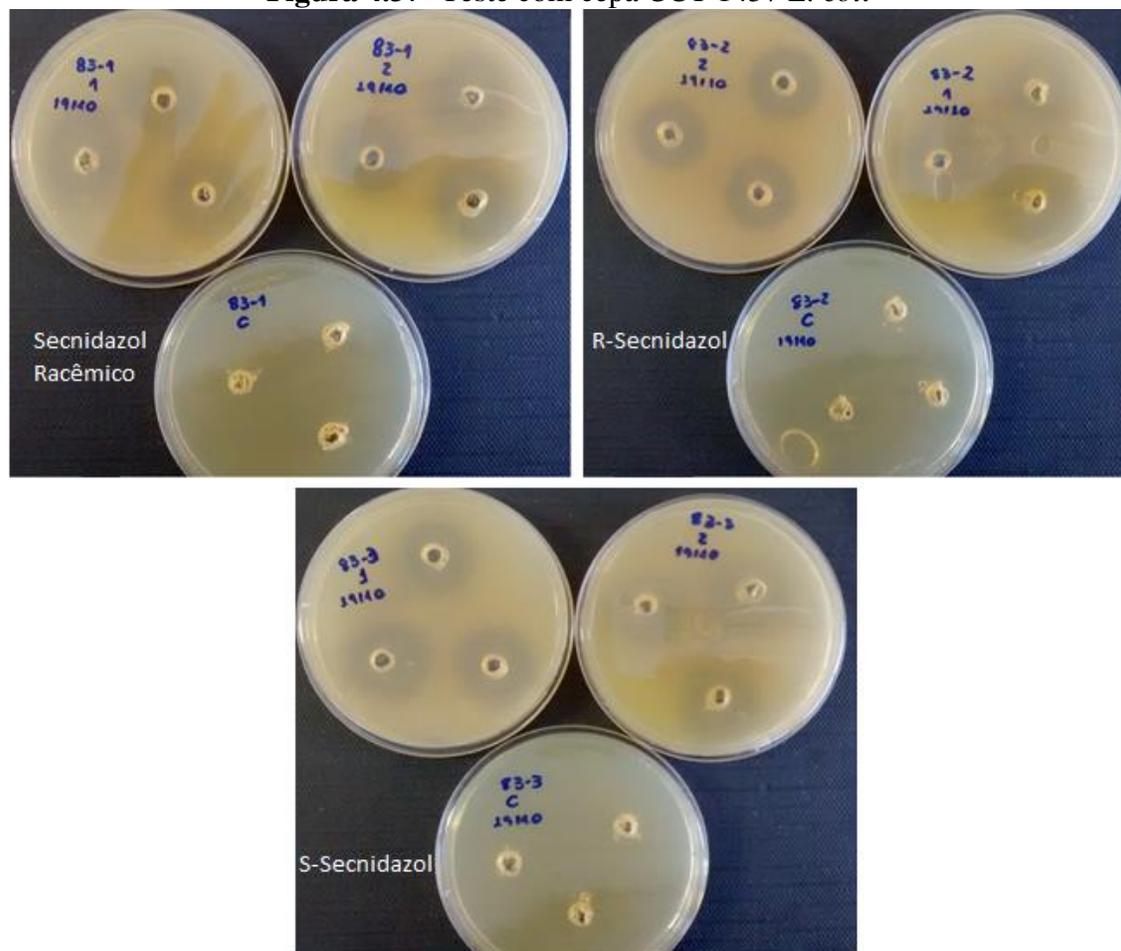
O teste de halo de inibição, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada. A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos.

Placas de ágar foram inoculadas com os microrganismos *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Em seguida, os discos de papel de filtro (cerca de 6 mm de diâmetro), contendo o fármaco racêmico e os enantiômeros foram colocados na superfície do ágar. As placas de Petri foram incubadas em condições adequadas e, em seguida, os diâmetros das zonas de crescimento de inibição foram medidos, conforme demonstrado nas Figuras 4.36 e 4.37. A Tabela 4.15 apresenta os resultados obtidos para os dois microrganismos testados.

Figura 4.36- Teste com cepa CCT 0089 *B. subtilis*



**Figura 4.37-** Teste com cepa CCT 1457 *E. coli*



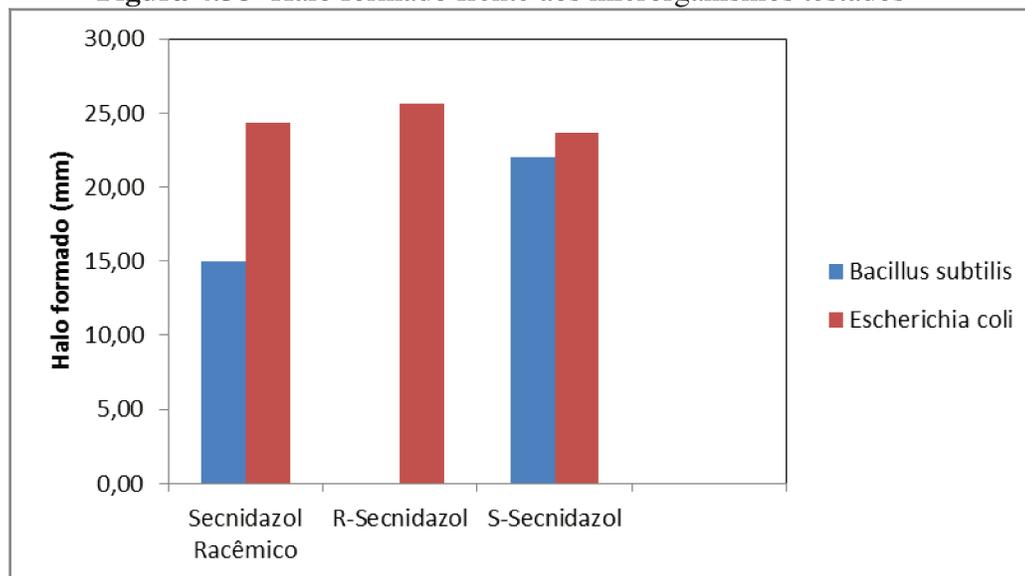
**Tabela 4.15** – Halo formado frente aos microrganismos testados.

Amostra	<i>Bacillus subtilis</i> (gram +)	<i>Escherichia coli</i> (gram -)
	Halo formado (mm)	
Secnidazol racêmico	15,00 ± 0,00	24,33 ± 1,21
R-secnidazol	00,00 ± 0,00	25,67 ± 1,63
S-secnidazol	22,00 ± 1,15	23,67 ± 1,75

De acordo com os halos formados é possível verificar que o S-secnidazol é discretamente mais eficaz do que sua forma racêmica para as bactérias gram-positivas (*B. subtilis*). Para a classe de bactérias gram-negativas (*E. coli*) não houveram diferenças significativas na eficiência dos produtos enantioméricos. Para melhor visualização, os dados foram dispostos em forma de gráfico na Figura 4.38. O teste de halo de inibição é um

teste qualitativo, portanto para melhor avaliação da atividade biológica dos enantiômeros obtidos serão consideradas as análises de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

**Figura 4.38-** Halo formado frente aos microrganismos testados



#### 4.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração de um agente antimicrobiano que inibirá o crescimento visível de um microrganismo após incubação, geralmente relatado como  $\text{mg L}^{-1}$ . A concentração bactericida mínima é definida como a menor concentração do fármaco que impedirá o crescimento visível do subcultivo, ou seja, que será capaz de eliminar o microrganismo. As Tabelas 4.16 e 4.17 apresentam os resultados obtidos para os dois microrganismos testados.

**Tabela 4.16** – CIM e CBM frente ao microrganismo *Bacillus subtilis*

Concentração (g/mL)	Secnidazol racêmico	R- secnidazol	S- secnidazol	Branco	Secnidazol racêmico	R- secnidazol	S- secnidazol	Branco
	<i>Bacillus subtilis</i>				<i>Bacillus subtilis</i>			
	CIM				CBM			
0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0125	-	-	-	+	-	-	-	+
0,00625	-	-	-	+	-	-	-	+
0,00313	-	-	-	+	-	-	-	+
0,0016	-	-	-	+	-	-	-	+
0,00078	+	-	+	+	+	-	+	+
0,00039	+	-	+	+	+	-	+	+
0,00020	+	+	+	+	+	+	+	+
0,00010	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Presença de crescimento/colônias; (-) Sem crescimento/colônias

**Tabela 4.17** – CIM e CBM frente ao microrganismo *Escherichia coli*

Concentração (g/mL)	Secnidazol racêmico	R- secnidazol	S- secnidazol	Branco	Secnidazol racêmico	R- secnidazol	S- secnidazol	Branco
	<i>Escherichia coli</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	CIM				CBM			
0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0125	-	-	-	-	-	-	-	-
0,00625	-	-	-	-	-	-	-	-
0,00313	+	+	-	-	+	+	-	-
0,0016	+	+	-	+	+	+	-	+
0,00078	+	+	+	+	+	+	+	+
0,00039	+	+	+	+	+	+	+	+
0,00020	+	+	+	+	+	+	+	+
0,00010	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Presença de crescimento/colônias; (-) Sem crescimento/colônias

Os testes de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima nos revela informação relevante quanto aos produtos enantioméricos obtidos. Para a bactéria gram-positiva (*B. subtilis*), o enantiômero R-secnidazol é 3,90 vezes mais eficaz do que a sua forma racêmica, enquanto para a bactéria gram-negativa (*E. coli*), o enantiômero S-secnidazol é 4,01 vezes mais eficaz que sua forma racêmica. Tais resultados nos permitem concluir que cada produto obtido pode ser utilizado para fins distintos. Dessa forma, pode-

se considerar que é extremamente viável a utilização dos enantiômeros em relação à sua forma racêmica. Como ambos enantiômeros apresentam em torno de 4 vezes maior eficiência que o racêmico, destacam-se dois pontos positivos quanto a sua utilização:

- utilização dos enantiômeros para fins específicos, ou seja, contra a ação de bactérias em que apresentaram maior eficiência;
- utilização de menor dose de fármaco para o efeito desejado. Por exemplo, para um determinado tratamento que seria necessário a utilização de 400 mg do fármaco racêmico pode-se utilizar apenas 100 mg do enantiômero, reduzindo assim os efeitos colaterais de sua utilização.

#### 4.6 INOVAÇÕES ALCANÇADAS PELA PRESENTE TESE

Com os resultados obtidos é possível apresentar as vantagens da presente Tese em relação aos documentos levantados que possuem similaridade com o tema abordado:

**Documento:** *Enantioseparation of Secnidazole by High-Performance Liquid Chromatography using Amylose-based Stationary Phase.*

NASCIMENTO, A. *et al.* Enantioseparation of Secnidazole by High-Performance Liquid Chromatography using Amylose-based Stationary Phase. **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n. 8-9, p. 739-750, 2012. ISSN 0263-6174.

**Diferenças da Tese em relação ao documento relacionado:** A presente Tese refere-se à obtenção dos enantiômeros puros do fármaco secnidazol, enquanto o Documento visa a enantiosseparação do fármaco. Ou seja, apenas a análise da separação dos enantiômeros na passagem pela coluna cromatográfica. O Documento analisa o comportamento termodinâmico do fármaco secnidazol através da técnica cromatográfica líquida de alta eficiência. Na presente Tese é possível obter os enantiômeros separados à partir dos parâmetros cromatográficos. Apesar dos documentos utilizarem as mesmas condições operacionais trata-se de abordagens diferentes.

**Problema técnico do documento relacionado:** Utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência apenas para análise termodinâmica do fármaco secnidazol.

**Vantagem da Tese em relação ao documento relacionado:** Na presente Tese foi desenvolvido um método para obtenção dos enantiômeros puros do fármaco secnidazol.

**Documento:** Resolução enantiomérica do secnidazol

NASCIMENTO, A. C. **Resolução enantiomérica do secnidazol.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. p. 144. Dissertação (Mestrado).

**Diferenças da Tese em relação ao documento relacionado:** A presente Tese refere-se à obtenção dos enantiômeros puros do fármaco secnidazol a partir da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com apenas uma coluna cromatográfica, enquanto o Documento utiliza uma unidade de leito móvel e seis colunas cromatográficas. Apesar de utilizarem as mesmas condições operacionais trata-se de técnicas distintas, utilizando equipamentos distintos. O processo do Documento necessita de um estudo das condições de sobrecarga do fármaco na passagem pela coluna cromatográfica, pois utiliza solução concentrada, enquanto que na presente Tese esse estudo não se faz necessário visto que utiliza solução diluída.

**Problema técnico do documento relacionado:** Utilização de grande quantidade de solventes e matéria-prima para obtenção dos enantiômeros. Necessidade de uma unidade de leito móvel simulado para a obtenção dos enantiômeros. Baixa pureza dos enantiômeros obtidos.

**Vantagem da Tese em relação ao documento relacionado:** Não necessita de uma unidade de leito móvel simulado para obtenção dos enantiômeros. Menor quantidade de solventes e matéria-prima para a obtenção dos enantiômeros.

**Documento:** US2006086667A

HAUCK, W., LUDEMANN-HOMBOURGER, O., RULAND, Y., LANDMESSER, N., MALLAMO, J. **Methods for the separation of enantiomeric sulfinylacetamides.** U.S. Patent Application n. 11/224,250, 27 abr. 2006

**Diferenças da Tese em relação ao documento relacionado:** No Documento a obtenção dos enantiômeros de fármaco modafinil é realizada através da técnica de cromatografia contínua, ou seja, necessita de uma unidade de leito móvel simulado. Além de precisar de altas concentrações de alimentação do fármaco:  $18 \text{ g L}^{-1}$ . As injeções sequenciais que o documento refere são para a cromatografia contínua, e não está detalhado no documento como realizar tal injeção sequencial. Na presente Tese a injeção sequencial é realizada em um cromatógrafo líquido, o que torna viável a obtenção dos enantiômeros do fármaco. O Documento cita três técnicas para obtenção dos enantiômeros: cromatografia em batelada, cromatografia contínua e processo estacionário com injeção sequencial, porém não revela qual a pureza obtida em cada processo, citando as análises apenas como Exemplo 1, Exemplo 2 e assim por diante. Na presente Tese é possível chegar a uma pureza de mais de 99% utilizando apenas o cromatógrafo líquido.

**Problema técnico do documento relacionado:** Grande volume de solvente e matéria-prima necessários para a obtenção dos enantiômeros. Necessita de uma unidade de leito móvel simulado. Falta clareza nos resultados de pureza apresentados.

**Vantagem da Tese em relação ao documento relacionado:** Menor consumo de solventes e matéria-prima. Possível obter os enantiômeros em um simples cromatógrafo líquido. A metodologia é de fácil entendimento.

**Documento:** *Enantioselective HPLC determination and pharmacokinetic study of secnidazole enantiomers in rats.*

DU, J., ZHANG, Y., CHEN, Y., LIU, D., CHEN, X., & ZHONG, D. Enantioselective HPLC determination and pharmacokinetic study of secnidazole enantiomers in rats. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 224-230, 2014.

**Diferenças da Tese em relação ao documento relacionado:** O Documento apresenta um estudo farmacocinético dos enantiômeros do secnidazol em plasma de ratos. Para esse estudo não houve a obtenção dos enantiômeros puros do fármaco, mas sua enantioseparação através de técnicas cromatográficas. A presente Tese obteve os enantiômeros puros e avaliou a atividade biológica dos mesmos frente a dois

microrganismos distintos. O Documento avalia o comportamento do fármaco secnidazol em plasma de rato, e apesar de ser um método validado não é suficiente para comparar o comportamento do fármaco em outros meios. Enquanto a presente Tese obteve os enantiômeros puros, com alto teor de pureza, e livre de qualquer contaminante, podendo ser utilizado em qualquer meio. O Documento avalia somente o comportamento farmacocinético do secnidazol, não fazendo referência a atividade biológica dos mesmos. A presente Tese é o primeiro estudo sobre a ação dos enantiômeros do secnidazol frente a diferentes microrganismos.

**Problema técnico do documento relacionado:** Inviabilidade na obtenção de enantiômeros puros. Resultados específicos para plasma de ratos. Utilização do S-ornidazol como padrão para o fármaco secnidazol.

**Vantagem da Tese em relação ao documento relacionado:** Obtenção dos enantiômeros puros, livres de quaisquer contaminantes, podendo ser utilizado em qualquer meio. Comprovação da atividade biológica dos enantiômeros do secnidazol. Viabilidade na obtenção dos enantiômeros, processo simples e fácil se ser utilizado em escala industrial.

# CAPÍTULO 5

## 5. CONCLUSÕES

---

O esforço empregado nesta Tese de Doutorado visou estabelecer um processo para a obtenção e purificação dos enantiômeros do secnidazol. Como resultado houve a purificação dos produtos enantioméricos com alto teor de pureza (acima de 99 %) na forma de cristal.

Duas técnicas cromatográficas foram adaptadas para melhorar a eficiência da obtenção dos enantiômeros. A técnica de injeção sequencial foi realizada com soluções diluídas e se destacou pela obtenção de produtos enantioméricos com elevado teor de pureza (99,77% para o R-secnidazol e 99,68% para o S-secnidazol). A técnica de injeção empilhada foi realizada com soluções concentradas que, apesar de possibilitar a obtenção de massa significativa dos enantiômeros, a pureza alcançada foi de 96,31% para o R-secnidazol e 85,44% para o S-secnidazol. Essa pureza é considerada baixa por se tratar de produtos farmacêuticos. Depois de obtidos, os enantiômeros foram submetidos a uma etapa de purificação que consistiu na evaporação total dos solventes através do rotaevaporador e posterior cristalização. Os cristais obtidos foram caracterizados por meio de técnicas microscópicas em que foi possível observar a mudança da forma cristalina dos enantiômeros em relação ao fármaco racêmico. Os enantiômeros também apresentaram diferentes formas cristalinas entre si, esse fenômeno é definido como polimorfismo. A morfologia dos cristais também interfere na atividade biológica do fármaco, e isso pode explicar o comportamento distinto dos enantiômeros.

Os enantiômeros foram avaliados quanto a sua atividade biológica frente a duas bactérias: uma gram-positiva e uma gram-negativa. Os microrganismos escolhidos foram as espécies *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. A escolha foi baseada de acordo com a ação do fármaco racêmico. Com a realização das análises de concentração inibitória mínima e

concentração bactericida mínima ficou comprovado que os enantiômeros puros possuem mais eficiência do que o fármaco racêmico, sendo que o R-secnidazol mostrou-se 3,90 vezes mais potente em relação a bactéria gram-positiva (*B. subtilis*) e o S-secnidazol mostrou-se 4,01 vezes mais potente em relação a bactéria gram-negativa (*E. coli*). Isso indica que, a partir do fármaco racêmico é possível a obtenção de dois novos produtos com atividades biológicas diferenciadas a medida que continuam demonstrando a mesma atividade biológica que o racêmico.

## **5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

### **5.1.1 Obtenção dos enantiômeros**

Para sugestões de trabalhos futuros recomenda-se o estudo da melhoria da técnica de injeção empilhada por meio da modificação da fase móvel utilizada. Modificando as proporções dos solventes utilizados seria possível modificar o fator de separação, isso poderia aumentar a pureza dos enantiômeros obtidos.

### **5.1.2 Caracterização dos enantiômeros**

Pode-se utilizar diferentes técnicas de cristalização para observar o comportamento dos cristais dos enantiômeros.

### **5.1.3 Atividade biológica**

Em relação a atividade biológica sugere-se um estudo com outros microrganismos, incluindo leveduras e protozoários.

Os estudos realizados comprovam a eficiência superior dos enantiômeros puros, a próxima etapa do desenvolvimento do fármaco seria os testes in vivo ou ex vivo.

Com os testes in vivo será possível contemplar a eficiência dos enantiômeros em relação ao fármaco racêmico, além de poder determinar a real ação do produto enantiomérico. Os testes in vitro confirmaram a ação diferente dos produtos frente a microrganismos distintos, os testes in vivo poderiam direcionar a relação fármaco/efeito e sugerir qual a patologia seria tratada com cada produto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Optimization strategies for HPLC enantioseparation of racemic drugs using polysaccharides and macrocyclic glycopeptide antibiotic chiral stationary phases. **Il Farmaco**, v. 57, n. 7, p. 513-529, 2002. ISSN 0014-827X.

\_\_\_\_\_. **Chiral separations by liquid chromatography and related technologies**. CRC Press, 2003. ISBN 0203911113.

AGRANAT, I.; WAINSCHEIN, S.; ZUSMAN, E. The predicated demise of racemic new molecular entities is an exaggeration. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 12, Dec 2012. ISSN 1474-1776.

ALBERS, A. P. F., *et al.* Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48, n. 305, p. 34-37, 2002.

ANDERSSON, S.; ALLENMARK, S. Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 54, n. 1-3, p. 11-23, Dec 31 2002. ISSN 0165-022X.

ARNOLD, F.; BLANCH, H.; WILKE, C. LIQUID-CHROMATOGRAPHY PLATE HEIGHT EQUATIONS. **Journal of Chromatography**, v. 330, n. 1, p. 159-166, 1985. ISSN 0021-9673.

ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Analysis of affinity separations II: The characterization of affinity columns by pulse techniques. **The Chemical Engineering Journal**, v. 30, n. 2, p. B25-B36, 1985. ISSN 0300-9467.

ATKINS, P. W. **Físico-Química - Fundamentos**, 3 ed., Editora LTC, São Paulo, 2003.

BAKSHI, M.; SINGH, S. ICH guidance in practice: establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p. 769-775, Nov 19 2004. ISSN 0731-7085.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova, Rio de Janeiro**, v. 6, n. 20, p. 647-656, 1997.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 1, p. 373-380, 1951. ISSN 0002-7863.

BERNARDI, L. S., *et al.* Solid-state evaluation and polymorphic quantification of venlafaxine hydrochloride raw materials using the Rietveld method. **Talanta**, v. 15; n. 117, p. 189-195, 2013.

BETANZOS-LARA, Soledad *et al.* Synthesis, characterization, and biological activity of cobalt (II), nickel (II), copper (II), and zinc (II) complexes of secnidazole. **Inorganica Chimica Acta**, v. 397, p. 94-100, 2013.

BOER, T. *et al.* Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC-MS in the characterization of tacrolimus. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 18-23, Jan 25 2013. ISSN 0731-7085.

BONATO, P.; JABOR, V.; DE GAITANI, C. Enantioselective analysis of drugs: Contributions of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Quimica Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, Jul-Aug 2005. ISSN 0100-4042.

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterisation of a drug molecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 192, n. 1, p. 47-53, Dec 1 1999. ISSN 0378-5173.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, Jan-Jun 1938. ISSN 0002-7863.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug-metabolism. **Journal of Chromatography a**, v. 694, n. 1, p. 39-48, Mar 3 1995. ISSN 0021-9673.

CANER, H. *et al.* Trends in the development of chiral drugs. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 3, p. 105-110, Feb 1 2004. ISSN 1359-6446.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. EdUFSCar, 2001. ISBN 8585173610.

CAVAZZINI, A.; FELINGER, A.; GUIOCHON, G. Comparison between adsorption isotherm determination techniques and overloaded band profiles on four batches of monolithic columns. **Journal of Chromatography a**, v. 1012, n. 2, p. 139-149, Sep 19 2003. ISSN 0021-9673.

CHOCHOLOUS, P.; SOLICH, P.; SATINSKY, D. An overview of sequential injection chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, n. 1-2, p. 129-135, Sep 26 2007. ISSN 0003-2670.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. In: (Ed.). **Fundamentos de cromatografia**: Unicamp, 2006.

CREMASCO, M. *et al.* Parameters estimation for amino acids adsorption in a fixed bed by moment analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 2, p. 181-194, Jun 2001. ISSN 0104-6632.

DANTUS, M.; WELLS, M. Regulatory issues in chromatographic analysis in the pharmaceutical industry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 7-9, p. 1413-1442, 2004. ISSN 1082-6076.

DE BOER, J. H. *et al.* The t-curve of multimolecular N<sub>2</sub>-adsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 21, n. 4, p. 405-414, 1966. ISSN 0021-9797.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. EdPUCRS, 2007. ISBN 8574307025.

DU, J., ZHANG, Y., CHEN, Y., LIU, D., CHEN, X., & ZHONG, D. Enantioselective HPLC determination and pharmacokinetic study of secnidazole enantiomers in rats. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 224-230, 2014.

DUAN, G.; CHING, C. B.; SWARUP, S. Kinetic and equilibrium study of the separation of propranolol enantiomers by high performance liquid chromatography on a chiral adsorbent. **Chemical Engineering Journal**, v. 69, n. 2, p. 111-117, 1998. ISSN 1385-8947.

FARIA, A. M. *et al.* Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, 2006. ISSN 0100-4042.

FELINGER, A.; ZHOU, D.; GUIOCHON, G. Determination of the single component and competitive adsorption isotherms of the 1-indanol enantiomers by the inverse method. **Journal of Chromatography a**, v. 1005, n. 1-2, p. 35-49, Jul 11 2003. ISSN 0021-9673.

FRANCOTTE, E. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. **Journal of Chromatography a**, v. 906, n. 1-2, p. 379-397, Jan 12 2001 2001. ISSN 0021-9673.

\_\_\_\_\_. Chiral stationary phases for preparative enantioselective chromatography. **Preparative Enantioselective Chromatography**, p. 48-77, 2005.

GARCIA, A. J. C. **Metodologia analítica para determinação de triclosan e clorofenóis por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) e cromatografia por injeção sequencial (SIC) com uso de coluna monolítica e empacotada**. Universidade de São Paulo, 2012. P. 135. Tese (Doutorado).

GILLIS, J.; WISEMAN, L. Secnidazole - A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. **Drugs**, v. 51, n. 4, p. 621-638, Apr 1996. ISSN 0012-6667.

GIRON, D. Thermal-analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 1-59, Jan 2 1995. ISSN 0040-6031.

\_\_\_\_\_. Thermal analysis, microcalorimetry and combined techniques for the study of pharmaceuticals. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 56, n. 3, p. 1285-1304, 1999. ISSN 1418-2874.

GUIMARÃES, C. A. *et al.* Comparative physical-chemical characterization of encapsulated lipid-based isotretinoin products assessed by particle size distribution and thermal behavior analyses. **Thermochimica Acta**, v. 505, n. 1, p. 73-78, 2010. ISSN 0040-6031.

GUIOCHON, G.; FELINGER, A.; SHIRAZI, D. G. G. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography**. Academic Press, 2006. ISBN 0080457223.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography, 1994**: Academic Press Inc., London, UK.

HAUCK, W., LUDEMANN-HOMBOURGER, O., RULAND, Y., LANDMESSER, N., MALLAMO, J. **Methods for the separation of enantiomeric sulfinylacetamides**. U.S. Patent Application n. 11/224,250, 27 abr. 2006

HUANG, Xi-Shou *et al.* Synthesis, characterization and bioactivity research of a derivative of secnidazole: 1-(2-chloropropyl)-2-methyl-5-nitro-1H-imidazole. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 41, n. 9, p. 1360-1364, 2011.

JAMES, F. *et al.* Determination of binary competitive equilibrium isotherms from the individual chromatographic band profiles. **Chemical Engineering Science**, v. 54, n. 11, p. 1677-1696, Jun 1999. ISSN 0009-2509.

JUNIOR, I. J. D. S. *et al.* Cromatografia em Leito Móvel Simulado na Produção de Substâncias Enantiomericamente Puras ou Enriquecidas em Larga Escala. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1027-1037, 2006.

KASPRZYK-HORDERN, B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4466-4503, 2010. ISSN 0306-0012.

KHAN, S. *et al.* Improved efficiency and stability of secnidazole - An ideal delivery system. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 42-49, Jan 2015. ISSN 1319-562X.

KUBIN, M. Beitrag zur theorie der chromatographie II. Einfluss der diffusion ausserhalb und der adsorption innerhalb des sorbens-korns. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 30, n. 9, p. 2900-2907, 1965. ISSN 1212-6950.

LI, Y. *et al.* Design, synthesis and antimicrobial activities evaluation of Schiff base derived from secnidazole derivatives as potential FabH inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3120-3126, Jun 1 2013. ISSN 0968-0896.

LIAO, S. *et al.* Preparation and characterization of a molecularly imprinted monolithic column for pressure-assisted CEC separation of nitroimidazole drugs. **Electrophoresis**, v. 31, n. 16, p. 2822-2830, Aug 2010. ISSN 0173-0835.

LIMA, N. G. P. B. Trissoralen um medicamento de baixa dosagem: estudos termoanalíticos da compatibilidade do fármaco-excipientes e determinação de parâmetros de qualidade para cápsulas magistrais. 2014.

LIN, G.-Q.; ZHANG, J.-G.; CHENG, J.-F. Overview of Chirality and Chiral Drugs.

LORENZ, H.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Processes To Separate Enantiomers. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 53, n. 5, p. 1218-1250, Jan 27 2014. ISSN 1433-7851.

LOURENCO, T.; CASSIANO, N.; CASS, Q. Chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010. ISSN 0100-4042.

MA, L.-W.; DU, W.; ZHAO, C.-S. Advances in the quantitative analytical methods of drug polymorphism. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 8, p. 004, 2011.

MAIER, D. *et al.* Evaluation of models combining rheological data with the molecular weight distribution. **Journal of Rheology**, v. 42, n. 5, p. 1153-1173, 1998. ISSN 0148-6055.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2013. ISBN 1118681347.

MIHLBACHLER, K. *et al.* Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Tröger's base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 955, n. 1, p. 35-52, 2002. ISSN 0021-9673.

MILLER, L. Preparative enantioseparations using supercritical fluid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1250, p. 250-5, Aug 2012. ISSN 1873-3778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658135> >.

MILLER, L. *et al.* Examples of preparative chiral chromatography on an amylose-based chiral stationary-phase in support of pharmaceutical research. **Journal of Chromatography a**, v. 658, n. 2, p. 429-435, Jan 14 1994. ISSN 0021-9673.

MITAL, A. Synthetic nitroimidazoles: biological activities and mutagenicity relationships. **Scientia pharmaceutica**, v. 77, n. 3, p. 497-520, 2009.

MIYABE, K. *et al.* Moment analysis of mass-transfer kinetics in C-18-silica monolithic columns. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 24, p. 6975-6986, Dec 15 2003. ISSN 0003-2700.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. Kinetic study of the mass transfer of S-Troger's base in the system cellulose triacetate and ethanol. **Journal of Chromatography a**, v. 849, n. 2, p. 445-465, Jul 23 1999. ISSN 0021-9673.

MIYABE, K.; SUZUKI, M. Chromatography of liquid-phase adsorption on octadecylsilyl-silica gel. **Aiche Journal**, v. 38, n. 6, p. 901-910, Jun 1992. ISSN 0001-1541.

MONISSETTE, S. *et al.* High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 275-300, Feb 23 2004. ISSN 0169-409X.

NASCIMENTO, A. *et al.* Enantioseparation of Secnidazole by High-Performance Liquid Chromatography using Amylose-based Stationary Phase. **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n. 8-9, p. 739-750, 2012. ISSN 0263-6174.

NASCIMENTO, A. C. **Resolução enantiomérica do secnidazol**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. p. 144. Dissertação (Mestrado).

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral drugs: an overview. **Int J Biomed Sci**, v. 2, n. 2, p. 85-100, 2006.

NOTOWICZ, A.; STOLZ, E.; DE KONING, G. A. J. **The nitroimidazole family of drug**. *British Journal of Veneral Diseases*. 54: 69-71 p. 1978.

OKAMOTO, Y.; IKAI, T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 12, p. 2593-2608, 2008. ISSN 0306-0012.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 37, n. 8, p. 1020-1043, May 4 1998. ISSN 1433-7851.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-30, 2011.

ORLANDO, R. M. Importância farmacêutica de fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, 2007. ISSN 1808-0804.

PEDEFERRI, M. *et al.* Experimental analysis of a chiral separation through simulated moving bed chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 54, n. 17, p. 3735-3748, Sep 1999. ISSN 0009-2509.

RAJENDRAN, A. Recent developments in preparative chromatographic processes. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 263-270, May 2013. ISSN 2211-3398.

RAMOS, A. M. **Separação de piperonal contido em uma solução de síntese a partir do óleo essencial de Piper hispidinervum por cromatografia líquida de alta eficiência com injeção empilhada**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2014. p. 138. Tese (Doutorado).

REKOSKE, J. Chiral separations. **Aiche Journal**, v. 47, n. 1, p. 2-5, Jan 2001. ISSN 0001-1541.

RENTSCH, K. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 54, n. 1-3, p. 1-9, Dec 31 2002. ISSN 0165-022X.

RIVERA, A. *et al.* Physico-chemical and solid-state characterization of secnidazole. **Farmaco**, v. 55, n. 11-12, p. 700-707, Nov-Dec 2000. ISSN 0014-827X.

ROSA, P. C. P. **Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (0, 0'-bis [4-terc-butilbenzoi]l-n, n'-dialil-l-tartadimid)**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. p. 140. Dissertação (Mestrado).

RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. John Wiley & Sons, 1984. ISBN 0471866067.

SEIDEL-MORGENSTERN, A. Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms. **Journal of Chromatography a**, v. 1037, n. 1-2, p. 255-272, May 28 2004 2004. ISSN 0021-9673.

SHEN, J.; IKAI, T.; OKAMOTO, Y. Synthesis and chiral recognition of novel amylose derivatives containing regioselectively benzoate and phenylcarbamate groups. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 7, p. 1041-1047, 2010. ISSN 0021-9673.

SHINDO, H.; CALDWELL, J. Development of chiral drugs in Japan: an update on regulatory and industrial opinion. **Chirality**, v. 7, n. 5, p. 349-352, 1995. ISSN 1520-636X.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 460pp, 2000.

SING, K. *et al.* Reporting physisorption data for gas solid systems with special reference to the determination of surface-area and porosity (recommendations 1984). **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985. ISSN 0033-4545.

SNYDER, L.; DOLAN, J.; VANDERWAL, S. Boxcar chromatography - a new approach to increased analysis rate and very large column plate numbers. **Journal of Chromatography**, v. 203, n. Jan, p. 3-17, 1981. ISSN 0021-9673.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Basic concepts and the control of separation. **Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition**, p. 19-86, 2010. ISSN 0470508183.

\_\_\_\_\_. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 1118210395.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. Organic chemistry, 2000. **Vollhardt, KPC, Schore, NE, Química Orgânica–Estrutura e Função**, 2004.

SUZUKI, M. **Adsorption engineering**. Kodansha, 1990. ISBN 0444988025.

SYKULA-ZAJAC, A. *et al.* Thermal and X-ray analysis of racemic bupivacaine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 105, n. 3, p. 1031-1036, Sep 2011. ISSN 1388-6150.

TANDON, P.; HONORATO, S. B.; MISHRA, S.; CHATURVEDI, D.; GUPTA, V. P.; AYALA, A. P.; SIESLER, H. W. Molecular Structure and Vibrational Spectroscopic Investigation of Secnidazole Using Density Functional Theory. **The Journal of Physical Chemistry A**. 113, p. 273-281, 2009.

TIAN, P. *et al.* Lipase-catalyzed resolutions of both enantiomers of ornidazole and secnidazole. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 853-857, Jul 2003. ISSN 1001-604X.

TULASHIE, S.; LORENZ, H.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Solubility of Mandelic Acid Enantiomers and Their Mixtures in Three Chiral Solvents. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 11, p. 5196-5200, Nov 2010. ISSN 0021-9568.

UPCROFT, J. A. *et al.* Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and -resistant Giardia, Trichomonas, and Entamoeba spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 1, p. 73-6, Jan 1999. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869568> >.

VERMA, Aradhana et al. Synthesis, Characterisation, Spectral and Microbial Studies of Transition Metal Complexes of the Drug, Secnidazole. **Journal of Chemistry**, v. 7, n. S1, p. S520-S526, 2010.

VIPPAGUNTA, S.; BRITTAIN, H.; GRANT, D. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3-26, May 16 2001. ISSN 0169-409X.

WANG, X. *et al.* Studies on Solvatomorphism of Betulinic Acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 9, p. 2696-2703, Sep 2014. ISSN 0022-3549.

WIKLER, M. A. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. ISBN 1562385879.

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **J Chromatogr A**, v. 906, n. 1-2, p. 105-25, Jan 2001. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11215883> >.

## APÊNDICE

### Apêndice A: Limite de Detecção

---

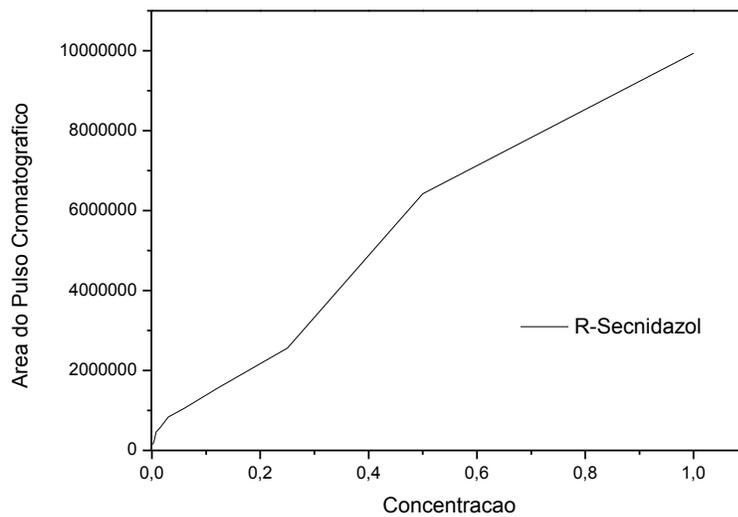
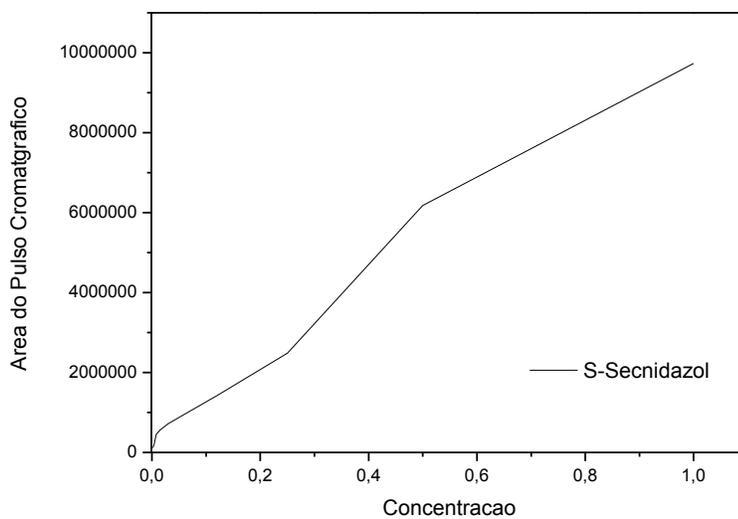
A solução racêmica do fármaco secnidazol foi diluída nas concentrações de 1,0 à 0,0005 mg mL<sup>-1</sup>. Essas diluições foram injetadas na coluna semipreparativa Chiralpak AD, fase móvel contendo 60% de isopropanol e 40% de acetonitrila, volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de 280nm Cromatógrafo, temperatura de 25°C e vazão de 2,0 mL min<sup>-1</sup>. O limite de detecção foi calculado por meio da Equação A1 e o limite de quantificação foi calculado por meio da Equação A2:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (A1)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (A2)$$

em que *DPa* é o desvio padrão e *IC* é a inclinação da curva.

As Figuras A1 e A2 apresentam as curvas obtidas para o R e S-Secnidazol, respectivamente.

**Figura A1- Curva R-secnidazol****Figura A2- Curva S-secnidazol**

A Tabela A1 apresenta os limites de detecção e quantificação para os enantiômeros R e S-Secnidazol.

**Tabela A1** – Limite de detecção e quantificação dos enantiômeros do secnidazol

	<b>R-secnidazol</b>	<b>S-secnidazol</b>
Limite de detecção (mg mL <sup>-1</sup> )	0,0088	0,0293
Limite de quantificação (mg mL <sup>-1</sup> )	0,0113	0,0378

# ANEXO

Análise Microbiológica (OS 180053)

## 1. OBJETIVOS

Determinação da atividade antimicrobiana por halo de inibição.

## 2. METODOLOGIA DE TESTE E MICRO-ORGANISMO TESTE

Preparo da suspensão microbiana:

A cultura de microrganismo foi repicada em slants de meio de cultura TSA e foi incubada a 35°C, por cerca de 18 horas. Após este período, foi realizada a avaliação de pureza das cepas, através de microscopia. Com auxílio de swab estéril, foi realizada a suspensão de cada microrganismo em água peptonada 0,1%, a turbidez foi checada com a escala de Macfarlad, tubo equivalente a concentração 6x10<sup>8</sup> UFC/mL.

Preparo das placas teste

Para realização do teste foram utilizadas placas de Petri descartáveis (90x15mm), onde foi adicionado cerca de 30 mL de meio de cultura Mueller Hinton (Oxoid®). Após a solidificação do meio, foi adicionado 0,1 mL da suspensão com o microrganismo teste em quatro placas para cada cepa, este volume foi espalhado sobre a superfície do meio com o auxílio de alça de Drigalski. Em seguida, com auxílio de um cilindro de metal, com 8 mm diâmetro externo, foram feitos 3 orifícios em cada placa, após retirar o excedente de Agar, o mesmo foi selado, com o mesmo meio de cultura fundido, para evitar que a amostra infiltrasse no meio de cultura.

Preparo das amostras

Foi preparada uma suspensão em água destilada com as amostras de 1 a 6, seguindo as indicações de concentração sugeridas pelo cliente (indicadas na tabela de identificação das amostras). Todas as amostras foram esterilizadas por filtração, usando membrana de 0,22 µm.

Inoculação e Incubação

Cada placa recebeu uma numeração, de acordo com a amostra. Foi inoculado 100 µL de cada amostra nos três orifícios da placa correspondente a sua numeração. As placas foram feitas em duplicatas e incubadas a 30°C para as placas do *Bacillus subtilis* e a 35°C para as placas de *Escherichia coli*.

## Leitura dos resultados

Após 24 horas de incubação, foram medidos, com auxílio de uma régua ou escalímetro, o diâmetro da zona translúcida (halo de inibição de crescimento microbiano), formado ao redor do orifício onde fora inoculada a amostra. Para cada amostra, e cada microrganismo, foram obtidos 6 valores e destes obtidos a média de resultado para o teste/amostra.

## Controles

Foi realizado controle negativo de contaminação do meio de cultura, onde o mesmo estava sem inoculação do microrganismo, ou de amostra, a fim de verificar se o meio de cultura apresentava-se estéril. A mesma foi incubada nas condições do teste. Também foi feito controle positivo de crescimento da suspensão microbiana, onde foi inoculado 100 µL de cada suspensão em placa que foi incubada para verificar se ocorria desenvolvimento adequado do micro-organismo.

O teste de esterilidade da amostra foi feito, inoculando em placa de Petri com orifícios para cada amostra e incubada, para avaliar se havia crescimento de alguma colônia contaminante. Todos os controles foram incubados nas condições do teste.

Microrganismo teste:

*Escherichia coli* CCT 1457 (ATCC 25922)

*Bacillus subtilis* CCT 0089 (ATCC 6633)