

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EMPREGO DA CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE ALTA EFICIÊNCIA E  
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SELETORES QUIRAIS NA SEPARAÇÃO  
ENANTIOMÉRICA DE PRAZICUANTEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ELISA DE SALDANHA SIMON

PORTO ALEGRE, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EMPREGO DA CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE ALTA EFICIÊNCIA E  
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SELETORES QUIRAIS NA SEPARAÇÃO  
ENANTIOMÉRICA DE PRAZICUANTEL**

Dissertação apresentada por **Elisa de Saldanha  
Simon** para obtenção do GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Nadia Maria Volpato

PORTO ALEGRE, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de março de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Flávia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Vera Lucia Eifler Lima

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Simon, Elisa de Saldanha  
Emprego da Cromatografia Contracorrente de Alta Eficiência e Avaliação de Diferentes Seletores Quirais na Separação Enantiomérica de Praziquantel / Elisa de Saldanha Simon. -- 2017.  
157 f.

Orientadora: Nadia Maria Volpato.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Cromatografia Contracorrente. 2|. Praziquantel. 3. Separação Enantiomérica. 4. Seletor Quiral. 5. Modelagem Molecular. I. Volpato, Nadia Maria, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico e no Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



## **AGRADECIMENTOS**

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Nadia Maria Volpato pela oportunidade, orientação e confiança depositada em encarar este desafio. Obrigada por sua dedicação, paciência e ensinamentos ao longo desses dois anos.

À Sabrina Laíz Büttenbender pelo incansável auxílio e dedicação nos experimentos e pelos momentos de descontração e troca de conhecimentos.

Ao professor Dr. Daniel Kawano pela enorme dedicação e auxílio nos estudos de modelagem molecular.

Aos professores do LCQFar pelo auxílio e incentivo no decorrer deste trabalho. Agradeço em especial a Prof.<sup>a</sup> Dra. Cássia Virgínia Garcia por me acolher como aluna especial neste programa de pós-graduação.

Aos colegas do laboratório, obrigada pelo acolhimento, auxílio, momentos de descontração e troca de conhecimentos e ideias.

Aos funcionários do laboratório pelo auxílio sempre que precisei.

À colega Sara Elis Bianchi pelo auxílio na utilização do cromatógrafo contracorrente de alta eficiência e pelas dicas referentes a técnica.

As colegas e amigas Marina Scopel e Nathalie Wingert, pelo auxílio com a cromatografia líquida e validação.

À colega e amiga Caren Gobetti, pela parceria nos estudos e por dividir angústias e incertezas.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia e do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, obrigada pela oportunidade em aperfeiçoar meus conhecimentos.

Ao colega Gustavo das Neves pelo auxílio nos estudos de modelagem molecular.

Aos meus pais, Aurelio e Angelica, por acreditarem no meu sonho e sempre me acolherem nas minhas decisões e nos momentos de cansaço e aflição. As minhas

irmãs Anelise e Luisa, pelo incentivo e carinho em todos os momentos. À minha avó Vera pelas palavras de otimismo e força.

Ao meu namorado Morgan, pelo companheirismo e incentivo, por ter apoiado minhas decisões, comemorando conquistas e sonhando futuros.

As amigas Mariana, Elis e Virgínia, por estarem sempre por perto, dividindo angústias e incertezas, sempre apoiando e torcendo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço, dedico e compartilho a felicidade por ter chegado até aqui.



## RESUMO

Com a crescente demanda de substâncias enantiomericamente puras e na busca por métodos que demandem menor tempo e custo, algumas metodologias preparativas, envolvendo separação quiral, sobressaem-se à síntese enantiosseletiva. A cromatografia contracorrente de alta eficiência (HPCCC) é uma técnica de separação líquido-líquido baseada nas diferenças de partição dos componentes de uma mistura, entre duas fases líquidas imiscíveis, e possui vantagens distintas na separação quiral. O anti-helmíntico praziquantel (PZQ) é obtido como mistura racêmica, sendo que o enantiômero *R*-(-)-PZQ é ativo, enquanto o *S*-(+)-PZQ está associado aos efeitos colaterais e ao sabor amargo. O isolamento do enantiômero *R*-(-)-PZQ levaria a redução da dose nas formulações, além de promover redução no sabor amargo de preparações líquidas, fator importante para a adesão ao tratamento, principalmente por crianças. O objetivo deste estudo foi o emprego da técnica de HPCCC e, com auxílio de modelagem molecular, a avaliação de diferentes seletores quirais (SQs) na separação enantiomérica do PZQ. Diversos sistemas de solventes bifásicos (SSBs) foram avaliados, através da determinação do coeficiente de partição (*K*) do PZQ, do tempo de separação das fases e das condições cromatográficas de operação, na ausência e presença de SQs. Também foi desenvolvida metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com fase estacionária quiral, para análise complementar das frações coletadas por HPCCC. Os SQs hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina e ácido L-(+)-tartárico foram avaliados experimentalmente e/ou empregando modelagem molecular. O método de CLAE quiral foi considerado adequado para o uso pretendido, fornecendo tempo de retenção de 9,24 e 10,16 minutos para o (*S*)-PZQ e o (*R*)-PZQ, respectivamente, com resolução de 1,7 entre os enantiômeros e pratos teóricos superiores a 4000 para ambos. O SQ HP- $\beta$ -CD, a partir da concentração de 100 mmol/L, dissolvido no SSB composto por hexano/acetato de etila/metanol/água, nas proporções 1:1:1:1 e 1,2:0,8:1,2:0,8 (v/v/v/v), resultou em índice de separação dos enantiômeros de PZQ, estando de acordo com os resultados de modelagem molecular, os quais não evidenciaram elevado poder discriminatório deste SQ em relação aos isômeros. O conjunto de parâmetros da modelagem molecular indicaram a carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina como o SQ mais promissor para a separação enantiomérica de PZQ.

**Palavras-chave:** separação quiral, HPCCC, praziquantel, seletor quiral, modelagem molecular.



## ABSTRACT

### Employment of High Performance Countercurrent Chromatography and Evaluation of Different Chiral Selectors in the Enantiomeric Separation of Praziquantel

With the increasing demand of enantiomerically pure substances and in the search for methods that require less time and cost, some preparative methodologies, involving chiral separation, stand out for the enantioselective synthesis. High performance countercurrent chromatography (HPCCC) is a liquid-liquid separation technique based on the partition differences of the components in a mixture, between two immiscible liquid phases, and has distinct advantages in the chiral separation. The antihelmintic praziquantel (PZQ) is obtained as racemic mixture, whereas the *R*-(-)-PZQ enantiomer is active, while *S*-(+)-PZQ is associated with side effects and bitter taste. Isolation of the *R*-(-)-PZQ enantiomer would lead to dose reduction in the formulations, besides promoting bitter taste reduction of liquid preparations, an important factor for treatment adherence, especially for children. The aim of this study was the employment of the HPCCC technique and, with the aid of molecular modeling, the evaluation of different chiral selectors (CSs) in the enantiomeric separation of PZQ. Several biphasic solvent systems (BSSs) were evaluated by partition coefficient (*K*) determination of the PZQ, the *settling time* and the operating chromatographic conditions, in the CSs absence and presence. It was also developed an analytical methodology by high performance liquid chromatography (HPLC), with chiral stationary phase, for complementary analysis of the HPCCC fractions. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD), hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin and L-(+)-tartaric acid were evaluated experimentally and/or using molecular modeling. The chiral HPLC method was considered suitable for the intended use, providing retention time of 9.24 and 10.16 minutes for (*S*)-PZQ and (*R*)-PZQ, respectively, with a resolution of 1.7 between the enantiomers and theoretical plates above 4000 for both. HP- $\beta$ -CD, above 100 mmol/L, dissolved in the BSS composed of hexane/ethyl acetate/methanol/water, in the proportions 1:1:1:1 and 1.2:0.8:1.2:0.8 (v/v/v/v), resulted in separation indication of the enantiomers of PZQ, being in agreement with the results of molecular modeling, which did not show a high discriminatory power of this CS in relation to the isomers. The set of molecular modeling parameters indicated carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin as the most promising CS for the enantiomeric separation of PZQ.

**Keywords:** chiral separation, HPCCC, praziquantel, chiral selector, molecular modeling.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação de dois enantiômeros .....	39
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da teoria dos três pontos .....	41
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da $\alpha$ -CD, $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD, respectivamente .....	47
<b>Figura 4</b> - Característica da cavidade das ciclodextrinas .....	49
<b>Figura 5</b> - Representação gráfica da formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas .....	49
<b>Figura 6</b> - Representação de uma coluna hidrostática .....	54
<b>Figura 7</b> - Representação de uma coluna hidrodinâmica .....	55
<b>Figura 8</b> - Movimento planetário síncrono “tipo J” de uma coluna espiral hidrodinâmica .....	56
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática do movimento das duas fases líquidas submetidas ao movimento planetário “tipo J” .....	57
<b>Figura 10</b> - Representação de um equipamento de HPCCC .....	59
<b>Figura 11</b> - Faixa ideal de valores de $K$ para aplicação em CCC .....	60
<b>Figura 12</b> - Representação da estrutura química do praziquantel .....	81
<b>Figura 13</b> - Cromatograma do PZQ obtido pelo modo de eluição gradiente (esquerda) e representação esquemática do gradiente linear água:acetoneitrila (v/v) (direita) .....	100
<b>Figura 14</b> - Cromatograma do PZQ racemato obtido por HPCCC com SSB 17 .....	106
<b>Figura 15</b> - Cromatograma dos enantiômeros de PZQ na concentração de 50 $\mu$ g/mL de racemato .....	109
<b>Figura 16</b> - Representação gráfica dos pontos experimentais para a linearidade de resposta do (S)-PZQ por CLAE quiral, nos três dias de análise (A, B e C) .....	110
<b>Figura 17</b> - Representação gráfica dos pontos experimentais para a linearidade de resposta do (R)-PZQ por CLAE quiral, nos três dias de análise (A, B e C) .....	110
<b>Figura 18</b> - Quantidade dos enantiômeros de praziquantel por fração coletada nas análises de HPCCC com SSB 17 e HP- $\beta$ -CD 50 mmol/L .....	115
<b>Figura 19</b> - Quantidade dos enantiômeros de praziquantel por fração coletada nas análises de HPCCC com SSB 17 e HP- $\beta$ -CD 100 mmol/L .....	116
<b>Figura 20</b> - Quantidade dos enantiômeros de praziquantel por fração coletada nas análises de HPCCC com SSB 17 e HP- $\beta$ -CD 150 mmol/L .....	117
<b>Figura 21</b> - Quantidade dos enantiômeros de praziquantel por fração coletada nas análises de HPCCC com SSB 17 e HP- $\beta$ -CD 200 mmol/L .....	117
<b>Figura 22</b> - Quantidade dos enantiômeros de praziquantel por fração coletada nas análises de HPCCC com SSB 19 e HP- $\beta$ -CD 100 mmol/L .....	119

<b>Figura 23</b> - Quantidade dos enantiômeros de praziquantel por fração coletada nas análises de HPCCC com SSB 17 e HP- $\gamma$ -CD 50 mmol/L .....	122
<b>Figura 24</b> - Quantidade dos enantiômeros de praziquantel por fração coletada nas análises de HPCCC com SSB 17 e ácido L-(+)-tartárico 400 mmol/L .....	123
<b>Figura 25</b> - Modos de ligação de acoplamento do ( <i>R</i> ) e ( <i>S</i> )-PZQ com ácido L-(+)-tartárico, destacando as interações intermoleculares .....	125
<b>Figura 26</b> - Poses de acoplamento do ( <i>R</i> )-PZQ (esquerda) e ( <i>S</i> )-PZQ (direita) em representações da superfície das ciclodextrinas 2-hidroxiopropil- $\gamma$ -ciclodextrina (HP- $\gamma$ -CD), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) e carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina (CM- $\beta$ -CD) .....	127
<b>Figura 27</b> - Poses de acoplamento do ( <i>R</i> )-PZQ (esquerda) e ( <i>S</i> )-PZQ (direita) em representações da superfície das ciclodextrinas sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD), heptakis-(2,6-di- <i>O</i> -metil)- $\beta$ -ciclodextrina (DM- $\beta$ -CD) e heptakis-(2,3,6-tri- <i>O</i> -benzoil)- $\beta$ -ciclodextrina (TB- $\beta$ -CD) .....	128
<b>Figura 28</b> - Modos de ligação de acoplamento do ( <i>R</i> )-PZQ (esquerda) e ( <i>S</i> )-PZQ (direita) com 2-hidroxiopropil- $\gamma$ -ciclodextrina (A e B) e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (C e D), destacando as interações intermoleculares .....	130
<b>Figura 29</b> - Modos de ligação de acoplamento do ( <i>R</i> )-PZQ (esquerda) e ( <i>S</i> )-PZQ (direita) com carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina (A e B) e sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina (C e D), destacando as interações intermoleculares .....	132
<b>Figura 30</b> - Modos de ligação de acoplamento do ( <i>R</i> )-PZQ (esquerda) e ( <i>S</i> )-PZQ (direita) com heptakis-(2,6-di- <i>O</i> -metil)- $\beta$ -ciclodextrina (A e B) e heptakis-(2,3,6-tri- <i>O</i> -benzoil)- $\beta$ -ciclodextrina (C e D), destacando as interações intermoleculares .....	134

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais classes de seletores quirais agrupados por fonte de obtenção .....	48
<b>Tabela 2</b> - Exemplos de ciclodextrinas utilizadas em enantioseparação .....	51
<b>Tabela 3</b> - Características dos dois tipos de sistemas em CCC .....	55
<b>Tabela 4</b> - Composição das 23 misturas de solventes da família Arizona nomeadas de A a Z (v/v/v/v) .....	64
<b>Tabela 5</b> - Proporções dos solventes para testes de partição .....	69
<b>Tabela 6</b> - Vantagens e desvantagens de algumas técnicas analíticas em comparação à CCC .....	78
<b>Tabela 7</b> - SSBs propostos para uso em CCC com base no comportamento do analito na pré-varredura por CLAE .....	87
<b>Tabela 8</b> - Condições cromatográficas utilizadas na validação do método analítico para determinação de ( <i>R</i> )-PZQ e ( <i>S</i> )-PZQ por CLAE quiral .....	93
<b>Tabela 9</b> - Diluições realizadas para preparo das soluções padrão de PZQ SQR para avaliação da linearidade .....	94
<b>Tabela 10</b> - Valores de coeficiente de partição ( <i>K</i> ) para PZQ nos SSBs 13 a 19 .....	101
<b>Tabela 11</b> - Valores de coeficiente de partição ( <i>K</i> ) para PZQ nos SSBs 22 e 26.....	101
<b>Tabela 12</b> - Valores de coeficiente de partição ( <i>K</i> ) para PZQ na presença do seletor quiral HP- $\beta$ -CD .....	102
<b>Tabela 13</b> - Avaliação da estabilidade das soluções amostra de PZQ para injeção em HPCCC armazenadas de 4 a 8 °C, durante 8 dias .....	104
<b>Tabela 14</b> - Resultados de retenção percentual de fase estacionária ( $R_{FE(\%)}$ ), intervalo de eluição, tempo de retenção ( $T_R$ ) e quantidade recuperada de PZQ nas análises por HPCCC .....	105
<b>Tabela 15</b> - Tempos de retenção ( $T_R$ ), número de pratos teóricos ( <i>N</i> ) e resolução para os enantiômeros de PZQ em função da vazão da FM hexano:2-propanol 70:30 (v/v), por CLAE quiral .....	108
<b>Tabela 16</b> - Tempos de retenção ( $T_R$ ), número de pratos teóricos ( <i>N</i> ) e resolução para os enantiômeros de PZQ em função da vazão da FM hexano:2-propanol 80:20 (v/v), por CLAE quiral .....	108
<b>Tabela 17</b> - Resultados obtidos para as curvas padrão A, B e C dos enantiômeros de PZQ obtidos por CLAE quiral .....	111

<b>Tabela 18</b> - Equações de reta, valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ), valor-P para o intercepto e erro padrão da regressão para (S)-PZQ e (R)-PZQ, referentes as curvas padrão A, B e C .....	112
<b>Tabela 19</b> - ANOVA das áreas determinadas para obtenção da curva padrão de (S)-PZQ por CLAE quiral .....	112
<b>Tabela 20</b> - ANOVA das áreas determinadas para obtenção da curva padrão de (R)-PZQ por CLAE quiral .....	113
<b>Tabela 21</b> - Resultados da precisão para os enantiômeros de PZQ obtidos por CLAE quiral .....	114
<b>Tabela 22</b> - Escores de acoplamento para as simulações do (R)-PZQ e (S)-PZQ com sete diferentes seletores quirais .....	124



## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> – Determinação do coeficiente de partição ( $K$ ) .....	60
<b>Equação 2</b> - Determinação do Volume da coluna ( $V_C$ ) .....	60
<b>Equação 3</b> - Determinação do Volume de retenção do analito ( $V_R$ ) .....	61
<b>Equação 4</b> - Determinação do fator de retenção ( $k$ ) .....	61
<b>Equação 5</b> - Determinação do fator de separação ( $\alpha$ ) .....	61
<b>Equação 6</b> - Determinação da resolução de pico ( $R$ ) .....	62
<b>Equação 7</b> - Determinação do número de pratos teóricos ( $N$ ) .....	62
<b>Equação 8</b> - Determinação da retenção de fase estacionária ( $R_{FE}$ ) .....	62
<b>Equação 9</b> - Determinação da retenção de fase estacionária ( $R_{FE}$ ) .....	62
<b>Equação 10</b> - Determinação da retenção de fase estacionária percentual ( $R_{FE}(\%)$ ) .....	62
<b>Equação 11</b> - Determinação do $K$ para modo normal de operação .....	89
<b>Equação 12</b> - Determinação do $K$ para modo reverso de operação .....	89
<b>Equação 13</b> - Determinação do Volume extra coluna ( $V_{EC}$ ) .....	90
<b>Equação 14</b> - Determinação da $R_{FE}$ no sistema de HPCCC .....	92
<b>Equação 15</b> - Determinação da $R_{FE}(\%)$ no sistema de HPCCC .....	92



## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BV	Balão Volumétrico
CCC	Cromatografia Contracorrente
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD	Ciclodextrina
CDTF	Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico
$C_{FE}$	Concentração de soluto na fase estacionária
$C_{FM}$	Concentração de soluto na fase móvel
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CM- $\beta$ -CD	Carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina
COSMO-RS	<i>Conductor-like Screening Model for Real Solvents</i>
DM- $\beta$ -CD	Heptakis-(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina
DMF	Drug Master File
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Eletroforese Capilar
ELS	<i>Evaporative Light Scattering</i>
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de Massas
EMA	<i>European Medicines Evaluation Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase Estacionária
FEQ	Fase Estacionária Quiral
FI	Fase Inferior
FS	Fase Superior
G.U.E.S.S.	<i>Generally Useful Estimate for Solvent Systems</i>
HP- $\beta$ -CD	2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
HP- $\gamma$ -CD	2-hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina
HPCCC	<i>High Performance Countercurrent Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
$^1\text{H-RMN}$	Ressonância Magnética Nuclear de Próton

HSCCC	<i>High Speed Countercurrent Chromatography</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
K	Coeficiente de partição
k	Fator de retenção
N	Número de Pratos Teóricos
NRTL-SAC	<i>Nonrandom Two-liquid Segment Activity Coefficient</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PZQ	Praziquantel
PZQ SQR	Praziquantel substância química de referência
PZQ W <sub>L</sub>	Quantidade de praziquantel presente na fase inferior do SSB, em miligramas
PZQ W <sub>T</sub>	Quantidade total de praziquantel adicionada ao tubo de ensaio, em miligramas
PZQ W <sub>U</sub>	Quantidade de praziquantel presente na fase superior do SSB, em miligramas
R	Resolução de Pico
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
R <sub>FE</sub>	Retenção de Fase Estacionária
rpm	Rotações por minuto
SA	Solução Amostra
SBE-β-CD	Sulfobutiléter-β-ciclodextrina
SE	Solução Estoque
SSB	Sistema de Solventes Bifásico
SQ	Seletor Quiral
SQR	Substância Química de Referência
TB-β-CD	Heptakis-(2,3,6-tri-O-benzoil)-β-ciclodextrina
T <sub>R</sub>	Tempo de Retenção
UNIFAC	<i>Universal Quasichemical Functional-group Activity Coefficients</i>
UV	Ultravioleta
V <sub>C</sub>	Volume da Coluna
V <sub>CA</sub>	Volume da Coluna Analítica
V <sub>EC</sub>	Volume extra coluna
V <sub>FE</sub>	Volume de Fase Estacionária no interior da coluna

$V_{FEEq}$	Volume de Fase Estacionária medido durante o equilíbrio dinâmico das fases no sistema
$V_{FM}$	Volume de Fase Móvel no interior da coluna
$V_R$	Volume de Retenção do Analito
$V_T$	Volume Total do Sistema de HPCCC
$W$	Largura de pico



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>37</b>
3.1. A Quiralidade e os Enantiômeros.....	39
3.1.1 Propriedades e importância biológica dos enantiômeros.....	40
3.1.2 Considerações regulatórias para desenvolvimento de fármacos quirais.....	42
3.2 Separação enantiomérica.....	44
3.2.1 Técnicas de separação enantiomérica.....	45
3.2.2 Seletores Quirais (SQs).....	46
3.2.2.1 Ciclodextrinas (CDs).....	47
3.2.2.2 Polissacarídeos.....	50
3.2.3 Modelagem molecular aplicada à enantioseparação.....	52
3.3 Cromatografia Contracorrente (CCC).....	52
3.3.1 Princípios e Evolução da CCC.....	52
3.3.2 Parâmetros cromatográficos em CCC.....	59
3.3.3 Sistema de Solventes Bifásico (SSB).....	63
3.3.3.1 Sistemas de Solventes Tradicionais.....	63
3.3.3.2 Sistemas de Solventes Aquosos.....	65
3.3.3.3 Outros Sistemas de Solventes.....	66
3.3.3.4 Seleção do Sistema de Solventes Bifásico.....	66
3.3.3.4.1 Seleção Empírica.....	67
3.3.3.4.2 Seleção Semiempírica.....	69
3.3.3.4.3 Seleção Teórica.....	70
3.3.4 Modos de eluição.....	71
3.3.4.1 Eluição isocrática e Eluição gradiente.....	71
3.3.4.2 Eluição com extrusão.....	71
3.3.4.3 Eluição em modo duplo.....	72

3.3.4.4 Reciclagem.....	72
3.3.4.5 Refinamento por zona de pH.....	73
3.3.5 Sistemas de Detecção.....	73
3.3.6 Aplicações da CCC.....	74
3.3.6.1 CCC aplicada à enantioseparação.....	74
3.3.7 Vantagens e Limitações da CCC.....	76
3.4 Esquistossomose e praziquantel.....	79
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
4.1 Materiais.....	85
4.1.1 Matéria-prima e Substância Química de Referência (SQR).....	85
4.1.2 Seletores quirais.....	85
4.1.3 Solventes.....	85
4.2 Métodos.....	85
4.2.1 Análise do praziquantel matéria-prima.....	85
4.2.2 Seleção do Sistema de Solventes Bifásico (SSB).....	86
4.2.2.1 Pré-varredura em CLAE.....	86
4.2.2.2 Determinação do coeficiente de partição ( <i>K</i> ) do PZQ em diferentes SSBs sem e com seletores quirais.....	87
4.2.2.3 Avaliação da solubilidade dos seletores quirais em diferentes SSBs	89
4.2.2.4 Determinação do tempo de separação ( <i>settling time</i> ) das fases ( <i>S<sub>T</sub></i> )	89
4.2.3 Desenvolvimento da metodologia para separação quiral de PZQ por HPCCC.....	89
4.2.3.1 Determinação do volume total ( <i>V<sub>T</sub></i> ) e do volume extra coluna ( <i>V<sub>EC</sub></i> ) do sistema de HPCCC.....	90
4.2.3.2 Preparo dos Sistemas de Solventes Bifásicos (SSBs) e da solução amostra.....	90
4.2.3.3 Estudo de estabilidade das soluções amostra de PZQ utilizadas para injeção no HPCCC.....	91
4.2.3.4 Análise do PZQ por HPCCC em diferentes SSBs sem e com seletor quiral.....	91
4.2.3.5 Avaliação da Retenção de Fase Estacionária ( <i>R<sub>FE</sub></i> ).....	92
4.2.3.6 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE quiral para análise das frações obtidas por HPCCC.....	93
4.2.3.6.1 Linearidade.....	94



4.2.3.6.2 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	94
4.3 Estudo de Modelagem Molecular do Praziquantel com Diferentes Seletores Quirais.....	95
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
5.1 Análise do praziquantel matéria-prima.....	99
5.2 Seleção do Sistema de Solventes Bifásico (SSB).....	99
5.2.1 Pré-varredura em CLAE.....	99
5.2.2. Determinação do coeficiente de partição ( $K$ ) do PZQ em diferentes SSBs sem e com seletores quirais.....	100
5.2.3 Determinação do tempo de separação ( <i>settling time</i> ) das fases ( $S_T$ )..	103
5.3 Desenvolvimento da metodologia para separação quiral de PZQ por HPCCC.....	103
5.3.1 Determinação do volume total ( $V_T$ ) e do volume extra coluna ( $V_{EC}$ ) do sistema de HPCCC.....	103
5.3.2 Estudo de estabilidade das soluções amostra de PZQ utilizadas para injeção no HPCCC.....	104
5.3.3 Análise do PZQ por HPCCC em diferentes SSBs sem seletor quiral....	104
5.3.4 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE quiral para análise das frações obtidas por HPCCC.....	107
5.3.4.1 Desenvolvimento do método analítico.....	107
5.3.4.2 Validação analítica.....	109
5.3.4.2.1 Linearidade.....	109
5.3.4.2.2 Precisão.....	113
5.3.5 Emprego da HP- $\beta$ -CD na separação quiral de PZQ.....	114
5.3.6 Emprego da HP- $\gamma$ -CD na separação quiral de PZQ.....	121
5.3.7 Emprego do ácido L-(+)-tartárico na separação quiral de PZQ.....	121
5.4 Estudo de Modelagem Molecular do Praziquantel com Diferentes Seletores Quirais.....	123
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>135</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>139</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>143</b>



---

## 1. INTRODUÇÃO

---



A quiralidade é uma propriedade intrínseca dos seres vivos. Assim, as diferentes respostas biológicas originadas de enantiômeros provém da discriminação estereosseletiva realizada pelos receptores biológicos, os quais são também compostos quirais. Essa característica é de extrema importância biológica, visto que muitos fármacos são quirais, e, sendo tais interações altamente específicas, diferenças na farmacodinâmica, farmacocinética, potência e toxicidade, de cada enantiômero, podem ser observadas (MAIER, FRANCO e LINDNER, 2001; AHUJA, 2011; SOLOMONS e FRYHLE, 2012).

A crescente inserção de fármacos enantiomericamente puros no mercado farmacêutico reflete o aumento do controle por parte das agências reguladoras, que levaram as indústrias farmacêuticas a fornecerem evidências científicas para justificar sua escolha pela comercialização de um dado racemato, ao invés da comercialização de um de seus enantiômeros (BERTHOD, 2010; ZEID, 2011; SOLOMONS e FRYHLE, 2012). Para garantir a segurança e eficácia dos fármacos disponíveis e em desenvolvimento, o controle da composição estereoquímica, desde a síntese até o consumo, é aplicável, envolvendo controle de qualidade e estudos farmacológicos, sendo necessário isolar e avaliar cada um dos enantiômeros separadamente (SANTORO e SINGH, 2001; SINGH, KEDOR-HACKMANN e SANTORO, 2006; BERTHOD, 2010; ZEID, 2011). Neste contexto, surgiu a necessidade de avanços crescentes no desenvolvimento de métodos analíticos e preparativos eficientes para separação de enantiômeros, sendo que algumas metodologias em escala preparativa se sobressaem à síntese enantiosseletiva por demandarem tempo e custo inferiores (FRANCOTTE, 2001; SINGH, KEDOR-HACKMANN e SANTORO, 2004; JÚNIOR, 2006; NGUYEN, HE e PAM-HUY, 2006).

Nas últimas décadas, as separações de enantiômeros têm sido amplamente realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC). No método por CLAE, um seletor quiral é quimicamente ligado a um suporte sólido com o objetivo de separar os enantiômeros de acordo com sua afinidade pelo mesmo. No entanto, este método requer custos elevados para imobilizar o seletor quiral sobre o suporte sólido e o rendimento é limitado. Para aplicações farmacêuticas, a atenção tem sido direcionada principalmente para a separação de compostos quirais em escala preparativa, particularmente na indústria farmacêutica (MAIER, FRANCO e LINDNER, 2001; MA e ITO, 2014). Neste contexto de crescente demanda de

substâncias enantiomericamente puras e na busca por metodologias de baixo custo, que demandem menor tempo, que sejam de fácil escalonamento e que o uso da escala preparativa permita elevada carga de amostra, a cromatografia contracorrente (CCC) tornou-se uma alternativa de escolha (SUTHERLAND, 2007; BERTHOD, RUIZ-ÁNGEL e CARDA-BROCH, 2009; TONG *et al.*, 2014).

A cromatografia contracorrente é uma técnica de separação líquido-líquido baseada nas diferenças de particionamento dos componentes de uma mistura, entre duas fases líquidas imiscíveis, compostas por dois ou mais solventes. Neste método cromatográfico, uma das fases líquidas é empregada como a fase estacionária (FE), o qual é mantida na tubulação espiral, denominada de coluna, através de campos gravitacionais, gerados por um movimento centrífugo, enquanto a outra fase é bombeada através do sistema, como fase móvel (FM). A proporção relativa do soluto que se distribui em cada uma das duas fases é determinada por seu respectivo coeficiente de partição ( $K$ ) (HOSTETTMANN, MARSTON e HOSTETTMANN, 1998).

Através da técnica de CCC é possível realizar a separação de enantiômeros com a utilização de um seletor quiral (SQ) que apresente enantiosseletividade suficientemente alta para o racemato a ser analisado (MINGUILLÓN, 2012; HUANG e DI, 2015). Para auxiliar na escolha do SQ mais apropriado para determinada enantioseparação, estudos de modelagem molecular podem ser utilizados. Estes consistem, entre outras aplicações, em uma ferramenta computacional aplicada em complementação às análises experimentais, devido às limitações das mesmas. O objetivo é compreender os mecanismos de complexação envolvidos entre enantiômeros/seletores quirais e correlacionar com os resultados experimentais (LI *et al.*, 2012; ELBASHIR e ABOUL-ENEIN, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015).

Devido à ausência de um suporte sólido, o que promove uma vantagem sobre a técnica de CLAE, e pelo fato da partição líquido-líquido ocorrer de forma contínua, a cromatografia contracorrente apresenta vantagens distintas na separação quiral, como a elevada capacidade de carga de amostra e ausência de adsorção da mesma, além da baixa demanda de solvente por quantidade de substrato processado (MINGUILLÓN, 2012; HUANG e DI, 2015). Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas mais avançadas de CCC, como a cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC, do inglês *high-speed countercurrent chromatography*) e a

cromatografia contracorrente de alta eficiência (HPCCC, do inglês *high performance countercurrent chromatography*). A HSCCC baseia-se em um sistema de equilíbrio hidrodinâmico, o qual é concebido com a utilização de um movimento planetário síncrono, gerando melhor eficiência de separação, ganhos no tempo de análise e na capacidade de carregamento de amostra. A técnica mais atual é a HPCCC, a qual foi desenvolvida com o aumento da velocidade de rotação e campo gravitacional, o que finalmente levou a maior retenção da fase estacionária na coluna, aumento da eficiência e tempos de análise mais curtos, sendo apresentada como instrumento poderoso frente às demais técnicas de CCC (PAN e LU, 2007; SUTHERLAND e FISHER, 2009; GUZLEK, WOOD e JANAWAY, 2009; YAO *et al.*, 2012; HUANG e DI, 2015).

O fármaco praziquantel (PZQ) é um anti-helmíntico de amplo espectro utilizado no tratamento de todos os tipos de esquistossomose. Faz parte da lista de fármacos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) e apresenta vantagens como eficácia, segurança, conveniência operacional e custo razoável (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; WHO, 2006, 2013; CIOLI, *et al.*, 2014; ALSAQABI e LOTFY, 2014; BRASIL, 2014a). É obtido como mistura racêmica, sendo que o enantiômero *R*-(-)-PZQ é ativo, enquanto o *S*-(+)-PZQ está associado aos efeitos colaterais, bem como ao sabor amargo. Estas informações demonstram que a substituição da mistura racêmica de praziquantel pela espécie *R*-(-)-PZQ, levaria a redução da dose necessária para a metade nas formulações, além de promover redução no sabor amargo de preparações líquidas, fator importante para a adesão ao tratamento, principalmente por crianças (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; MEYER *et al.*, 2009; CIOLI, *et al.*, 2014).

Além das dificuldades técnicas e financeiras da síntese enantiosseletiva, percebe-se a falta de interesse das indústrias farmacêuticas por este fármaco, visto que a esquistossomose é uma doença negligenciada. Por conseguinte, a maioria das tentativas de solucionar o problema são oriundas de universidades, institutos de pesquisa e laboratórios governamentais. Além disso, a síntese da mistura racêmica é um procedimento de baixo custo, o que incentiva o uso da mesma, levando ao desenvolvimento de metodologias de separação para obtenção do enantiômero *R*-(-)-PZQ (DECIT, 2010; BRASIL, 2009a; BRASIL, 2014a).

Neste sentido, com o objetivo de promover a separação dos enantiômeros do PZQ, trabalhos anteriores utilizaram CLAE com coluna de fase estacionária quiral, composta de derivados de celulose ou amilose e também derivados de ciclodextrinas e antibióticos (KELLY, HE e STEWART, 1993; BONATO *et al.*, 1999; DING *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; FARIAS, 2013). Alguns estudos aplicaram a técnica de EC utilizando derivados de ciclodextrinas como seletores quirais (BONATO *et al.*, 2001; MATTHIJS *et al.*, 2004). Também constam relatos de processos cromatográficos contínuos em escala preparativa, utilizando fases estacionárias com seletores quirais, porém, alguns não obtiveram aceitável potencial de discriminação (CHING *et al.*, 1993; LIM *et al.*, 1995; LIM e CHING, 1996). Até a presente data, verificou-se que não constam relatos na literatura científica sobre a separação quiral de PZQ através da técnica de HPLC, o que justifica a possibilidade de emprego da mesma para a separação dos enantiômeros deste fármaco, trabalho que poderá contribuir para a separação quiral em escala industrial.



---

## **2. OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo Geral:

Empregar a técnica de Cromatografia Contracorrente de Alta Eficiência (HPCCC) na separação dos enantiômeros de praziquantel, determinando o sistema de solventes bifásico (SSB) apropriado e, com auxílio de modelagem molecular, o seletor quiral (SQ) mais promissor para a separação.

## 2.2 Objetivos Específicos:

- Determinar o coeficiente de partição do fármaco praziquantel em diferentes sistemas de solventes bifásicos, na ausência e na presença de seletores quirais em diferentes concentrações;
- Avaliar a solubilidade de diferentes seletores quirais em relação aos sistemas de solventes propostos;
- Avaliar diferentes sistemas de solventes bifásicos frente aos parâmetros ideais para aplicação na separação quiral de praziquantel por HPCCC;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral, para análises complementares das frações coletadas por HPCCC.
- Avaliar diferentes seletores quirais, experimentalmente e com auxílio de modelagem molecular, na separação quiral de praziquantel por HPCCC;



---

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

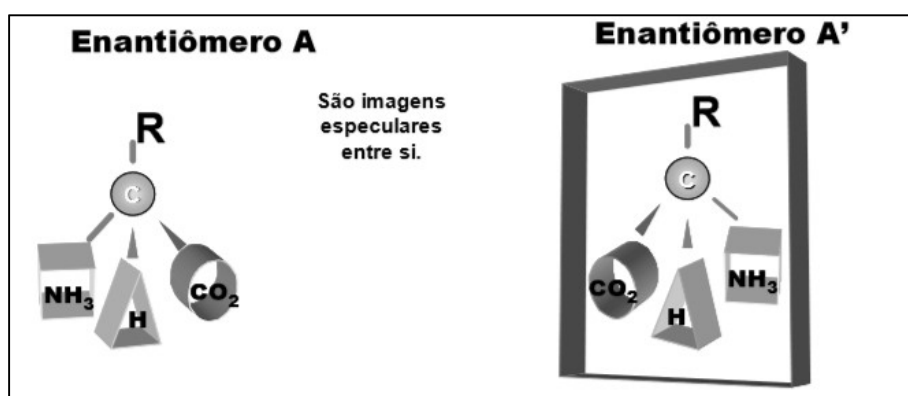
---



### 3.1 A Quiralidade e os Enantiômeros

O início do estudo e da compreensão dos fenômenos quirais e, por consequência, da estereoquímica, é atribuído, em parte, a Jean-Baptist Biot, Louis Pasteur e van'Hoff/Le Bel que descobriram, durante o século XIX, a capacidade de alguns compostos de desviar a luz plano polarizada, a assimetria molecular desses compostos e a configuração tetraédrica do átomo de carbono, respectivamente. A partir dessas descobertas foi possível compreender que substâncias que não possuem elemento de simetria no arranjo espacial de seus grupos ligantes irão apresentar-se na forma de um par de enantiômeros, os quais são isômeros, ou seja, substâncias diferentes de mesma fórmula molecular, porém, que apresentam imagens especulares entre si e não sobreponíveis (Figura 1). Os enantiômeros só ocorrem em compostos cujas moléculas apresentam quiralidade, que constitui a propriedade geométrica de um objeto rígido (ou arranjo espacial de pontos ou átomos) de não ser sobreponível à sua imagem especular. Se um objeto (ou molécula) é sobreponível à sua imagem especular, então é denominado de aquiral. A molécula é considerada aquiral se possuir um plano de simetria (ou plano especular), ou seja, um plano imaginário que corta a molécula de modo que as duas metades sejam uma a imagem especular da outra (MOSS, 1996; ORLANDO *et al.*, 2007; WOLF, 2008; BERTHOD, 2010; SOLOMONS e FRYHLE, 2012).

Figura 1 - Representação de dois enantiômeros.



Fonte: Adaptado de Orlando *et al.* (2007).

Uma forma de reconhecer a existência de um par de enantiômeros é quando a molécula contém um átomo tetraédrico ao qual se ligam quatro diferentes átomos ou grupos de átomos. Este átomo é denominado de centro de quiralidade,

frequentemente marcado com um asterisco na estrutura molecular (MOSS, 1996; SOLOMONS e FRYHLE, 2012).

De acordo com o arranjo espacial, os enantiômeros recebem os prefixos *R* ou *S*, seguindo o sistema de nomenclatura desenvolvido pelos químicos R. S. Cahn, C. K. Ingold e V. Prelog em 1966 e adotado pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), o sistema Cahn-Ingold-Prelog (CIP) ou sistema *R,S*. Tais prefixos (*R*) e (*S*) são as palavras *rectus* e *sinister*, em latim, que significam direito e esquerdo, respectivamente. Existe também outra nomenclatura atribuída aos enantiômeros e que está relacionada à sua capacidade de desviar a luz plano-polarizada para a direita (*dextrógiro*, *D* ou *+*) e para a esquerda (*levógiro*, *L* ou *-*) (MOSS, 1996; BERTHOD, 2010; SOLOMONS e FRYHLE, 2012). Esta propriedade que compostos quirais podem apresentar, depende não somente do arranjo espacial dos seus átomos, mas também do meio em que eles se encontram. Dessa forma, podemos perceber que as denominações *R-S* e *D-L* são independentes e, portanto podemos ter enantiômeros (*S*)-(+)- ou (*S*)-(-)- e, da mesma maneira, o enantiômero (*R*)-(+)- ou (*R*)-(-)- (ORLANDO *et al.*, 2007; BERTHOD, 2010).

A mistura equimolar de um par de enantiômeros é chamada de racemato ou mistura racêmica e como não apresenta capacidade de desviar a luz plano-polarizada, é frequentemente representada pelo prefixo ( $\pm$ )-, *rac*- ou *racem*- ou ainda através dos símbolos *RS* ou *SR*. A falta de atividade óptica, neste caso, resulta do fato de que um dos enantiômeros desvia o plano da luz polarizada para um determinado valor, enquanto que seu par o desvia, na mesma proporção, mas na direção oposta, anulando o valor final (BERTHOD, 2010; SOLOMONS e FRYHLE, 2012).

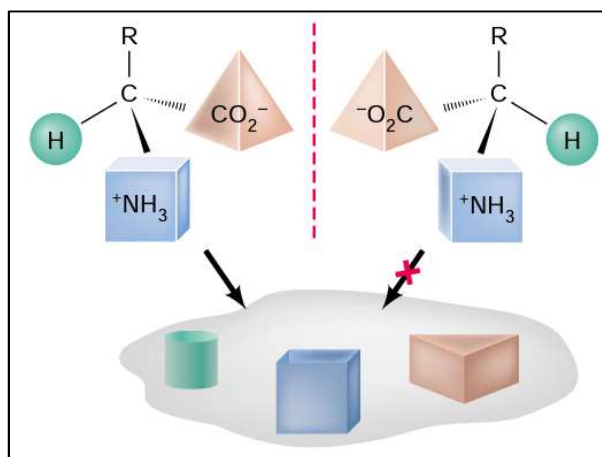
### 3.1.1 Propriedades e importância biológica dos enantiômeros

Para os enantiômeros puros, ou seja, quando todas as suas moléculas (dentro dos limites de detecção) possuem o mesmo senso quiral (configuração espacial), as propriedades físicas são idênticas, tais como, ponto de fusão, ponto de ebulição e solubilidade em solventes comuns. No caso de uma mistura de enantiômeros, independente da proporção em que se encontrem, estas propriedades se diferem (MOSS, 1996; SOLOMONS e FRYHLE, 2012).



Quimicamente os enantiômeros demonstram comportamentos diferentes somente em ambientes quirais. Uma vez que a maioria dos receptores endógenos, como proteínas de membranas e enzimas, também são compostos quirais, a discriminação estereosseletiva de dois enantiômeros por receptores biológicos deve-se à interação espacial específica enantiômero-receptor. Esta interação é explicada pela teoria dos três pontos, inspirada por Easson e Stedman e, 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). Essa característica é de extrema importância biológica, visto que a maioria dos fármacos é quiral, pois tais interações altamente específicas podem originar, além de diferenças farmacodinâmicas, diferenças farmacocinéticas, ocasionando distinção quanto absorção, metabolismo, potência e a toxicidade de cada enantiômero (AHUJA, 2011; SOLOMONS e FRYHLE, 2012).

Figura 2 - Representação esquemática da teoria dos três pontos.



Fonte: Adaptado de SOLOMONS e FRYHLE (2012).

Em relação à ação farmacológica de fármacos quirais, comportamentos biológicos distintos podem ser esperados: (a) toda a atividade farmacológica é atribuída a apenas um dos enantiômeros, sendo que o outro é inativo; (b) os enantiômeros possuem idêntica atividade farmacológica, tanto qualitativamente, como quantitativamente; (c) os enantiômeros possuem a mesma ação farmacológica, mas potências diferentes; (d) os enantiômeros possuem diferentes ações farmacológicas, mas que são desejáveis terapeuticamente; (e) um dos enantiômeros é responsável pela ação farmacológica desejada e o outro pelos efeitos colaterais indesejados; (f) a

ação farmacológica de um enantiômero, ou até mesmo seu efeito colateral, é antagonizada pelo outro enantiômero (LIMA, 1997).

No caso em que dois enantiômeros possuem potência de ação diferente, a IUPAC recomenda que o enantiômero de maior ação farmacológica e afinidade pelo receptor seja denominado de eutômero enquanto que o outro enantiômero responsável pelo efeito indesejado seja denominado distômero. Além disso, a proporção da atividade do eutômero em relação ao distômero recebe a denominação de razão eudísmica e representa a eficácia ou estereoespecificidade do enantiômero mais ativo (MOSS, 1996; NGUYEN, HE e PHAM-HUY, 2006).

Os enantiômeros de fármacos podem ter perfis de atividade biológica distintos, muitas vezes, com consequências graves. Após a tragédia da talidomida (1957-1961), em razão do (S)-(-)-enantiômero apresentar efeitos teratogênicos, foi introduzido um rigoroso controle em relação à pureza dos enantiômeros utilizados na medicina, por parte das agências reguladoras mundiais, com atenção especial no caso de fármacos quirais. Este controle levou as indústrias farmacêuticas a fornecerem evidências científicas para justificar sua escolha pela comercialização de um dado racemato, ao invés da comercialização de um de seus enantiômeros na inserção de novos fármacos (BERTHOD, 2010; SOLOMONS e FRYHLE, 2012).

### **3.1.2 Considerações regulatórias para desenvolvimento de fármacos quirais**

Vários países possuem legislação própria quanto ao desenvolvimento e comercialização de fármacos enantioméricos (FDA, 1992; EMEA, 1993; CANADA, 2000). A primeira abordagem direta à questão da quiralidade, por parte das agências reguladoras, relacionada ao desenvolvimento de novos fármacos, foi realizada no ano de 1992 pelo Food and Drug Administration (FDA). O FDA publicou o documento intitulado *FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs*. O racional para este documento surgiu da convergência de dois principais aspectos. Como primeiro aspecto, tem-se o crescente aumento de dados históricos demonstrando diferentes características dos enantiômeros em sistemas biológicos, tanto quanto diferenças farmacocinéticas na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação; entretanto, estas diferenças não foram rotineiramente estudadas, devido a dificuldade na separação. O segundo aspecto foram os avanços tecnológicos que permitiram a separação comercial em larga escala de compostos quirais e a produção

de um único enantiômero. Desta forma, as perspectivas do FDA mudaram para abordar controles de fabricação aceitáveis relacionados à síntese, impurezas, avaliação farmacológica e toxicológica, caracterização do metabolismo e distribuição, bem como a avaliação clínica de fármacos quirais (FDA, 1992; ZEID, 2011).

No ano seguinte, em 1993, foi a vez da European Medicines Evaluation Agency (EMA) publicar seu guia a respeito, intitulado *Investigation of Chiral Active Substances*. Baseia-se em muitos pontos do guia publicado pelo FDA, mas apresenta orientações mais específicas para estudos na área química e não clínicos (EMA, 1993; ZEID, 2011). As autoridades regulatórias japonesas (Ministry of Health, Labour and Welfare) não publicaram, até a presente data, um guia específico para o desenvolvimento de compostos quirais. Elas utilizam uma abordagem semelhante as adotadas pelo FDA e EMA e observa-se um aumento no desenvolvimento de enantiômeros em relação a racematos (SHIMAZAWA *et al.*, 2008; ZEID, 2011). Em 1998, a agência reguladora canadense, Health Canada, publicou o seu guia intitulado *Stereochemical Issues in Chiral Drug Development*, o qual tornou-se válido em maio de 2000. O conteúdo deste guia segue muito do que o FDA e EMA determinaram em seus guias em relação as considerações sobre o desenvolvimento de enantiômeros puros, racematos e misturas não-racêmicas. A diferença está no fato de que este guia é o mais recente sobre o assunto e apresenta mais detalhes sobre o momento em que certos métodos analíticos ou avaliações deve ser realizados (CANADA, 2000; ZEID, 2011).

Apesar das agências reguladoras supracitadas diferirem em alguns pontos em relação às normas exigidas, parece haver um consenso de que comparações entre enantiômeros e misturas racêmicas, em estudos de farmacocinética, farmacodinâmica e toxicológicos, envolvendo animais e humanos, são requisitos para uma adequada avaliação científica na escolha do desenvolvimento de um enantiômero ou racemato. Além disso, estas agências convergem para o fato de que estes estudos são uma ligação para a permissão do uso dos dados toxicológicos do racemato, em conjunto com os dados de toxicidade a longo prazo para um único enantiômero. O foco das agências é: (1) desenvolver métodos enantiômero-específicos previamente ao desenvolvimento; (2) determinar a relativa contribuição farmacológica de cada enantiômero *in vitro* e *in vivo* (em animais e em humanos), comparada ao racemato; (3) comparar o perfil toxicológico do racemato com os enantiômeros separados para

confirmar a sua atividade relativa. De posse destes dados é que será possível tomar uma decisão cientificamente baseada se é adequado ou não prosseguir com o desenvolvimento do racemato, do enantiômero puro ou da mistura não-racêmica (ZEID, 2011).

No Brasil não há nenhuma legislação específica sobre desenvolvimento e comercialização de fármacos quirais publicada pela ANVISA. A exigência está relacionada às características do insumo farmacêutico ativo (IFA) quando do registro, renovação de registro ou alteração pós-registro de radiofármacos, medicamentos novos, específicos, similares e genéricos. A agência solicita dados sobre a estereoquímica do IFA, quando este apresentar quiralidade, principalmente em relação ao teor dos estereoisômeros, quando a proporção dos mesmos possa comprometer a eficácia e a segurança do medicamento (BRASIL, 2007a, 2007b, 2009b, 2009c, 2011, 2014b, 2016a e 2016b).

### **3.2 Separação enantiomérica**

A obtenção de substâncias enantiomericamente puras tornou-se um grande desafio para os pesquisadores e para a indústria farmacêutica e observa-se, ao longo dos anos, um aumento constante de enantiômeros puros, associado à diminuição acentuada da introdução de novos racematos (BERTHOD, 2010). Tal aumento somente se tornou possível devido a avanços crescentes das técnicas de separação enantiomérica (ou resolução) e sínteses enantiosseletivas (assimétrica). As estratégias para o desenvolvimento de fármacos quirais compreendem: (1) desenvolvimento de um racemato; (2) desenvolvimento de um enantiômero puro; (3) desenvolvimento de fármaco contendo razão fixa (não-racêmica) dos enantiômeros; (4) desenvolvimento de enantiômero a partir de fármaco racêmico já aprovado (*chiral switch*). Estas técnicas são fundamentais na produção e no controle de qualidade de fármacos enantiopuros, sendo aplicadas para garantir a qualidade e pureza de produtos de partida, intermediários de síntese e produtos finais, bem como para assegurar a estabilidade dos próprios fármacos e de seus medicamentos. Ao mesmo tempo, revelam-se imprescindíveis na pesquisa clínica de fármacos quirais, assim como em determinados estudos de bioequivalência (SRINIVAS, BARBHAIYA e MIDHA, 2001; FRANCOTTE, 2001; MAIER, FRANCO e LINDNER, 2001; AGRANAT, CANER e CALDWELL, 2002; FB 5 ed, 2010).

As vantagens do uso de fármacos enantioméricamente puros são evidentes: diminuição da dose total, redução dos efeitos indesejáveis e perfis farmacológicos superiores. A questão econômica não deve ser priorizada, com argumentos de que um custo proibitivo pode mesmo impedir a resolução em grande escala, pois esta questão não pode se contrapor aos fatores essenciais de saúde, muito embora, existam algumas situações onde a forma racêmica é permitida e mesmo indicada (AGRANAT, CANER e CALDWELL, 2002). O desenvolvimento do racemato ou da mistura não-racêmica pode ser justificado sob as seguintes condições: (1) os enantiômeros são instáveis *in vitro* ou sofrem racemização *in vivo*; (2) os enantiômeros tem propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas semelhantes; (3) não é tecnicamente factível separar os enantiômeros em quantidade suficiente ou com suficiente qualidade e (4) uma mistura não-racêmica pode ser justificada quando uma razão específica dos enantiômeros é esperada para melhora do perfil terapêutico do fármaco (SRINIVAS, BARBHAIYA e MIDHA, 2001; ZEID, 2011).

Embora a síntese assimétrica seja útil para a preparação de grandes quantidades de material e quando um dos enantiômeros é considerado tóxico ou inativo, o tempo requerido no seu desenvolvimento pode torná-la impraticável e não-atrativa, especialmente quando se necessita de apenas pequenas quantidades do enantiômero, como é o caso de algumas aplicações farmacêuticas. Por este motivo, a resolução de uma mistura racêmica é preferível e tem-se ainda, como vantagem, a produção dos dois enantiômeros com elevado grau de pureza óptica, essencial para testes farmacocinéticos, farmacológicos e farmacodinâmicos (FRANCOTTE, 2001; JÚNIOR, 2006; NGUYEN, HE e PAM-HUY, 2006).

### **3.2.1 Técnicas de separação enantiomérica**

A separação quiral, também designada por resolução quiral ou separação enantiomérica, é um procedimento utilizado para separar os dois isômeros de um composto racêmico e consiste em uma operação necessária tanto na indústria farmacêutica como na terapia clínica. Em relação à indústria farmacêutica, pode-se citar a síntese de fármacos quirais, a qual envolve procedimentos de controle de qualidade da rota sintética e de controle de possíveis impurezas originadas na síntese e decorrentes da degradação do fármaco, além do controle de qualidade de produtos acabados. As análises de fármacos quirais em fluidos biológicos são muito mais

complexas do que as suas quantificações e separações na indústria, embora possam utilizar as mesmas técnicas. Devido à complexidade das amostras biológicas e também às baixas concentrações de fármacos nos fluidos, a determinação destes exige primeiramente uma extração com elevada recuperação, seguida de uma técnica analítica de alta sensibilidade, precisão e reprodutibilidade. Portanto, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas técnicas de separação quiral que permitam baixo custo e, até mesmo aplicação em grande escala, são alvo da pesquisa acadêmica, bem como do avanço industrial (MAIER, FRANCO e LINDNER, 2001; NGUYEN, HE e PAM-HUY, 2006).

As técnicas de separação enantiomérica podem ser utilizadas para fins analíticos e preparativos, sendo que algumas técnicas podem atender às duas finalidades. A escolha final da técnica depende da natureza de cada fármaco e também da quantidade, do tempo e do custo da produção. As técnicas geralmente utilizadas para separação de enantiômeros são as seguintes: Cromatografia, Eletroforese Capilar, Cristalização, Membranas e Sensores, Extração Líquido-Líquido e Catálise Assimétrica por biotransformação. As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas e dentre elas temos: Cromatografia Gasosa, Cromatografia de Fluido Supercrítico, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e de Camada Delgada, Eletrocromatografia Capilar, Leito Móvel Simulado e Cromatografia Contracorrente. A maioria destas técnicas utiliza um seletor quiral (SQ), substância que irá promover a enantiodiscriminação, auxiliando no processo de separação dos enantiômeros (MAIER, FRANCO e LINDNER, 2001; NGUYEN, HE e PAM-HUY, 2006; NING, 2011).

A separação analítica de enantiômeros é mais frequentemente realizada por CLAE e Eletroforese Capilar, porém, como as indústrias farmacêuticas estão procurando desenvolvimento de métodos de baixo custo, que demandem menor tempo e que sejam de fácil escalonamento, em que o uso da escala preparativa permita elevada carga de amostra, a Cromatografia Contracorrente (CCC) é uma excelente opção para atender a todos estes requisitos (SUTHERLAND, 2007; BERTHOD, RUIZ-ÁNGEL e CARDA-BROCH, 2009).

### **3.2.2 Seletores Quirais (SQs)**

As moléculas que apresentam dois ou mais elementos de quiralidade são chamadas de diastereoisômeros e, diferente dos enantiômeros, não são

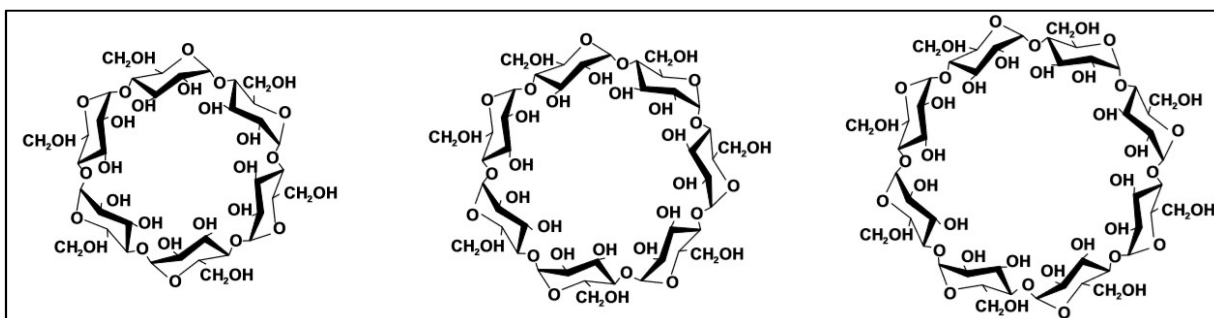
sobreponíveis e podem apresentar diferentes propriedades físicas e químicas em ambientes quirais e aquirais (WOLF, 2008; BERTHOD, 2010). O passo fundamental na separação enantiomérica e no reconhecimento quiral é a formação de complexos diastereoisoméricos transitórios entre os enantiômeros e o seletor quiral (SQ), e os diastereoisômeros assim formados podem ser então separados devido às diferenças em suas propriedades. O seletor quiral consiste em uma substância utilizada como auxiliar quiral, podendo ser adicionado à fase móvel (FM) ou adicionado/fixado à fase estacionária (FE) do sistema de separação (BERTHOD, 2010; SCRIBA, 2016). Interações iônicas, forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças repulsivas/atrativas de van der Waals, interações  $\pi$ - $\pi$ , interações íon-dipolo ou dipolo-dipolo e fenômenos de inclusão, contribuem para o processo de reconhecimento quiral (MAIER, FRANCO e LINDNER, 2001; BERTHOD, 2010).

Os diferentes seletores quirais utilizados para várias técnicas de separação enantiomérica podem ser obtidos de fontes naturais ou serem sintetizados, muitas vezes, a partir de fontes naturais, a fim de otimizar sua performance. Na Tabela 1 constam exemplos de seletores quirais, separados em classes e agrupados por fonte de obtenção. Dentre os SQs citados, as ciclodextrinas e os polissacarídeos merecem destaque por sua considerável aplicação.

### 3.2.2.1 Ciclodextrinas (CDs)

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos de seis a doze unidades de D-(+)-glicopirranose, conectadas por ligações  $\alpha$ -(1,4)-glicosídicas, sendo que as mais utilizadas apresentam seis, sete ou oito unidades de glicopirranose, conhecidas como  $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -CD, respectivamente (Figura 3 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) (HE, 2010; LOURENÇO, CASSIANO e CASS, 2010).

Figura 3 - Estrutura química da  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente.



Fonte: Adaptado de IACOVINO *et al.* (2017).

Tabela 1- Principais classes de seletores quirais agrupados por fonte de obtenção.

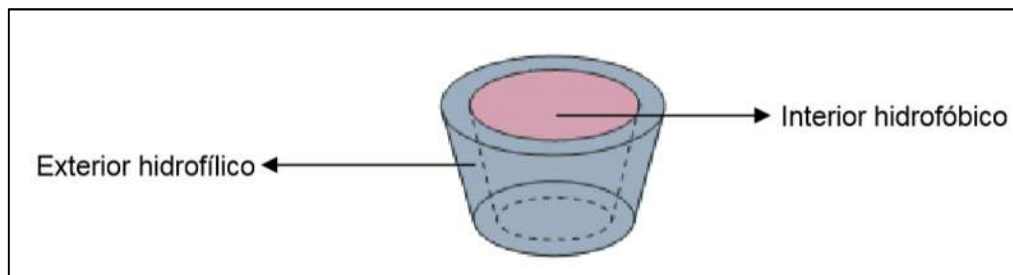
<b>Fonte de obtenção</b>	<b>Classe</b>	<b>Exemplo de Seletor Quiral</b>
<i>Natural</i>	Polissacarídeos	Celulose, Amilose, Amido, Dextran, Heparina, Pectinas
	Oligossacarídeos	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Ciclodextrinas, Dissacarídeos, Maltodextrinas
	Proteínas	Albumina sérica humana e bovina, Orosomucóide ( $\alpha$ -glicoproteína ácida), Membranas Ovomucóides, Celobiohidrolase, Avidina, Quimiotripsina, Ovotransferrina, Pepsina
	Glicopeptídeos macrocíclicos	Vancomicina, Teicoplanina, Ristocetina, Avoparcina
	Alcalóides da cinchona	Quinina, Quinidina
	Moléculas de baixo peso molecular	Aminoácidos, Ácido cólico/sais biliares, Alcalóides, Ácidos Tartáricos
<i>Semi-sintética</i>	Polissacarídeos modificados	Ésteres de polissacarídeos, Carbamatos de Polissacarídeos
	Oligossacarídeos modificados	Ciclodextrinas derivatizadas, Polímeros de ciclodextrinas
	Sulfatos de polissacarídeos	Dextran sulfato, $\lambda$ -carragenana, Derivados de condroitina
<i>Sintética</i>	Troca de ligantes	Complexos formados entre Cu(II), Ni(II) ou Zn(II) com L-aminoácidos, como L-histidina e L-prolina.
	Polímeros	Poli(N-acrilóil-(S)-fenilalanina etil éster); derivados de O,O'-diarilol-N,N'-dialil-l-tartardiamida; tartarato de O,O'-bis(3,5dimetilbenzoi)-N,N'-dialil-l-diamida; trans-1,2-ciclo-hexanodiil-bis-acrilamida
	Éteres coroa quirais	Derivados do Ácido 18-coroa-6-tetracarboxílico
	Tipo Pirkle	Whelk-O-1 (1-(3,5-Dinitrobenzamido)-1,2,3,4,-tetrahidrofenantreno); 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina

Fonte: Adaptado de MAIER, FRANCO e LINDNER (2001); BERTHOD (2010); LOURENÇO, CASSIANO e CASS (2010).



Apresentam uma cavidade em forma de cone truncado, com o interior de característica apolar/hidrofóbica contendo grupamentos éter, e as bordas maiores e menores da cavidade, revestidas com grupos hidroxila primários e secundários, respectivamente, originando um caráter hidrofílico (Figura 4). Desta forma, as moléculas orgânicas tendem a formar complexos de inclusão, introduzindo sua porção hidrofóbica na cavidade das CDs (HE, 2010; LOURENÇO, CASSIANO e CASS, 2010).

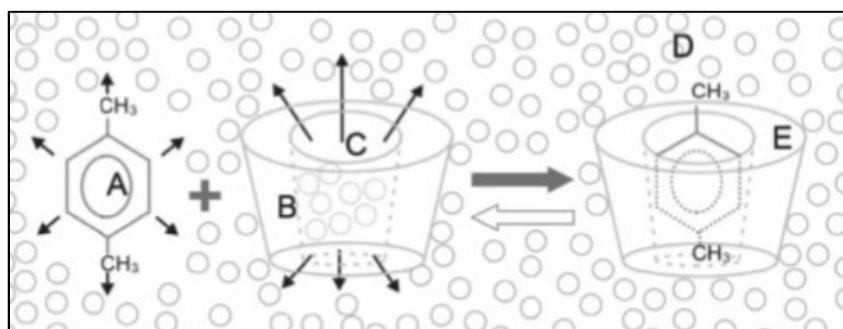
Figura 4 - Característica da cavidade das ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado de REZENDE (2008).

As CDs são amplamente utilizadas para a separação quiral, com sucesso, através de diversas técnicas, como exemplo a cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar (EC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia contracorrente (CCC). A complexação por inclusão é o mecanismo responsável pelo seu reconhecimento quiral, o qual é decorrente de suas estruturas geométricas e grupos funcionais disponíveis. No processo de reconhecimento quiral, os enantiômeros entram, pelo menos parcialmente, na cavidade das moléculas de ciclodextrina formando complexos diastereoisoméricos, estabilizados por diferentes forças de interação (Figura 5) (BERTHOD, 2010; LOURENÇO, CASSIANO e CASS, 2010).

Figura 5 - Representação gráfica da formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado de MIRANDA *et al.* (2011).

Legenda: (A) molécula de fármaco; (B) ciclodextrina (CD); (C) cavidade da ciclodextrina; (D) moléculas de água; (E) complexo fármaco-CD.

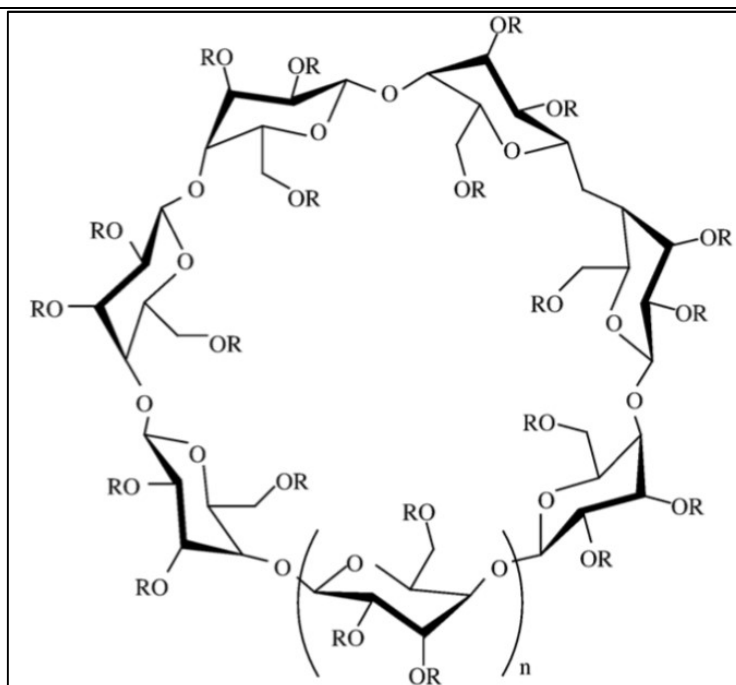
A derivação dos grupos hidroxila primários e secundários possibilitou o desenvolvimento de novas ciclodextrinas com diferentes funcionalidades, polaridades e cargas e, conseqüentemente, com diferentes tipos de interações. A Tabela 2 exemplifica os diferentes tipos de ciclodextrinas modificadas disponíveis, agrupadas de acordo com sua carga, podendo ser neutras, catiônicas ou aniônicas, além das ciclodextrinas nativas (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; BERTHOD, 2010; IACOVINO *et al.*, 2017).

### 3.2.2.2 Polissacarídeos

Amilose e celulose são os polissacarídeos mais utilizados como seletores quirais em diversas técnicas de separação enantiomérica, por apresentarem elevada enantioselectividade, estabilidade e eficiência de separação. Podem sofrer modificações, resultando em carbamatos ou ésteres, os quais representam suportes quirais amplamente utilizados como fases estacionárias em cromatografia líquida. Esta associação apresenta-se altamente eficaz para separações de enantiômeros por CLAE. Fases estacionárias quirais (FEQs) compostas por estes seletores são comercializadas por diferentes fabricantes, como exemplo temos Chiralcel® OD, Chiralpak® AD, Chiralpak® IA e IB, Lux® Cellulose-1, Lux® Celulose-2 e Lux® Amylose-2, dentre outras. Estes polímeros quirais oferecem tantos sítios de interação possíveis que muitos enantiômeros são discriminados encontrando três pontos de interação diferentes, sem possibilidade de conhecer exatamente o mecanismo de atuação, podendo estar envolvidas ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações dipolo-dipolo, além das interações  $\pi$ - $\pi$  (PÉREZ, SANTOS e MINGUILLÓN, 2006; BERTHOD, 2010; HE, 2010; LOURENÇO, CASSIANO e CASS, 2010; AMOSS e MAIER, 2011; CHANKVETADZE, 2012; SCRIBA, 2016).

Tabela 2 - Exemplos de ciclodextrinas utilizadas em enantioseparação.

<i>Tipo</i>	<i>Nome</i>	<i>n</i>	<i>R</i>	<i>Abreviação</i>
<i>Nativas</i>	$\alpha$ -ciclodextrina	0	-H	$\alpha$ -CD
	$\beta$ -ciclodextrina	1	-H	$\beta$ -CD
	$\gamma$ -ciclodextrina	2	-H	$\gamma$ -CD
<i>Neutras</i>	2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina	1	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	HP- $\beta$ -CD
	2-hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina	2	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	HP- $\gamma$ -CD
	Heptakis-(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina	1	$-\text{CH}_3$	DM- $\beta$ -CD
	Heptakis-(2,3,6-tri-O-benzoil)- $\beta$ -ciclodextrina	1	$-\text{COC}_6\text{H}_5$	TB- $\beta$ -CD
<i>Catiônicas</i>	2-hidroxipropiltrimetilamônio- $\beta$ -ciclodextrina	1	$-\text{CH}_2\text{OHCHCH}_2(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{Cl}^-$	QA- $\beta$ -CD
<i>Aniônicas</i>	Carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina	1	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	CM- $\beta$ -CD
	$\beta$ -ciclodextrina-sulfatada	1	$-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$	S- $\beta$ -CD
	Sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina	1	$-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$	SBE- $\beta$ -CD



Fonte: Adaptado de BLANCO e VALVERDE (2003); BREWSTER e LOFTSSON (2007); IACOVINO *et al.* (2017).

### 3.2.3 Modelagem molecular aplicada à enantioseparação

A modelagem molecular consiste, entre outras aplicações, em uma ferramenta computacional utilizada na elucidação dos mecanismos de reconhecimento quiral entre enantiômeros e seletores quirais, a fim de auxiliar na escolha do seletor quiral mais apropriado para determinada enantioseparação. É utilizada em complementação às análises experimentais, devido às limitações das mesmas. O objetivo é compreender os mecanismos de complexação envolvidos no reconhecimento quiral e correlacionar com os resultados experimentais de enantioseparação. Estudos de simulações de poses de acoplamento molecular (*molecular docking*), com auxílio de algoritmos de amostragem, fornecem informações sobre a geometria tridimensional da estrutura formada entre cada enantiômero e cada SQ, em relação às forças intermoleculares envolvidas, bem como à energia de ligação gerada. Programas computacionais de acoplamento molecular executam a tarefa de verificação das possíveis conformações e energias de ligação formadas pelos complexos enantiômero-SQ, através de funções de escore específicas, e a variação dessa energia, devido à formação do complexo, é dada pela energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) (MAIER, FRANCO e LINDNER, 2001; LI *et al.*, 2012; ELBASHIR e ABOULENEIN, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015).

No entanto, os algoritmos atuais não estimam a energia absoluta associada à interação intermolecular com precisão satisfatória. Questões relacionadas aos efeitos de solvente, íons e modificadores, por exemplo, são desafios importantes que requerem atenção no desenvolvimento de um estudo de modelagem molecular. Da mesma forma, entender os princípios pelos quais as interações ocorrem, demonstra o considerável potencial que estes estudos representam na pesquisa e desenvolvimento farmacêuticos (MAIER, FRANCO e LINDNER, 2001; BERTHOD, 2010; FERREIRA *et al.*, 2015).

**O texto completo da dissertação defendida que ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 53 a 78 foi suprimido, por tratar-se de manuscrito submetido à publicação. Consta da descrição dos seguintes itens: Cromatografia Contracorrente (CCC), Princípios e Evolução da CCC, Parâmetros Cromatográficos em CCC, Sistema de Solventes Bifásico (SSB), Modos de eluição, Sistemas de Detecção, Aplicações em CCC, Vantagens e Limitações da CCC.**

























































### 3.4 Esquistossomose e praziquantel

A esquistossomose, popularmente conhecida como “barriga d’água”, representa a segunda doença tropical de maior prevalência mundial, após a malária, constituindo uma das doenças parasitárias de elevada ocorrência nos países em desenvolvimento. Trematódeos do gênero *Schistosoma* compreendem seu agente etiológico, que têm como hospedeiro intermediário caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*. A fase inicial da doença pode ser sintomática ou assintomática; já a fase tardia inicia-se a partir dos seis meses após a infecção, podendo durar vários anos. Devido à sua localização no corpo humano, o parasita ocasiona a obstrução dos vasos do intestino e do fígado, sendo esta a causa da maioria dos sintomas da doença, podendo levar ao óbito (WHO, 2006; TAYLOR, 2008; BRASIL, 2009a; DECIT, 2010; BRASIL, 2014a).

É considerada um grande problema de saúde pública, afetando principalmente as zonas rurais, estando associada à pobreza e à falta de saneamento básico, devido ao baixo índice de desenvolvimento econômico. No Brasil, a transmissão da esquistossomose é ativa em alguns estados, mais intensamente na costa litorânea da região nordeste até importantes bacias hidrográficas da região sudeste. Apesar de fazer parte das estratégias do Ministério da Saúde, é considerada uma doença negligenciada e afeta cerca de 240 milhões de pessoas em todo o mundo e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2014a; WHO, 2016) .

É uma doença de veiculação hídrica, cuja transmissão ocorre quando o indivíduo entra em contato com águas superficiais contaminadas onde existam os hospedeiros intermediários, os quais liberam as cercárias, larvas do *Schistosoma* em estado maduro, que penetram na pele e mucosa de seres humanos. A incubação dura em torno de um mês e é caracterizada por febre, mal estar, anorexia, tosse e fadiga, correspondendo à migração do parasita pela corrente sanguínea. Na fase adulta, as larvas fixam-se nos sistemas porta e mesentérico, e são eliminadas nas fezes. Ainda que inicialmente assintomática, a esquistossomose pode originar desnutrição, anemia e implicações no crescimento e desenvolvimento de crianças. As formas crônicas da doença são classificadas de acordo com o órgão mais acometido, podendo ser hepatointestinal, hepática, vasculopulmonar, glomerulopática, neurológica,

pseudoneoplásica ou linfoproliferativa. A suscetibilidade ao verme independe de sexo e idade, mas a doença é mais crítica em crianças em idade escolar, visto que apresentam necessidades nutricionais aumentadas e podem estar continuamente expostas ao solo e água contaminados, sem proteção e adequada higiene pessoal (DECIT 2010; BRASIL, 2009a; BRASIL, 2014a).

O anti-helmíntico de escolha para o tratamento dos cinco tipos de esquistossomose é o praziquantel (PZQ), devido à sua eficácia e segurança comprovadas, além da sua conveniência operacional e custo razoável, embora sua dose eficaz seja consideravelmente elevada. Faz parte da lista de fármacos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS), destacando-se pelo fato da administração em dose única (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; WHO, 2006, 2013; CIOLI, *et al.*, 2014; ALSAQABI e LOTFY, 2014; BRASIL, 2014a). Outro fármaco também eficaz contra a esquistossomose é a oxamniquina, porém, além de não atuar contra todos os tipos de esquistossomos, apresenta efeitos colaterais no sistema nervoso central, além do custo superior ao PZQ (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2014a).

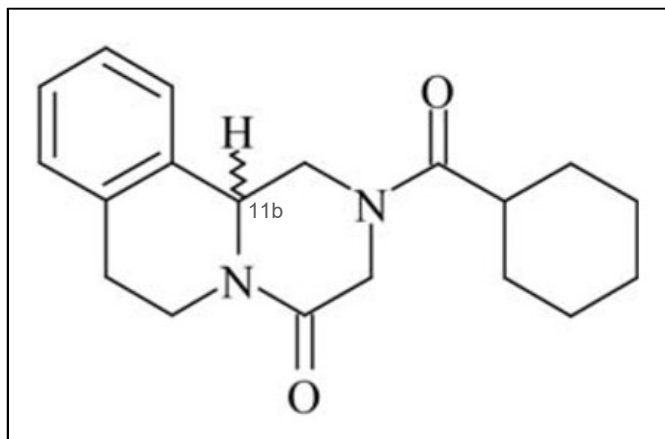
Apesar das significativas reduções nos custos decorrentes da expiração da patente, o praziquantel continua sendo um dos antihelmínticos mais caros do mercado. Vários estudos têm demonstrado que os custos dos medicamentos representam a proporção mais significativa dos gastos totais incorridos por um programa de controle da esquistossomose (WHO, 2013).

O PZQ, de nome químico 2-(Cicloexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexaidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona,  $C_{19}H_{24}N_2O$ , possui um centro quiral na posição 11b (Figura 6). Apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco, muito pouco solúvel em água, facilmente solúvel em etanol e diclorometano, com ponto de fusão de 136°C a 142°C, massa molecular 312,41 g/mol (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; FB 5 ed, 2010). É um fármaco anti-helmíntico de amplo espectro que atua provavelmente através da inibição da bomba de  $Na^+$  e  $K^+$  dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e bivalentes, principalmente o cálcio, o que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica, levando à morte do parasita. Além disso, o fármaco promove alterações no tegumento do parasita, que



compreende uma camada externa protetora (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; CIOLI *et al.*, 2014; ALSAQABI e LOTFY, 2014).

Figura 6 - Representação da estrutura química do praziquantel.



Fonte: Adaptado de FB 5 ed (2010).

O PZQ é administrado como racemato, sendo que o enantiômero *R*-(-)-PZQ é ativo, enquanto o *S*-(+)-PZQ é inativo, além de ser responsável pelos efeitos colaterais e pelo sabor amargo desagradável do fármaco. Efeitos colaterais mais comuns compreendem distúrbios gastrointestinais (náusea, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia com sangue ou muco), cefaléia, vertigem, dores musculares e articulares, erupções cutâneas, febre baixa, hepatomegalia e esplenomegalia (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; MEYER *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2016). A partir desta perspectiva, apenas metade da composição do fármaco administrada é, de fato, responsável pela ação farmacológica (MEYER *et al.*, 2009). De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o PZQ é representado pela classe II, apresentando alta permeabilidade, porém, baixa solubilidade. Tal característica também contribuiu para a necessidade de administração do fármaco em altas doses por via oral, visto que o mesmo precisa vencer a barreira aquosa do estômago e metabolismo hepático de primeira passagem, para alcançar a circulação sanguínea em concentrações plasmáticas eficazes (BECKET, SCHEP e TAN, 1999; SOUZA, FREITAS E STORPIRTIS, 2007). Para o tratamento da esquistossomose, doses entre 40 a 60 mg/kg de peso são requeridas e, no Brasil, o mesmo é comercializado na forma de comprimidos de 150, 500 e 600 mg (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; ANVISA 2017).

De acordo com Meyer e colaboradores (2009), a formulação líquida preparada somente com o *R*-(-)-PZQ apresentou sabor significativamente menos amargo que a formulação baseada na mistura racêmica. Considerando estas informações, pode-se inferir que a utilização do *R*-(-)-PZQ puro levaria à redução da dose necessária pela metade, e as formulações apresentariam sabor menos amargo, além de serem confeccionadas em formas farmacêuticas de menor dose, no caso de comprimidos, fatos que contribuem de forma significativa para a adesão ao tratamento, principalmente por crianças.

No entanto, a síntese da mistura racêmica apresenta baixo custo, o que reduz o interesse da indústria farmacêutica em realizar a síntese enantiosseletiva, a qual requer elevado tempo para seu desenvolvimento e possui alto custo, levando ao uso de técnicas de separação quiral. Neste sentido, trabalhos anteriores utilizaram CLAE com coluna de fase estacionária quiral, composta de derivados de celulose ou amilose e também derivados de ciclodextrinas e antibióticos para separação dos enantiômeros de PZQ (KELLY, HE e STEWART, 1993; BONATO *et al.*, 1999; DING *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; FARIAS, 2013). Alguns estudos aplicaram a técnica de EC utilizando derivados de ciclodextrinas como seletores quirais (BONATO *et al.*, 2001; MATTHIJS *et al.*, 2004). Também constam relatos de processos cromatográficos contínuos em escala preparativa, utilizando fases estacionárias com seletores quirais, porém, alguns não obtiveram aceitável potencial de discriminação (CHING *et al.*, 1993; LIM *et al.*, 1995; LIM e CHING, 1996). Até a presente data não foram encontradas publicações científicas que relatem o uso da técnica de cromatografia contracorrente de alta eficiência (HPCCC) para separação dos enantiômeros do fármaco praziquantel, o que justifica a investigação da possibilidade de emprego da mesma para tal finalidade.

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---



## **4.1 Materiais**

### **4.1.1 Matéria-prima e Substância Química de Referência (SQR)**

A matéria-prima do fármaco praziquantel (PZQ) micronizado foi doada pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos, localizado no Rio de Janeiro, identificada com o lote 201103267. A substância química de referência do praziquantel (PZQ SQR) foi adquirida junto à Farmacopeia Brasileira, identificada com o lote FB004/2012 com teor de 100,1658%, sendo empregada como referência nas análises que exigiram a quantificação do PZQ matéria-prima nas diferentes metodologias realizadas ao longo deste estudo.

### **4.1.2 Seletores quirais**

As substâncias 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) (Cavasol® W7 HP Pharma) e 2-hidroxiopropil- $\gamma$ -ciclodextrina (HP- $\gamma$ -CD) (Cavasol® W8 HP Pharma) utilizadas como seletores quirais nas análises por cromatografia contracorrente de alta eficiência foram gentilmente fornecidas pela empresa Ashland® (São Paulo, Brasil), identificadas com os lotes A1403A0150 e A1306A0113, respectivamente. Foi adquirida a substância ácido L-(+)-tartárico da marca Synth® (São Paulo, Brasil), também utilizada como seletor quiral (SQ) nas mesmas análises, identificada com o lote 199793.

### **4.1.3 Solventes**

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes solventes grau HPLC: hexano, acetato de etila, metanol, etanol, isopropanol, clorofórmio e diclorometano, obtidos de diferentes fabricantes/fornecedores. Utilizou-se também o solvente isopropanol grau P.A. (Sigma-Aldrich®, Brasil) para preparo de amostras. A água purificada utilizada em todas as análises foi produzida no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, da Faculdade de Farmácia da UFRGS, através de sistema de purificação de água, marca Millipore, modelo Direct-Q 3 UV.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Análise do praziquantel matéria-prima**

A análise do PZQ foi realizada para avaliar a manutenção da pureza do material doado pela instituição Farmanguinhos e garantir a qualidade dos estudos a serem realizados posteriormente. As análises foram realizadas conforme metodologia constante na monografia do fármaco na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).

Foram realizadas as análises em triplicata de perda por dessecação e doseamento, utilizando para tal estufa à vácuo (marca Precision, modelo 19), balança analítica (marca AND, modelo HM-202) e cromatógrafo líquido de alta eficiência (marca Shimadzu, modelo CBM-20A, equipado com controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20 AC, forno CTO-20AC e detector PDA SPD-M20A). O software utilizado para controle e aquisição dos dados foi o LC-Solution®. Para as análises por CLAE, utilizou-se coluna de fase estacionária composta por octadecilsilica - C18 (250 x 4,6 mm), de tamanho de partícula de 5 µm (X-Bridge, Waters®), fase móvel composta por água:acetoneitrila (40:60, v/v) com vazão de 1,5 mL/min, volume de injeção de 10 µL e detecção em comprimento de onda de 210 nm. As soluções utilizadas foram filtradas, previamente à análise, com filtro de membrana de diâmetro de poro de 0,45 µm (Merck Millipore®). Os equipamentos citados estão localizados no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

#### **4.2.2 Seleção do Sistema de Solventes Bifásico (SSB)**

##### **4.2.2.1 Pré-varredura em CLAE**

Para avaliar a polaridade do fármaco praziquantel e promover um direcionamento inicial para a família de solventes a ser utilizada nas análises por HPLC, realizou-se uma pré-varredura por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se coluna e cromatógrafo líquido, conforme descritos no item 4.2.1. Esta estratégia foi sugerida por Leitão e colaboradores (2005) para a separação dos flavonoides livres e glicosilados de *Siparuna guianensis* por CCC. De posse do tempo de retenção ( $T_R$ ) do analito, pode-se avaliar a polaridade do mesmo e promover o direcionamento para o SSB a ser utilizado. Esta pré-varredura também é indicada pelo fabricante do equipamento de HPLC, Dynamic Extractions, o qual sugere que, posteriormente, sejam definidas as proporções iniciais a serem testadas (DYNAMIC EXTRACTIONS, 2009). De acordo com a porcentagem de acetoneitrila, no tempo de retenção do analito, determinadas proporções da família HEMWat podem ser

seguidas (Tabela 3). Os SSBs indicados por números referem-se às misturas de solventes nas proporções descritas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** deste trabalho, a qual faz parte de protocolos previamente descritos na literatura científica, que servem como ponto de partida para separações em CCC.

Tabela 3- SSBs propostos para uso em CCC com base no comportamento do analito na pré-varredura por CLAE.

<b>% de acetonitrila no tempo de retenção do analito</b>	<b>SSBs indicados para o Modo Normal</b>	<b>SSBs indicados para o Modo Reverso</b>
0 - 20	2 - 7	1 - 5
20 - 40	8 - 13	5 - 10
40 - 60	13 - 19	10 - 16
60 - 80	19 - 25	16 - 22
80 - 100	25 - 27	23 - 27

*Fonte:* Adaptado de DYNAMIC EXTRACTIONS (2009).

*Notas:* A coluna da esquerda indica a porcentagem de acetonitrila no momento da eluição do analito no modo gradiente e relaciona com SSBs indicados para o modo normal (coluna do meio) ou modo reverso (coluna da esquerda) de operação em CCC. Os SSBs indicados devem ser verificados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** deste trabalho.

A solução amostra (SA) foi preparada na concentração de 0,18 mg/mL de PZQ em água:acetonitrila (40:60, v/v) e foi filtrada previamente à análise com filtro de membrana de diâmetro de poro de 0,45 µm. As análises foram realizadas em triplicata e foi executado um gradiente linear com fase móvel (FM) composta por água:acetonitrila, de 0 a 100% de acetonitrila, na vazão de 1 mL/min, tempo de análise de 60 minutos, volume de injeção de 20 µL e a detecção do PZQ foi realizada em comprimento de onda de 210 nm.

4.2.2.2 Determinação do coeficiente de partição (*K*) do PZQ em diferentes SSBs sem e com seletos quirais

Foi elaborado um protocolo para a determinação do coeficiente de partição (*K*) do PZQ, com base em metodologias descritas nas publicações da literatura científica. Foi necessária a utilização do cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu, modelo CBM-20A, para quantificar o fármaco em uma das fases dos SSBs testados.

Diferentes sistemas de solventes foram testados, compostos por misturas entre hexano, acetato de etila, metanol, água, diclorometano e clorofórmio, modificando-se a proporção de cada um nos sistemas. Foram preparados por simples mistura e pré-equilibrados por agitação vigorosa por 1 minuto, com auxílio de agitador de tubos tipo vórtex (marca Fanem, modelo 251). Avaliou-se o  $K$  do PZQ em diferentes SSBs sem e com seletos quirais, em diferentes concentrações. Os SQs foram solubilizados na quantidade total de água do sistema de solventes em teste, antes da mistura com os demais solventes. Para SSBs que não continham água, o SQ foi adicionado ao metanol.

Uma massa acuradamente pesada de PZQ (em torno de 7,00 mg) foi adicionada a tubos de ensaio. O SSB pré-equilibrado a ser testado (14 mL) foi adicionado a cada tubo de ensaio e procedeu-se agitação vigorosa por 5 minutos. Os tubos foram mantidos em repouso por uma hora a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Após, foram agitados vigorosamente por 5 minutos e permaneceram em repouso por 30 minutos. Este ciclo de agitação/repouso foi repetido uma vez. Ao final deste tempo, procedeu-se a coleta de alíquota de 1,0 mL da fase inferior de cada tubo de ensaio. As alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, diluídas com água:acetonitrila (40:60, v/v) e filtradas com filtro de membrana de diâmetro de poro de 0,45. Posteriormente, realizou-se a análise por CLAE, conforme descrito no item 4.2.1, utilizando método farmacopeico para doseamento do fármaco praziquantel (FB 5 ed, 2010), para determinar a quantidade de fármaco presente na fase inferior do SSB (PZQ  $W_L$ ), em miligramas. A quantidade de fármaco na fase superior do SSB (PZQ  $W_U$ ) foi calculada através da diferença entre a quantidade total de praziquantel (PZQ  $W_T$ ) adicionada ao tubo de ensaio e a quantidade do mesmo presente na fase inferior.

O valor de  $K$  foi calculado pela razão entre as quantidades do analito presentes na fase estacionária (FE) e na fase móvel (FM), conforme preconizado por Berthod e colaboradores (2009). De acordo com o SSB utilizado, a FE pode ser a fase superior ou inferior e o mesmo ocorre para a FM, assim, o coeficiente de partição ( $K$ ) do PZQ pode ser determinado através da Equação (11) quando for utilizado o modo normal de operação ou Equação (12) quando for utilizado o modo reverso:



$$K = \text{PZQ } W_L / \text{PZQ } W_U \quad (11)$$

$$K = \text{PZQ } W_U / \text{PZQ } W_L \quad (12)$$

Todas as análises para determinação do coeficiente de partição do PZQ foram realizadas em triplicata, juntamente com uma unidade denominada de branco, contendo somente o SSB pré-equilibrado, para avaliar a interferência dos solventes na linha de base dos cromatogramas obtidos.

#### 4.2.2.3 Avaliação da solubilidade dos seletores quirais em diferentes SSBs

Previamente à análise do coeficiente de partição do PZQ na presença dos seletores quirais HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD e ácido L-(+)-tartárico, procedeu-se a determinação da solubilidade dos mesmos, nos diferentes SSBs testados. Diferentes concentrações de cada seletor quiral foram testadas, adicionando-os a tubos de ensaio contendo a fase superior, fase inferior ou o SSB pré-equilibrado, e procedendo-se vigorosa agitação com auxílio de vórtex por 5 minutos, a fim de assegurar a formação de um sistema bifásico, ausente de partículas em suspensão.

#### 4.2.2.4 Determinação do tempo de separação (*settling time*) das fases ( $S_T$ )

Em tubos de ensaio, adicionou-se alíquotas de 7 mL de cada fase (inferior e superior) dos SSBs propostos. Os mesmos foram fechados, cuidadosamente invertidos por cinco vezes para misturar seu conteúdo e colocados em posição vertical. Com auxílio de um cronômetro, observou-se o tempo necessário para que o sistema formasse duas camadas claras e com interface distinta, sendo este considerado o tempo de separação das fases ( $S_T$ ).

### 4.2.3 Desenvolvimento da metodologia para separação quiral de PZQ por HPCCC

Para o desenvolvimento de metodologia para separação quiral do racemato de praziquantel por HPCCC, utilizou-se cromatógrafo líquido contracorrente, marca Dynamic Extractions, modelo Spectrum, localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF), da Faculdade de Farmácia da UFRGS. O mesmo é equipado com duas bombas para solventes, um injetor manual, um coletor de frações, duas colunas analíticas conectadas em série (totalizando 23,5 mL), duas colunas semipreparativas conectadas em série (totalizando 132 mL), válvula para

seleção da coluna a ser utilizada, válvula para seleção do modo de operação (normal ou reverso), controlador de temperatura, controlador de velocidade de rotação e um detector DAD, que permite o uso de quatro comprimentos de onda simultâneos. O software utilizado para controle e aquisição dos dados foi o Clarity® (DataApex, República Tcheca).

#### 4.2.3.1 Determinação do volume total ( $V_T$ ) e volume extra coluna ( $V_{EC}$ ) do sistema de HPCCC

O volume total do sistema ( $V_T$ ) de HPCCC foi determinado conforme recomendações do fabricante Dynamic Extractions e realizado em duplicata. A coluna analítica do cromatógrafo líquido contracorrente foi completamente preenchida com a fase estacionária (inferior) do sistema de solventes bifásico hexano:acetato de etila:metanol:água (1:1:1:1, v/v/v/v) com vazão de 5 mL/min. A fase móvel (superior) do SSB em questão foi então bombeada através do sistema, com vazão de 4 mL/min. O solvente descartado na saída da coluna foi coletado em uma proveta graduada de 50 mL e o volume de fase estacionária ( $V_{FE}$ ) foi determinado assim que obteve-se duas fases na proveta. O  $V_{FE}$  obtido correspondeu ao volume total do sistema de HPCCC ( $V_T$ ). O volume extra coluna ( $V_{EC}$ ) compreende o volume da tubulação da válvula de injeção até a coluna adicionado do volume da tubulação intercolunas e do volume da tubulação da coluna até a célula de fluxo do detector, todos em mililitros. De acordo com o volume da coluna analítica ( $V_{CA}$ ) de 23,5 mL, informado pelo fabricante do equipamento, obteve-se o volume extra coluna através da Equação (13):

$$V_{EC} = V_T - V_{CA} \quad (13)$$

#### 4.2.3.2 Preparo dos Sistemas de Solventes Bifásicos (SSBs) e da solução amostra

A preparação das fases móvel e estacionária dos SSBs selecionados para uso em HPCCC foi feita através do equilíbrio prévio entre os solventes nas devidas proporções, em um funil de separação, a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ). O seletor quiral a ser testado em cada análise foi previamente solubilizado na água que compunha o sistema de solventes. Para SSBs que não continham água, o SQ foi adicionado ao metanol. Os solventes foram adicionados um a um ao funil de separação e procedeu-se a agitação por três vezes, com posterior repouso do SSB

por 5 minutos. Após este equilíbrio, as fases foram coletadas e levadas a banho ultrassom (marca Unique, modelo USC 5000) por 30 minutos, para desgaseificação.

As soluções amostra foram preparadas através da dissolução de quantidade acuradamente pesada de PZQ em FE a ser utilizada ou na mistura fase móvel:fase estacionária (1:1, v/v) utilizadas na análise, obtendo-se uma concentração final de 1 mg/mL. Posteriormente, a solução amostra foi levada a banho ultrassom por 2 a 5 minutos para completa solubilização do fármaco nos solventes.

#### 4.2.3.3 Estudo de estabilidade das soluções amostra de PZQ utilizadas para injeção no HPLC

Para avaliar a estabilidade das soluções contendo PZQ para injeção no equipamento de HPLC, foram preparadas soluções amostra contendo PZQ na concentração final de 1 mg/mL. O fármaco foi dissolvido em duas misturas de solventes distintas, hexano:acetato de etila (1:1, v/v) e metanol:água (1:1, v/v), e as soluções foram levadas a banho de ultrassom por 2 a 5 minutos.

Com auxílio de pipeta volumétrica, coletou-se 1,0 mL de cada solução, transferiu-se para recipiente adequado e levou-se a capela de exaustão (marca Permutation) para completa evaporação dos solventes, a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Os resíduos obtidos foram ressuspensos em água:acetonitrila (40:60, v/v), diluídos em balão volumétrico de 10 mL e filtrados em membrana com diâmetro de poro de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ . As soluções amostra recém preparadas ( $T_0$ ) foram analisadas por CLAE, conforme metodologia descrita no item 4.2.1, para determinar a concentração de PZQ. As soluções amostra foram mantidas sob refrigeração ( $4\text{ a }8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e analisadas, através da mesma metodologia, após 1, 3 e 8 dias de armazenamento ( $T_1$ ,  $T_3$  e  $T_8$ ).

#### 4.2.3.4 Análise do PZQ por HPLC em diferentes SSBs sem e com seletor quiral

As análises de HPLC foram realizadas em cromatógrafo líquido contracorrente (marca Dynamic Extractions, modelo Spectrum), utilizando-se a coluna analítica do equipamento. Para cada análise, foi selecionado o modo de operação normal ou reverso, conforme o caso, e a coluna foi preenchida com a fase estacionária do SSB, a uma vazão de 5 mL/min. Para garantia do total preenchimento da coluna, é indicado que seja bombeado um volume de fase estacionária superior a 1,25

volumes de coluna. A velocidade de rotação da coluna foi sempre de 1600 rpm e a fase móvel foi bombeada com vazão de 1 mL/min. O volume excedente de fase estacionária presente na coluna era deslocado pela fase móvel e coletado na saída da coluna, com o auxílio de proveta volumétrica. Quando se observava a saída da fase móvel e o surgimento de duas fases, significava que o equilíbrio hidrodinâmico entre ambas as fases era atingido. Procedia-se, então, a injeção de 1 mL da solução amostra de PZQ, dando início à análise cromatográfica. As frações eram coletadas em tubos de ensaio com periodicidade e volume pré-estabelecidos para cada análise. Durante todas as análises, a temperatura do equipamento foi mantida em 30 °C e os comprimentos de onda para detecção foram de 254 e 263 nm, utilizando detector DAD.

As frações coletadas por HPLCC eram levadas a capela de exaustão (marca Permutation) para evaporação completa do solvente, a temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C). Para SSBs sem seletor quiral, os resíduos obtidos eram ressuspensos em água:acetonitrila (40:60, v/v), filtrados em membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm e analisados por CLAE conforme descrito no item 4.2.1. Para SSBs contendo seletor quiral em sua composição, os resíduos eram ressuspensos em 2-propanol grau P.A., cada solução filtrada em membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm e analisada por CLAE quiral, conforme metodologia a ser descrita a seguir.

#### 4.2.3.5 Avaliação da Retenção de Fase Estacionária ( $R_{FE}$ )

O volume de fase estacionária recolhido em proveta volumétrica, após o surgimento de duas fases, quando do bombeamento de fase móvel, foi utilizado para avaliação da retenção da fase estacionária ( $R_{FE}$ ) no sistema. A  $R_{FE}(\%)$  foi calculada conforme as Equações (14) e (15):

$$R_{FE} = [V_{CA} - (V_{FEEq} - V_{EC})] / V_{CA} \quad (14)$$

$$R_{FE}(\%) = R_{FE} \times 100 \quad (15)$$

Onde,  $V_{CA}$  corresponde ao volume da coluna analítica,  $V_{FEEq}$  corresponde ao volume de fase estacionária coletado na proveta durante o equilíbrio hidrodinâmico e  $V_{EC}$  corresponde ao volume extra coluna.

#### 4.2.3.6 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE quiral para análise das frações obtidas por HPLCC

Para o desenvolvimento de metodologia analítica quiral complementar das frações coletadas por HPLCC, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu e modelo Class VP, equipado com controlador SCL-10A VP, bomba A LC-10AD VP, bomba B LC-10AD VP, desgaseificador DGU-20A3, auto injetor SIL-10AD VP, injetor manual CTO-10AC VP, forno CTO-10AC VP e detector UV SPD-M10A VP. O software utilizado para controle e aquisição dos dados foi o Class VP®. Foi utilizada coluna cromatográfica Chiralpak® AD-H (Daicel), com fase estacionária composta de amilose *tris*-(3,5-dimetilfenilcarbamato).

Com base em dados encontrados na literatura científica para o fármaco praziquantel, a fase móvel foi composta de hexano:2-propanol (BEE-GIM e CHI-BUN, 1996; BONATO *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2004). Diferentes proporções dos solventes, vazões de fase móvel e temperatura do sistema foram testados a fim de determinar os parâmetros mais adequados para a análise, que resultassem em adequados tempos de retenção, resolução entre os enantiômeros e número de pratos teóricos. A detecção foi feita em comprimento de onda de 210 nm.

A validação parcial do método de análise quiral por CLAE para determinação dos enantiômeros de praziquantel (*R*)-PZQ e (*S*)-PZQ, nas frações obtidas por CCC, foi efetuada com base na legislação vigente através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: linearidade e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) (BRASIL, 2003). Para tal, foram utilizadas as condições cromatográficas constantes na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições cromatográficas utilizadas na validação do método analítico para determinação de (*R*)-PZQ e (*S*)-PZQ por CLAE quiral.

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
Fase móvel	Hexano:2-propanol (80:20, v/v)
Vazão	0,8 mL/min
Coluna	Chiralpak® AD-H (Daicel) (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Detecção	Comprimento de onda de 210 nm
Temperatura	30 °C
Volume de injeção	20 µL

#### 4.2.3.6.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade foram construídas três curvas padrão, em três diferentes dias, com seis concentrações de PZQ SQR racemato, no intervalo de 0,2 µg/mL a 80,0 µg/mL.

Realizou-se o preparo de uma solução estoque (SE) a cada dia, na concentração de 100,0 µg/mL, que foi diluída conforme a Tabela 5. O preparo de cada SE foi realizado pesando-se em torno de 5,00 mg de PZQ SQR, a cada dia de análise, o qual foi transferido cuidadosamente para balão volumétrico (BV) de 50 mL e o volume completado com 2-propanol grau HPLC. Com o auxílio de pipeta automática, alíquotas dessa solução foram transferidas para BV de 10 mL, previamente identificados, e o volume foi completado com 2-propanol grau HPLC. Para a solução padrão de 0,2 µg/mL utilizou-se a solução padrão de 2,0 µg/mL como ponto de partida, diluindo-se em 10 vezes.

Tabela 5 - Diluições realizadas para preparo das soluções padrão de PZQ SQR para avaliação da linearidade.

<b>Volume de SE 100,00 µg/mL</b>	<b>Volume final</b>	<b>Concentração final</b>
<b>(mL)</b>	<b>(mL)</b>	<b>(µg/mL)</b>
8,0	10	80,0
6,0	10	60,0
4,0	10	40,0
2,0	10	20,0
0,2	10	2,0

Todas as soluções padrão de PZQ foram filtradas com filtro de membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro, e em seguida, procedeu-se à análise cromatográfica, conforme condições descritas na Tabela 4. Foi realizada uma leitura para cada solução padrão.

#### 4.2.3.6.2 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Para avaliar a dispersão dos resultados entre experimentos independentes e repetidos de uma mesma amostra, avaliou-se a precisão, através da repetibilidade e precisão intermediária.

Na avaliação da repetibilidade foram preparadas seis soluções independentes de PZQ matéria-prima, ou seja, provenientes de seis pesadas do insumo, na concentração média da curva padrão de 40 µg/mL, em 2-propanol grau HPLC. Cada solução amostra (SA) foi filtrada com filtro de membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro, e em seguida, procedeu-se a análise cromatográfica, conforme condições descritas na Tabela 4, realizando-se uma leitura para cada solução amostra.

Para avaliação da precisão intermediária, repetiu-se no dia seguinte o procedimento da repetibilidade, com o preparo de seis novas soluções amostra, as quais foram posteriormente filtradas e analisadas por CLAE quiral.

### **4.3 Estudo de Modelagem Molecular do Praziquantel com Diferentes Seletores Quirais**

O estudo de modelagem molecular do fármaco praziquantel com sete diferentes seletores quirais foi realizado em colaboração com o professor Dr. Daniel Fábio Kawano, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em São Paulo.

A fim de obter algumas informações sobre o potencial de alguns seletores quirais para o isolamento do enantiômero puro (*R*)-PZQ, realizou-se simulações de acoplamento molecular para prever as interações de ambos os enantiômeros do PZQ com os seletores quirais ácido L-(+)-tartárico e seis ciclodextrinas: 2-hidroxiopropil-γ-ciclodextrina, 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina, carboximetil-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina, heptakis-(2,6-di-O-metil)-β-ciclodextrina e heptakis-(2,3,6-tri-O-benzoil)-β-ciclodextrina.

As estruturas tridimensionais do ácido L-(+)-tartárico e (*R*)/(*S*)-PZQ foram construídas usando a versão on-line de Corina ([https://www.mn-am.com/online\\_demos/corina\\_demo](https://www.mn-am.com/online_demos/corina_demo)), que atribui às estruturas 3-D comprimentos e ângulos de ligação pré-definidos, dependendo do tipo de ligação, tipo de átomo e estado de hibridização, e define os ângulos de torção mais prováveis de acordo com a natureza da estrutura (GASTEIGER, RUDOLPH e SADOWSKI, 1990; SADOWSKI, GASTEIGER e KLEBE, 1994). As geometrias moleculares dos ligantes foram então refinadas através da minimização de energia padrão em Spartan 14

(WAVEFUNCTION, 2014). As estruturas das ciclodextrinas foram desenhadas no Discovery Studio Visualizer 4.1 (ACCELRYS, 2014) modificando os modelos cristalográficos das  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas (PDB IDs: 1BFN e 5E70, respectivamente). As geometrias das cadeias laterais das estruturas resultantes foram então refinadas através de minimização de energia padrão em Spartan 14 (WAVEFUNCTION, 2014), enquanto se mantinham limitadas as geometrias dos resíduos de D-glicopiranosil.

Para as simulações de acoplamento molecular, os estados de protonação para ambos os ligantes foram atribuídos usando o módulo Epik disponível na suíte de Schrödinger 10.3 usando parâmetros padrão ( $\text{pH}=7,0 \pm 2,0$ ). A grade de acoplamento foi então construída para ácido L-(+)-tartárico e para as ciclodextrinas utilizando uma caixa interior (centro da caixa que envolve a estrutura 3-D do ligante) de  $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$  e uma caixa exterior (caixa na qual todos os átomos do ligante devem ser confinados) que estendiam  $20 \text{ \AA}$  em cada direção a partir da caixa interior. Nenhuma das restrições foi usada em nenhuma das simulações. Os acoplamentos foram realizados utilizando os ajustes do procedimento Extra Precision (XP) do módulo de acoplamento na suíte de Schrödinger 10.3 (FRIESNER *et al.*, 2004).

O modo de ligação mais provável de cada estrutura foi então atribuído com base na melhor pose para cada enantiômero, sendo que as interações intermoleculares correspondentes com os seletores quirais foram estudadas através da inspeção visual, com a ajuda do módulo de interações receptor-ligante do Discovery Studio Visualizer 4.1 (ACCELRYS, 2014).



---

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



**O texto completo da dissertação defendida que ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 99 a 134 foi suprimido, por tratar-se de manuscrito em preparação a ser submetido à publicação. Consta da descrição dos dados referentes ao item Resultados e Discussão, relacionados à aplicação da técnica de cromatografia contracorrente de alta eficiência e a estudos de modelagem molecular na separação quiral do fármaco praziquantel.**





















































































- As características de solubilidade e polaridade do PZQ conduziram para o emprego da família de solventes HEMWat, com composição pertencente à categoria de media polaridade.
- Os seletores quirais avaliados experimentalmente apresentaram-se solúveis nos sistemas de solventes bifásicos testados.
- A presença de seletores quirais afetou o comportamento de partição do PZQ nos sistemas de solventes bifásicos avaliados. Entretanto, os valores de coeficiente de partição obtidos para o fármaco, permaneceram na faixa recomendada.
- A excelente retenção de fase estacionária no sistema de HPCCC para os SSBs avaliados, em modo normal de operação, reforçou também o baixo tempo de separação entre as fases inferior e superior.
- Os SSBs de crescente polaridade resultaram em baixa retenção do fármaco na fase estacionária, refletindo em um intervalo de eluição inferior aos demais SSBs testados.
- O método desenvolvido para análise dos enantiômeros de PZQ por cromatografia líquida de alta eficiência quiral demonstrou desempenho satisfatório, comprovado pelo estudo de validação parcial realizada, sendo adequado para o uso pretendido.
- O emprego da CLAE quiral permitiu visualizar indício de separação ou coeluição perfeita entre (*S*)-PZQ e (*R*)-PZQ na técnica de HPCCC, quando do emprego de determinados SSBs com os SQs empregados experimentalmente.
- O seletor quiral ácido L-(+)-tartárico não resultou na separação enantiomérica experimental do PZQ por HPCCC, comportamento que foi confirmado através dos dados obtidos por modelagem molecular.
- O seletor quiral HP- $\gamma$ -CD não apresentou poder discriminatório entre os enantiômeros de PZQ experimentalmente, mesmo observando-se, através da modelagem molecular, que o diâmetro maior da sua cavidade central poderia

propiciar melhor acomodação dos anéis de ambos enantiômeros, além da maior afinidade pelo (S)-PZQ.

- A HP- $\beta$ -CD resultou em indício de separação dos enantiômeros de PZQ experimentalmente, a partir da concentração de 100 mmol/L, quando adicionada aos SSBs 17 e 19, condizendo com os resultados de modelagem molecular que não indicaram elevado poder discriminatório para este seletor quiral.
- A técnica de HPLC permitiu recuperação completa da quantidade injetada de PZQ no sistema, para todas as condições testadas.
- Para a CM- $\beta$ -CD, obteve-se a maior diferença entre os valores de  $\Delta G_{\text{ligação}}$  obtidos (0,80 kcal/mol) para os o (R)-PZQ e (S)-PZQ, indicando que esta ciclodextrina melhor discriminaria os enantiômeros de PZQ, podendo ser considerada o seletor quiral mais promissor para esta separação.

---

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

---



Considerando os resultados obtidos até o momento, principalmente aqueles oriundos da modelagem molecular, e o fato do projeto referente a separação dos enantiômeros de PZQ por HPCCC ter sido contemplado pela Chamada Universal MCTI/CNPq nº 01/2016, a visualização de possibilidades de estudos mais aprofundados sobre a separação quiral do PZQ por HPCCC conduzem à proposta de continuidade deste trabalho, com a carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina (CM- $\beta$ -CD).

Para tal, será necessário adquirir a onerosa CM- $\beta$ -CD, testar sua solubilidade em relação aos sistemas de solventes bifásicos propostos, determinar o coeficiente de partição do PZQ em diferentes SSBs, na ausência e presença da CM- $\beta$ -CD, e avaliar seu potencial como seletor quiral na separação dos enantiômeros de PZQ, por HPCCC.



---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---





ACD/LABS. ACD/LogP. **Predict octanol-water partitioning coefficients from structure.** Disponível em <http://www.acdlabs.com/products/percepta/predictors/logp/>. Acesso em: 09/07/15.

ACCELRY'S. **Discovery Studio Visualizer**, release 4.1. Accelrys Software Inc: San Diego, 2014.

AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL, J. Putting Chirality to Work: the strategy of chiral switches. **Nature Reviews**, v. 1, n. 10, p. 743-768, 2002.

AHUJA, S. Overview of Chiral Separations. In: AHUJA, S. (Ed.). **Chiral Separation Methods for pharmaceutical and biotechnological products.** New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. p. 1-8.

ALSAQABI, S. M.; LOTFY, W. M. Praziquantel: a review. **Veterinary Science and Technology**, v. 5, n. 5, 2014.

AMOSS, C. W.; MAIER, N. M. Separation of Chiral Compounds on Polysaccharide Columns. In: AHUJA, S. (Ed.). **Chiral Separation Methods for pharmaceutical and biotechnological products.** New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. p. 57-129.

ANVISA. **Consulta a Medicamentos.** Disponível em: <http://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>. Acesso em 10/01/2017.

BECKET, G.; SCHEP, L. J.; TAN, M. Y. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 65-71, 1999.

BEE-GIM, L.; CHI-BUN, C. Characterization of Chiral Adsorbents on the Chromatographic Separation of Praziquantel Enantiomers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, p. 169-175, 1996.

BERTHOD, A. Chiral Recognition Mechanisms in Enantiomers Separations: A General View. In: BERTHOD, A (Ed.). **Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications.** Heidelberg: Springer, 2010. p. 1-32.

BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Use of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate in countercurrent chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 1, p. 168-177, 2004.

BERTHOD, A.; HASSOUN, M.; RUIZ-ANGEL, M. J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 2, p. 327-340, 2005.

BERTHOD, A.; RUIZ-ÁNGEL, M.J.; CARDA-BROCH, S. Countercurrent chromatography: People and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4206-4217, 2009.

BERTHOD, A. *et al.* Countercurrent Chromatography in Analytical Chemistry (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 355-387, 2009.

BEZOLD, F.; GOLL, J.; MINCEVA, M. Study of the applicability of non-conventional aqueous two-phase systems in counter-current and centrifugal partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 126–132, 2015.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7-8, p. 428-439, 2003.

BONATO, P. S. *et al.* Chiral Stationary Phases based on Cellulose and Amylose tris-3,5-dimethylphenylcarbamate derivates for the Resolution of Selected Chiral Drugs and Metabolites. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, n. 12, p. 1813-1827, 1999.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; PAIAS, F. O.; LANCHOTE, V. L. Chiral capillary electrophoretic separation of selected drugs and metabolites using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, n. 8, p. 1115–1131, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 16 de 2 de março de 2007, Aprova Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2007a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 17 de 2 de março de 2007, Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/esquistossomose>>. Acesso em 05/12/2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 57 de 17 de novembro de 2009, Dispõe sobre o registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2009b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 64 de 18 de dezembro de 2009, Dispõe sobre o Registro de Radiofármacos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2009c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 24 de 14 de junho de 2011, Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 60 de 10 de outubro de 2014, Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2014b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 73 de 7 de abril de 2016, Dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2016a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 76 de 2 de maio de 2016, Dispõe sobre realização de alteração, inclusão, e cancelamento pós-registro de medicamentos específicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2016b.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645-666, 2007.

CAI, Y. *et al.* Preparative Enantioseparation of DL- $\alpha$ -Methylbenzylamine by High-Speed Countercurrent Chromatography using L-(+)-Tartaric Acid as Chiral Selector. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 1489–1495, 2007.

CANADA. **Guidance for Industry: Stereochemical Issues in Chiral Drug Development**. Ottawa: Health Canada, 2000. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/applic-demande/guide-ld/chem/stereo-eng.php>>. Acesso em 20/12/2016.

CHANKVETADZE, B. Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 1269, p. 26-51, 2012.

CHING, C. B.; LIM, B. G.; LEE, E. J. D.; NG, S. C. Preparative resolution of praziquantel enantiomers by simulated counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 634, p. 215-219, 1993.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, n. 1, p. S3-S9, 2003.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-29, 2014.

COSTA, F. DAS N. *et al.* Solvent system selectivities in countercurrent chromatography using *Salicornia gaudichaudiana* metabolites as practical example with off-line electrospray mass-spectrometry injection profiling. **Journal of Chromatography A**, v. 1385, p. 20–27, 2015.

DECIT. Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**. v. 44,

n.1, p.200-202, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v44n1/23.pdf>> Acesso em 12/12/2016.

DING, G. S. *et al.* Chiral Separation of Racemates of Drugs and Amino Acid Derivatives by High Performance Liquid Chromatography on a Norvancomycin-Bonded Chiral Stationary Phase. **Chromatographia**, v. 59, n. 7-8, p. 443-449, 2004.

DUANMU, Q. *et al.* Semi-preparative high-speed counter-current chromatography separation of alkaloids from embryo of the seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn by pH-gradient elution. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 12, p. 1746–1751, 2010.

DYNAMIC EXTRACTIONS. **Quick Start Guide for Spectrum HPCCC Instrument**. Documento Confidencial. 2009.

DYNAMIC EXTRACTIONS. **Quick Start Sheets Spectrum**. Documento Confidencial. 2010.

DYNAMIC EXTRACTIONS. **CCC Instruments: Science & Solutions, 2017**. Disponível em: <<http://www.dynamicextractions.com/>>. Acesso em: 10/01/2017.

ELBASHIR, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Capillary Electrophoresis and Molecular Modeling as a Complementary Technique for Chiral Recognition Mechanism. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 131–137, 2013.

EMA. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **Investigation of Chiral Active Substances**. Londres: EMA, 1993. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000706.jsp&mid=WC0b01ac0580028bfd](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000706.jsp&mid=WC0b01ac0580028bfd)>. Acesso em 20/12/2016.

ENGLERT, M.; HAMMANN, S.; VETTER, W. Isolation of  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene and lutein from carrots by countercurrent chromatography with the solvent system modifier benzotrifluoride. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 119–125, 2015.

FARIAS, B. V. **Avaliação do equilíbrio de adsorção e projeto de condições de separação de Praziquantel por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/7881>>. Acesso em 20/12/2016.

FB 5 ed. **Farmacopeia Brasileira**, 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p. 142-143, 2010. 1 v.

FDA. Food and Drug Administration. **FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs**, 1992. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm>>. Acesso em 20/12/2016.

FERREIRA, G. F. *et al.* Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, p. 13384-13421, 2015.

FRANCOTTE, E. R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 379-397, 2001.

FREIRE, M. G. *et al.* Insight into the Interactions that Control the Phase Behaviour of New Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol Polymers and Ionic Liquids. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 6, p. 1831–1839, 2012.

FREY, A.; HOPMANN, E.; MINCEVA, M. Selection of biphasic liquid systems in liquid-liquid chromatography using predictive thermodynamic models. **Chemical Engineering and Technology**, v. 37, n. 10, p. 1663–1674, 2014.

FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. G.U.E.S.S. - A generally useful estimate of solvent systems in CCC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, n. 17, p. 2777–2806, 2005.

FRIESEN, J. B.; PAULI, F. Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, p. 52-59, 2007.

FRIESEN, J. B. *et al.* Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1765–1796, 2015.

FRIESNER, R. A. *et al.* Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1: method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1739-1749, 2004.

FRIESNER, R. A. *et al.* Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 6177-6196, 2006.

GARRARD, I. Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 12–13, p. 1923–1935, 2005.

GASTEIGER, J.; RUDOLPH, C.; SADOWSKI, J. Automatic generation of 3D-atomic coordinates for organic molecules. **Tetrahedron Computer Methodology**, v. 3, n. 6, p. 537-547, 1990.

GILLI, G., GILLI, P. **The nature of hydrogen bond**: outline of a comprehensive hydrogen bond theory. New York: Oxford University Press, 2009.

GRABOWSKI, S. J. Hydrogen bonding strength-measures based on geometric and topological parameters. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 17, p. 18-31, 2004.

GUZLEK, H.; WOOD, P. L.; JANAWAY, L. Performance comparison using the GUESS mixture to evaluate counter-current chromatography instruments. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 19, p. 4181–4186, 2009.

HAMMANN, S.; CONRAD, J.; VETTER, W. Fractionation of technical octabromodiphenyl ether by countercurrent chromatography combined with gas chromatography/mass spectrometry and offline and online  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v. 1398, p. 83–93, 2015.

HAN, C. *et al.* Enantioseparation of racemic trans- $\delta$ -viniferin using high speed counter-current chromatography based on induced circular dichroism technology. **Journal of Chromatography A**, v. 1324, p. 164–170, 2014.

HE, B. L. Chiral Recognition Mechanism: Practical Considerations for Pharmaceutical Analysis of Chiral Compounds. In: BERTHOD, A (Ed.). **Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications**. Heidelberg: Springer, 2010. p. 153-201.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation**, 2 ed., Germany: Springer, 1998.

HUANG, X.; DI, D. Chiral separation by counter-current chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 128-133, 2015.

HUANG, X. Y. *et al.* An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 214–225, 2016.

IACOVINO, R. *et al.* Cyclodextrins as Complexing Agents: Preparation and Applications. **Current Organic Chemistry**, v. 21, p. 162-176, 2017.

IGNATOVA, S. *et al.* Gradient elution in counter-current chromatography: A new layout for an old path. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 36, p. 6053–6060, 2011.

ITO, Y. Countercurrent Chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 5, p. 105- 129, 1981.

ITO, Y. Origin and Evolution of the Coil Planet Centrifuge: A Personal Reflection of My 40 Years of CCC Research and Development. **Separation & Purification Reviews**, v.34, p. 131–154, 2005a.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 145-168, 2005b.

ITO, Y. pH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism, procedure and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, n. 1, p. 71–85, 2013.

ITO, Y. Counter-current motion in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, p. 128-132, 2014.

ITO, Y.; BOWMAN, R. L. Countercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition Chromatography without Solid Support. **Science**, v. 167, n. 3916, p. 281–283, 1970.

JAIN, A. S. *et al.* Sulfobutyl ether $\gamma$   $\beta$ -cyclodextrin (SBE $\gamma$   $\beta$ -CD) carbamazepine complex: preparation, characterization, molecular modeling, and evaluation of in vivo anti-epileptic activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1163-1175, 2011.

JÚNIOR, I.J.S. **Separação Cromatográfica dos Enantiômeros do Anestésico Bupivacaína e Projeto de Condições de Operação em Leito Móvel Simulado**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000391578&fd=y>>. Acesso em 10/12/2016.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

KELLY, J. W.; HE, L.; STEWART, J. T. Liquid chromatographic separation of praziquantel enantiomers in serum using a cellulose-based chiral stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 11, n. 11-12, p. 1141-1144, 1993.

KOSTANYAN, A. E. Simple equations to simulate closed-loop recycling liquid-liquid chromatography: Ideal and non-ideal recycling models. **Journal of Chromatography A**, v. 1423, p. 71–78, 2015.

KROEMER, R. T. Structure-based drug design: docking and scoring. **Current Protein and Peptide Science**, v. 8, p. 312-328, 2007.

LEITÃO, G. G. *et al.* Separation of Free and Glycosylated Flavonoids from *Siparuna guianensis* by Gradient and Isocratic CCC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 2041–2051, 2005.

LEITÃO, G.; COSTA, F. Gradient Elution in Countercurrent Chromatography. **Planta Medica**, v. 81, n. 17, p. 1592–1596, 21 set. 2015.

LI, W. *et al.* Molecular Modeling Study of Chiral Separation and Recognition Mechanism of  $\beta$ -Adrenergic Antagonists by Capillary Electrophoresis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 710-725, 2012.

LI, S. *et al.* Comparison of counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography applied to separating minor impurities in drug preparations. **Journal of Chromatography A**, v. 1344, p. 51-58, 2014.

LI, W.; WU, T. Rapid separation of polysaccharides using a novel spiral coil column by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 8, p. 1404–1410, 2016.

LIM, B.; CHING, C.; TAN, R. B. H.; NG, S. Recovery of (-)-praziquantel from racemic mixtures by continuous chromatography and crystallisation. **Chemical Engineering Science**, v. 50, n. 4, p. 2289-2298, 1995.

LIM, B.; CHING, C. Preliminary design of a simulated counter-current chromatography system for the separation of praziquantel enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 734, p. 247-258, 1996.

LIMA, V. L. E. Os Fármacos e a Quiralidade: uma breve abordagem, **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657-663, 1997.

LIU, Y. *et al.* Structural Characterization and Enantioseparation of the Chiral Compound Praziquantel. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 12, p. 3039-3046, 2004.

LIU, Y. *et al.* Three-phase solvent systems for the comprehensive separation of a wide variety of compounds from *Dicranostigma leptopodum* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 12, p. 2038–2045, jun. 2015a.

LIU, Y. *et al.* Solvent System Selection Strategies in Countercurrent Separation. **Planta Medica**, v. 81, n. 17, p. 1582–1591, 2015b.

LOURENÇO, T. C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

LV, Y. C. *et al.* Preparative enantioseparation of ofloxacin by High Speed Countercurrent Chromatography using L-(+)-tartaric acid as chiral selector. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, p.1328–1334, 2010.

MA, Y.; ITO, Y. Chiral High-Speed Counter-Current Chromatography: Future Strategies for Chiral Selector Development. **Current Chromatography**, v. 1, n. 1, p. 69-80, 2014.

MACHATHA, S. G.; YALKOWSKY, S. H. Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP®, ACDlogP and KowWin® to experimentally determined values. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 185-192, 2005.

MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 3-33, 2001.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 181–194, 2006.

MATTHIJS, N. *et al.* Electrophoretic separation strategy for chiral pharmaceuticals using highly-sulfated and neutral cyclodextrins based dual selector systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 525, p. 247-263, 2004.

MEYER, T. *et al.* Taste, A New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in Schistosomiasis Treatment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2009.



MICHEL, T.; DESTANDAU, E.; ELFAKIR, C. New advances in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography: Focus on coupling strategy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 4, p. 957–969, 2014.

MINGUILLÓN, C. Countercurrent Chromatography, Scope and Perspectives: Application to Chirotechnology. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 1, p. 35-45, 2012.

MIRANDA, J. C. *et al.* Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 665-681., 2011.

MORGAN, J.; GREENBERG, A.; LIEBMAN, J. F. Paradigms and paradoxes: O- and N-protonated amides, stabilization energy, and resonance energy. **Structural Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 197-199, 2012.

MOSS, G. P. Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 2193-2222, 1996.

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral drugs: an overview. **International Journal of Biomedical Science**, v. 2, n. 2, p. 85-100, 2006.

NING, J. G. Chiral Separations by Various Techniques. In: AHUJA, S. (Ed.). **Chiral Separation Methods for pharmaceutical and biotechnological products**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. p. 131-145.

NOLAN, T.; SINGH, N.; McCURDY, C. R. Ligand macromolecule interactions: theoretical principles of molecular recognition. In: Roque, A. C. A. (Ed.) **Ligand-macromolecular interactions in drug discovery: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2010. p. 13-29.

OKA, H. *et al.* Separation of antibiotics by counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p. 35-52, 1998.

ORLANDO, R. M. *et al.* Importância Farmacêutica de Fármacos Quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 8-14, 2007. Disponível em : <[revistas.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/2115/2061](http://revistas.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/2115/2061)>. Acesso em: 15/12/2016.

PAN, Y.; LU, Y. Recent Progress in Countercurrent Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 649-679, 2007.

PÉREZ, E.; SANTOS M. J.; MINGUILLÓN, C. Application of cellulose and amylose arylcarbamates as chiral selectors in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1107, p. 165-174, 2006.

REN, D. B. *et al.* Correlation and prediction of partition coefficient using nonrandom two-liquid segment activity coefficient model for solvent system selection in counter-current chromatography separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1301, p. 10–18, 2013.

REN, D. B. *et al.* Systematic and practical solvent system selection strategy based on the nonrandom two-liquid segment activity coefficient model for real-life counter-current chromatography separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1393, p. 47–56, 2015.

REN, D. *et al.* Computation-aided separation of seven components from *Spirodela polyrrhiza* (L.) via counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 165, p. 160–165, 2016.

REZENDE, R. L. O. **Separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno por CLAE em fase estacionária quiral**. 2008. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-04022009-195023/>. Acesso em: 15/12/2016.

RUBIO, N. *et al.* Multiple dual-mode countercurrent chromatography applied to chiral separations using a (S)-naproxen derivative as chiral selector. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 48, p. 8505–8511, 2009.

RUBIO, N.; MINGUILLÓN, C. Enantioselective Recognition in Solution: The Case of Countercurrent Chromatography. In: BERTHOD, A (Ed.). **Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications**. Heidelberg: Springer, 2010. p. 241-274.

SADOWSKI, J.; GASTEIGER, J.; KLEBE, G. Comparison of automatic three-dimensional model builders using 639 X-ray structures. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 34, n. 4, p. 1000-1008, 1994.

SANTORO, M. I. R. M.; SINGH, A. K. Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 259-268, 2001.

SCRIBA, G. K. E. Chiral recognition in separation Science: un update. **Journal of Chromatography A**, v. 1467, p. 56-78, 2016.

SHIMIZAWA, R. *et al.* Present State of New Chiral Drug Development and Review in Japan. **Journal of Health Science**, v. 54, n. 1, p 23-29, 2008.

SINGH, A. K.; KEDOR- HACKMANN, E. R. M.; SANTORO, M. I. R.M. Enantiomeric separation and quantitative determination of propranolol enantiomers in pharmaceutical preparations by chiral liquid chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 301-308, 2004.

SINGH, A. K.; KEDOR- HACKMANN, E. R. M.; SANTORO, M. I. R.M. Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 553-566, 2006.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GARRARD, I. A comprehensive classification of solvent systems used for natural product purifications in countercurrent and centrifugal partition chromatography. **Natural product reports**, v. 32, n. 11, p. 1556–61, 2015.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012, 1 v.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/esquistossomose>>. Acesso em 05/12/2016.

SRINIVAS, N. R.; BARBHAIYA, R. H.; MIDHA, K. K. Enantiomeric Drug Development: Issues, Considerations, and Regulatory Requirements. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 9, p. 1205-1215, 2001.

SUMNER, N. Developing Counter Current Chromatography to meet the needs of pharmaceutical discovery. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 36, p. 6107-6113, 2011.

SUN, G. *et al.* Separation of phenylsuccinic acid enantiomers using biphasic chiral recognition high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 14, p. 1736–1741, 2014.

SUN, Q. *et al.* The cytotoxicity study of praziquantel enantiomers. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 2061-2068, 2016.

SUTHERLAND, I. A. Recent progress on the industrial scale-up of counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, p. 6-13, 2007.

SUTHERLAND, I. A., FISHER, D. Role of counter-current chromatography in the modernization of Chinese herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 740-753, 2009.

TANG, K. *et al.* Modelling and optimization of a two phase system for the separation of equal enantiomers by recycling high-speed counter-current chromatography. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 26, p. 821-828, 2015.

TAYLOR, M. **Global trends in schistosomiasis control**. Bulletin of the World Health Organization. v. 86, n. 10, p. 738, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin/volumes/86/10/08-058669/en/>>. Acesso em 11/12/2016.

TONG, S. *et al.* Enantiomeric separation of (*R*, *S*)-naproxen by recycling high speed counter-current chromatography with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 32, p. 5434–5440, 2011.

TONG, S. *et al.* Chiral ligand exchange high-speed countercurrent chromatography: mechanism and application in enantioseparation of aromatic  $\alpha$ -hydroxyl acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 110-118, 2014.

TONG, S.; ZHENG, Y.; YAN, J. Application and comparison of high performance liquid chromatography and high speed counter-current chromatography in enantioseparation of ( $\pm$ )-2-phenylpropionic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 79–86, 2013.

WAVEFUNCTION. **Spartan**, version 14. Wavefunction Inc: Irvine, 2014.

WHO. World Health Organization. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis**. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. Geneva: WHO Press, 2006, 56 p.

WHO. World Health Organization. **Schistosomiasis**: progress report 2001-2011 and strategic plan 2012-2020. Geneva: WHO Press, 2013.

WHO. World Health Organization. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>>. Acesso em 12/12/2016.

WOLF, C. **Dynamic Stereochemistry of chiral compounds**: principles and applications. Cambridge: RSC, 2008.

WOOD, P. *et al.* Counter-current chromatography separation scaled up from an analytical column to a production column. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1–2, p. 25–30, 2007.

WU, X. *et al.* Separation of chemical constituents from three plant medicines by counter-current chromatography using a three-phase solvent system at a novel ratio. **Journal of Chromatography A**, v. 1384, p. 107–114, 2015.

YAO, S.; *et al.* Developments of instruments and methods related with high-speed countercurrent chromatography and their applications in research of natural medicines. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 417-432, 2012.

YIN, H. *et al.* The separation of flavonoids from *Pongamia pinnata* using combination columns in high-speed counter-current chromatography with a three-phase solvent system. **Journal of Chromatography A**, v. 1315, p. 80–85, 2013.

YUAN, L. M. *et al.* Enantioseparation of Chlorpheniramine by High Speed Countercurrent Chromatography Using Carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin as Chiral Selector. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 19, p. 3057–3063, 2005.

ZEID, R. L. Regulatory and Development Considerations of Chiral Compounds. In: AHUJA, S. (Ed.). **Chiral Separation Methods for pharmaceutical and biotechnological products**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. p. 9-34.

ZHANG, Y. *et al.* Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 8, p. 571-577, 2005.

ZHOU, X. Y. *et al.* Aqueous biphasic system based on low-molecular-weight polyethylene glycol for one-step separation of crude polysaccharides from *Pericarpium granati* using high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 129–134, 2014.