UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do
fenoprofeno por CLAE em fase estacionária quiral

Ricardo Leite de Oliveira Rezende

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Dra. Maria Inês Rocha
Miritello Santoro

São Paulo
2008

RICARDO LEITE DE OLIVEIRA REZENDE

Separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno
por CLAE em fase estacionária quiral

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Fármaco e Medicamentos

Área de Concentração: Produção e
Controle Farmacêuticos
Orientadora: Profa. Tit. Dra. Maria Inês
Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2008

Ricardo Leite de Oliveira Rezende

Separação dos Enantiômeros do Cetoprofeno e do Fenoprofeno por CLAE em Fase Estacionária Quiral

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Fármaco e Medicamentos

Área de Concentração: Produção e Controle Farmacêuticos

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Profa. Tit. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
1º Examinador

Profa. Dra. Nadia Maria Volpato
Faculdade de Farmácia da UFRGS
2º Examinador

AGRADECIMENTOS

À minha amiga Vanessa Alves Pinheiro, por ter aberto as portas da Universidade de São Paulo para mim.

Ao meu amigo Maurício Rocha de Magalhães Sampaio, que com interesses comuns aos meus, facilitou a minha vinda para esta cidade e a minha permanência aqui.

À Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, por ter me concedido a oportunidade de realizar um antigo sonho.

Ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh, pela ajuda oferecida no início deste trabalho.

À minha amiga Renata Soares, companheira de mestrado, pela amizade sincera, confiança e incentivo.

Ao meu colega de pós-graduação Gabriel Lima Barros de Araújo, por fornecer as amostras de fenoprofeno cálcico diidratado (fármaco e medicamento) e por sua valorosa amizade.

Ao técnico de laboratório Renato Vieira do Nascimento Junior, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela ajuda com as determinações do teor de água, pelo método de Karl Fischer.

À doutoranda Kátia Cirlene Alves Botelho e ao técnico de laboratório Charles Lima Brito, pela ajuda na obtenção dos espectros de infravermelho.

À doutoranda Simone Schramm Andrade, por me ajudar em diversas ocasiões, sempre com extrema boa vontade.

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos e à sua esposa, Profa. Dra. Lucildes Pita Mercuri, um agradecimento especial, pelo exemplo inspirador, incentivo,

suporte, amizade e por toda ajuda oferecida em diversos momentos, deste e de outros trabalhos.

À minha mãe, Maria Emília Leite, por seu amor incondicional e por me ofertar sempre o amparo emocional e as palavras de encorajamento de que preciso. Simplesmente, tudo o que sou, ou o que faço, devo a ela.

À minha noiva Ana Ferreira Ribeiro, a quem amo tanto, por ter sido desde o início a minha maior incentivadora, mas também por todo seu amor, carinho e compreensão.

RESUMO

Durante muito tempo, os fármacos quirais de origem sintética foram comercializados predominantemente como racematos. Atualmente, sabe-se que os enantiômeros de um fármaco quiral podem apresentar propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas bastante distintas. Assim sendo, técnicas analíticas enantiosseletivas são fundamentais para a pesquisa e para o controle da qualidade desses fármacos.

O cetoprofeno e o fenoprofeno são dois fármacos quirais, pertencentes à classe dos agentes antiinflamatórios não-esteróides derivados do ácido propiônico. Seus enantiômeros apresentam significativas diferenças farmacodinâmicas. Por essa razão, pretendeu-se desenvolver, no presente trabalho, métodos de separação enantiomérica para ambos os fármacos. Para tanto, utilizou-se a técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência em fase estacionária quiral (coluna Whelk-O 1), nos modos normal e reverso. Abordagens uni- e multivariadas foram utilizadas para desenvolver e otimizar os métodos de separação.

Pôde-se observar que a enantiosseletividade exibida pela coluna Whelk-O 1 em fase normal é superior àquela exibida em fase reversa. Empregando a CLAE em fase normal, foi possível desenvolver métodos de separação apropriados para os enantiômeros de ambos os fármacos. Em fase reversa, no entanto, apenas os enantiômeros do fenoprofeno puderam ser separados satisfatoriamente.

SUMMARY

For a long time, the synthetic chiral drugs were marketed mainly as racemates. Currently, it is known that enantiomers of chiral drugs may exhibit quite different pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties. Therefore, enantioselective analytical techniques are critical to the research and quality control of these drugs.

Ketoprofen and fenoprofen are two chiral drugs, belonging to the class of propionic acid-derived nonsteroidal anti-inflammatory agents. Their enantiomers show significant pharmacodynamic differences. For that reason, we aimed to develop, in this work, separation methods for the enantiomers of both drugs. In order to do so, it was used the high-performance liquid chromatography technique and the Whelk-O 1 column as the chiral stationary phase, under normal- and reversed-phase modes. Uni- and multivariate approaches were used to develop and optimize the separation methods.

It was noted that the enantioselectivity exhibited by the Whelk-O 1 column under normal-phase mode is higher than that exhibited under reversed-phase mode. Under normal-phase mode, it was possible to achieve an appropriate separation for the enantiomers of both drugs. Under reversed-phase mode, however, only the enantiomers of fenoprofen could be successfully separated.

SUMÁRIO

1 Introdução	15
2 Revisão da literatura	19
2.1 Estereoquímica: a química em três dimensões	19
2.1.1 Histórico	19
2.1.2 Terminologia básica da estereoquímica	22
2.1.2.1 Outros termos comumente empregados em estereoquímica	27
2.1.3 Nomenclatura dos enantiômeros	29
2.2 A importância biológica e farmacêutica da quiralidade	33
2.2.1 Quiralidade e farmacodinâmica	35
2.2.2 Quiralidade e farmacocinética	39
2.2.3 Quiralidade e estudos de bioequivalência	42
2.2.4 Quiralidade e farmacotécnica	50
2.2.5 A quiralidade no desenvolvimento de novos fármacos	52
2.3 Cetoprofeno e fenoprofeno: agentes antiinflamatórios não-esteróides	62
2.3.1 Caracterização físico-química dos fármacos	69
2.3.1.1 Cetoprofeno	69
2.3.1.2 Fenoprofeno cálcico diidratado	70
2.4 Técnicas de separação enantiomérica	72
2.4.1 Técnicas analíticas de separação enantiomérica	77
2.4.1.1 Técnicas de eletromigração em capilares	77
2.4.1.2 Técnicas cromatográficas	83
2.4.1.2.1 Cromatografia em camada delgada	83
2.4.1.2.2 Cromatografia a gás	86
2.4.1.2.3 Cromatografia a fluido supercrítico	86
2.4.1.2.4 Cromatografia a líquido de alta eficiência	88
2.5 Métodos de separação enantiomérica por CLAE	89
2.5.1 Método indireto	89
2.5.2 Método direto	93
2.6 Princípios do reconhecimento quiral	94
2.7 Fases estacionárias quirais	95
2.7.1 Fases estacionárias quirais do tipo doador-aceptor	96
2.7.1.1 A coluna Whelk-O 1	98
2.7.2 Fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos	100
2.7.3 Fases estacionárias quirais derivadas de ciclodextrinas	102
2.7.4 Fases estacionárias quirais derivadas de éteres de coroa	104
2.7.5 Fases estacionárias quirais do tipo troca de ligantes	105
2.7.6 Fases estacionárias quirais derivadas de proteínas	106
2.7.7 Fases estacionárias quirais derivadas de antibióticos glicopeptídicos ..	108
2.7.8 Outras fases estacionárias quirais	109

2.8 Outras técnicas analíticas importantes	110
2.9 Revisão dos métodos para separação e determinação quantitativa dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno por CLAE	115
3 Objetivos	135
4 Justificativas	137
5 Materiais e métodos	139
5.1 Materiais	139
5.1.1 Reagentes e solventes	139
5.1.2 Substância química de referência	140
5.1.3 Amostras dos fármacos e medicamentos	140
5.1.3.1 Fármacos	140
5.1.3.2 Medicamentos	141
5.1.4 Equipamentos	142
5.1.5 Consumíveis e outros materiais	143
5.2 Métodos	144
5.2.1 Qualificação dos fármacos: ensaios de identificação	144
5.2.1.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho	144
5.2.1.2 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta	145
5.2.1.3 Determinação da faixa de fusão	146
5.2.1.4 Ensaio para identificação de cálcio	146
5.2.1.5 Determinação do teor de água pelo método de Karl Fischer	147
5.2.1.6 Determinação do teor de água por termogravimetria	148
5.2.2 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno por CLAE em fase reversa	148
5.2.2.1 Preparação da amostra	148
5.2.2.2 Preparação das fases móveis	149
5.2.2.3 Condições comuns a todos os ensaios	150
5.2.2.4 Ensaios preliminares	150
5.2.2.5 Planejamento fatorial fracionário	151
5.2.2.6 Planejamento composto central	155
5.2.2.7 Determinação das condições ótimas para a separação	159
5.2.2.8 Avaliação dos cromatogramas	161
5.2.3 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno por CLAE em fase normal	163
5.2.3.1 Preparação da amostra	163
5.2.3.2 Preparação das fases móveis	164
5.2.3.3 Condições comuns a todos os ensaios	165
5.2.3.4 Investigação da seletividade de diferentes modificadores orgânicos	165
5.2.3.5 Otimização da vazão da fase móvel	168
5.2.3.6 Otimização da temperatura da coluna	169
5.2.3.7 Otimização da quantidade de ácido acético empregada na fase móvel	170
5.2.3.8 Avaliação dos cromatogramas	170

5.2.4 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase reversa	171
5.2.4.1 Preparação da amostra	171
5.2.4.2 Preparação das fases móveis	172
5.2.4.3 Condições comuns a todos os ensaios	172
5.2.4.4 Desenvolvimento do método	173
5.2.5 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase normal	174
5.2.5.1 Preparação da amostra	174
5.2.5.2 Preparação das fases móveis	174
5.2.5.3 Condições comuns a todos os ensaios	175
5.2.5.4 Ensaios preliminares	176
5.2.5.5 Planejamento de mistura	177
5.2.5.6 Determinação das condições ótimas para a separação	180
5.2.5.7 Avaliação dos cromatogramas	182
5.2.5.8 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros	182
5.2.6 Aplicação dos métodos selecionados às amostras de medicamentos ..	183
6 Resultados	185
6.1 Qualificação dos fármacos: ensaios de identificação	185
6.1.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho	185
6.1.2 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta	188
6.1.3 Determinação da faixa de fusão	190
6.1.4 Ensaio para identificação de cálcio	190
6.1.5 Determinação do teor de água pelo método de Karl Fischer	192
6.1.6 Determinação do teor de água por termogravimetria	193
6.2 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno por CLAE em fase reversa	194
6.2.1 Ensaios preliminares	194
6.2.2 Planejamento fatorial fracionário	196
6.2.2.1 Avaliação dos cromatogramas obtidos	196
6.2.2.2 Cálculo e avaliação dos efeitos	200
6.2.3 Planejamento composto central	208
6.2.3.1 Avaliação dos cromatogramas obtidos	208
6.2.3.2 Construção dos modelos matemáticos	214
6.2.3.3 Avaliação do grau de ajuste dos modelos	215
6.2.3.4 Obtenção das superfícies de resposta	222
6.2.4 Determinação das condições ótimas para a separação	225
6.3 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno por CLAE em fase normal	226
6.3.1 Investigação da seletividade de diferentes modificadores orgânicos	226
6.3.2 Otimização da vazão da fase móvel	230
6.3.3 Otimização da temperatura da coluna	233
6.3.4 Otimização da quantidade de ácido acético empregada na fase móvel	236
6.3.5 Determinação das condições ótimas para a separação	240

6.4 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase reversa	241
6.4.1 Avaliação dos cromatogramas obtidos	241
6.5 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase normal	245
6.5.1 Ensaios preliminares	245
6.5.2 Planejamento de mistura	247
6.5.2.1 Avaliação dos cromatogramas obtidos	247
6.5.2.2 Construção dos modelos matemáticos	251
6.5.2.3 Avaliação do grau de ajuste dos modelos	254
6.5.3 Determinação das condições ótimas para a separação	262
6.5.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros	263
6.6 Aplicação dos métodos selecionados às amostras de medicamentos.....	263
7 Discussão	265
7.1 Qualificação dos fármacos: ensaios de identificação	265
7.2 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno por CLAE em fase reversa	268
7.3 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno por CLAE em fase normal	279
7.4 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase reversa	284
7.5 Desenvolvimento do método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase normal	286
7.6 Aplicação dos métodos selecionados às amostras de medicamentos.....	290
8 Conclusões	293
9 Referências bibliográficas	295

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, os fármacos quirais de origem sintética foram comercializados predominantemente como racematos. No entanto, graças aos avanços proporcionados pelas novas tecnologias que se tornaram disponíveis a partir da década de 80, permitindo a obtenção de enantiômeros puros em grandes quantidades, o interesse e a preocupação com a estereoquímica da ação farmacológica têm crescido. Hoje, pode-se dizer que a estereoquímica é reconhecida como uma dimensão essencial da farmacologia. Mais ainda, acredita-se que a assimetria (ou quiralidade) molecular tenha sido um fenômeno essencial para o surgimento dos primeiros organismos vivos, e que certamente o é para a manutenção da vida como a conhecemos.

A assimetria molecular permite a ocorrência de um tipo singular de isomerismo, o enantiomerismo. Os enantiômeros possuem propriedades físicas idênticas e apresentam o mesmo comportamento químico quando em ambientes aquirais. No entanto, o corpo humano é essencialmente quiral, possibilitando, assim, que enantiômeros de um fármaco apresentem propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas bastante distintas.

Por essa razão, algumas das principais agências reguladoras dos mercados de medicamentos passaram a adotar exigências específicas para o registro de novos fármacos quirais e medicamentos que os contenham. Tais exigências têm por objetivo obrigar as indústrias a fornecer evidências científicas que justifiquem suas escolhas pela comercialização de um dado racemato, ao invés da comercialização de um de seus enantiômeros em particular. Essa nova postura das agências reguladoras conduziu a um declínio dramático no lançamento de novos racematos,

além de estimular a comercialização da forma enantiopura apropriada de antigos fármacos racêmicos.

Atualmente, o número de fármacos quirais ultrapassa o número de fármacos aquirais comercializados. Observa-se também que os fármacos enantiopuros são responsáveis por uma parcela cada vez maior da fatia do mercado que cabe aos fármacos quirais. Entretanto, esse crescimento só se tornou possível devido ao maior domínio adquirido sobre as sínteses assimétricas e, sobretudo, aos enormes avanços nas técnicas de separação enantiomérica em escala produtiva. Paralelamente, as técnicas analíticas capazes de separar e quantificar os enantiômeros também se desenvolveram, como uma resposta às exigências impostas pela pesquisa, desenvolvimento e comercialização de fármacos enantiopuros. Dentro desse contexto, tais técnicas são fundamentais na produção e no controle da qualidade desses fármacos, onde são aplicadas para garantir a identidade e a 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, as técnicas analíticas capazes de separar e quantificar enantiômeros se revelam imprescindíveis na pesquisa clínica e pré-clínica de fármacos quirais, assim como em determinados estudos de bioequivalência.

Dentre as técnicas analíticas de separação enantiomérica, a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com o emprego de fase estacionária quiral (FEQ) merece especial destaque. A CLAE é uma técnica amplamente difundida e que possui boa aceitação, sendo capaz de oferecer os níveis de exatidão e precisão necessários às análises para determinação da pureza enantiomérica de fármacos. Além disso, a grande disponibilidade atual de colunas quirais permite encontrar o

seletor quiral adequado para a separação de praticamente qualquer fármaco, embora essa não seja, necessariamente, uma tarefa fácil.

O cetoprofeno e o fenoprofeno são dois fármacos quirais, pertencentes à classe dos agentes antiinflamatórios não-esteróides derivados do ácido propiônico. Esses derivados são denominados conjuntamente de *profenos*. Como os outros fármacos dessa classe, eles exercem ações antipirética, analgésica e antiinflamatória, sendo muito prescritos na prática médica. Seus enantiômeros apresentam significativas diferenças farmacodinâmicas, as quais conduziram ao interesse na avaliação do valor terapêutico individual dos mesmos. Por essa razão, alguns dos profenos se encontram disponíveis como enantiômeros puros, como é o caso do (S)-(+)-cetoprofeno. E a julgar pela tendência de comercialização de fármacos na forma enantiomericamente pura, espera-se que o mesmo ocorra com outros profenos atualmente comercializados como racematos, como o fenoprofeno.

Diante do exposto, ambicionou-se desenvolver, com o presente trabalho, métodos de separação enantiomérica para os fármacos, cetoprofeno e fenoprofeno, os quais pudessem satisfazer às exigências quanto à resolução mínima necessária para se determinar quantitativamente, e com exatidão aceitável, os enantiômeros de cada fármaco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTEREOQUÍMICA: A QUÍMICA EM TRÊS DIMENSÕES

A estereoquímica é a subdivisão da química que aborda o estudo do arranjo espacial relativo dos átomos nas moléculas.

2.1.1 HISTÓRICO

As origens da estereoquímica se encontram na primeira metade do século dezanove, quando então vários cientistas franceses estudavam os fenômenos da difração, interferência e polarização da luz. Em particular, a polarização linear da luz e a rotação do plano de polarização despertaram muito rapidamente a atenção dos cientistas por causa da possível relação entre esses fenômenos e a estrutura da matéria. Foi o físico Jean-Baptiste Biot quem descobriu em 1815 a atividade óptica, que é a habilidade, possuída por uma dada substância, de girar o plano de polarização da luz¹.

Mas foi o cientista francês, Louis Pasteur, quem verdadeiramente deu início à estereoquímica. À época (1848-1850), Pasteur estava especialmente interessado no estudo dos cristais e, mais especificamente, num tipo peculiar de cristais: os cristais hemiédricos, cuja geometria característica os faz não possuir um plano de simetria¹.

Uma nota publicada em 1844 pelo químico alemão Eilhard Mitscherlich perturbava Pasteur. Essa nota afirmava que os sais duplos paratartarato e tartarato

de sódio e amônio possuíam a mesma composição química, a mesma forma cristalina, com os mesmos ângulos, o mesmo peso específico, a mesma dupla refração e, conseqüentemente, a mesma inclinação em seus eixos ópticos. Quando dissolvidos em água, a refração de ambos era a mesma. Mas o tartarato dissolvido desviava o plano de polarização da luz, enquanto o paratartarato era indiferente. A nota dizia ainda que a natureza e o número, bem como o arranjo e as distâncias entre os átomos eram as mesmas. Isso fazia com que, para Pasteur, essas duas substâncias tão parecidas (sem, no entanto, serem idênticas) colocassem em dúvida a própria definição de espécie química dada por Chevreul em 1823¹.

Para Pasteur, Mitscherlich provavelmente se enganara ao não perceber uma suposta diferença na geometria dos cristais que, ainda segundo Pasteur, deveria estar relacionada à capacidade de desviar o plano de polarização da luz. Pasteur desconfiava que o tartarato de sódio e amônio devesse ser hemiédrico, como todos os outros sais do ácido tartárico já estudados por ele (e que desviavam o plano de polarização da luz) enquanto que o paratartarato não o seria. Pôs-se então a estudar esses sais e, como desconfiava, os cristais do tartarato eram hemiédricos, mas, para sua surpresa, os cristais do paratartarato também o eram. A única diferença observada por Pasteur era que, nos cristais do tartarato, todas as facetas hemiédricas se voltavam para a mesma direção, enquanto que, nos cristais do paratartarato, elas se voltavam ora para a direita, ora para a esquerda¹.

Pasteur entra então para a história ao realizar a primeira resolução de um conglomerado racêmico: munido de uma lente de aumento e pinça, ele separa os cristais de paratartarato em duas porções, de acordo com a direção para a qual se voltavam suas facetas hemiédricas. E examinando separadamente a solução desses diferentes cristais, observou que ambas produziam o mesmo desvio no plano de

polarização da luz, só que em direções opostas. Observou ainda que uma solução preparada com a mesma massa de cada um dos dois cristais não produzia nenhum desvio (ou, em outras palavras, que os desvios se anulavam)¹.

Como a assimetria dos cristais era destruída com a sua solubilização, Pasteur concluiu, corretamente, que a causa dos desvios no plano de polarização da luz deveria residir na assimetria das moléculas. Foi também Pasteur quem, pela primeira vez, obteve uma resolução enantiomérica empregando, separadamente, o método de formação de diastereômeros e o método da fermentação estereosseletiva por microorganismos¹.

O desenvolvimento das idéias estereoquímicas ingressou em um novo estágio em 1858, quando August Kekulé introduziu suas idéias sobre valência e ligações químicas e propôs uma forma de representá-las. Sua tese principal era a de que o carbono era tetravalente e capaz de se ligar a outros átomos de carbono para formar longas cadeias ou mesmo anéis. Os trabalhos de Kekulé serviram de base para que, em 1874, van't Hoff propusesse o modelo tetraédrico para o átomo de carbono ligado a quatro outros átomos, modelo esse que explicava corretamente o número de isômeros encontrados para os metanos di-, tri- e tetrasubstituídos. Também em 1874, Le Bel publicou suas idéias estereoquímicas, com uma abordagem diferente da de van't Hoff e bastante influenciado pelas idéias de Pasteur. Le Bel tratava da assimetria não de átomos individuais, mas de toda a molécula. Hoje, moléculas como os alenos substituídos, os espiranos e os bifenilos são bastante conhecidas por sua assimetria sem, no entanto, possuírem um carbono assimétrico¹.

2.1.2 TERMINOLOGIA BÁSICA DA ESTEREOQUÍMICA

Isômeros são compostos diferentes que possuem a mesma fórmula molecular. Os isômeros se dividem em isômeros constitucionais e estereoisômeros².

Os **isômeros constitucionais** são isômeros que se diferem uns dos outros em virtude de os seus átomos estarem ligados em ordens diferentes, ou seja, possuem conectividade diferente². A figura 2.1 apresenta três compostos que se relacionam entre si como isômeros constitucionais.

Figura 2.1 – Exemplos de isômeros constitucionais: 1-Propanol (I), 2-Propanol (II) e Éter etil metílico (III).

Os **estereoisômeros** são isômeros que diferem somente pela disposição de seus átomos no espaço. Estereoisômeros não são isômeros constitucionais, pois têm os mesmos átomos constitutivos ligados na mesma seqüência. Podem ser divididos em duas categorias gerais: os enantiômeros e os diastereômeros².

Os **enantiômeros** são estereoisômeros cujas moléculas se relacionam como imagens especulares que não se superpõem. Os enantiômeros possuem pontos de fusão e ebulição idênticos, bem como os mesmos índices de refração e espectros de absorção no infravermelho. Suas velocidades de reação com reagentes aquirais e solubilidades em solventes aquirais também não se diferenciam entre si. Os enantiômeros, no entanto, exibirão comportamento diferente quando interagirem com outras substâncias quirais que se apresentem na forma enantiomericamente

pura ou com excesso de um dado enantiômero. Os enantiômeros também terão comportamento distinto frente à luz plano-polarizada. Quando um feixe de luz plano-polarizada passa por uma solução de um dado enantiômero, o plano de polarização gira no espaço. Além disso, os enantiômeros provocam o mesmo desvio angular no plano de polarização do feixe de luz, mas em sentidos opostos. Diz-se que os enantiômeros, quando separados, são compostos opticamente ativos, em razão de seu efeito sobre a luz plano-polarizada².

Os enantiômeros só ocorrem com os compostos cujas moléculas são quirais. Diz-se que uma molécula é **quiral** quando ela possui a propriedade da quiralidade. **Quiralidade** é a propriedade geométrica de um objeto rígido (ou arranjo espacial de pontos ou átomos) de ser não-sobreponível à sua imagem especular. Se um objeto (ou molécula) é sobreponível à sua imagem especular então ele é denominado **aquiral**^{2,3}. Em outras palavras, uma molécula é aquiral se ela possuir um plano de simetria. Um **plano de simetria** se define como um plano imaginário que corta a molécula de tal forma que as duas metades sejam uma a imagem especular da outra².

Uma maneira de reconhecer a possibilidade da existência de enantiômeros é quando a molécula contém um átomo tetraédrico ao qual se ligam quatro diferentes átomos ou grupos de átomos. Esse átomo pode ser chamado de estereocentro ou centro quiral. Um **estereocentro** é definido como um átomo ao qual estão ligados grupos de tal natureza que a permuta de quaisquer dois grupos provoca a formação de um estereoisômero². Nem todos os estereocentros, porém, são tetraédricos. Os átomos de carbono centrais (carbonos 2 e 3) do *cis*- e do *trans*-2-buteno são exemplos de estereocentros planos triangulares, pois a permuta dos grupos em qualquer dos dois átomos também produz um estereoisômero² (figura 2.2).

Figura 2.2 – Exemplos de estereocentros planos triangulares no *cis*- e *trans*-2-buteno.

Em geral, em se tratando de compostos orgânicos, o termo estereocentro se refere a um estereocentro tetraédrico, a menos que se faça menção em contrário. Qualquer átomo tetraédrico coordenado a quatro grupos diferentes constitui um estereocentro, não só o carbono. O silício e o germânio (ambos no mesmo grupo da tabela periódica que o carbono), bem como o nitrogênio, o fósforo e o enxofre são os elementos que mais comumente desempenham o papel de estereocentros². A figura 2.3 ilustra três diferentes situações onde átomos de carbono exercem o papel de estereocentros.

Figura 2.3 – Três diferentes situações onde átomos de carbono exercem o papel de estereocentros.

Moléculas que não possuem um estereocentro ainda assim podem possuir uma imagem especular não-sobreponível, podendo existir como enantiômeros. Essas moléculas contêm um plano quiral ou eixo quiral e são, portanto, assimétricas

em relação àquele plano ou eixo. As estruturas dos enantiômeros da metaqualona, um sedativo-hipnótico, ilustram esse fato. Nessas moléculas há um eixo quiral entre o átomo de nitrogênio ligado ao anel benzênico e esse mesmo anel. A assimetria dessas duas moléculas se deve às interações estéricas entre os grupos metila, que não permitem a livre rotação em torno do eixo quiral⁴. As fórmulas estruturais dos enantiômeros da metaqualona são apresentadas na figura 2.4.

Figura 2.4 – Enantiômeros da metaqualona.

Diastereômeros são estereoisômeros cujas moléculas não são imagens especulares uma da outra. Diferentemente dos enantiômeros, as propriedades físicas e químicas dos diastereômeros podem diferir e não é incomum que possuam diferentes pontos de fusão e ebulição, índices de refração e solubilidades^{2,4}.

O diastereoisomerismo é comumente observado em moléculas com mais de um estereocentro. Uma regra útil para se calcular o número máximo de estereoisômeros nos compostos cujo estereoisomerismo provém de estereocentros tetraédricos é: o número total de estereoisômeros não é maior do que 2^n , onde n é o número de estereocentros tetraédricos. No entanto, uma estrutura com dois estereocentros nem sempre possuirá quatro estereoisômeros. Algumas vezes, possuirá apenas três. Isso acontece porque algumas moléculas são aquirais embora

tenham estereocentros². Um membro aquiral de um conjunto de diastereômeros que inclui um ou mais membros quirais é denominado **composto meso**³. A figura 2.5 apresenta as estruturas de todos os estereoisômeros possíveis para o 1,3-dimetilciclopentano e para o 1,2-dibromocicloexano.

Figura 2.5 – Estereoisômeros possíveis para o 1,3-dimetilciclopentano e para o 1,2-dibromocicloexano.

O **isomerismo cis-trans** é um caso particular de diastereoisomerismo onde os diastereômeros se diferem pela estereoquímica nos átomos adjacentes a uma dupla ligação ou em átomos diferentes em um anel. Os prefixos *cis* e *trans* são usados para descrever a relação entre dois ligantes conectados a esses átomos. O isômero será tido como um *cis*-isômero se os dois ligantes se localizarem no mesmo lado de um plano específico. Se eles se localizarem em lados opostos, sua posição

relativa será descrita como *trans* e o isômero será tido como um *trans*-isômero. O plano de referência apropriado de uma dupla ligação é perpendicular àquele das ligações σ (sigma) relevantes e passa através da dupla ligação. Para um anel, é o plano principal do anel (o anel sendo uma conformação, real ou assumida, sem ângulos reentrantes nos dois átomos ao qual se conectam os átomos ou grupos substituintes). Se há mais do que dois substituintes ligados ao anel, o uso de *cis* e *trans* requer a definição de um substituinte de referência. Para os alcenos, os termos *cis* e *trans* podem ser ambíguos e têm sido amplamente substituídos pela convenção *E,Z* para a nomenclatura de compostos orgânicos^{2,3}.

2.1.2.1 OUTROS TERMOS COMUMENTE EMPREGADOS EM ESTEREOQUÍMICA

Excesso enantiomérico: Para uma mistura de (+)- e (-)-enantiômeros, com a composição representada pelas respectivas frações molares (ou em peso) $F_{(+)}$ e $F_{(-)}$, onde $F_{(+)} + F_{(-)} = 1$, o excesso enantiomérico é definido como $|F_{(+)} - F_{(-)}|$ e o excesso enantiomérico em porcentagem, como $100 \times |F_{(+)} - F_{(-)}| \%$. Frequentemente, esse termo é abreviado como e.e.³.

Enantiomericamente puro/enantiopuro: Diz-se que uma amostra é enantiomericamente pura ou enantiopura quando todas as suas moléculas (dentro dos limites de detecção) possuem o mesmo senso quiral (mesma configuração espacial)³.

Epímeros: São diastereômeros que possuem a configuração oposta em apenas um de dois ou mais estereocentros tetraédricos presentes na respectiva entidade molecular³.

Racemato: É a mistura equimolar de um par de enantiômeros. O racemato não exibe atividade óptica. O nome químico ou fórmula de um racemato se distingue daquele dos enantiômeros pelo prefixo ($\pm$)- ou *rac*- (ou *racem*-) ou ainda pelos símbolos *RS* ou *SR*³.

Racêmico: relativo a racemato³.

Composto racêmico: É um racemato cristalino no qual os dois enantiômeros estão presentes em iguais quantidades em um arranjo bem definido dentro da rede cristalina de um composto de adição cristalino homogêneo³.

Conglomerado racêmico: É uma mistura mecânica equimolar de cristais, os quais contêm apenas um dos dois enantiômeros presentes em um racemato³.

Racemização: É a produção de um racemato a partir de um material de partida quiral no qual um enantiômero está presente em excesso³.

Resolução: É a separação de um racemato nos enantiômeros que o compõem³.

Configuração: No contexto da estereoquímica, o termo é restrito ao arranjo espacial de átomos de uma entidade molecular que diferencia os estereoisômeros, onde o isomerismo entre estes últimos não se deve a diferenças conformacionais³.

Conformação: é o arranjo espacial (temporário) de átomos que possibilita a distinção entre estereoisômeros os quais podem se interconverter pela rotação em torno de suas ligações simples^{2,3}.

Os termos citados acima são os mais usuais. Para a relação completa de termos relacionados à estereoquímica, sugere-se uma consulta à recomendação da IUPAC, intitulada *Basic Terminology of Stereochemistry*, de 1996.

2.1.3 NOMENCLATURA DOS ENANTIÔMEROS

São três os principais sistemas de nomenclatura usados para se diferenciar os enantiômeros, cada qual baseado num conjunto diferente de princípios ou regras.

- I. Os enantiômeros podem ser diferenciados de acordo com o sentido em que giram o plano da luz plano-polarizada. O nome do enantiômero dextrógiro é precedido do prefixo “(+)-” (ou “d-”) e isso significa que ele gira o plano da luz plano-polarizada no sentido horário. O enantiômero levógiro tem seu nome precedido do prefixo “(-)-” (ou “l-”) e isso significa que ele gira o plano da luz plano-polarizada no sentido anti-horário. Já a magnitude da rotação óptica para um dado par de enantiômeros

independe da configuração espacial, mas varia com a concentração do analito, temperatura, comprimento de onda, solvente, etc².

II. O segundo sistema de nomenclatura difere os enantiômeros correlacionando suas configurações à configuração de um composto de referência, arbitrariamente escolhido como padrão. Esse composto de referência é o gliceraldeído. O (+)-gliceraldeído é identificado como D-(+)-gliceraldeído e o (-)-gliceraldeído como L-(-)-gliceraldeído. As configurações das moléculas podem ser relacionadas entre si através de reações com a estereoquímica conhecida, como as reações que não provocam o rompimento das ligações de um dado estereocentro. As moléculas têm a mesma configuração relativa quando grupos semelhantes ou idênticos ocupam a mesma posição no espaço. Se suas configurações se assemelham ao D-(+)-gliceraldeído, recebem o prefixo “D-”. Se, por outro lado, se assemelham ao L-(-)-gliceraldeído, recebem o prefixo “L-”. As designações “D” e “L” não se relacionam, necessariamente, com o sentido da rotação óptica dos compostos aos quais se aplicam. Assim, pode-se encontrar compostos que sejam D-(+) ou D-(-) e ainda outros que sejam L-(+) ou L-(-). Esse sistema de identificação, embora apresente desvantagens, ainda persiste na nomenclatura de açúcares e aminoácidos, principalmente².

III. Enquanto o primeiro sistema não fornece nenhuma informação quanto à configuração dos enantiômeros e o segundo sistema fornece apenas sua configuração relativa, o terceiro sistema fornece informação quanto à

configuração absoluta dos enantiômeros e permite que qualquer pessoa conhecedora das regras de nomenclatura reproduza a estrutura de um dado composto a partir apenas de seu nome químico específico. Esse sistema é denominado sistema (*R-S*) ou sistema Cahn-Ingold-Prelog (em homenagem aos três químicos que o criaram). O “*R*” e o “*S*” vêm das palavras latinas *rectus* e *sinister*, significando direito e esquerdo, respectivamente. Com base nesse sistema, o nome químico tradicional é acrescido dos prefixos “(*R*)-” ou “(*S*)-” de acordo com a configuração dos enantiômeros². Esse sistema de identificação adota o seguinte procedimento:

- a. Cada um dos quatro grupos ligados ao estereocentro é numerado de acordo com a sua prioridade. A prioridade é atribuída, inicialmente, com base no número atômico do átomo diretamente ligado ao estereocentro. O grupo cujo átomo diretamente ligado ao estereocentro possui o maior número atômico tem a maior prioridade e *recebe* o número “1”; o grupo cujo átomo diretamente ligado ao estereocentro possui o segundo maior número atômico tem a prioridade seguinte e recebe o número “2”; e assim sucessivamente. No caso de isótopos, o isótopo com a maior massa atômica tem a prioridade mais elevada².
- b. Quando dois ou mais átomos diretamente ligados ao estereocentro possuírem o mesmo número atômico, consideram-se os outros átomos sucessivos presentes nos grupos e que não foram hierarquizados. O processo continua até que se possa tomar uma decisão. Atribui-se a

prioridade com base no primeiro ponto de diferença (por *diferença* se entende um átomo com maior número atômico). As regras para uma cadeia ramificada exigem que seja seguida a cadeia com os átomos de prioridade mais elevada².

- c. Orienta-se a fórmula (ou o modelo) de modo que o grupo com a prioridade mais baixa fique no ponto mais distante possível em relação ao observador².
- d. Traça-se então uma curva ligando o grupo de número 1 ao grupo de número 2 e este, por fim, ao de número 3. Se, nesse traçado, o sentido for horário, o enantiômero é identificado por “(R)”. Se o sentido for anti-horário, o enantiômero é identificado por “(S)”². A figura 2.6 ilustra a aplicação do sistema Cahn-Ingold-Prelog de nomenclatura.

Figura 2.6 – Exemplo da aplicação do sistema de nomenclatura Cahn-Ingold-Prelog ao aminoácido (S)-alanina.

No caso de compostos com grupos contendo ligações duplas ou triplas, esses grupos são hierarquizados como se os dois átomos envolvidos

nessas ligações fossem duplicados ou triplicados, respectivamente, ou seja:

onde os símbolos entre parêntesis são representações duplas ou triplas dos átomos na extremidade oposta da ligação múltipla. Dessa forma, o grupo vinila tem prioridade mais elevada que o grupo isopropila, por exemplo². Existem outras regras para estruturas mais complexas, mas que não serão apresentadas aqui.

2.2 A IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA E FARMACÊUTICA DA QUIRALIDADE

A quiralidade é aceita hoje como um dos principais pré-requisitos para a existência de vida seja na Terra, seja fora dela⁵. E, de fato, a quiralidade é um fenômeno que permeia todo o universo². A vida é essencialmente assimétrica, das partículas elementares microscópicas aos níveis molecular e macroscópico⁶.

Nos anos 50, os físicos puderam observar o fenômeno da quiralidade entre as partículas elementares, as mesmas que compõem as biomoléculas, ao descobrirem que os elétrons emitidos durante o decaimento β (beta) de núcleos radioativos são predominantemente levógiros⁶.

Além disso, a maioria das moléculas que constituem os seres vivos é quiral e, usualmente, apenas uma forma de cada molécula quiral ocorre numa determinada espécie. Todos os 20 aminoácidos que constituem as proteínas de ocorrência natural, exceto um, são quirais, e todos são classificados como esquerdos². Os processos químicos nas células vivas dependem dessas assimetrias e as mantêm, uma vez que são dirigidos por catálise enzimática. As enzimas são moléculas protéicas que possuem uma complexa estrutura tridimensional, capaz de fornecer um sítio ativo onde os substratos podem se encaixar. Apenas moléculas com a forma correta podem participar de reações catalisadas por enzimas. Dessa maneira, enzimas constituídas de L-aminoácidos podem sintetizar mais L-aminoácidos⁷. Já as moléculas dos açúcares naturais são quase todas classificadas como direitas, inclusive a desoxirribose, que é o açúcar que ocorre no ADN (ácido desoxirribonucléico). O próprio ADN tem estrutura helicoidal e todos os ADNs que ocorrem naturalmente espiralam para a direita².

Recentemente, foi demonstrado que a escolha dos organismos vivos terrestres pelos ácidos nucleicos dextrógiros baseados em D-açúcares e pelas proteínas dextróginas baseadas em L-aminoácidos poderia ser devida ao campo de força helicoidal dextrógiro gerado pela quiralidade orbital da Terra (QOT), que faz com que os enantiômeros helicoidais dextrógiros sejam mais estáveis que os correspondentes enantiômeros helicoidais levógiros. Esse campo de força é gerado principalmente pelos movimentos de rotação e translação da Terra, ambos dextrógiros. Como o campo gerado pela QOT sofre mudanças periódicas num dado ponto da superfície terrestre à medida que o tempo evolui, a estabilidade e a atividade das biomoléculas helicoidais também se alteram e dariam origem aos ritmos biológicos nos organismos vivos⁶.

A vida também é quiral em nível macroscópico. As conchas marinhas são quirais e as helicoidais têm uma hélice dextrógira. Muitos vegetais exibem quiralidade na forma como se enroscam nos elementos de apoio e, por razões ainda desconhecidas, a maioria das pessoas é destra².

Por fim, sabe-se que os enantiômeros podem apresentar ações diferenciadas quando interagem com seres vivos⁸. Um bom exemplo é o composto denominado limoneno; uma de suas formas enantioméricas é a principal responsável pelo odor de laranja, enquanto a outra é responsável pelo odor de limão². Outro exemplo é dado pelos feromônios quirais, que são substâncias empregadas para comunicação por alguns animais, onde um dos enantiômeros é geralmente bioativo, enquanto o outro é inativo ou antagoniza a atividade do primeiro⁸. O mesmo acontece com os fármacos quirais, geralmente caracterizados por diferentes atividades farmacológicas, podendo apresentar também diferentes perfis farmacocinéticos.

2.2.1 QUIRALIDADE E FARMACODINÂMICA

A maioria dos fármacos tem sua ação explicada com base na teoria dos receptores. As moléculas receptoras no organismo são proteínas que exibem alta afinidade por ligantes de certa estrutura molecular, de modo análogo à ligação enzima-substrato. A ligação de um substrato a um receptor aciona um mecanismo que se manifesta como uma resposta biológica. Esse mecanismo pode ser uma modificação na atividade de uma enzima ou o transporte de íons, etc. Qualquer que seja sua função fisiológica, os receptores têm algo em comum: são moléculas quirais

e podem, portanto, ser enantiosseletivos em suas ligações com moléculas mensageiras⁹.

A enantiosseletividade na interação fármaco-receptor foi proposta por Cushny em 1926, segundo o qual a diferença na atividade biológica entre dois enantiômeros seria devida à ligação destes a sítios de mesma quiralidade. Suas idéias, posteriormente, inspiraram o amplamente aceito modelo de contato em três pontos. Segundo esse modelo, o enantiômero mais ativo se ajusta melhor ao receptor porque seus três grupos, XYZ, adjacentes ao estereocentro, se apresentam numa seqüência tal que melhor corresponde à seqüência formada pelos grupos X'Y'Z' que representam os pontos de ligação no sítio de ligação quiral do receptor protéico. O enantiômero menos ativo seria incapaz então de se ligar tão efetivamente ao receptor, uma vez que representa a imagem especular do enantiômero mais ativo. A figura 2.7 ilustra a ligação dos enantiômeros ao receptor, segundo o modelo de contato em três pontos. Esse mesmo modelo foi aplicado mais tarde para a compreensão da especificidade enzimática e também serviu de base para a compreensão da separação cromatográfica de enantiômeros em colunas quirais⁹.

Figura 2.7 – Ligação de enantiômeros ao receptor, segundo o modelo de contato em três pontos.

Pode-se dizer que quanto melhor é o encaixe ou a ligação do fármaco com o receptor, melhor é o fármaco. Além disso, se ambos os enantiômeros conseguem se encaixar no sítio ativo, então é provável que nenhum dos dois tenha um bom encaixe. Há ainda uma relação entre a afinidade de um fármaco por seu receptor e a dose efetiva necessária para que sua ação farmacológica seja observada. A assim chamada *regra de Pfeiffer* diz que “quanto menor a dose efetiva de um fármaco, maior a diferença na ação farmacológica entre os isômeros ópticos do qual o fármaco faz parte”⁹.

À razão entre a atividade do enantiômero mais ativo (também chamado *eutômero*) e aquela do enantiômero menos ativo (também chamado *distômero*), dá-se o nome de *razão eudísmica*. Há uma relação direta entre a razão eudísmica e a potência de um fármaco; que é, quanto maior a razão eudísmica, mais potente é o fármaco ou menor é sua dose efetiva. O desenvolvimento desse conceito demonstrou que a enantiosseletividade na ação biológica é a regra e não a exceção⁹.

Várias situações podem ser encontradas no que diz respeito à ação farmacológica de enantiômeros:

I. *Toda a atividade farmacológica é devida a apenas um dos enantiômeros.*

Um exemplo desse caso é a α -metildopa, onde toda a atividade anti-hipertensiva se deve ao (S)-isômero. Se considerarmos o (R)-isômero inativo, devemos entender a inatividade como limitada aos testes farmacológicos realizados. O (R)-isômero pode ser considerado, nesse caso, como uma impureza isomérica⁹.

- II. *Os enantiômeros possuem idêntica atividade farmacológica, tanto qualitativamente, como quantitativamente.* A prometazina ilustra esse fato; seus isômeros possuem propriedades quase equivalentes quanto à ação anti-histamínica e à toxicidade⁹.
- III. *Os enantiômeros possuem a mesma ação farmacológica, mas potências diferentes.* Os bloqueadores β -adrenérgicos, como o propranolol, exemplificam esse caso. A razão eudísmica entre os isômeros do propranolol é igual a 130, sendo o (S)-(-)-propranolol o enantiômero mais ativo⁹.
- IV. *Os enantiômeros possuem diferentes ações farmacológicas, mas que são desejáveis terapeuticamente.* Nessa categoria se encontram os enantiômeros quinidina e quinina, com ações antiarrítmica e antimalárica, respectivamente. O propoxifeno é outro exemplo, onde o dextropropoxifeno é um agente analgésico e o levopropoxifeno, que é desprovido de ação analgésica, é empregado como antitussígeno⁹.
- V. *Um dos enantiômeros é responsável pela ação farmacológica almejada e o outro pelos efeitos colaterais indesejados.* Vários são os enantiômeros que se enquadram nesse grupo. O exemplo mais conhecido talvez seja o da talidomida, onde o (R)-isômero tem ação sedativa e o (S)-isômero é responsável por anomalias fetais⁹.

- VI.** *A ação farmacológica de um enantiômero, ou mesmo seu efeito colateral, é antagonizada pelo outro enantiômero.* Como exemplo, o (*R*)-(+)-enantiômero do diurético indacrinona apresenta o efeito colateral de reter o ácido úrico, já o (*S*)-(-)-enantiômero age como uricosúrico, promovendo a secreção de ácido úrico e, dessa forma, combatendo o efeito colateral do (*R*)-isômero⁹.

Embora boa parte da diferença observada nas atividades farmacológicas dos enantiômeros possa ser atribuída às suas diferentes afinidades pelos receptores, essa também pode ser devida à estereosseletividade presente nas diversas etapas farmacocinéticas.

2.2.2 QUIRALIDADE E FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética é a parte da farmacologia que estuda os processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos fármacos. Os processos de absorção, distribuição e eliminação são fenômenos que geralmente não diferenciam entre os enantiômeros. No entanto, se o fármaco interage com uma enzima ou sistema de transporte, então pode haver discriminação quiral e, com isso, diferenças farmacocinéticas entre os enantiômeros podem ser observadas.

Os processos farmacocinéticos são regulados, em parte, pelo transporte através de barreiras epiteliais. A pele e o trato gastrointestinal representam barreiras epiteliais importantes à absorção de um fármaco¹⁰. Durante a absorção pode ocorrer estereosseletividade, principalmente se o fármaco se assemelhar a um nutriente

para o qual sistemas de transporte ativo estão disponíveis; exemplos incluem a L-dopa, o L-metotrexato e a L-cefalexina¹¹.

O transporte através de células epiteliais também pode afetar a distribuição de um fármaco. Por exemplo, sistemas de transporte no epitélio do plexo coróide podem ser necessários para que um fármaco atinja o fluido cérebro-espinhal e o transporte através dos capilares especializados da barreira hematoencefálica é importante na distribuição de fármacos ao cérebro¹⁰. A estereosseletividade também pode ser observada, durante a distribuição, como consequência da ligação preferencial de um dos enantiômeros às proteínas plasmáticas (especialmente a albumina e, em menor extensão, a glicoproteína α_1 -ácida), além de proteínas teciduais¹¹. Como, de um modo geral, apenas a fração livre (ou não ligada) do fármaco é capaz de atravessar as membranas celulares para exercer sua ação terapêutica, ou para ser metabolizada, fatores capazes de influenciar a ligação do fármaco às proteínas plasmáticas podem afetar significativamente sua farmacocinética e farmacodinâmica¹².

No tocante à eliminação renal dos fármacos, espera-se que a filtração glomerular de estereoisômeros livres no plasma seja a mesma para cada isômero. Entretanto, a secreção e absorção ativas do fármaco nos túbulos renais podem apresentar estereosseletividade, como já foi demonstrado para o metoprolol, o pindolol e a cloroquina¹¹. O (S)-(-)-enantiômero do pindolol, por exemplo, tem uma depuração renal 30% maior que a do (R)-(+)-enantiômero¹⁰. No geral, essas diferenças tendem a ser modestas, com as razões enantioméricas da ordem de dois ou menos¹¹; entretanto, exceções a essa generalização existem, como a quinidina que é depurada quatro vezes mais rapidamente que a quinina¹⁰. Já para a ocorrência de excreção biliar, os fármacos têm de atravessar duas diferentes

membranas do hepatócito, a sinusoidal e a canalicular, onde os sistemas de transporte podem novamente ter papel relevante¹⁰.

No entanto, a contribuição mais importante para as diferenças nos perfis farmacocinéticos de uma mistura de isômeros ocorre, geralmente, como resultado da estereosseletividade em seu metabolismo. Esse fato não chega a ser surpreendente, uma vez que as reações de biotransformação envolvem a interação direta entre um substrato e uma enzima quiral. Nessas reações, um isômero pode ser metabolizado mais rapidamente que o outro, ou um estereoisômero em particular pode ser produzido preferencialmente. Podem ainda ocorrer ambas as situações, onde um enantiômero é preferencialmente metabolizado para formar um determinado isômero em particular¹¹.

As consequências estereoquímicas das reações de biotransformação se enquadram em uma das seguintes categorias:

- I. Um centro proquiral de uma molécula simétrica é metabolizado de maneira a formar preferencialmente um de dois enantiômeros possíveis¹¹.
- II. Os enantiômeros são metabolizados de maneiras distintas, onde as transformações são observadas em sítios da molécula distantes do centro quiral, de modo que a molécula original é quiral e o produto de sua biotransformação também o é¹¹.
- III. Um diastereômero é formado pela introdução de um segundo centro quiral à molécula original do fármaco. Isso pode se dar através de reações de funcionalização (também chamadas de reações de fase I) em um centro

proquiral ou através de reações de conjugação (fase II) com um agente de conjugação quiral, como o ácido glicurônico¹¹.

- IV. O substrato sofre uma transformação no centro quiral que resulta na perda da assimetria, onde, como resultado, temos um metabólito aquiral¹¹.
- V. O substrato quiral é bioconvertido em sua imagem especular, sem nenhuma outra mudança em sua estrutura, o que recebe o nome de *inversão quiral*. Alguns fármacos da classe dos antiinflamatórios derivados do ácido propiônico, coletivamente conhecidos como *profenos*, sofrem inversão quiral¹¹.

2.2.3 QUIRALIDADE E ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

O termo *biodisponibilidade* se aplica à velocidade e à extensão em que um fármaco é absorvido e se torna disponível no local de ação. O termo *bioequivalência* se refere à comparação entre as biodisponibilidades de diferentes formulações, ou lotes do mesmo produto farmacêutico. A avaliação da biodisponibilidade de medicamentos ou formulações requer o monitoramento da concentração do fármaco no plasma (ou no soro) e/ou na urina¹³.

A importância de métodos de doseamento enantiosseletivos no estudo dos processos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e de interação entre fármacos é amplamente reconhecida e várias revisões recentes destacaram o papel que a quiralidade exerce nesses processos, bem como a importância da

enantiosseletividade em explicar resultados atípicos na relação concentração-efeito e na interação entre fármacos, em se tratando de fármacos racêmicos. No entanto, a necessidade de métodos de doseamento enantiosseletivos em estudos de bioequivalência permanece sendo objeto de debates e controvérsias¹⁴.

Aqueles que defendem o uso dos métodos enantiosseletivos de doseamento o fazem com base no argumento de que, se a atividade farmacológica ou a toxicidade de um racemato é devida inteira ou predominantemente a um dos enantiômeros, os estudos de bioequivalência devem então se fundamentar na concentração do isômero ativo, ao invés de se fundamentarem na concentração total dos isômeros (ativo + menos ativo ou inativo). Em favor desse argumento está o fato de que hoje se encontram comercialmente disponíveis excelentes reagentes para derivatização quiral, bem como várias FEQs, o que torna possível o desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos para vários fármacos quirais¹⁵.

Já aqueles que são contrários ao uso de métodos enantiosseletivos em todos os estudos de bioequivalência argumentam que os métodos enantiosseletivos poderiam acrescentar uma maior dificuldade ao estudo, bem como iriam encarecê-lo, sem nenhuma vantagem aparente. Adicionalmente, argumentam que a determinação individual de cada isômero não mudaria o resultado do estudo, em virtude de os estudos tradicionais de bioequivalência serem baseados em planejamentos cruzados (*crossover design*) em que a mistura de isômeros é administrada na mesma proporção para todos os indivíduos, nos quais a concentração máxima e a área sobre a curva são comparadas sob condições idênticas depois da administração dos produtos teste e referência^{15,16}.

Entretanto, apesar das diferentes opiniões que cercam o assunto, parece haver um consenso geral de que não há a necessidade do emprego de métodos

enantiosseletivos na determinação da bioequivalência para racematos onde os enantiômeros são qualitativa e quantitativamente semelhantes em suas ações farmacológicas, toxicidades e perfis farmacocinéticos¹⁵.

A primeira recomendação acerca do uso de métodos enantiosseletivos de doseamento, em estudos de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos racêmicos, foi proposta por uma agência reguladora sueca, a *Medicinal Product Agency*, em 1991. Em 1992, novas recomendações foram propostas numa conferência intitulada *Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies*, ocorrida em *Crystal City, Washington*, nos Estados Unidos. Também em 1992, num artigo de Nerukar *et al.*, do *U.S. Office of Generic Drugs*, foi declarado que esse escritório, subordinado à *Food and Drug Administration* (FDA), não desejava impor o emprego de métodos enantiosseletivos, como exigência para os estudos de bioequivalência, na ausência de razões que o justificassem. No entanto, as razões que justificariam o emprego desses métodos não foram descritas em detalhes no artigo em questão. No ano seguinte, foi a vez de a Comunidade Européia publicar um guia declarando que estudos de bioequivalência para o registro de genéricos contendo fármacos quirais deveriam ser baseados em métodos enantiosseletivos de doseamento, a menos que os enantiômeros apresentassem cinéticas lineares¹⁴.

Em 1996, Karim¹⁷ publicou uma avaliação crítica das primeiras recomendações acerca do emprego de métodos enantiosseletivos nos estudos de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos racêmicos e, diante das limitações dessas recomendações, propôs um algoritmo com base no qual se pode decidir quando tais métodos devem ser empregados. De acordo com o algoritmo

proposto, os métodos enantiosseletivos devem ser usados em apenas duas situações:

- I. *Quando o eutômero sofre elevado metabolismo de primeira passagem, produzindo mudanças na razão plasmática entre os enantiômeros relacionadas à velocidade de absorção.* (Razões plasmáticas variáveis são observadas quando os processos de distribuição, metabolização e/ou eliminação são saturáveis e os fatores que contribuem para essa variação, além da velocidade de absorção, incluem a via de administração e a dose administrada). Nessa situação, o algoritmo sugere que as concentrações do eutômero e total (eutômero + distômero) devem ser determinadas. O principal argumento, nesse caso, para a determinação da concentração plasmática do eutômero, é que a concentração plasmática total determinada por métodos não-enantioespecíficos vai refletir principalmente a concentração do enantiômero menos ativo.
- II. *Quando o eutômero sofre pequeno metabolismo de primeira passagem se comparado ao metabolismo de primeira passagem que ocorre com o distômero, e uma razão plasmática específica entre os enantiômeros é importante para que o efeito terapêutico ótimo seja alcançado.* Nesse caso, as características do metabolismo alteram a concentração relativa entre os enantiômeros, favorecendo o aumento na concentração do isômero mais ativo. Nessa situação, o algoritmo sugere que as concentrações de cada enantiômero sejam determinadas separadamente.

Em 1997, foi a vez de Mehvar e Jamali¹⁸ recomendarem o emprego de métodos enantiosseletivos nos estudos de bioequivalência para os casos em que os enantiômeros apresentem farmacocinética não-linear ou em que os enantiômeros apresentem diferenças significativas no perfil farmacocinético, mesmo que possuam farmacocinética linear. Esses autores também sugeriram o emprego dessa abordagem para fármacos racêmicos passíveis de inversão quiral e para a maioria dos medicamentos de liberação modificada que contenham enantiômeros. Por outro lado, ainda de acordo com esses autores, métodos não enantiosseletivos seriam adequados nos estudos de bioequivalência para fármacos racêmicos com farmacocinética linear e enantiosseletividade mínima a moderada em seus parâmetros farmacocinéticos.

As atuais recomendações em vigor da *European Medicines Agency* (EMA)^{19,20} e da FDA²¹ acerca da condução de estudos de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos racêmicos são conflitantes. A EMA recomenda que todos os estudos de bioequivalência para registro de medicamentos genéricos contendo fármacos quirais devem ser baseados em métodos analíticos enantiosseletivos, a menos que:

- I. O medicamento candidato a genérico e o de referência contenham apenas um dos enantiômeros como substância ativa, sendo os enantiômeros idênticos e estáveis em ambos os produtos.
- II. Ambos os produtos contenham o racemato, onde os dois enantiômeros que o compõem apresentam farmacocinéticas lineares.

Por outro lado, a FDA recomenda o emprego de métodos não-enantiosseletivos nos estudos de bioequivalência. Os métodos enantiosseletivos são indicados apenas quando todas as condições descritas a seguir são atendidas, sendo, então, os critérios de bioequivalência aplicados aos isômeros separadamente. As condições são:

- I. Os enantiômeros exibem diferentes características farmacodinâmicas;
- II. Os enantiômeros exibem diferentes características farmacocinéticas;
- III. A eficácia/segurança se deve fundamentalmente ao enantiômero presente em menor concentração plasmática;
- IV. O processo de absorção é não-linear para pelo menos um dos enantiômeros (o que é evidenciado por mudanças na concentração relativa entre os enantiômeros em razão de mudanças na velocidade de absorção do fármaco).

O ibuprofeno é um fármaco capaz de ilustrar as divergências entre ambas as recomendações²². Segundo as recomendações da EMEA, um estudo de bioequivalência entre medicamentos formulados com ibuprofeno racêmico deveria ser conduzido com métodos enantiosseletivos, já que os enantiômeros desse fármaco podem demonstrar farmacocinéticas não-lineares. No entanto, de acordo com a FDA, métodos enantiosseletivos não seriam necessários, já que, nesse caso, o eutômero não é o enantiômero que apresenta a menor concentração plasmática.

Em um estudo onde o ibuprofeno foi utilizado como modelo, Garcia-Arieta *et al.*²² concluíram que os métodos não-enantiosseletivos seriam adequados para estudos de bioequivalência entre medicamentos desse fármaco, desde que as velocidades de absorção não diferissem muito entre os dois produtos. Contudo, os autores ressaltaram que as informações a respeito das velocidades de absorção são desconhecidas *a priori*. Esse estudo também demonstrou que métodos não-enantiosseletivos são capazes de mascarar a real diferença entre as formulações, em relação à exposição ao eutômero, não apenas quando a razão plasmática eutômero/distômero é muito pequena, mas também quando essa razão está acima ou próxima a uma unidade. Esse fato levanta questionamentos em relação à terceira condição a ser atendida, segundo as recomendações da FDA, para o emprego de métodos enantiosseletivos nos estudos de bioequivalência.

Garcia-Arieta *et al.*²² sugeriram ainda que métodos enantiosseletivos devem ser empregados quando a velocidade de absorção afetar a razão plasmática entre os enantiômeros, uma vez que, ainda segundo os autores, quantificações do eutômero são mais capazes de detectar diferenças entre as formulações, mesmo que isso signifique, a princípio, resultados menos precisos. Os autores afirmam ainda que a precisão poderia ser melhorada com o aumento do tamanho da amostra (número de voluntários) ou com o aumento do número de replicatas (número de vezes em que é repetida a quantificação dos enantiômeros nas amostras), ao passo que a exatidão seria prejudicada se o racemato fosse escolhido como um marcador substituto, já que este seria tendencioso.

Pelo acima exposto, fica evidente a necessidade de uma harmonização entre as atuais recomendações internacionais em vigor, no tocante à realização dos estudos de bioequivalência. Cabe aqui ressaltar também que o Brasil, representado

pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ainda não dispõe de legislação própria que, de maneira específica, regulamente ou oriente a condução dos estudos de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos quirais. Nesse contexto, o algoritmo desenvolvido por Karim¹⁷ e as sugestões apresentadas por Mehvar e Jamali¹⁸ seriam um bom ponto de partida para as discussões necessárias à harmonização das recomendações existentes (bem como para o posicionamento da ANVISA).

Parece racional supor que, qualquer que seja o texto final de uma recomendação harmonizada, ele deveria contemplar a relevância que o metabolismo de primeira passagem pode exercer sobre a razão enantiomérica plasmática, bem como a importância da possível saturabilidade dos diversos processos envolvidos na disposição dos enantiômeros (distribuição, metabolismo e eliminação). Além disso, a influência de outros fatores, como a dose administrada, a velocidade de absorção e a inversão quiral, deve ser considerada.

Até que haja essa harmonização, o papel da quiralidade nos estudos de bioequivalência precisa continuar sendo objeto de pesquisas e debates; e ainda que a necessidade de utilização de métodos enantiosseletivos se apresente mais como exceção do que regra nesses estudos, para alguns fármacos racêmicos tais métodos são fundamentais, especialmente em se tratando de formas farmacêuticas de liberação modificada.

2.2.4 QUIRALIDADE E FARMACOTÉCNICA

Algumas propriedades físicas entre racematos e seus respectivos enantiômeros puros podem apresentar diferenças significativas, especialmente se as substâncias se encontram na forma cristalina. Comumente, observa-se que os racematos apresentam pontos de fusão superiores àqueles de seus enantiômeros puros. Essa observação provavelmente se deve a uma organização mais eficiente das moléculas dentro da rede cristalina nos compostos racêmicos. Essa organização mais eficiente, por outro lado, leva a uma diminuição na solubilidade do composto racêmico em relação aos seus enantiômeros puros. Em se tratando de fármacos quirais, essa diferença de solubilidade, por sua vez, pode afetar a dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica, o que, conseqüentemente, é capaz de alterar a velocidade de absorção do mesmo pelo organismo. Dessa forma, para contornar problemas de solubilidade, pode ser vantajoso utilizar-se do enantiômero puro ao invés do composto racêmico. Entretanto, os compostos racêmicos e seus respectivos enantiômeros puros formam, freqüentemente, tipos diferentes de cristais; portanto, em se tratando de formulações sólidas, a substituição de um pelo outro é capaz de alterar as características de fluidez da mistura fármaco-excipiente, o que pode ser relevante no processo de produção do medicamento. Já o ponto de fusão geralmente mais baixo dos enantiômeros puros pode significar uma melhor penetrabilidade cutânea quando comparados aos compostos racêmicos, o que faz com que os primeiros sejam mais atrativos para o desenvolvimento de formulações transdérmicas²³.

Por outro lado, um medicamento contém, normalmente, um ou mais excipientes, que são usados para conferir estabilidade, facilitar a manipulação e a

administração do fármaco, conferir características organolépticas aceitáveis, etc. Vários dos excipientes comumente empregados são quirais, como os açúcares, a celulose, o alginato e as ciclodextrinas. Há, portanto, a possibilidade de interações diastereoméricas entre fármacos e excipientes quirais, que podem resultar em perfis de liberação diferentes entre dois enantiômeros, especialmente em formulações de liberação sustentada. Quando essas formulações são empregadas para veicular racematos, o racemato, ao dissolver-se na água que penetra na matriz de liberação lenta, forma um ambiente quiral semelhante ao encontrado nas colunas cromatográficas quirais. Nessas circunstâncias, os enantiômeros podem ser liberados a diferentes velocidades²³.

Nos últimos dez anos, alguns trabalhos²⁴⁻²⁷ investigaram a enantiosseletividade na liberação dos enantiômeros do cetoprofeno a partir de matrizes contendo derivados quirais da celulose, especialmente a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Esses trabalhos puderam comprovar a interação preferencial entre a HPMC e um dos enantiômeros do cetoprofeno, resultando em velocidades de liberação diferentes para cada um dos enantiômeros. Para formas farmacêuticas sólidas de uso oral, a velocidade de absorção do fármaco depende da velocidade com a qual o mesmo é liberado pela forma farmacêutica. Diferentes velocidades de liberação podem resultar em diferentes velocidades de absorção. Como já discutido anteriormente, no item 2.2.3, a evidência de absorção enantiosseletiva ou a formação de complexos entre fármacos e excipientes quirais que resulte em dissolução enantiosseletiva pode exigir a aplicação de métodos enantiosseletivos nos estudos de bioequivalência. No entanto, diferentes velocidades de liberação podem, em alguns casos, não apresentar grande relevância clínica ou biofarmacêutica²⁶. De qualquer maneira, o emprego de

excipientes quirais oferece uma linha de pesquisa para o desenvolvimento de formas farmacêuticas especialmente planejadas para liberarem seus fármacos enantiosseletivamente.

2.2.5 A QUIRALIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Atualmente, a importância e as implicações da quiralidade no desenvolvimento de novos fármacos são bem reconhecidas, seja no meio acadêmico, industrial ou regulatório. Há alguns anos, o desenvolvimento de medicamentos contendo apenas o enantiômero mais ativo não era considerado viável²⁸. Contudo, após décadas de farmacologia e terapêutica essencialmente bidimensionais, nas quais o arsenal terapêutico era dominado por racematos, uma redescoberta da estereoquímica ocorreu no início da década de 80. Essa redescoberta foi motivada pelo surgimento de novas tecnologias que possibilitaram a preparação de enantiômeros puros em quantidade, levando a um interesse renovado pelo papel da estereoquímica na ação dos fármacos²⁹.

Hoje, há dois métodos básicos para a produção de enantiômeros, que são: a síntese assimétrica e a separação de misturas racêmicas. Ambos são capazes de fornecer enantiômeros em pequena ou em larga escala, ajustando-se à demanda imposta pelo emprego de enantiômeros em pesquisa e desenvolvimento, ou pela produção de medicamentos. Os dois métodos evoluíram substancialmente nos últimos anos, facilitando o desenvolvimento de fármacos enantiopuros e diminuindo os custos envolvidos com o mesmo³⁰.

Embora o cenário atual favoreça o desenvolvimento de fármacos enantiopuros, cabe ao laboratório responsável a decisão final quanto à forma estereoisomérica do fármaco a ser desenvolvido (forma enantiopura ou racêmica, por exemplo). No entanto, qualquer que seja a decisão tomada, as agências reguladoras irão exigir, para o registro, justificativas científicas baseadas em parâmetros como qualidade, segurança e eficácia, bem como na relação risco-benefício atribuída ao emprego da forma escolhida. Por outro lado, as agências se mostram dispostas a analisar as decisões em conjunto com as indústrias e a discutilas caso a caso³¹.

Como em várias questões emergentes, a regulamentação do desenvolvimento de fármacos quirais começou sua história lentamente, aparecendo mais cedo em algumas declarações das agências reguladoras, mas aguardando algum tempo até que uma verdadeira política se formasse³⁰. A primeira abordagem direta à questão da quiralidade no desenvolvimento de novos fármacos, por parte das agências reguladoras, foi feita em 1992, com a publicação, pela FDA, do documento intitulado *FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs*³². No ano seguinte, foi a vez da EMEA expor seu posicionamento quanto à matéria, com a publicação do guia intitulado *Investigation of Chiral Active Substances*¹⁹. Um pouco mais tarde, em 1998, a agência reguladora canadense, *Health Canada*, também publica seu guia, intitulado *Stereochemical Issues in Chiral Drug Development*³³.

Esses guias têm foco principalmente nos compostos quirais que se relacionam como enantiômeros, já que diastereômeros, de um modo geral, não compartilham as mesmas propriedades químicas e físicas e não apresentam as

mesmas propriedades farmacológicas (a menos que ocorra interconversão *in vivo*), devendo ser tratados como fármacos distintos e desenvolvidos como tais^{19,32,33}.

Apesar de diferirem em pequenos detalhes, quatro pontos importantes são comuns entre as várias recomendações das agências reguladoras supracitadas: (1) os desenvolvedores devem reconhecer a ocorrência de quiralidade em novos fármacos, (2) tentar separar os estereoisômeros, (3) determinar a contribuição de cada estereoisômero para a atividade farmacológica de interesse e então (4) selecionar racionalmente a forma estereoisomérica que será proposta para comercialização^{19,29,32,33}.

Desta forma, durante a pesquisa por novos fármacos, quando uma molécula quiral é identificada como a mais promissora, as questões estereoquímicas, como a seleção do isômero desejado ou a opção pelo racemato, são consideradas durante o desenvolvimento, preferencialmente, em seu estágio inicial. Hoje, as estratégias potenciais para o desenvolvimento de fármacos quirais são: (1) desenvolvimento de um racemato; (2) desenvolvimento de um fármaco contendo uma razão fixa (não-racêmica) dos enantiômeros; (3) desenvolvimento de um fármaco enantiopuro completamente novo (*de novo*); e (4) o desenvolvimento de um fármaco enantiopuro a partir de um fármaco racêmico já aprovado, o chamado *quiral switch*²⁸.

No presente cenário, a menos que os dois enantiômeros ofereçam benefícios terapêuticos sinérgicos ou complementares e não estejam associados a nenhuma toxicidade aparente, o desenvolvimento de um racemato pode não ser uma opção viável economicamente. As atuais políticas das agências reguladoras sugerem que, para a aprovação de um racemato, não apenas este seja avaliado pré-clínica e clinicamente, como também cada um de seus enantiômeros individualmente. Em outras palavras, caso o desenvolvedor escolha pelo racemato, isto irá significar um

custo muito mais elevado com pesquisas, se comparado aos custos e benefícios decorrentes do desenvolvimento de um fármaco enantiopuro. Razões ainda existem que podem justificar o registro de um racemato, como: (1) os enantiômeros sofrem pronunciada racemização *in vivo* ou são desprovidos de estabilidade configuracional *in vitro*; e (2) os enantiômeros possuem perfis farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos semelhantes; entre outras poucas razões. No entanto, é possível afirmar que o desenvolvimento de racematos é cada vez menos a opção escolhida pelas indústrias farmacêuticas inovadoras^{28,33}.

Em alguns casos, graças às diferentes propriedades farmacológicas entre os enantiômeros, a razão entre eles pode ser manipulada de modo a oferecer o melhor efeito terapêutico ou o melhor perfil farmacológico, com base no uso proporcional dos dois enantiômeros em uma razão fixa²⁸. A indacrinona ilustra um desses casos: seu isômero dextrógiro apresenta forte ação diurética, mas também causa retenção de ácido úrico; no entanto, seu isômero levógiro apresenta propriedades antiuricosúricas que se contrapõem ao efeito colateral do isômero dextrógiro. Embora a indacrinona seja comercializada como racemato, foi avaliado o desenvolvimento clínico do fármaco nas razões de 1:4 e 1:8 entre seus isômeros dextro e levorotatórios, respectivamente^{34,35}. Não obstante a comercialização de fármacos contendo uma razão fixa (não-racêmica) dos enantiômeros ser racional e desejada em algumas situações, tais fármacos não representam uma porção significativa dos fármacos quirais disponíveis, considerando-se o número de racematos e fármacos enantiopuros comercializados.

Em contrapartida, graças ao reconhecimento da importância da quiralidade e aos avanços tecnológicos, tem sido observada uma onda de crescimento no desenvolvimento de fármacos enantiopuros²⁸. Atualmente, os fármacos enantiopuros

respondem por uma parcela cada vez maior das novas entidades terapêuticas que são introduzidas no mercado. Em 1992, correspondiam a 20% dos novos fármacos; em 2002, essa proporção já alcançava 75%²⁹. Os medicamentos contendo fármacos quirais na forma enantiopura, por sua vez, representaram 33% e 34% do total das vendas mundiais de medicamentos em 1999 e em 2000, respectivamente. Como essas vendas aumentaram pouco mais de 8% em 2000, esses números representam um crescimento de aproximadamente 13% na venda de medicamentos constituídos por fármacos enantiopuros no mesmo ano³⁶.

Algumas das vantagens do desenvolvimento e emprego de fármacos enantiopuros na terapêutica são: a diminuição da dose total de fármaco administrada, a simplificação da relação dose-resposta, a exclusão de uma fonte de variabilidade na resposta interindividual, bem como a eliminação da toxicidade devida ao distômero²⁹. O desenvolvimento de fármacos enantiopuros pode ser especialmente vantajoso se os dois enantiômeros possuírem diferentes ações farmacológicas que conduzam a benefícios terapêuticos exclusivos, como ocorre com o já citado propoxifeno (subitem 2.2.1), onde cada isômero é comercializado separadamente, com finalidades terapêuticas distintas²⁸. Esses fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos levaram a uma preferência crescente por fármacos enantiopuros nos círculos industrial e regulatório²⁹.

As principais razões (aqui excluídas as de motivação econômica) que justificam o desenvolvimento de um fármaco enantiopuro são: (1) o fato de que a atividade farmacológica desejada (ou o benefício terapêutico), com respeito a um racemato, reside em apenas um dos enantiômeros; e (2) o fato de que, a despeito da igualdade na ação farmacológica entre dois enantiômeros, haja benefícios

inequívocos no emprego de apenas um dos isômeros, em virtude da diferença em seus efeitos colaterais ou perfis toxicológicos²⁸.

Uma das alternativas para o desenvolvimento de fármacos enantiopuros, juntamente com a síntese *de novo*, é o *chiral switch*. Este último apresenta, no entanto, algumas vantagens exclusivas. Por um lado, há a questão do tempo necessário para o desenvolvimento e o custo envolvido, ambos consideravelmente menores que os exigidos no desenvolvimento de um fármaco totalmente novo. Por outro lado, a obtenção de patentes para enantiômeros de produtos racêmicos pré-existentes funciona como uma estratégia para inviabilizar a concorrência promovida pelos produtos genéricos, estabelecendo uma nova reserva de mercado e ampliando os prazos legais de proteção patentária^{29,30}.

Entre os agentes antiinflamatórios não-esteróides (AINEs), encontramos alguns exemplos de *chiral switch* que deram origem a sucessos mercadológicos. O ibuprofeno e o cetoprofeno racêmicos deram origem ao (S)-(+)-ibuprofeno e ao (S)-(+)-cetoprofeno, respectivamente. O emprego do (S)-(+)-ibuprofeno possibilitou algumas das vantagens observadas no uso de fármacos enantiopuros, como a diminuição da dose total de fármaco administrada e a redução da variabilidade na resposta interindividual, aliadas a um melhor perfil toxicológico e a um início de ação mais rápido. Por sua vez, o (S)-(+)-cetoprofeno é comercializado como dexcetoprofeno trometamol (sal formado pela reação entre o (S)-(+)-cetoprofeno e a trometamina), o qual é absorvido, a partir do estômago, em maior extensão e mais rapidamente que o ácido livre. Neste caso, o *chiral switch*, aliado à nova forma salina, oferece como resultado três vantagens: (1) analgesia efetiva em doses menores, (2) início de ação mais rápido e (3) reduzida irritação gástrica, com melhor tolerabilidade^{29,31}.

Adicionalmente, muito embora ainda não esteja no mercado, o (*R*)-enantiômero do flurbiprofeno está em fase adiantada de pesquisa clínica como fármaco promissor para o tratamento do câncer de próstata em estágio avançado. Este mesmo fármaco também poderá ser aplicado no tratamento do câncer de cólon e é uma das promessas para a prevenção e tratamento do mal de Alzheimer, o que demonstra que a avaliação em separado de cada enantiômero pode fornecer novas indicações para antigos fármacos³¹.

Entretanto, apesar das vantagens e dos sucessos do desenvolvimento de fármacos enantiopuros através do *chiral switch*, a literatura registra também alguns fracassos; em alguns casos, o benefício terapêutico pode não ser alcançado. Alguns exemplos relativamente recentes indicam que embora o *chiral switch* possa melhorar a eficácia de alguns fármacos, a segurança no emprego dos mesmos permanece como exigência fundamental para que obtenham aprovação e permaneçam no mercado. A dexfenfluramina, desenvolvida a partir da fenfluramina, deixou rapidamente de ser comercializada devido a casos fatais de valvulopatia cardíaca; em um caso semelhante, o dilevalol (*R,R*-enantiômero do labetalol) também foi retirado do mercado por causa de sua hepatotoxicidade^{28,30}.

Para que o desenvolvimento de um fármaco quiral tenha sucesso, várias questões são fundamentais e devem ser solucionadas. Uma dessas questões diz respeito ao desenvolvimento dos métodos necessários para a determinação qualitativa e quantitativa dos estereoisômeros, que sejam suficientemente sensíveis e seletivos para dar suporte ao desenvolvimento do medicamento e ao monitoramento do fármaco nos estudos pré-clínicos, clínicos e toxicológicos²⁸. Nesse contexto, algumas das recomendações das agências reguladoras exigem,

direta ou indiretamente, o emprego de métodos enantiosseletivos^{19,32,33,37} e são listadas a seguir:

- Padrões químicos de referência devem estar disponíveis para ambos os enantiômeros e devem ser de pureza enantiomérica aceitável.
- Durante a síntese de um fármaco enantiopuro, a identidade e a pureza enantiomérica dos materiais quirais de partida, bem como dos reagentes quirais devem ser estabelecidas. Os controles em processo, que permitam determinar a identidade e a pureza dos produtos intermediários de síntese nos quais centros quirais adicionais tenham sido introduzidos, devem ser enantiosseletivos.
- As especificações para o fármaco devem incluir ensaios enantiosseletivos para a determinação de sua identidade e de sua pureza ou composição. A análise da rotação óptica pode ser empregada para ambos os fins; mas um método mais específico e sensível é exigido para a determinação quantitativa dos enantiômeros.
- Em se tratando de um fármaco enantiopuro, um limite para a concentração do distômero, se presente, deve ser especificado. Esse limite deve ser estabelecido com base nas concentrações encontradas nos lotes empregados nos estudos pré-clínicos e clínicos. Nesses casos, o distômero deve ser considerado uma impureza e métodos validados para sua identificação e quantificação devem ser empregados.

- Em se tratando de uma mistura não racêmica de enantiômeros, limites para a proporção de cada componente devem ser criados, com base na composição dos lotes empregados nos estudos pré-clínicos e clínicos.
- A estabilidade do fármaco enantiopuro, com relação à ocorrência de racemização ou inversão estereosseletiva cruzada, sob condições de estresse ou nas condições padronizadas para os estudos de estabilidade de longa duração, deve ser investigada.
- A pureza enantiomérica do fármaco enantiopuro também deve ser investigada na forma farmacêutica, empregando-se um método enantiosseletivo validado, antes e durante os estudos de estabilidade conduzidos para se determinar o prazo de validade do medicamento. Os resultados dos estudos de estabilidade preliminares podem ser considerados suficientes. Entretanto, um ensaio para a análise da pureza enantiomérica deve ser incorporado à especificação do medicamento, se os resultados da investigação assim o justificarem.
- Um ensaio (com seus respectivos limites) que determine a composição da mistura não-racêmica, no que diz respeito à proporção de cada componente no medicamento é exigido. A proporção relativa dos componentes também deve ser monitorada nos estudos de estabilidade de longa duração.

- Durante as investigações pré-clínicas e clínicas, realizadas com o fármaco enantiopuro, estudos de estabilidade configuracional *in vivo* devem ser conduzidos. Se ocorrer inversão quiral do eutômero, o distômero deve ser considerado um metabólito e deverá ser tratado como tal no decorrer dessas investigações.
- Em se tratando de um fármaco enantiopuro, métodos enantiosseletivos de determinação quantitativa são pré-requisito para a avaliação da farmacocinética do fármaco, salvo casos específicos (como quando o fármaco é um composto endógeno animal, por exemplo). A farmacocinética do enantiômero deve ser seguida, empregando-se esses métodos em cada espécie animal usada nos estudos pré-clínicos, bem como durante os estudos de fase I, em humanos. Se ficar comprovado que racemização ou inversão quiral não ocorrem, então os métodos enantiosseletivos podem não ser necessários em todos os estudos subseqüentes.
- Para o desenvolvimento de racematos também são exigidos métodos enantiosseletivos durante os estudos farmacocinéticos, realizados em animais e em humanos e empregados para validar os resultados dos estudos de toxicidade aguda e com doses múltiplas.

2.3 CETOPROFENO E FENOPROFENO: AGENTES ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES

O cetoprofeno e o fenoprofeno pertencem à classe dos fármacos conhecidos como agentes antiinflamatórios não-esteróides (AINEs). Os AINEs disponíveis atualmente, em sua maioria, inibem tanto a atividade da ciclooxigenase-1 (COX-1) quanto da ciclooxigenase-2 (COX-2) e, dessa forma, inibem as sínteses das prostaglandinas e do tromboxano. A inibição da COX-2 parece mediar, pelo menos em parte, as ações antipirética, analgésica e antiinflamatória dos AINEs, porém a inibição simultânea da COX-1 provoca efeitos colaterais indesejáveis, principalmente os que levam às úlceras gástricas resultantes da produção reduzida de prostaglandinas e tromboxano³⁸.

Todos os AINEs são antipiréticos, analgésicos e antiinflamatórios, porém existem diferenças importantes em suas atividades. Quando utilizados como analgésicos, esses fármacos geralmente são eficazes apenas contra dores de intensidade leve a moderada. Embora seus efeitos máximos sejam muito mais brandos, os AINEs apresentam vantagens sobre os opióides, por não produzirem os efeitos colaterais indesejáveis destes últimos sobre o sistema nervoso central (SNC), como depressão respiratória e desenvolvimento de dependência física. São indicados no controle da dor pós-operatória crônica ou no controle da dor devida a inflamação, não sendo, em geral, capazes de aliviar a dor proveniente de vísceras ocas. Os AINEs são particularmente eficazes nas situações em que a inflamação conduz à sensibilização dos receptores da dor aos estímulos mecânicos ou químicos normalmente indolores³⁸.

Como antipiréticos, os AINEs reduzem a temperatura corpórea nos estados febris. A regulação da temperatura corpórea depende de um equilíbrio delicado entre

a produção e a perda de calor; o nível em que essa temperatura é mantida é regulado pelo hipotálamo. Na febre, esse nível está aumentado. A febre pode ser devida a uma infecção ou a uma lesão tecidual, inflamação, rejeição de enxertos, neoplasia maligna ou outras doenças. Um aspecto comum a todas estas condições é o aumento da produção de citocinas. As citocinas, por sua vez, aumentam a síntese da prostaglandina E_2 (PGE_2) em regiões do hipotálamo. A PGE_2 , por meio do aumento do monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico), estimula o hipotálamo a elevar a temperatura corpórea, promovendo aumento da produção de calor, juntamente com a redução da sua dissipação. Os AINEs desenvolvem sua ação antipirética inibindo a síntese da PGE_2 ³⁸.

No entanto, a principal aplicação clínica dos AINEs é como agentes antiinflamatórios no tratamento de distúrbios músculo-esqueléticos como artrite reumatóide, osteoartrite e espondilite anquilosante. Embora a capacidade de desencadear uma resposta inflamatória seja fundamental à sobrevivência, em algumas situações e doenças, a resposta inflamatória é exagerada e persistente, sem qualquer benefício aparente. Os processos inflamatórios envolvem uma série de fenômenos que podem ser desencadeados por vários estímulos, como agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo e lesão térmica ou provocada por outros agentes físicos. Em nível macroscópico, a inflamação geralmente é evidenciada por sinais clínicos bem conhecidos como eritema, edema, hiperestesia (hiperalgesia) e dor. As respostas inflamatórias ocorrem em três fases diferentes, cada qual aparentemente mediada por mecanismos diversos: (1) fase transitória aguda caracterizada por vasodilatação localizada e aumento da permeabilidade vascular; (2) fase subaguda, ou tardia, marcada principalmente pela infiltração dos leucócitos e células fagocitárias; e (3) fase proliferativa crônica, na qual há

degeneração tecidual e fibrose. Em geral, os AINEs proporcionam apenas alívio sintomático da dor e da inflamação associadas à doença e não interrompem a progressão da lesão patológica dos tecidos durante os episódios graves³⁸.

Entre os efeitos colaterais do tratamento com AINEs estão incluídos o bloqueio da agregação plaquetária (pela inibição da síntese dos tromboxanos), prolongamento da gestação (pela inibição da motilidade uterina) ou ainda parto espontâneo, inibição da função renal mediada pelas prostaglandinas, e ulceração e intolerância gastrintestinais. Desses, o mais comum é a ulceração gástrica ou intestinal. A lesão gástrica originada por esses fármacos, embora possa ser causada por irritação local (para medicamentos administrados por via oral), também pode ser provocada por inibição da biossíntese das prostaglandinas gástricas, especialmente PGI_2 e PGE_2 , que atuam como protetoras da mucosa gástrica, inibindo a secreção ácida do estômago, aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa e estimulando a secreção do muco citoprotetor do intestino³⁸.

A maioria dos AINEs quirais é representada por ácidos arilalcanóicos contendo, pelo menos, um átomo de carbono tetraédrico assimétrico. O cetoprofeno e o fenoprofeno são agentes importantes da classe dos AINEs derivados do ácido propiônico. Os membros dessa classe apresentam, em comum, um grupo carboxílico separado de um núcleo aromático por, em geral, um átomo de carbono. A esse núcleo podem estar ligados grupos lipofílicos volumosos. A presença de um substituinte α -metila realça a potência. São, portanto, moléculas com caráter ácido fraco^{38,39}. As fórmulas estruturais planas do cetoprofeno e do fenoprofeno estão apresentadas na figura 2.8.

Figura 2.8 – Fórmulas estruturais planas do cetoprofeno e do fenoprofeno.

Alguns dos medicamentos comercializados no Brasil que contêm o fármaco cetoprofeno estão listados na tabela 1.1⁴⁰. Para o fenoprofeno, no Brasil, existe uma única especialidade farmacêutica, cujo nome comercial é Trandor[®]. Todos os medicamentos listados contêm o respectivo fármaco sob a forma racêmica.

Tabela 1.1 – Alguns dos medicamentos que contêm os fármacos cetoprofeno ou fenoprofeno.

Fármaco	Nome Comercial	Forma Farmacêutica	Classificação	Laboratório
Cetoprofeno	Profenid [®]	Cápsula gelatinosa dura	Referência	Aventis Pharma Ltda.
		Comprimido de desintegração lenta		
		Comprimido revestido		
		Gel		
		Pó liofilizado p/ solução injetável		
	Cetoprofeno	Solução oral	Genérico	Apotex do Brasil Ltda.
		Supositório		
		Comprimido de desintegração lenta		
Cetoprofeno	Cetoprofeno	Pó liofilizado p/ solução injetável	Genérico	Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda.
		Cápsula gelatinosa dura		
	Cetoprofeno	Gel	Genérico	EMS Indústria Farmacêutica Ltda.
		Solução oral		
	Cetoprofeno	Pó liofilizado p/ solução injetável	Genérico	Eurofarma Laboratórios Ltda.
		Solução Injetável		
Cetoprofeno	Cetoprofeno	Cápsula gelatinosa dura	Genérico	Medley S/A Ind. Farmacêutica
		Comprimido revestido		
		Gel		
Cetoprofeno	Cetoprofeno	Solução oral	Genérico	Ranbaxy Farmacêutica Ltda.
		Comprimido revestido		
Fenoprofeno	Trandor [®]	Cápsula gelatinosa dura	Referência	Eli Lilly do Brasil Ltda.

Os derivados do ácido propiônico constituem um grupo de AINEs úteis e eficazes, podendo apresentar vantagens significativas sobre o ácido acetilsalicílico e a indometacina para muitos pacientes, mas apresentam também todos os inconvenientes desse grupo de medicamentos. Os AINEs derivados do ácido propiônico encontram indicação para o tratamento dos distúrbios músculo-esqueléticos já citados, bem como para o tratamento da artrite gotosa aguda. Além disso, como analgésicos, são indicados para os casos de tendinite e bursite agudas e para dismenorréia primária. Em geral, a intensidade dos efeitos colaterais é menor do que a associada à ingestão da indometacina ou de doses elevadas de ácido acetilsalicílico³⁸.

Para os AINEs derivados do ácido propiônico, a habilidade de inibir as ciclooxigenases e, conseqüentemente, a biossíntese das prostaglandinas é creditada quase que exclusivamente aos (S)-enantiômeros^{39,41,42}. Sabe-se que os (R)-enantiômeros são de 100 a 1000 vezes menos potentes que os (S)-enantiômeros na inibição da ciclooxigenase in vitro^{43,44}. São também os (S)-enantiômeros os responsáveis por vários dos efeitos colaterais relatados para essa classe de fármacos, já que muitos desses efeitos colaterais são conseqüência direta da inibição da biossíntese das prostaglandinas³⁸. Muito embora essa diferença farmacodinâmica tenha levado ao interesse, relativamente recente, na avaliação do valor terapêutico dos enantiômeros se administrados individualmente⁴⁵, vários fármacos dessa classe ainda são comercializados na forma racêmica, incluindo o cetoprofeno e o fenoprofeno. No entanto, graças aos atuais incentivos regulatórios^{19,28,30,32,33,37} e à conseqüente expansão no desenvolvimento de novos fármacos enantiopuros, bem como no assim chamado *chiral switch*^{29,31,36}, alguns dos AINEs se encontram disponíveis como enantiômeros puros. É o caso do (S)-(+)-

naproxeno, já desenvolvido na forma enantiopura, e do (S)-(+)-ibuprofeno e do (S)-(+)-cetoprofeno, resultados de *chiral switch* (subitem 2.2.5).

Por outro lado, apesar de a atividade antiinflamatória e a toxicidade gástrica estarem principalmente associadas aos (S)-enantiômeros, há evidências de que os (R)-enantiômeros dos AINEs derivados do ácido propiônico apresentem ação analgésica⁴⁶, como já foi demonstrado para o (R)-(-)-cetoprofeno e para o (R)-(-)-flurbiprofeno^{43,47-50}. De especial interesse é a aplicação do (R)-(-)-cetoprofeno no tratamento da dor neuropática⁵¹.

No que se refere à sua farmacocinética, o cetoprofeno exibe pouca estereosseletividade após sua administração na forma racêmica^{52,53}. Entretanto, sua extensa ligação à albumina sérica humana (ASH) ocorre de maneira aparentemente estereosseletiva, especialmente na ocorrência de doenças hepáticas⁵⁴⁻⁵⁷, enquanto que os enantiômeros do fenoprofeno, por outro lado, ligam-se à ASH ambos na mesma extensão⁵⁸.

Um aspecto particularmente importante do metabolismo dos AINEs derivados do ácido propiônico é a inversão unidirecional que ocorre do (R)-enantiômero para o (S)-enantiômero *in vivo*⁴⁵. A extensão com a qual esta inversão ocorre varia de fármaco para fármaco e também com a espécie animal considerada⁵⁹⁻⁶². O (R)-(-)-ibuprofeno pode exibir uma inversão a (S)-(+)-ibuprofeno superior a 70% após administração sistêmica, ao passo em que o (R)-(-)-flurbiprofeno sofre pouca ou nenhuma inversão ao (S)-(+)-enantiômero quando administrado a ratos ou humanos⁴⁸. Aproximadamente 10% do (R)-(-)-cetoprofeno é convertido a (S)-(+)-cetoprofeno após administração oral^{52,63}, mas esta porcentagem pode ser maior na ocorrência de doenças renais⁶⁴. Rubin *et al.*⁶⁵ determinaram as concentrações do (R)- e (S)-enantiômeros do fenoprofeno no plasma e na urina de voluntários após

administração oral do (*RS*)-fenoprofeno. Além disso, concentrações urinárias de seus principais metabólitos foram determinadas. Foi demonstrado que o (*R*)-enantiômero do fenoprofeno é bioconvertido a (*S*)-fenoprofeno, o qual foi a principal forma isomérica encontrada no plasma e na urina. A extensão da inversão quiral, do (*R*)-fenoprofeno ao seu (*S*)-isômero, foi praticamente total.

Há evidências de que a inversão quiral observada com alguns AINEs ocorre principalmente no trato gastrointestinal. Num estudo em ratos, observou-se que a extensão da inversão quiral do benoxaprofeno é maior após administração oral, quando comparada às administrações intravascular e intraperitoneal. Também em ratos, demonstrou-se que a extensão da inversão do (*R*)-cetoprofeno a (*S*)-cetoprofeno é semelhante após as administrações intravascular e intraperitoneal, mas é três vezes menor quando comparada à que ocorre após administração oral, sugerindo a importância do trato gastrintestinal na interconversão entre os enantiômeros¹⁴. Esses achados podem vir a contribuir como argumentos em favor do emprego dos métodos estereosseletivos nos estudos de bioequivalência entre medicamentos que contenham esses fármacos e que sejam destinados à administração oral, já que tanto a ocorrência de inversão quiral como o metabolismo pré-sistêmico são fatores críticos a serem considerados nesses estudos, principalmente se as formas farmacêuticas em questão forem formas farmacêuticas de liberação modificada.

Além disso, para vários AINEs derivados do ácido propiônico, a ocorrência de inversão quiral, associada às demais etapas farmacocinéticas possivelmente enantiosseletivas, faz com que a concentração plasmática relativa entre os enantiômeros de um desses fármacos esteja sendo constantemente modificada em favor do aumento relativo na concentração do (*S*)-enantiômero. Por essa razão, e

em virtude da diferença farmacodinâmica entre os enantiômeros, qualquer estudo com esses fármacos que objetive correlacionar a concentração plasmática com um dado efeito farmacológico deve ser conduzido com métodos estereoespecíficos de determinação quantitativa. Métodos analíticos incapazes de discriminar entre os enantiômeros, mas que apenas determinem a quantidade ou a concentração total presente desses isômeros, fornecerão informações não confiáveis ou, na melhor das hipóteses, informações de valor limitado que podem levar a erros de interpretação⁴⁵.

2.3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FÁRMACOS

2.3.1.1 CETOPROFENO^{66,67,68}

O nome químico do cetoprofeno é ácido (2*RS*)-2-(3-benzoilfenil)propanóico. Sua fórmula molecular é $C_{16}H_{14}O_3$ e sua massa molecular relativa é 254,28. O cetoprofeno se apresenta como pó cristalino, branco ou quase branco. É facilmente solúvel em acetona, em etanol e em diclorometano, sendo praticamente insolúvel em água. Funde-se entre 92 e 97 °C. Apresenta constante de dissociação (pK_a) a 25 °C igual a 4,5 e seu coeficiente de partição ($\log P$) no sistema octanol/tampão pH 7,4 é igual a 0. Seu espectro de absorção no infravermelho (obtido a partir de dispersão em pastilhas de brometo de potássio) é mostrado na figura 2.9. A tabela 2.2, por sua vez, apresenta as principais bandas observadas nesse espectro e suas prováveis atribuições.

Figura 2.9 – Espectro de absorção no infravermelho do cetoprofeno, obtido a partir de dispersão em pastilhas de KBr (Espectro de Referência).

Tabela 2.2 – Bandas principais observadas no espectro de absorção no infravermelho do cetoprofeno e suas prováveis atribuições.

Posição da banda / cm^{-1}	Atribuição
1693	Estiramento C=O no grupamento ácido ⁶⁹
1656	Estiramento C=O no grupamento cetona ⁶⁹
1284	Acoplamento entre a deformação (no plano) O-H e o estiramento C-O no dímero formado entre as moléculas de cetoprofeno por ligações de hidrogênio entre suas carboxilas ⁷⁰
1226	Deformação (no plano) O-H na hidroxila alcoólica livre ⁷⁰
714	Deformação C-H nos anéis aromáticos ⁶⁹
690	Deformação C-H nos anéis aromáticos ⁶⁹

2.3.1.2 FENOPROFENO CÁLCICO DIIDRATADO^{71,72,73}

O fenoprofeno é usualmente empregado em cápsulas e comprimidos sob a forma de fenoprofeno cálcico diidratado. O nome químico do fenoprofeno cálcico diidratado é (2*RS*)-2-(3-fenoxifenil)propionato de cálcio diidratado. Sua fórmula molecular é $(\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_3)_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e sua massa molecular relativa é 558,63.

Figura 2.10 – Fórmula estrutural plana do fenopropeno cálcico diidratado.

O fenopropeno cálcico diidratado se apresenta como pó cristalino, branco ou quase branco, inodoro ou quase inodoro. É solúvel em etanol 96%, pouco solúvel em *n*-hexanol, em metanol e em água, sendo praticamente insolúvel em clorofórmio. Funde-se entre 105 e 110 °C. Apresenta constante de dissociação (pK_a) a 25 °C igual a 4,5 e seu coeficiente de partição ($\log P$) no sistema octanol/tampão pH 7,4 é igual a 0,8. Seu espectro de absorção no infravermelho (obtido a partir de dispersão em pastilhas de brometo de potássio) é mostrado na figura 2.11. A tabela 2.3, por sua vez, apresenta as principais bandas observadas nesse espectro e suas prováveis atribuições.

Figura 2.11 – Espectro de absorção no infravermelho do fenopropeno cálcico diidratado, obtido a partir de dispersão em pastilhas de KBr (Espectro de Referência).

Tabela 2.3 – Bandas principais observadas no espectro de absorção no infravermelho do fenoprofeno cálcico e suas prováveis atribuições.

Posição da banda / cm^{-1}	Atribuição
1562	Estiramento simétrico e assimétrico no grupamento carboxilato ⁷⁴
1268	Estiramento assimétrico no grupamento éter ⁷⁴
1248	Estiramento assimétrico no grupamento éter ⁷⁴
1225	Estiramento assimétrico no grupamento éter ⁷⁴
1211	Estiramento assimétrico no grupamento éter ⁷⁴
696	Deformação (fora do plano) C-H nos anéis aromáticos ⁷⁴

2.4 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA

A ciência da separação enantiomérica evoluiu bastante desde os trabalhos pioneiros de Pasteur¹. Hoje, praticamente todo o conjunto de técnicas de separação pode ser empregado como ferramenta potencial para a resolução, direta ou indireta, de enantiômeros⁷⁵. No entanto, a maioria das técnicas de separação pode ser enquadrada em um de dois métodos fundamentais, ambos originalmente empregados por Pasteur, que são: (a) a resolução após a conversão dos enantiômeros em diastereômeros e (b) a resolução cinética de enantiômeros.

No primeiro método, os enantiômeros podem ser convertidos em diastereômeros pela formação de sais, através da reação com ácidos ou bases quirais, ou pela ligação covalente a outros reagentes quirais. Os diastereômeros, assim formados, podem ser posteriormente separados, graças às suas diferentes propriedades físicas. A separação dos diastereômeros pode se dar pelo emprego das técnicas de destilação, extração com solventes comuns, extração em fluido supercrítico, sublimação, separação mecânica, mas, mais comumente, a separação é realizada pela técnica de cristalização fracionada. Após a separação, as moléculas

originais dos enantiômeros podem ser recuperadas através da liberação do auxiliar quiral empregado (ácido ou base) ou, ainda, pelo rompimento adequado da ligação covalente com o reagente quiral. As técnicas cromatográficas e as técnicas de eletromigração em capilares para separação enantiomérica, quer envolvam a formação de compostos diastereoméricos estáveis ou apenas a formação de complexos diastereoméricos transitórios, também se enquadram aqui e serão discutidas mais adiante.

Na reação com um reagente quiral ou um catalisador quiral, os enantiômeros exibem diferentes velocidades de reação. Se essa diferença é suficientemente grande, os enantiômeros podem ser separados pela reação preferencial de um deles, acarretando em um excesso enantiomérico em favor do enantiômero menos reativo. Como este método se baseia na diferença entre as velocidades de reação, o método é chamado de resolução cinética. A resolução bioquímica entre enantiômeros, através da conversão enzimática enantiosseletiva de apenas um dos enantiômeros, é um caso particular de resolução cinética.

Por outro lado, enantiômeros puros podem ser obtidos não apenas pela resolução de racematos, mas também por meio de síntese assimétrica. Contudo, muito embora um número cada vez maior de métodos de síntese assimétrica esteja sendo descrito e aplicado à produção de substâncias enantiomericamente puras, relativamente poucos são selecionados para a produção em larga escala de enantiômeros, particularmente nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos fármacos. Apesar de a síntese assimétrica ser útil quando grandes quantidades dos enantiômeros puros são requeridas, o tempo necessário para o seu desenvolvimento e os custos envolvidos podem fazer com que, nesses estágios iniciais, essa abordagem seja inadequada para as pequenas quantidades dos enantiômeros puros

que são exigidas. Uma desvantagem adicional da síntese assimétrica é que ela fornece apenas um dos enantiômeros quando, na verdade, ambos são necessários para o desenvolvimento do novo fármaco. Portanto, técnicas preparativas fundamentadas em separações enantioméricas representam uma boa alternativa para a obtenção de ambos os enantiômeros^{75,76}.

Entre as técnicas que são capazes de separar enantiômeros em escala preparativa, as mais utilizadas são as técnicas cromatográficas⁷⁵, em várias de suas diferentes abordagens, como a CLAE, a cromatografia a fluido super- ou subcrítico (CFS)⁷⁷ e a cromatografia a gás⁷⁸ (CG), sendo as duas primeiras abordagens as mais empregadas atualmente⁷⁶. Outras técnicas podem ser aplicadas, associadas ou não às já citadas, como a técnica de leito móvel simulado⁷⁹ (associada à CLAE, CFS ou CG) e a técnica de cromatografia contra-corrente⁸⁰ (CCC). No tocante à CLAE, a utilização da técnica pelo método direto através do emprego de FEQs⁸¹ é de especial interesse, devido à recuperação facilitada dos enantiômeros.

Porém, quando a separação de grandes quantidades (de quilos a toneladas) de compostos quirais é realizada pelo emprego das técnicas cromatográficas, questões ecológico-ambientais devem ser levadas em consideração, de modo a reduzir a toxicidade e o risco potencial desses processos, em virtude da grande quantidade de solventes que é empregada. Ao mesmo tempo, esse grande consumo de solventes usualmente requer a prática de métodos de reciclagem. Assim, as técnicas que empregam fases móveis alternativas, constituídas dos assim chamados *solventes verdes*, tornam-se mais atraentes⁷⁵. Entre essas técnicas está a CFS, que emprega CO₂ e pequenas quantidades de modificadores alcoólicos. O emprego de CO₂ como fase móvel apresenta como vantagens, além do seu caráter amigável ao meio ambiente, o seu baixo custo e a sua facilidade de remoção. Além disso, por

possibilitar tempos de corrida reduzidos e a rápida remoção do solvente, a CFS tem se tornado o método de escolha para a separação de enantiômeros durante a pesquisa por novos fármacos. Adicionalmente, esta técnica já é capaz de fornecer, em procedimentos preparativos de escala laboratorial, enantiômeros puros em quantidades equivalentes a algumas centenas de gramas^{75,82}.

Por sua vez, a técnica de leito móvel simulado (LMS) também é de interesse crescente na indústria farmacêutica por combinar o uso efetivo de FEQs de elevado custo com a redução significativa no consumo total de solventes, durante a produção de grandes quantidades de enantiômeros puros. É ainda mais promissora a combinação de ambas as técnicas, CFS e LMS, na produção de enantiômeros em larga escala⁸².

São também muito comuns, em processos industriais de separação enantiomérica, as técnicas de cristalização fracionada e a resolução cinética (especialmente a resolução bioquímica através de conversão enzimática), empregadas isoladamente ou em conjunto com técnicas cromatográficas, como o leito móvel simulado. Quando a cristalização é a técnica escolhida, o emprego de métodos de racemização do enantiômero não desejado, o qual representa normalmente 50% do material de partida (ou qualquer outra razão) é bastante vantajoso, por razões ecológicas, mas também por razões econômicas⁷⁵.

Outras técnicas emergentes, como as membranas enantiosseletivas e a extração líquido-líquido, também possuem potencial para atender às finalidades preparativas, embora alguns problemas técnicos ainda tenham que ser superados para que essas técnicas sejam mais eficientes⁷⁵.

De um modo geral, as técnicas de separação servem a finalidades preparativas ou analíticas. Algumas técnicas, com as devidas adaptações, podem

servir às duas finalidades. Dependendo das características da molécula alvo e da escala da separação, as necessidades a serem atendidas pela técnica irão diferir. Em se tratando de separações em escala preparativa, além de uma enantiosseletividade adequada, uma elevada capacidade de carga é outro importante pré-requisito para a técnica. Aliadas a essas características, outras se fazem necessárias, como robustez, inércia química e estabilidade térmica da FEQ, bem como dos enantiômeros a serem resolvidos. Outros parâmetros devem ser cuidadosamente considerados, por sua relação com a produtividade da técnica, como a solubilidade dos enantiômeros no meio onde a separação ocorre (em contraste com as técnicas analíticas, onde a solubilidade não é usualmente um problema)⁷⁵.

As técnicas analíticas de separação enantiomérica, por sua vez, atendem a objetivos diferentes. Essas técnicas são necessárias para controlar a pureza enantiomérica de materiais de partida e de produtos finais. O controle também é essencial no caso de reagentes, auxiliares e catalisadores quirais empregados na síntese de substâncias enantiopuras, pois a qualidade desses compostos irá definir a pureza enantiomérica dos produtos resultantes. Além disso, como já foi discutido no subitem 2.2.5, as exigências de algumas agências reguladoras tornaram obrigatória a disponibilidade de métodos enantiosseletivos para a avaliação da pureza enantiomérica de fármacos quirais. Dessa maneira, as características de desempenho desejáveis em um método analítico de separação enantiomérica são: elevada sensibilidade (o que se traduz em baixos limites de detecção), exatidão, precisão e seletividade adequadas, de modo a permitir a determinação de razões enantioméricas extremas e a detecção de impurezas. Adicionalmente, o tempo

requerido para a realização de uma análise também deve ser considerado na avaliação e escolha do método⁷⁵.

Assim sendo, adotando as características de desempenho desejáveis como critérios para a escolha do método analítico de separação enantiomérica a ser empregado, as seguintes técnicas devem ser mencionadas como as mais adequadas aos objetivos analíticos: a cromatografia em camada delgada (CCD), a CG, a CFS, a CLAE e as técnicas de eletromigração em capilares (TECs)⁷⁵.

2.4.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA

2.4.1.1 TÉCNICAS DE ELETROMIGRAÇÃO EM CAPILARES

As TECs são aquelas onde as separações dos analitos ocorrem em capilares de reduzido diâmetro interno, por ação de um intenso campo elétrico. Essas técnicas incluem técnicas eletroforéticas capilares e técnicas cromatográficas capilares eletricamente conduzidas, baseadas em diferentes princípios de separação. Em alguns casos, esses princípios se sobrepõem⁸³. Como todas se baseiam no uso de capilares de reduzido diâmetro interno, elas são geralmente inadequadas para separações em escala preparativa. Contudo, têm sido aplicadas com sucesso na separação, em escala analítica, de uma ampla variedade de moléculas quirais⁸². A literatura científica está repleta de trabalhos que demonstram a aplicação dessas técnicas objetivando a separação enantiomérica e vários artigos de revisão foram publicados nos últimos anos⁸⁴⁻⁸⁹. Entre as diversas TECs, as mais comumente

empregadas para separação e determinação quantitativa de enantiômeros são: a eletroforese capilar, a cromatografia eletrocinética (e seus casos especiais, como a cromatografia eletrocinética micelar e a cromatografia eletrocinética em microemulsão) e a eletrocromatografia capilar.

Foi durante a década de noventa que as TECs se estabeleceram como ferramentas importantes para a separação enantiomérica com finalidades analíticas, sendo reconhecidas por apresentarem alto poder de resolução aliado à grande flexibilidade no que diz respeito às condições de separação⁸². O maior poder de resolução das TECs, quando comparadas à CLAE, deve-se à diferença nos perfis radiais de velocidade entre o fluxo eletroosmótico (TECs) e o fluxo laminar (CLAE), nos sistemas eletro- e hidrodinâmicos, respectivamente, onde o fluxo eletroosmótico apresenta um perfil plano (sendo um pouco mais lento apenas nas proximidades da parede do capilar), enquanto o perfil do fluxo laminar é parabólico (figura 2.12). Isso equivale a dizer que nas TECs ocorre menor dispersão dos analitos, resultando em maior eficiência. Essa maior eficiência facilita a separação dos enantiômeros, a qual é possível com fatores de separação tão baixos quanto $\alpha = 1,01$ ⁹⁰.

Figura 2.12 – Diferença nos perfis radiais de velocidade entre o fluxo laminar (CLAE) e o fluxo eletroosmótico (TECs).

A flexibilidade das TECs, por sua vez, é uma de suas vantagens mais atraentes. Usando a mesma instrumentação e o mesmo capilar, é possível, simplesmente alterando a composição do eletrólito de corrida, encontrar o meio ótimo para a separação⁸⁹. Ao mesmo tempo, alterando somente a composição do eletrólito de corrida, pode-se, inclusive, passar de uma para outra técnica, entre as várias TECs existentes. Há também grande liberdade na escolha dos seletores quirais a serem empregados⁸⁴, sendo que, na cromatografia eletrocinética, a maioria dos seletores quirais utilizados já foi anteriormente empregada na CLAE, à exceção dos surfactantes quirais. No entanto, um novo seletor quiral, que viesse a ser desenvolvido, seria mais facilmente aplicado nas TECs que na CLAE⁸⁹. Nesta última, FEQs são empregadas para promover o reconhecimento quiral ou, em uma abordagem diferente, aditivos quirais são adicionados à fase móvel com a mesma função. Contudo, na CLAE, o uso de fases estacionárias ou aditivos quirais eleva significativamente os custos associados ao emprego da técnica, uma vez que quantidades relativamente grandes de fase estacionária ou aditivo quiral são necessárias. Já nas TECs, embora alguns dos seletores quirais sejam caros, as quantidades comumente requeridas são consideravelmente reduzidas^{87,89}.

Há ainda a possibilidade de se combinar a grande eficiência das TECs com a seletividade da cromatografia, através da eletrocromatografia capilar. A eletrocromatografia capilar é usualmente caracterizada como uma técnica híbrida, que combina os princípios cromatográficos e eletroforéticos de separação; ou seja, combina a separação pela diferença nos coeficientes de partição entre duas fases, com a separação pela diferença na velocidade de migração dos analitos no campo elétrico^{86,88}. Na eletrocromatografia capilar, o capilar acomoda as fases estacionária e móvel. Os analitos, por outro lado, são transportados através do capilar de acordo

com suas mobilidades eletroosmóticas e também de acordo com suas mobilidades eletroforéticas efetivas, se carregados. Em alguns casos, com o objetivo de tornar a análise mais rápida e estabilizar o fluxo, um gradiente de pressão adicional é aplicado externamente, mas isso ocasiona a perda parcial do perfil plano favorável do fluxo eletroosmótico⁸⁶.

Adicionalmente, os tempos de análise relativamente reduzidos (quando comparados à CLAE), o baixo custo das análises, a necessidade de uma quantidade muito pequena de amostra, o consumo praticamente nulo de solventes orgânicos e a simplicidade instrumental são outras das vantagens que fazem as TECs se estabelecerem entre as principais técnicas utilizadas para a separação enantiomérica^{83,84,90}.

Não obstante todas as vantagens oferecidas pelas TECs, há duas razões normalmente apresentadas para que esse conjunto de técnicas ainda não esteja sendo amplamente empregado. Uma das razões é sua baixa sensibilidade. A baixa sensibilidade das TECs é atribuída à pequena quantidade de amostra injetada no capilar e também ao pequeno caminho óptico que possibilita a detecção, o qual é, normalmente, idêntico ao diâmetro interno do capilar. A segunda razão é relacionada a problemas com a validação dos métodos que empregam as TECs, como a falta de reprodutibilidade dos tempos de migração e da resolução entre os picos, e a menor precisão relacionada à quantificação⁹¹.

No entanto, há uma série de alternativas para aumentar a sensibilidade das TECs. Uma das alternativas é usar células de detecção que propiciem um caminho óptico aumentado, como as células do tipo *bolha* ou *Z*. Porém, o uso dessas células só é vantajoso nos casos em que o eletrólito de corrida não apresente absorção no comprimento de onda empregado. Além disso, com o emprego dessas células, a

sensibilidade só pode ser aumentada de 3 a 5 vezes (células bolha) ou ainda em 10 vezes (célula Z), sendo comum ocorrerem turbulências no eletrólito, as quais evitam um aumento da sensibilidade e ainda reduzem a resolução^{91,92}.

Uma alternativa muito melhor para aumentar a sensibilidade é o emprego de procedimentos de concentração *on-line* da amostra. Esses procedimentos permitem injetar um maior volume da amostra, sem que haja alargamento das bandas e a conseqüente perda da eficiência. Dentre eles, o mais simples é chamado de empilhamento dos analitos (*stacking*), caracterizado, normalmente, pela dissolução da amostra em uma solução tampão em geral mais diluída que aquela empregada como eletrólito de corrida^{90,91}. O empilhamento dos analitos pode, por sua vez, aumentar a sensibilidade entre 10 a 100 vezes⁹¹.

Outras técnicas vêm sendo usadas para concentrar os analitos e, ao mesmo tempo, eliminar interferentes e tornar a amostra mais compatível com o sistema empregado, como a extração e a microextração em fase sólida, a extração com membranas e a extração líquido-líquido⁹⁰. Há ainda a possibilidade de se aumentar a sensibilidade empregando outros sistemas de detecção em substituição à detecção por espectrofotometria UV-Vis, como a detecção por espectrometria de massas, a detecção por fluorescência induzida a laser e a detecção condutométrica⁹¹. Todavia, todos esses sistemas de detecção apresentam também suas desvantagens ou limitações.

Em resumo, há um grande arsenal de métodos robustos que podem melhorar a sensibilidade das TECs. Apesar disso, devido às limitações inerentes a esse conjunto de técnicas, freqüentemente não se consegue atingir a mesma sensibilidade que é atingida com o emprego da CLAE⁹¹.

No tocante à reprodutibilidade dos tempos de migração e da resolução entre os picos, Holzgrabe *et al.*⁹¹ afirmam que ela é extremamente dependente do condicionamento do capilar. Os autores afirmam ainda que a adoção de procedimentos adequados de condicionamento é necessária e, ao mesmo tempo, suficiente para garantir à técnica a mesma reprodutibilidade observada na CLAE. Além disso, também sugerem o revestimento da superfície interna dos capilares com soluções apropriadas e, em alguns casos, a própria substituição do capilar, como maneira de se assegurar a reprodutibilidade das TECs.

A temperatura à qual o capilar é exposto é outro fator importante que deve ser controlado para garantir a reprodutibilidade nas análises, pois afeta a viscosidade e a condutividade do eletrólito de corrida, influenciando sobre os tempos de migração. Um controle de temperatura também é exigido na CLAE. No entanto, ao passo em que, na CLAE, fornos para o controle da temperatura da coluna já são acessórios comuns, alguns equipamentos para TECs ainda não dispõem de um controle adequado da temperatura⁹¹.

Por fim, as TECs estão amplamente difundidas no meio acadêmico, mas ainda não ganharam a mesma projeção na indústria ou nas agências reguladoras. Nas farmacopéias, por sua vez, há um predomínio dos ensaios de determinação da rotação óptica como forma de se verificar a pureza enantiomérica para a grande maioria dos fármacos quirais, ainda que a determinação da rotação óptica seja um método bastante insensível. Apenas mais recentemente é que TECs foram introduzidas nas farmacopéias e, ainda assim, mais notadamente na análise de aminoácidos, peptídeos e compostos protéicos, bem como outros produtos de origem biológica. Em raras exceções, a pureza enantiomérica é determinada através de métodos mais sensíveis, como a CLAE ou as TECs⁹¹. Será interessante

descobrir, no futuro, qual dessas duas técnicas terá substituído, mais amplamente, o ensaio para determinação da rotação óptica. A julgar por sua prevalência nas farmacopéias, a CLAE concorre com grande vantagem.

2.4.1.2 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

As técnicas cromatográficas são processos físicos de separação nos quais os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, onde uma das fases é estacionária e a outra se move em uma direção definida. A fase estacionária pode ser um sólido, um gel ou um líquido. Se líquida, ela pode estar distribuída sobre um suporte sólido, que pode ou não contribuir para o processo de separação. O líquido pode estar ainda quimicamente ligado ao suporte sólido (fase ligada) ou pode ser imobilizado sobre o suporte por, por exemplo, polimerização *in situ*. A fase móvel, por sua vez, pode ser um gás, um líquido ou um fluido super- ou subcrítico. As técnicas cromatográficas podem ser classificadas ou divididas de acordo com vários critérios, como a forma do leito cromatográfico, o estado físico da fase móvel, ou ainda de acordo com o mecanismo de separação⁹³. Aquelas que mais se destacam no campo da separação enantiomérica são listadas e discutidas abaixo.

2.4.1.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

O senso comum entre vários pesquisadores é que a CCD está obsoleta e é incapaz de fornecer resultados reprodutíveis e de permitir grande resolução entre os

compostos em uma separação. No entanto, a disponibilidade de métodos confiáveis, robustos e eficientes para a resolução de enantiômeros por CCD representaria uma valiosa contribuição ao arsenal de técnicas capazes de separar enantiômeros⁹⁴.

A CCD é relativamente barata, rápida e amplamente difundida. Entre as várias outras vantagens oferecidas pela técnica, destacam-se a possibilidade de processamento paralelo de diversas amostras (com conseqüente redução do tempo total de análise por amostra) e o baixo consumo de solventes. Além disso, a CCD também pode ser empregada para a investigação de sistemas apropriados de separação enantiomérica para o uso posterior em CLAE⁹⁴.

Contudo, a CCD apresenta algumas desvantagens quando comparada às técnicas de CLAE e CG. Além das já citadas, menor reprodutibilidade e menor poder de resolução, os limites de detecção são algumas vezes superiores aos alcançados em outras técnicas cromatográficas (menor sensibilidade)^{94,95}. Adicionalmente, a CCD é mais dependente das condições ambientais, tais como umidade relativa, temperatura ou poluentes atmosféricos, bem como impõe dificuldades na análise de substâncias altamente voláteis ou que sejam sensíveis ao oxigênio ou à luz⁹⁵. Também é bastante mais difícil automatizar completamente a CCD ao nível que já se provou possível para a CLAE e para a CG, muito embora avanços importantes já tenham sido realizados nessa direção⁹⁴.

Entre esses avanços está a introdução de espectrodensímetros de varredura, os quais permitem a quantificação dos analitos diretamente sobre a cromatoplaca. Esses equipamentos permitem trabalhar em comprimentos de onda pertencentes às regiões ultravioleta e infravermelho do espectro eletromagnético, havendo também a opção de detecção por fluorescência. A aquisição de dados por espectrodensitometria e a moderna análise computadorizada de imagens

capturadas por câmeras de vídeo possibilitaram maior confiança na aplicação da CCD em análises quantitativas, além de, obviamente, evitar uma série de etapas trabalhosas. Essas etapas, antes necessárias para a quantificação dos analitos, com certeza contribuíam para a inexatidão e baixa reprodutibilidade da técnica. Hoje, a quantificação *in situ* nas análises por CCD está bem estabelecida⁹⁴ e o termo *cromatografia planar* é mais freqüentemente empregado para designar a moderna CCD instrumental.

Outro avanço importante, e que contribuiu para que a técnica pudesse ser considerada de alto desempenho, foi a comercialização de cromatoplasmas que empregam sílica-gel com partículas de menor diâmetro⁹⁵. Essa redução no diâmetro das partículas de sílica-gel possibilitou um aumento significativo na precisão da técnica, bem como a diminuição dos tempos de análise e do (já baixo) consumo de solventes⁹⁶. Entretanto, apenas um tipo de cromatoplasma especificamente destinado à separação enantiomérica está disponível comercialmente. Seu mecanismo de separação se baseia na troca de ligantes, sendo mais indicado para a separação de aminoácidos e seus derivados^{94,96}. Apesar disso, há a possibilidade de se utilizar cromatoplasmas convencionais e impregná-las com seletos quirais ou adicioná-los diretamente à fase móvel. Ao mesmo tempo, vários pares enantioméricos foram resolvidos em cromatoplasmas convencionais contendo derivados da celulose como fase estacionária, sem a adição de outros seletos quirais, graças à quiralidade da própria celulose^{94,97}.

Todavia, o número de separações enantioméricas realizadas por CCD é pequeno se comparado àquele por CLAE, mas o potencial para uma maior utilização já foi demonstrado⁹⁷. No entanto, embora a CCD seja uma técnica útil e barata, ela continuará sendo subutilizada para separações enantioméricas até que uma maior

variedade de cromatoplasmas com FEQs de elevada seletividade e ampla aplicabilidade esteja disponível comercialmente⁸².

2.4.1.2.2 CROMATOGRAFIA A GÁS

A CG continua sendo uma das mais importantes técnicas de separação enantiomérica, graças ao desenvolvimento de novas FEQs com maior estabilidade térmica e aos avanços na tecnologia das colunas capilares. Alta resolução, maior eficiência da coluna e simplicidade na composição da fase móvel estão entre as vantagens oferecidas pela técnica. A CG é particularmente útil na resolução de compostos não-aromáticos usados em síntese assimétrica, os quais não são facilmente separados por cromatografia líquida. Entretanto, a CG é limitada a compostos naturalmente voláteis e estáveis a temperaturas elevadas, ou àqueles que, após derivatização, possuam essas características. Além disso, as FEQs podem racemizar a altas temperaturas, o que, tipicamente, resulta em um decréscimo no fator de separação (α)⁸².

2.4.1.2.3 CROMATOGRAFIA A FLUIDO SUPERCRÍTICO

Nos últimos anos, ficou evidente a utilidade atingida pela CFS com o emprego de FEQs empacotadas, especialmente na pesquisa por novos fármacos. A CFS, a qual emprega fluido super- ou subcrítico (mais comumente CO₂), muitas vezes possibilita uma separação de 3 a 5 vezes mais rápida que a CLAE em fase normal,

devido à maior difusibilidade e à menor viscosidade da fase móvel. Essa maior velocidade é muito interessante para as separações analíticas e é extremamente importante para as separações preparativas⁸².

As vantagens da CFS ainda incluem: (a) maior resolução por unidade de tempo, menor tempo exigido para o reequilíbrio da coluna e maior simplicidade na composição da fase móvel, resultando em desenvolvimento mais rápido de métodos e análises mais rápidas quando comparados àqueles por CLAE; (b) a habilidade única de variar a força da fase móvel por meio de alterações em sua densidade, ou seja, variando-se as condições de temperatura e pressão; (c) a possibilidade de explorar diferentes seletividades, complementares àquelas observadas com a CLAE, pois as interações com a fase móvel não são equivalentes na CLAE e na CFS, além da compatibilidade com praticamente todos os seletores quirais usados na CLAE e na CG; (d) comparado ao hexano, o CO₂ possui maior compatibilidade com os solventes polares, possibilitando maior flexibilidade na escolha do modificador orgânico e, conseqüentemente, da fase móvel; (e) menor consumo de solvente orgânico e o caráter ambientalmente amigável do CO₂ e (f) uma combinação das vantagens inerentes da CG, sem as limitações causadas pela elevada temperatura sobre a seletividade, bem como a compatibilidade com os detectores comumente empregados na CLAE e na CG⁸².

A CFS, juntamente com a CLAE, está entre as técnicas mais difundidas e que mais rapidamente ganharam destaque no campo da separação enantiomérica⁸². Contudo, parece que o grande aproveitamento da técnica ocorreu principalmente na obtenção de compostos enantiopuros, onde, mais especificamente, outras vantagens do método podem ser aproveitadas, como a maior velocidade na obtenção dos enantiômeros e a facilidade de remoção do solvente. Na área

analítica, no entanto, a despeito do crescimento constante no número de usuários industriais e do aumento dramático na venda de equipamentos⁸², ainda será preciso mais tempo, especialmente em países em desenvolvimento, para que a CFS possa competir com a CLAE, devido ao número relativamente grande de cromatógrafos a líquido já instalados. Também contribui para a predominância da CLAE a ausência de uma descrição da técnica de CFS nos métodos gerais das farmacopéias, bem como a ausência, em qualquer monografia específica dos códigos oficiais de farmácia, de ensaios que a empreguem.

2.4.1.2.4 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

A CLAE é, dentre as técnicas de separação enantiomérica, a mais amplamente utilizada⁹⁸. Suas vantagens sobre outras técnicas cromatográficas incluem: (a) a possibilidade de ser aplicada tanto em escala analítica, quanto em escala preparativa, de modo eficiente, simples e flexível, permitindo sua efetiva adaptação à quantidade requerida de enantiômeros puros, quando para fins preparativos; (b) apresenta, com o emprego de detectores por espectrofotometria no UV-Vis, boa sensibilidade, que pode ainda ser aumentada com o emprego de outros detectores, como o detector de massas; (c) boa reprodutibilidade em relação aos tempos de retenção e em relação à resolução entre os picos (mas que pode ser prejudicada pelo desgaste da fase estacionária, por exemplo); (d) relativa facilidade de hifenização com outras técnicas; (e) elevado grau de automação e de aperfeiçoamento dos equipamentos (o que permite, por exemplo, o controle adequado sobre a temperatura da coluna); (f) possibilidade de se trabalhar à

temperatura ambiente ou a temperaturas inferiores; (g) possibilidade de se trabalhar com compostos voláteis e não-voláteis; (h) grande variedade de seletos quirais disponíveis para serem empregados na resolução dos enantiômeros; (i) grande aceitação por parte das agências reguladoras, além da vasta presença nas farmacopéias e (j) a presença de um número relativamente grande de equipamentos já instalados nas indústrias, nas instituições de ensino e pesquisa e nos laboratórios fiscais, o que faz com que a técnica seja escolhida também para o desenvolvimento de métodos de separação de enantiômeros, entre outras vantagens.

2.5 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA POR CLAE

Há dois métodos distintos de se empregar a CLAE para separar enantiômeros. São eles: o método indireto e o método direto.

2.5.1 MÉTODO INDIRETO

Se dois compostos quirais, racemato A e racemato B, em uma reação que não afete seus centros assimétricos, reagem de modo a formar ligações covalentes, então quatro diferentes produtos podem ser formados, de acordo com a reação química abaixo:

onde os produtos 1 e 4 se relacionam como enantiômeros entre si, bem como os produtos 2 e 3. Já os produtos 1 e 3 se relacionam como diastereômeros um do

outro, assim como os produtos 2 e 4. A princípio, a análise de uma mistura dos quatro isômeros acima, por CLAE convencional (não-quiral), poderia fornecer um cromatograma constituído de dois picos, onde um dos picos representaria a co-eluição dos isômeros 1 e 4 e o outro pico, a co-eluição dos isômeros 2 e 3. A razão da co-eluição desses picos é que a CLAE convencional pode separar diastereômeros, mas não enantiômeros⁹⁹.

Por outro lado, se o racemato A reagisse com uma forma enantiomericamente pura de B, por exemplo, (–)-B, a reação teria como produtos apenas os diastereômeros 2 e 4. A princípio, a análise da mistura contendo os produtos dessa reação, por CLAE convencional, também poderia fornecer um cromatograma constituído de dois picos. Contudo, nesse caso, cada um dos picos representaria apenas um dos diastereômeros, agora eluindo isoladamente. Se assumirmos que as respostas do detector aos dois diastereômeros são iguais, a razão entre as áreas dos picos dos diastereômeros será igual à razão enantiomérica de A, sendo esse o fundamento do método indireto. O método recebe esse nome, pois, através dele, são separados solutos que se relacionam como diastereômeros e não como enantiômeros⁹⁹.

No exemplo acima, o reagente (–)-B, usado para converter os enantiômeros de A em dois diastereômeros, é chamado de reagente de derivatização quiral (RDQ). As reações mais comuns envolvendo os RDQs são aquelas que levam à formação de amidas, carbamatos e uréias quirais, entre outras^{98,99}. Além disso, usualmente se obtém a separação dos diastereômeros formados empregando-se uma fase estacionária aquiral, embora uma FEQ também possa ser utilizada. Pode-se, ainda, empregar a CLAE em fase reversa ou normal. No entanto, a última é preferida, devido à sua melhor seletividade para isômeros⁹⁸.

Durante o desenvolvimento de um método indireto de análise enantiosseletiva por CLAE, uma série de precauções especiais devem ser tomadas para garantir exatidão, precisão e a própria aplicabilidade do método. Uma dessas precauções é garantir a pureza enantiomérica do RDQ, pois, conforme anteriormente explicado, a presença de ambos os enantiômeros em um RDQ, que a princípio deveria ser enantiomericamente puro, leva à formação de pares enantioméricos que não serão separados por CLAE convencional e, portanto, à formação de produtos que podem não mais refletir a razão enantiomérica da amostra original^{99,100}. Se não for possível o emprego de um RDQ enantiomericamente puro, ao menos se deve conhecer sua razão enantiomérica, para que possam ser aplicados fatores apropriados de correção aos resultados das determinações¹⁰⁰. Entretanto, a validade dessas correções em algumas situações é questionável⁹⁹.

Outros fatores podem levar à formação de produtos que não mais representem a razão enantiomérica da amostra original, como a ocorrência de racemização durante as etapas de derivatização ou, ainda, a ocorrência de resolução cinética. A primeira pode ocorrer tanto com a amostra a ser analisada, como com o próprio RDQ, e pode ser facilitada pelas condições necessárias à derivatização, no que diz respeito à temperatura, umidade, pH, interações com solventes, etc. Já a resolução cinética ocorre quando os enantiômeros que constituem a amostra reagem com o RDQ a diferentes velocidades. De maneira a evitar a resolução cinética, é fundamental garantir que ambos os enantiômeros reajam completamente. Para tanto, é importante otimizar a quantidade do RDQ empregado, bem como o tempo de reação. Novamente, assumem importância fatores como temperatura, pH, tipo e força das soluções tampão empregadas, entre outros, devendo ser investigada a influência de cada um deles¹⁰⁰.

Também é necessário construir curvas analíticas para cada diastereômero, relacionando suas concentrações com as respectivas respostas do detector, para garantir que não há diferenças na sensibilidade deste último frente a cada um dos isômeros¹⁰⁰.

Diante do exposto, fica evidente que a aplicação do método indireto requer uma série de investigações e experimentos adicionais, o que o torna muito mais trabalhoso que o método direto, a ser discutido mais adiante. Além disso, sua utilização fica limitada a moléculas enantioméricas que possuam grupos funcionais facilmente derivatizáveis, o que é outro inconveniente.

No entanto, apesar das inúmeras desvantagens do método indireto, algumas situações podem fazer com que seu emprego seja desejável. Há casos, por exemplo, em que, na ausência de um grupamento cromóforo na molécula original, a reação com um RDQ apropriado não só poderia propiciar a seletividade necessária, como também poderia aumentar a sensibilidade do método, introduzindo o grupamento cromóforo ausente. Do mesmo modo, há casos em que, mesmo com o uso de FEQs, a derivatização continua a ser fundamental para que haja o reconhecimento quiral ou, ainda, para que os analitos tenham um comportamento cromatográfico adequado⁹⁹. Apesar desses casos em que o método indireto se torna desejável, seu emprego hoje é muito menos freqüente, graças aos avanços no desenvolvimento e na oferta de colunas quirais, o que favorece a aplicação do método direto na CLAE enantiosseletiva.

2.5.2 MÉTODO DIRETO

Um método de separação enantiomérica por CLAE é considerado direto se ele realmente envolve a separação de moléculas que se relacionam entre si como enantiômeros, ou seja, moléculas não convertidas, através de ligações covalentes com um RDQ, em seus derivados diastereomericamente relacionados. No entanto, mesmo em um método direto, os enantiômeros originais podem ou não ser derivatizados através da reação com um reagente aquiral⁹⁸.

O método direto se fundamenta na formação de complexos moleculares diastereoméricos transitórios entre os enantiômeros a serem separados e um seletor quiral⁹⁸. Um seletor quiral é o componente quiral do sistema de separação capaz de interagir enantiosseletivamente com os enantiômeros a serem separados¹⁰¹ e pode ser representado, no método direto, por aditivos quirais adicionados à fase móvel ou pela FEQ.

Os aditivos quirais são empregados menos freqüentemente devido aos problemas que lhes são inerentes, como a necessidade de seu fornecimento contínuo que, aliada aos preços geralmente elevados dos seletores quirais, torna essa abordagem menos atraente. Além disso, seu uso é comumente associado a picos de formato inadequado e com baixo número de pratos, assim como também está associado a problemas relacionados à detecção⁹⁸. Se os aditivos quirais não são transparentes à radiação aplicada na detecção, seu emprego eleva a absorvidade da própria fase móvel e, conseqüentemente, diminui a sensibilidade em relação aos analitos de interesse.

Por outro lado, desde 1980, a utilização de FEQs tem sido predominante nas separações enantioméricas por CLAE⁹⁸. Apesar do custo relativamente elevado das

FEQs (normalmente mais caras que as fases estacionárias convencionais empregadas em CLAE), sua utilização é mais econômica quando comparada ao uso de aditivos quirais e não está associada aos inconvenientes deste último. Adicionalmente, se comparado ao método indireto de separação enantiomérica por CLAE, o emprego de FEQs requer muito menos trabalho e, provavelmente, é muito mais confiável.

2.6 PRINCÍPIOS DO RECONHECIMENTO QUIRAL

A expressão *reconhecimento quiral* se refere à habilidade de um seletor quiral de interagir de forma distinta com cada um dos enantiômeros. No método direto de separação enantiomérica por CLAE, os analitos e o seletor quiral formam complexos diastereoméricos transitórios, através de diferentes mecanismos de interação, como ligações de hidrogênio, interações π - π , empilhamento de dipolos (*dipole stacking*), complexos de inclusão, complexos de coordenação com metais, interações estéricas, entre outros⁹⁸. Não raro, um seletor quiral específico pode exibir múltiplos mecanismos de reconhecimento quiral⁹⁹. Os tipos de interação que irão ocorrer em um caso em particular dependem dos grupos funcionais presentes no seletor quiral, nos próprios analitos e também na fase móvel, sendo que essas interações poderão ser de natureza atrativa ou repulsiva¹⁰².

Os complexos diastereoméricos transitórios formados devem possuir diferenças em suas energias livres, sendo mais estável aquele cuja energia livre for menor. O enantiômero que formar o complexo mais estável, por sua vez, será aquele que ficará mais tempo retido pela coluna. A diferença de energia livre entre

os complexos diastereoméricos transitórios formados determina a magnitude da enantiosseletividade demonstrada nas interações quirais entre o seletor quiral e os analitos, ao passo em que a retenção e a eficiência observadas são determinadas pela soma das interações quirais e aquirais entre os mesmos⁹⁹.

Conforme o modelo mais amplamente aceito, proposto por Dalgliesh em 1952, ao menos três interações são necessárias entre o seletor quiral e um dos enantiômeros a serem separados. Além disso, pelo menos uma dessas interações deve depender da configuração estereoquímica do analito (ver subitem 2.2.1)^{98,99}. No entanto, Wainer e Doyle¹⁰³ propuseram um modelo que requer quatro sítios de ligação e uma quinta interação repulsiva (estérica), sendo esta a responsável pelo reconhecimento quiral. Este último modelo, de fato, mostrou excelente correlação com parâmetros cromatográficos obtidos na resolução de derivados do 1-fenil-2-aminopropano, onde foi empregada uma coluna do tipo *Pirkle*.

2.7 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS

Duas estratégias podem ser aplicadas para se alcançar a separação direta de enantiômeros por CLAE com o emprego de FEQs. A primeira estratégia consiste em selecionar a melhor FEQ disponível para resolver os enantiômeros de um dado racemato de interesse, enquanto a segunda consiste em modificar (derivatizar) os enantiômeros de maneira que eles possam então ser separados numa FEQ em particular⁸¹.

A primeira estratégia é a mais aplicada (provavelmente por causa de sua maior simplicidade). Através dela, tenta-se identificar a FEQ capaz de apresentar a

maior seletividade em relação aos compostos que se pretende separar. Para isso, algumas ferramentas podem ser usadas, como bancos de dados eletrônicos, guias do usuário (fornecidos pelos fabricantes de colunas), mas a experimentação de umas poucas colunas ainda é o método mais usado na prática⁸¹. A seleção dessas colunas para a experimentação deve ser feita de modo racional, com base no conhecimento das estruturas dos analitos e do seletor quiral, e também com base no mecanismo de reconhecimento quiral das FEQs disponíveis.

Estima-se que mais de 1300 FEQs tenham sido preparadas e que mais de 200 tenham sido comercializadas. Dessa maneira, é importante compreender e classificar as diferentes FEQs para que se possa selecionar a mais adequada para uma dada separação que se deseje⁸². As FEQs mais comumente utilizadas são descritas a seguir:

2.7.1 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO DOADOR-ACCEPTOR

As FEQs do tipo *doador-aceptor* são também conhecidas como FEQs do tipo *Brush* ou, em homenagem ao seu inventor, FEQs do tipo *Pirkle*. Pirkle se baseou na teoria da reciprocidade para planejar racionalmente diversas colunas do tipo doador-aceptor. Essa teoria afirma que o reconhecimento quiral é um evento recíproco, ou seja, se um dos enantiômeros de Y pode separar os enantiômeros de X, então um dos enantiômeros de X pode separar os enantiômeros de Y⁹⁸.

Nas FEQs do tipo Pirkle, um seletor quiral de peso molecular relativamente baixo é ligado a um substrato de sílica ou zircônio. As moléculas individuais do seletor quiral são igualmente distribuídas sobre o substrato e geralmente atuam

independentemente em suas interações com o soluto. Esse seletor quiral possui ao menos um grupo aromático, o qual é capaz de realizar interações π - π com o soluto. O grupo aromático pode ser π -doador ou π -acceptor. Alguns seletores possuem ambos os tipos de grupo aromático. A FEQ forma com o soluto um complexo π -doador/ π -acceptor e esse complexo é então estabilizado por ligações adicionais, que podem ser do tipo ligações de hidrogênio, interações de dipolo ou repulsão estérica¹⁰².

As FEQs do tipo Pirkle são geralmente utilizadas em fase normal, devido ao fato de as interações π - π serem favorecidas em solventes não-polares. Contudo, separações em fase reversa também podem ser realizadas com essas FEQs, particularmente para compostos altamente polares ou iônicos, como ácidos carboxílicos⁸². Em fase reversa, no entanto, a enantiosseletividade é usualmente inferior àquela obtida em fase normal; em alguns casos, pode ser observada a inversão na ordem de eluição dos enantiômeros, indicando uma mudança no mecanismo de reconhecimento quiral¹⁰². A influência da fase móvel pode inviabilizar a previsão da ordem de eluição dos solutos, a despeito do tamanho relativamente pequeno dos seletores quirais.

Entretanto, uma das vantagens das FEQs do tipo Pirkle é que várias delas estão disponíveis em ambas as formas enantioméricas, permitindo a alteração intencional da ordem de eluição dos enantiômeros através da simples substituição de uma das colunas por sua equivalente enantiomérica. Essa capacidade é útil em aplicações analíticas e preparativas. Além disso, em algumas separações, alguns picos podem ser largos e possuírem cauda. A quantificação de um enantiômero presente em menores concentrações e que elua junto à cauda do outro enantiômero (este último presente em maiores concentrações) normalmente requer maiores

valores de α , se comparada à situação oposta, onde o enantiômero presente em menor concentração elui antes⁹⁸.

As FEQs do tipo Pirkle possuem ainda outras vantagens, como a boa capacidade de transferência de massa, a durabilidade (consequência da estabilidade química e térmica que exibem) e a compatibilidade com uma grande variedade de solventes, o que permite, inclusive, seu uso nos modos super- e subcrítico¹⁰².

2.7.1.1 A COLUNA WHELK-O 1

A coluna Whelk-O 1 é uma coluna do tipo Pirkle, que deriva do 4-(3,5-dinitrobenzamido)tetraidrofenantreno, covalentemente ligado à sílica (figura 2.13). A Whelk-O 1 foi especialmente planejada para a separação do naproxeno e seu desenvolvimento foi baseado na teoria da reciprocidade. Primeiramente, utilizou-se o próprio naproxeno como seletor quiral, em uma coluna que foi empregada para separar uma série de compostos em seus respectivos enantiômeros. Mais tarde, um dos enantiômeros de um dos compostos do qual se obteve boa separação, atuando como seletor quiral, revelou-se capaz de separar os enantiômeros do naproxeno. Modificações e melhoramentos posteriores deram origem à coluna Whelk-O 1⁹⁸.

Figura 2.13 – Representação da estrutura química da FEQ (S,S)-Whelk-O 1.

A coluna Whelk-O 1 possui um grupo doador e um grupo aceptor de elétrons π , representados, respectivamente, pelos grupos aromáticos tetraidrofenantreno e dinitrobenzamida. Assim sendo, é capaz de resolver enantiômeros que contenham grupos π -ácidos ou π -básicos. De fato, a coluna Whelk-O 1 é capaz de separar diversos tipos de enantiômeros, exibindo uma versatilidade superior à apresentada pelas FEQs derivadas de polissacarídeos⁹⁸. Entre os compostos que podem ser resolvidos pela Whelk-O 1 estão amidas, epóxidos, ésteres, uréias, carbamatos, éteres, aziridinas, fosfonatos, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, alcoóis e os antiinflamatórios não-esteróides derivados do ácido arilpropanóico¹⁰⁴.

Além disso, como o seletor quiral é ligado covalentemente à sílica, a coluna Whelk-O 1 é compatível com todos os solventes normalmente empregados como fase móvel em cromatografia, o que representa mais uma vantagem sobre boa parte

das FEQs derivadas de polissacarídeos. Portanto, como outras colunas do tipo Pirkle, a Whelk-O 1 pode ser operada em fase normal, reversa ou, ainda, nos modos super- ou subcrítico. Em fase reversa, a fase móvel pode apresentar qualquer polaridade, mas o pH deve permanecer entre 2,5 e 7,5. Água, acetato de etila, acetonitrila, butanol, clorofórmio, diclorometano, etanol, heptano, hexano, isopropanol, metanol e tetraidrofurano são alguns dos solventes normalmente empregados com a coluna Whelk-O 1. Entre os aditivos que comumente participam da composição da fase móvel se encontram o ácido acético, o acetato de amônio, a di- e a trietilamina. Para que se mantenha a integridade da coluna, recomenda-se que o ácido trifluoroacético não seja utilizado¹⁰⁴.

2.7.2 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são polímeros de condensação de carboidratos (açúcares). A amilose e a celulose são dois dos polissacarídeos de ocorrência natural mais comuns. Os polissacarídeos naturais não são muito úteis para o preparo de FEQs, devido à baixa capacidade de resolução que oferecem e a pouca resistência mecânica que possuem. Contudo, compostos obtidos pela derivatização desses dois polissacarídeos naturais apresentam propriedades cromatográficas e enantiosseletivas superiores¹⁰².

Diversas FEQs constituídas de trifenilésteres ou trifenilcarbamatos de amilose ou celulose estão disponíveis comercialmente. Essas FEQs estão entre as que apresentam a mais ampla aplicabilidade entre as FEQs disponíveis e são capazes de resolver uma grande e variada seleção de compostos quirais. Também são

bastante flexíveis, pois podem ser usadas em fase normal ou reversa, em modo polar orgânico ou, ainda, super- ou subcrítico¹⁰².

O reconhecimento quiral nas FEQs derivadas de polissacarídeos é atribuído à formação de complexos de inclusão, aliada a interações adicionais que dependem do modo cromatográfico, como ligações de hidrogênio, interações de dipolo e π , e forças de van der Waals. A enantiosseletividade dessas FEQs pode variar em função do polissacarídeo e do composto empregado na derivatização do mesmo. Os componentes da fase móvel, a temperatura e o modo cromatográfico também podem afetar a enantiosseletividade¹⁰².

Em fase normal, o reconhecimento quiral ocorre pelo encaixe estérico em cavidades quirais, com a contribuição de ligações de hidrogênio e interações de dipolo e π . O modificador orgânico, normalmente um álcool, é capaz de alterar a enantiosseletividade. Solventes apróticos são capazes de melhorar a resolução onde as ligações de hidrogênio forem importantes para o reconhecimento quiral. No entanto, com a maioria das FEQs derivadas de polissacarídeos, o uso desses solventes não é normalmente recomendado¹⁰². Aliás, o número reduzido de solventes com os quais as FEQs derivadas de polissacarídeos são compatíveis representa uma limitação para várias dessas fases, exceção feita para aquelas onde o seletor quiral é ligado covalentemente à sílica, como as colunas Chiralpak IA, Chiralpak IB e Chiralpak IC.

Já em fase reversa, o uso das FEQs derivadas de polissacarídeos tem crescido rapidamente. Aqui, o mecanismo de reconhecimento quiral dominante é creditado à inclusão forma-dependente em cavidades quirais. Dadas as características dos eluentes normalmente empregados, interações secundárias ficam enfraquecidas em relação ao modo normal. A fase reversa é particularmente

útil para solutos que não podem ser analisados em fase normal devido à insolubilidade ou às características de retenção desfavoráveis. O modo polar orgânico, por outro lado, é mais comumente empregado em separações preparativas e apresenta seletividade diferente daquela observada em fase reversa¹⁰².

2.7.3 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) são polímeros macrocíclicos da glicopirranose (figura 2.14), de ocorrência natural, e têm forma toroidal assimétrica, assemelhando-se a um cone truncado (figura 2.15). As CDs estão disponíveis como α -, β - e γ -CDs, que se diferenciam entre si pelo número de unidades de glicopirranose que as compõem, a saber: 6, 7 e 8 unidades, respectivamente^{98,102}. Entretanto, a β -CD e seus derivados são as CDs mais amplamente empregadas nas separações enantioméricas⁹⁸.

As CDs possuem cavidades relativamente não-polares que permitem, através de interações hidrofóbicas, a inclusão de grupamentos não-polares de moléculas hóspedes. O tamanho (diâmetro) da molécula do analito, em geral, determina se o mesmo será capaz de se encaixar na cavidade da CD. Para que haja um bom encaixe e, conseqüentemente, para que haja reconhecimento quiral, a porção hidrofóbica da molécula do analito não deve ser nem muito menor, nem muito maior que a cavidade da CD⁹⁸. Interações adicionais também podem ocorrer por impedimento estérico ou através de ligações de hidrogênio entre a molécula hóspede e as hidroxilas presentes na borda da cavidade. Esses grupos hidroxila podem ser modificados por derivatização e tanto as CDs originais como as CDs

derivatizadas têm sido extensivamente utilizadas para a separação de enantiômeros¹⁰². As CDs também são empregadas, na CLAE, como aditivos quirais na composição da fase móvel. Além disso, seu uso também é bastante comum nas separações enantioméricas por TECs e por CG.

Figura 2.14 – Estrutura molecular da β-CD, polímero constituído de 7 monômeros de glicopirranose, conectados por ligações α-(1,4)-glicosídicas.

Figura 2.15 – Forma toroidal assimétrica da CD, que se assemelha a um cone truncado.

As FEQs derivadas de CDs, assim como as derivadas de polissacarídeos, também podem ser usadas em fase normal ou reversa, no modo polar orgânico ou, ainda, super- ou subcrítico. Um mecanismo de inclusão ocorre em fase reversa e essa interação é tanto mais forte quanto maior o conteúdo de água na fase móvel. Ainda em fase reversa, a seletividade é dependente da hidrofobicidade e da compatibilidade estérica dos enantiômeros. Moléculas que possuam anéis aromáticos na posição α ou β , com tamanho comparável à cavidade da CD, e pelo menos um grupo capaz de formar ligações de hidrogênio, próximos ao centro quiral, têm a separação favorecida. Em fase reversa, é vantajoso modificar o pH ou a força iônica da fase móvel para melhorar o mecanismo de inclusão. Em outros modos de separação, o soluto tem que competir com os componentes não polares da fase móvel pela cavidade da CD e o mecanismo de reconhecimento quiral é alterado. No modo polar orgânico, as interações predominantes são ligações de hidrogênio com as hidroxilas no exterior da CD. A separação é favorecida para solutos que possuam um mínimo de dois grupos distintos capazes de formar ligações de hidrogênio (um dos quais deve estar ligado ao centro quiral ou estar próximo a ele) e um grupo volumoso próximo ao centro quiral^{82,102}.

2.7.4 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE ÉTERES DE COROA

Éteres de coroa são compostos cíclicos heteroatômicos que, diferentemente das ciclodextrinas, possuem uma cavidade hidrofílica e a superfície exterior hidrofóbica. A cavidade dos éteres de coroa possui uma forte afinidade por cátions, predominantemente através de interações eletrostáticas. Os éteres de coroa 18-

coroa-6 podem complexar não apenas cátions inorgânicos, mas também aminas aromáticas primárias. Essa interação ocorre principalmente através da formação de ligações triplas de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio do grupo amônio e os átomos de oxigênio do éter de coroa. A introdução de grupos volumosos no exterior desses éteres propicia barreiras estéricas e induz interações enantiosseletivas com a molécula hóspede. Se a molécula hóspede é capaz de formar complexos razoavelmente estáveis com o éter de coroa, então as interações repulsivas ou atrativas com essas barreiras diminuem a estabilidade do complexo formado com um dos enantiômeros, resultando no reconhecimento quiral¹⁰².

Geralmente, as duas formas enantioméricas das FEQs derivadas de éteres de coroa estão disponíveis, permitindo o controle da ordem de eluição dos enantiômeros. Além disso, também estão disponíveis colunas onde o éter de coroa (ou seu derivado) está covalentemente ligado à sílica, o que permite maior flexibilidade no uso de solventes orgânicos na fase móvel. Essa maior flexibilidade no uso de solventes orgânicos possibilita a separação de uma variedade maior de compostos nessas colunas¹⁰².

2.7.5 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO TROCA DE LIGANTES

O mecanismo de separação com as FEQs do tipo *troca de ligantes* é baseado na formação de complexos diastereoméricos ternários que envolvem: os enantiômeros que se pretende separar (*R* e *S*), um íon de um metal de transição (*M*), usualmente Cu^{2+} , e uma terceira molécula quiral (*L*), normalmente um aminoácido, que é fornecida ao sistema pela FEQ. Os quelatos diastereoméricos

formados nesse sistema são representados pela forma L-M-R e L-M-S. Quando esses complexos possuem diferentes estabilidades, o enantiômero que participa do complexo menos estável elui antes, permitindo a separação dos enantiômeros¹⁰⁵.

Os solutos capazes de serem separados nas FEQs do tipo troca de ligantes devem ser capazes de formar complexos de coordenação com metais de transição, o que limita esses solutos a α -aminoácidos e seus derivados e a α -hidroxiácidos mono- e dicarboxílicos. São empregadas fases móveis aquosas e os seguintes fatores podem ser manipulados para controlar a retenção: a concentração do íon metálico, o pH, o tipo e a concentração do modificador orgânico, além da temperatura¹⁰⁵. Os compostos a serem separados não precisam possuir grupos cromóforos para serem detectados por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, uma vez que os complexos com o cobre absorvem radiação pertencente a essa região do espectro. No entanto, a sensibilidade da detecção fica comprometida devido ao sinal de fundo¹⁰⁰.

2.7.6 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE PROTEÍNAS

As proteínas são polímeros complexos de elevada massa molecular específica, compostos de subunidades quirais (L-aminoácidos). A habilidade das proteínas de se ligarem estereoespecificamente a moléculas menores foi usada para desenvolver uma série de FEQs que se encontram comercialmente disponíveis¹⁰⁵. Entre as proteínas empregadas na fabricação dessas FEQs estão a glicoproteína α_1 -ácida (a principal proteína plasmática na ligação a fármacos básicos), a albumina sérica humana (a principal proteína plasmática na ligação a fármacos fracamente

ácidos), a albumina sérica bovina, a ovomucóide, a celobioidrolase e a pepsina^{98,102}. As FEQs desenvolvidas com quaisquer dessas proteínas são úteis na resolução de racematos e todas possuem uma variedade extremamente ampla de aplicações, com destaque especial para a glicoproteína α_1 -ácida¹⁰⁵. Contudo, a aplicação dessas FEQs vem diminuindo nos últimos anos, devido ao fato de serem menos estáveis e, normalmente, mais caras que outras FEQs, além de só poderem ser utilizadas em fase reversa. Também contribui para sua menor utilização o fato de não serem adequadas às aplicações preparativas, graças à sua baixa capacidade de carga, a menor entre as FEQs⁸².

O mecanismo pelo qual as proteínas interagem estereoespecificamente com moléculas quirais é complexo e não muito bem compreendido. As principais interações com enantiômeros parecem ser hidrofóbicas e eletrostáticas, mas ligações de hidrogênio e interações de transferência de carga também podem contribuir para o reconhecimento quiral. Porções diferentes da proteína podem estar envolvidas nessas interações estereosseletivas, e a inclusão do enantiômero na estrutura tridimensional da proteína também pode contribuir para a enantiosseletividade⁹⁸.

As interações responsáveis pela ligação do soluto com a proteína usualmente envolvem outros mecanismos não-estereoespecíficos, além dos estereoespecíficos já citados. A soma desses mecanismos faz com que parâmetros como a composição e a vazão da fase móvel, a temperatura, a força iônica do tampão e o pH afetem sensivelmente as separações^{98,102,105}. Esses parâmetros podem ser ajustados para melhorar a separação dos solutos nas FEQs protéicas e, não raro, inversões na ordem de eluição são observadas com a alteração desses parâmetros¹⁰².

2.7.7 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE ANTIBIÓTICOS GLICOPEPTÍDICOS

Há três antibióticos glicopeptídicos que têm sido bastante utilizados como seletores quirais e estão disponíveis como FEQs: a ristocetina A, a teicoplanina e a vancomicina. Esses antibióticos macrocíclicos possuem diversas características que os permitem interagir enantiosseletivamente com compostos quirais, como múltiplos centros quirais e uma diversidade de grupos funcionais, que inclui carboidratos, anéis aromáticos, fenóis, ácidos, ésteres, aminas e ligações do tipo amida. Conseqüentemente, eles podem interagir com solutos através de ligações de hidrogênio, interações de dipolo, π - π , hidrofóbicas e eletrostáticas, além de impedimentos estéricos¹⁰².

Há dois tipos de FEQs que derivam da teicoplanina. Em uma dessas fases, os carboidratos foram removidos da estrutura original do antibiótico glicopeptídico¹⁰². A enantiosseletividade entre elas é diferente¹⁰², mas, em geral, é superior àquela exibida pela ristocetina A ou pela vancomicina⁸². As FEQs derivadas de antibióticos glicopeptídicos apresentam boa seletividade para aminoácidos e ácidos carboxílicos e também podem ser empregadas para resolver compostos neutros ou básicos. Além disso, apresentam como vantagens a boa estabilidade e a boa capacidade de carga⁹⁸, aliadas à possibilidade de serem utilizadas em vários modos cromatográficos¹⁰².

Em fase reversa, as interações predominantes são as eletrostáticas e as hidrofóbicas. No modo polar orgânico, acredita-se que as interações eletrostáticas também sejam predominantes. Entretanto, as interações hidrofóbicas ficam enfraquecidas e há um favorecimento das ligações de hidrogênio e interações de dipolo, em relação à fase reversa. Em fase normal, uma fase móvel constituída de

hexano/álcool geralmente é utilizada, além de, normalmente, serem empregados ácido trifluoroacético e trietilamina como aditivos. Esses aditivos ionizam a fase estacionária e os solutos, além de reduzirem as interações não-específicas secundárias. No modo super- ou subcrítico, as interações são semelhantes às que ocorrem em fase normal¹⁰².

2.7.8 OUTRAS FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS

Mais recentemente, foram introduzidas no mercado FEQs derivadas dos alcalóides da Cinchona, quinina e quinidina. Esses alcalóides, na forma de carbamatos, foram imobilizados em sílica como suporte, dando origem a FEQs cujos nomes comerciais são: ProntoSIL Chiral AX QN-1 e Chiralpak QN-AX, derivadas da quinina, e ProntoSIL Chiral AX QD-1 e Chiralpak QD-AX, derivadas da quinidina. Essas FEQs demonstraram boa enantiosseletividade para ácidos quirais e, embora apresentem boa enantiosseletividade em fase normal, são mais utilizadas em fase reversa. Em fase reversa é possível tirar vantagens das interações por pareamento iônico (os alcalóides quinina e quinidina são contra-íons efetivos para ácidos carboxílicos e sulfônicos). Conseqüentemente, essas fases são classificadas como trocadoras de ânions quirais fracos. Já nas separações em fase normal, não há interações por pareamento iônico e se acredita que as interações encontradas sejam semelhantes às aquelas que ocorrem com FEQs do tipo Pirkle¹⁰².

Kromasil CHI-DMB, Kromasil CHI-TBB, e Chiraspher NT são FEQs poliméricas e também se encontram entre as FEQs de maior sucesso, especialmente em aplicações preparativas⁸².

2.8 OUTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS IMPORTANTES

A pureza enantiomérica de substâncias quirais também pode ser determinada por técnicas que não envolvem a separação dos enantiômeros. Dentre essas técnicas, a mais clássica é a determinação da rotação óptica, através da polarimetria. A polarimetria é, ainda hoje, a técnica mais empregada pelas farmacopéias para a diferenciação entre racematos e fármacos enantiopuros. No entanto, sabe-se que essa é uma técnica muito pouco sensível. Em um trabalho de Thunberg *et al.*¹⁰⁶, a polarimetria não foi capaz de diferenciar entre racematos e misturas enantioméricas cujo excesso enantiomérico variava de 40% a 80%, devido à pequena razão sinal-ruído apresentada. Isso significa que o emprego da polarimetria como teste de identificação ou teste de pureza nem sempre é relevante. Esse mesmo trabalho demonstrou que a técnica espectroscópica de dicroísmo circular pode determinar com maior exatidão a pureza enantiomérica de misturas não-racêmicas, devido à sua maior sensibilidade.

O dicroísmo circular (DC) faz parte das técnicas ditas *quirópticas*, que são as técnicas ópticas capazes de diferenciar entre dois enantiômeros. As técnicas quirópticas incluem a polarimetria, a dispersão rotatória óptica (DRO) e o DC. Nessas técnicas, a detecção de moléculas quirais é baseada na interação entre um centro quiral do analito e a onda eletromagnética polarizada incidente¹⁰⁷.

A polarimetria e a DRO determinam, ambas, a extensão com a qual um raio de luz linearmente polarizada é rotacionado durante sua transmissão através de um meio contendo uma amostra quiral. As duas técnicas são inteiramente equivalentes para espécies quirais que não absorvem e diferem somente no fato de que a DRO fornece uma resposta espectral, enquanto que medidas polarimétricas são

normalmente restritas a um número limitado de comprimentos de onda pré-selecionados. A DRO é preterida enquanto técnica analítica por faltar-lhe especificidade e por causa da dificuldade de se determinar a linha de base com exatidão¹⁰⁷.

O DC, por sua vez, é a mais sofisticada das três técnicas quirópticas, pois medidas de rotação e absorbância são feitas simultaneamente. De fato, o DC é baseado na diferença apresentada pelos enantiômeros na absorção de ondas eletromagnéticas circularmente polarizadas dextro- e levorotatórias. Na aplicação do DC a problemas analíticos, as duas propriedades, quiralidade e absorção, fornecem a informação necessária para determinações qualitativas e quantitativas, respectivamente. No que diz respeito às determinações qualitativas, o DC fornece espectros que possuem características bastante peculiares, de tal forma que permitem caracterizar o analito. As determinações quantitativas, por outro lado, são baseadas nas áreas ou alturas de bandas que se apresentam no espectro, tal como na espectrofotometria de absorção UV-Vis. Além disso, como não há sinal referente a dicroísmo circular em comprimentos de onda onde não há absorção pelo analito, a linha de base é facilmente definida, o que por si só torna o DC superior à DRO para fins analíticos¹⁰⁷.

As técnicas quirópticas também têm sido utilizadas associadas à CLAE, como alternativa às técnicas de detecção convencionais. Na CLAE, os detectores quirópticos auxiliam na determinação da ordem de eluição dos analitos e podem oferecer a sensibilidade ou seletividade exigidas quando se trabalha nos extremos da escala de excesso enantiomérico.

Recentemente, em um trabalho de Linder, Yanik e Bobbitt¹⁰⁸, foram confrontadas as vantagens entre o emprego de detectores de absorbância UV-Vis e

polarimétrico a laser na determinação de excessos enantioméricos superiores a 99%. Comparados aos polarímetros comuns, os detectores polarimétricos a laser têm sua sensibilidade bastante aumentada, de tal modo que, nesse trabalho, a detecção polarimétrica a laser possibilitou a quantificação de impurezas enantioméricas em quantidades inferiores a 0,2%. Com base na razão sinal-ruído do detector durante os experimentos, e desde que obedecidas algumas condições para a separação cromatográfica, seria possível detectar impurezas enantioméricas presentes em quantidades iguais a 0,1%.

Ao mesmo tempo, além de ter se mostrado bastante sensível, a detecção polarimétrica a laser também é considerada seletiva, pois somente moléculas quirais são detectadas. Além disso, não há necessidade de que o analito apresente absorção, o que faz da polarimetria a laser a técnica de detecção quiróptica de escolha para compostos como açúcares e outras moléculas quirais que não possuem grupos cromóforos¹⁰⁹.

A detecção por DC, por sua vez, é ainda mais seletiva que a polarimetria a laser, pois, para que um analito apresente dicroísmo circular, é necessário que possua, além do centro quiral, um grupo cromóforo, e ambos devem estar localizados de maneira a formar um *quiróforo*. Quiróforo é o nome dado ao arranjo formado por um centro quiral e um grupo cromóforo quando se encontram estruturalmente adjacentes um ao outro, e é a porção da molécula responsável pelo aparecimento das bandas *Cotton*, que caracterizam um espectro de dicroísmo circular¹¹⁰. Todas essas exigências fazem com que a detecção por DC seja muito mais seletiva que a detecção por espectrofotometria de absorção UV-Vis comum¹⁰⁷, além de torná-la especialmente atraente quando componentes da matriz interferem no cromatograma.

Adicionalmente, a detecção polarimétrica a laser e a detecção por DC ainda apresentam outras diferenças importantes em relação à detecção por espectrofotometria no UV-Vis. Nesta última, a resposta fornecida pelo detector é unimodal e idêntica em relação ao sinal e à magnitude para os dois enantiômeros de um par enantiomérico. Por outro lado, os detectores polarimétricos a laser e os detectores por DC respondem diretamente à atividade óptica intrínseca dos analitos, de tal modo que cada enantiômero de um par enantiomérico produz respostas iguais em magnitude, mas de sinais opostos. Além disso, com o emprego desses detectores, racematos e compostos aquirais não produzem nenhum sinal¹⁰⁹.

Essa resposta bimodal única, aliada à resposta de outro detector não-quirótico, assume importância fundamental em determinações quantitativas onde não há resolução entre os enantiômeros ou onde a resolução é apenas parcial¹⁰⁹. Nessas situações, onde os dois enantiômeros co-eluem, nem um detector convencional, nem um detector exclusivamente quirótico seriam adequados para determinar o excesso enantiomérico, caso fossem empregados isoladamente. Porém, se ambos os detectores são colocados em série, uma distinção quantitativa pode ser feita. Medidas da absorbância ou do índice de refração, por exemplo, fornecem a soma das concentrações dos dois isômeros e o sinal do detector quirótico fornece a informação a partir da qual se pode calcular a diferença entre as duas concentrações. Assim, a concentração de cada isômero é prontamente obtida através da solução dessas equações (soma e diferença)¹⁰⁷. Todavia, atualmente, não é necessário que dois detectores sejam colocados em série, uma vez que já são oferecidos detectores capazes de determinar, simultaneamente, a absorção no UV-Vis e o dicroísmo circular, a partir de uma única célula de detecção.

Entretanto, além das técnicas quirópticas, existem outras técnicas que dispensam a separação dos enantiômeros na determinação da pureza enantiomérica de substâncias quirais e que também merecem ser citadas, como a ressonância magnética nuclear (RMN)¹¹¹⁻¹¹³, a calorimetria exploratória diferencial¹¹⁴ e as técnicas eletroquímicas com o emprego de sensores enantiosseletivos¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Paralelamente, também são importantes, no contexto da análise de fármacos quirais, as técnicas capazes de determinar a configuração absoluta desses fármacos. Algumas das técnicas já mencionadas, que permitem quantificar os enantiômeros, também podem ser aplicadas na determinação da configuração absoluta de moléculas assimétricas, como é o caso da RMN¹¹⁸ e das técnicas quirópticas¹¹⁹⁻¹²³.

Entre as técnicas quirópticas empregadas com esse objetivo se encontram a polarimetria¹¹⁹⁻¹²¹, o DC^{119,121} (eletrônico), o dicroísmo circular vibracional^{119,122,123} (DCV) e o espalhamento Raman, análogo ao DCV, chamado *atividade óptica Raman vibracional*¹¹⁹ (AORV). Todos esses métodos quirópticos apresentam como desvantagem o fato de que, através deles, a determinação da configuração absoluta não é realizada diretamente, mas sim através da comparação de dados experimentais com previsões obtidas através de cálculos mecânico-quânticos. Por outro lado, eles permitem a análise de compostos em solução, o que amplia o número de compostos que podem ser analisados por essas técnicas. A AORV é uma técnica relativamente recente. Das técnicas quirópticas já mais consagradas pelo uso, a mais praticada, poderosa e confiável é o DCV. Além disso, o DCV requer cálculos um pouco menos complexos que aqueles exigidos pelo DC eletrônico e pela polarimetria.

A RMN, por sua vez, tem a seu favor o fato de ser uma técnica já bastante conhecida. No entanto, apresenta como desvantagem a necessidade de reagentes de deslocamento quirais, aditivos quirais ou reações de derivatização.

Também merece ser citada aqui a cristalografia de raios-x¹²⁴, que com seus recentes melhoramentos técnicos se tornou a técnica padrão para a determinação *a priori* da configuração absoluta de moléculas assimétricas. Contudo, uma grande dificuldade com essa técnica é conseguir um cristal adequado para a determinação. Aliás, essa necessidade limita a técnica a amostras sólidas, o que é outra de suas desvantagens.

Outras técnicas podem ainda ser aplicadas na determinação da configuração absoluta de fármacos quirais, como a resolução enzimática e a síntese estereosseletiva, embora nem sempre sejam de muita praticidade. Além disso, tem havido interesse crescente na determinação da configuração absoluta de compostos assimétricos com base somente na análise de dados obtidos por estudos de modelagem, associados às informações fornecidas pela retenção cromatográfica desses compostos em FEQs empregadas na CLAE¹²⁵.

2.9 REVISÃO DOS MÉTODOS PARA SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS ENANTIÔMEROS DO CETOPROFENO E DO FENOPROFENO POR CLAE

Os primeiros métodos desenvolvidos para separar e quantificar os enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno, por CLAE, foram métodos indiretos de separação enantiomérica^{126,127}. Conforme discutido no subitem 2.5.1, os métodos indiretos empregam RDQs na derivatização dos enantiômeros, conduzindo à

formação de diastereômeros, os quais são posteriormente separados, em sua maioria, em fases estacionárias aquirais. Como os profenos possuem em suas estruturas químicas um grupo funcional carboxila, o qual é facilmente convertido em um grupo amida pela reação com uma amina, diversas aminas quirais já foram empregadas para a derivatização quiral dos profenos. Entre as aminas mais comumente empregadas, destacam-se a 1-feniletilamina (ou α -metilbenzilamina)¹²⁸⁻¹³⁵, a L-leucinamida¹³⁶⁻¹⁴⁰ e a 1-(1-naftil)-etilamina^{131,141-143}. A reação entre o profeno e a amina quiral normalmente ocorre de modo indireto, passando primeiro pela transformação do profeno em um intermediário mais reativo, como um cloreto de acila ou um derivado imidazólico. Para tanto, faz-se reagir o profeno com cloreto de tionila ou 1,1'-carbonildiimidazol, respectivamente. Outra opção é a formação de um anidrido misto como intermediário, pela reação do profeno com cloroformato de etila, por exemplo. O emprego do 1,1'-carbonildiimidazol usualmente requer temperaturas mais elevadas e/ou um tempo relativamente longo para que a reação se complete. O emprego do cloroformato de etila, por sua vez, permite que a reação se complete rapidamente, mesmo à temperatura ambiente¹²⁶. Há ainda outros métodos para se promover a reação entre o profeno e a amina quiral, como o método proposto por Thomason *et al.*¹³¹.

Outras aminas quirais, especialmente desenvolvidas para possibilitar a detecção por fluorescência, também foram sintetizadas e empregadas como RDQs na derivatização de profenos¹⁴³⁻¹⁴⁵. Nesse contexto, Santa *et al.*¹⁴³ sintetizaram algumas aminas fluorescentes que permitiram o desenvolvimento de métodos de separação bastante sensíveis, empregando detecção por fluorescência e por espectrometria de massas. Com a utilização de algumas das aminas sintetizadas, foi possível alcançar excelente resolução entre os enantiômeros do cetoprofeno, dentro

de tempos de eluição razoáveis. No entanto, no procedimento de derivatização descrito pelos autores, os enantiômeros que se pretende separar são colocados para reagir com a amina quiral por um período de 12 horas, o que inviabiliza a aplicação do método em análises de rotina, as quais exigem métodos cada vez mais rápidos. Já no trabalho de Iwaki *et al.*¹⁴⁴, o tempo de reação na etapa de derivatização é de 3 horas. O trabalho publicado por Al-Kindy *et al.*¹⁴⁵, por sua vez, descreve um procedimento de derivatização no qual o tempo de reação é de apenas 30 minutos. Nesse trabalho, os autores sintetizaram uma nova amina quiral fluorescente e a empregaram no desenvolvimento de métodos indiretos de separação para diversos compostos. Contudo, não conseguiram obter a resolução dos enantiômeros do fenoprofeno e, embora tenham conseguido separar os enantiômeros de cetoprofeno, só o fizeram à custa de um longo tempo de eluição para os solutos. Além disso, a intensidade da fluorescência observada para o derivado do (S)-cetoprofeno foi equivalente à metade daquela observada para o derivado do (R)-cetoprofeno.

De fato, os métodos indiretos de separação enantiomérica por CLAE podem, em algumas situações, ser mais apropriados para a determinação de enantiômeros em matrizes biológicas, devido à sua sensibilidade e versatilidade¹⁴⁵. Entretanto, diante da alternativa oferecida pelos métodos diretos, tendem a cair em desuso para a análise da pureza de fármacos quirais em medicamentos. Embora trabalhos relativamente recentes envolvendo métodos indiretos de separação enantiomérica tenham sido publicados^{133-135,142}, tais métodos têm sido preteridos em virtude de suas várias desvantagens, já discutidas no subitem 2.5.1.

A tabela 2.4 traz alguns exemplos de métodos indiretos de separação por CLAE para os enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno.

Tabela 2.4 – Exemplos de métodos indiretos de separação por CLAE para os enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno (continua).

Fármaco(s)	RDQs	Coluna	Fase móvel	Deteção	Referência
CET/FEN	1-feniletilamina e cloreto de tionila	Hypersil APS (125 x 5 mm, 5 µm)	i-OCT:DCM:MeOH (55:44,8:0,2) (CET) i-OCT:DCM:MeOH (75:24:1) (FEN)	UV 308 nm	128
CET/FEN	1-feniletilamina e cloreto de tionila	Lichrosorb Si-60 (250 x 4 mm, 5 µm)	DCM:ACN (95:5) (CET) DCM:ACN (96:4) (FEN)	UV 254 nm (CET) 272 nm (FEN)	129
CET	1-feniletilamina e cloreto de tionila	SGE (Sílica) (250 x 4 mm, 5 µm)	HEP:IPA (92:8)	UV 254 nm	130
CET/FEN	1-feniletilamina, DEC e 1-HBT	Techsphere ODS* (250 x 5 mm, 5 µm)	NaH ₂ PO ₄ 75 mM:ACN:H ₃ PO ₄ (50:50:0,15)** (CET) NaH ₂ PO ₄ 75 mM:ACN:H ₃ PO ₄ (45:55:0,21)** (FEN)	UV 254 nm	131
CET/FEN	1-feniletilamina e cloroformato de etila	Nova-Pak C ₁₈ * (100 x 8 mm, 4 µm)	H ₂ O:ACN:HAc:Et ₃ N (57:43:0,1:0,03)	UV 255 nm	132
CET	L-leucinamida e cloroformato de etila	LiChroCart RP-18* (250 x 4 mm, 7 µm)	Tampão fosfato*** 10 mM pH 6,5:ACN (62:38)	UV 260 nm	136
CET	L-leucinamida e cloroformato de etila	Partisil 5 ODS-3* (100 x 4,6 mm, 5 µm)	KH ₂ PO ₄ 60 mM:ACN:Et ₃ N (64:36:0,02)	UV 275 nm	137

Tabela 2.4 – Exemplos de métodos indiretos de separação por CLAE para os enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno (conclusão).

Fármaco(s)	RDQs	Coluna	Fase móvel	Deteção	Referência
CET/FEN	L-leucinamida e cloroformato de etila	Partisil 5 ODS-3* (100 x 4,6 mm, 5 µm)	KH ₂ PO ₄ 70 mM:ACN:Et ₃ N (65:35:0,02) pH 6,0	UV 275 nm (CET) 232 nm (FEN)	138
CET	1-(1-naftil)-etilamina e cloroformato de etila	Partisil 5 ODS-3* (100 x 4,6 mm, 5 µm)	H ₂ O:ACN:HAc:Et ₃ N (45:55:0,1:0,02)	UV 232 nm	141
CET	DBD-Apy ou NBD-Apy, DPDS e TPP	TSKgel ODS-80Ts (150 x 4,6 mm, 5 µm)	DBD-Apy: H ₂ O:ACN (35:65) NBD-Apy: H ₂ O:ACN (50:50)	Fluorescência e ESI-MS	143
FEN	DAPEA, DPDS e TPP	TSKgel ODS-80TM (150 x 4,6 mm, 5 µm)	NaAc 50 mM pH 6,5:ACN (35:65)	Fluorescência Ex.: 338 nm Em.: 535 nm	144
CET	DNS-Apy, DPDS e TPP	TSKgel ODS-80TM (150 x 4,6 mm, 5 µm)	H ₂ O:ACN (50:50)	Fluorescência Ex.: 340 nm Em.: 530 nm	145

RDQs, reagentes de derivatização quiral; CET, cetoprofeno; FEN, fenoprofeno; DEC, cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; 1-HBT, 1-hidroxibenzotriazol; DBD-Apy, (S)-4-(N,N-dimetilaminossulfonil)-7-(3-aminopirrolidin-1-il)-2,1,3-benzoxadiazol; NBD-Apy, (R)-4-nitro-7-(3-aminopirrolidin-1-il)-2,1,3-benzoxadiazol; DPDS, dissulfeto de 2,2'-dipiridina; TPP, trifenilfosfina; DAPEA, 1-(4-dansilaminofenil)etilamina; DNS-Apy, 1-(5-dimetilamino-1-naftalenossulfonil)-(S)-3-aminopirrolidona; i-OCT, isooctano; DCM, diclorometano; MeOH, metanol; ACN, acetonitrila; HEP, n-heptano; IPA, 2-propanol; NaH₂PO₄, fosfato monobásico de sódio; H₃PO₄, ácido fosfórico; HAc, ácido acético; Et₃N, trietilamina; KH₂PO₄, fosfato monobásico de potássio; NaAc, acetato de sódio; UV, ultravioleta; ESI-MS, espectrometria de massa acoplada à ionização por eletrospray; Ex., excitação; Em., emissão. *Equipada com coluna de guarda. **A fase móvel contém ainda pentanossulfonato de sódio (5 mM) e seu pH aparente é igual a 2,8. ***O autor omite, no artigo em questão, qual o sal utilizado no preparo do tampão fosfato.

Todavia, reações de derivatização não são privilégio exclusivo dos métodos indiretos de separação enantiomérica. Os métodos diretos também podem envolver reações de derivatização com reagentes aquirais, objetivando incorporar um grupamento químico que aumente a sensibilidade do detector ao analito, minimizar interações indesejadas com a fase estacionária, ou ainda promover ou melhorar o reconhecimento quiral e a resolução^{126,127}.

Na literatura, dentre os métodos diretos de separação enantiomérica por CLAE que se aplicam aos enantiômeros do cetoprofeno e/ou do fenoprofeno, há exemplos de utilização da abordagem acima. De fato, foram encontrados trabalhos em que métodos aquirais de derivatização foram utilizados para promover a resolução dos enantiômeros em uma determinada FEQ¹⁴⁶⁻¹⁵² e/ou para aumentar a sensibilidade do detector ao analito (via derivatização aquiral fluorogênica)^{143,153}.

Nos trabalhos que correspondem às referências 146 a 149 foram utilizadas FEQs do tipo Pirkle. O emprego de FEQs do tipo Pirkle na separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno será discutido mais adiante.

Já no trabalho correspondente à referência 143 e nos que correspondem às referências 150 a 153 foram utilizadas FEQs poliméricas que empregam o tris(4-metilbenzoato) de celulose¹⁵⁰⁻¹⁵² ou o tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose^{143,153} como seletor quiral. Uma das desvantagens comumente associadas ao emprego de FEQs derivadas de carboidratos é o baixo número de pratos alcançado, conforme é exemplificado na tabela 2.5. Essa mesma tabela apresenta, para os trabalhos que correspondem às referências 150 a 152, os reagentes empregados na derivatização, a fase móvel utilizada e alguns indicadores de desempenho das separações.

Os dois primeiros métodos que constam na tabela 2.5 são muito semelhantes e foram desenvolvidos pelos mesmos autores^{150,151}. Empregando o primeiro

método¹⁵⁰, os autores conseguiram obter uma resolução apenas parcial para os enantiômeros do cetoprofeno, conforme é evidenciado nos cromatogramas apresentados no artigo correspondente. Já no método posterior¹⁵¹, um aumento no fator de separação e na resolução pode ser observado. No entanto, não se pode afirmar, com certeza, que com este aumento os autores tenham alcançado a completa resolução entre os enantiômeros do cetoprofeno, uma vez que o artigo correspondente não apresenta nenhum cromatograma referente a essa separação. Melhores resultados foram atingidos pela aplicação do método desenvolvido por Aboul-Enein *et al.*¹⁵², onde o emprego do 9-aminofenantreno, como reagente de derivatização aquiral, possibilitou a resolução em linha de base dos enantiômeros do cetoprofeno. Contudo, os métodos propostos em qualquer desses trabalhos compartilham algumas desvantagens comuns a todos os métodos que envolvem reações de derivatização: são trabalhosos e demorados.

Tabela 2.5 – Alguns dos métodos diretos de separação por CLAE para os enantiômeros do cetoprofeno e/ou fenoprofeno que envolvem derivatização com reagentes aquirais.

Fármaco	Reagente(s) de derivatização	Fase móvel	N_1	α	R_s	Referência
CET	Benzilamina, EDC e HOBT	TP 50 mM pH 1,5:MeOH (25:75)	-	1,33	1,22	150
CET	Benzilamina, EDC e HOBT	TP 100 mM pH 2,0:MeOH (30:70)	623	1,40	1,58	151
FEN	Benzilamina, EDC e HOBT	TP 100 mM pH 2,0:MeOH (30:70)	633	1,46	2,04	151
CET	9-aminofenantreno	TP 20 mM pH 2,0:ACN:MeOH (15:60:25)	-	1,76	6,44	152

CET, cetoprofeno; FEN, fenoprofeno; N_1 , número de pratos referente ao primeiro pico; α , fator de separação; R_s , resolução; EDC, cloridrato de 1-etil-3-dimetilaminopropil-carbodiimida; HOBT, 1-hidroxibenzotriazol; TP, tampão perclorato; MeOH, metanol; ACN, acetonitrila.

A literatura também registra, dentre os métodos diretos de separação enantiomérica por CLAE desenvolvidos para a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e/ou do fenoprofeno, alguns poucos trabalhos envolvendo o emprego de aditivos quirais¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Em CLAE, os aditivos quirais são, por definição, seletos quiraes adicionados à fase móvel.

Em um desses trabalhos, Ameyibor e Stewart¹⁵⁴ empregaram β -CDs como aditivos quirais na tentativa de promover a separação do cetoprofeno, do fenoprofeno e do ibuprofeno. As β -CDs testadas foram a β -CD natural, a metil- β -CD, a hidroxipropil- β -CD e a β -CD sulfatada. Dentre essas, somente a hidroxipropil- β -CD se revelou capaz de promover a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno. Os autores, porém, não foram capazes de obter uma resolução completa entre esses enantiômeros. Além disso, nenhuma das β -CDs testadas foi capaz de promover a separação dos enantiômeros do ibuprofeno. Em um trabalho publicado posteriormente, onde foram empregadas condições cromatográficas praticamente idênticas, Ameyibor e Stewart¹⁵⁵ conseguiram, enfim, resolver os enantiômeros do cetoprofeno em linha de base. Para tanto, foram injetados apenas 10 μ L de uma solução muito diluída do fármaco em soro humano, cuja concentração correspondia a 150 ng.mL⁻¹. Uma observação interessante, com relação a esses dois trabalhos, foi o emprego de uma coluna do tipo C18 com partículas de sílica não-porosa com diâmetro médio de 1,5 μ m, o que possibilitou a rápida eluição dos enantiômeros, sem que isso, no entanto, resultasse em prejuízos para a separação.

Também já foram empregados como aditivos quirais, para promover a separação dos enantiômeros do cetoprofeno, antibióticos macrocíclicos como a vancomicina^{156,157} e a norvancomicina¹⁵⁷. Aparentemente, o emprego desses antibióticos como aditivos quirais permite alcançar maiores valores de resolução

entre os enantiômeros do cetoprofeno que aqueles alcançados com o emprego da hidroxipropil- β -CD. Outra vantagem é que essa maior resolução pode ser obtida utilizando-se concentrações inferiores de vancomicina ou norvancomicina (especialmente desta última) na fase móvel.

De qualquer maneira, ficou demonstrado que com qualquer desses aditivos quirais é possível desenvolver métodos sensíveis, exatos e precisos para a separação e quantificação dos enantiômeros do cetoprofeno. Contudo, devido às desvantagens inerentes ao uso de aditivos quirais, já discutidas no subitem 2.5.2, e à grande oferta de colunas com os mais variados tipos de seletos quirais, incluindo β -CDs e antibióticos macrocíclicos, essa abordagem tem sido relativamente pouco adotada.

De fato, FEQs derivadas de β -CDs e antibióticos macrocíclicos já foram utilizadas para promover a resolução entre os enantiômeros do cetoprofeno e/ou do fenoprofeno.

Zhong *et al.*¹⁵⁸ obtiveram a separação parcial dos enantiômeros do cetoprofeno empregando uma FEQ experimental derivada da β -CD, onde esta foi modificada pela reação com 4-cloro-3,5-dinitro-trifluorometilbenzeno. Entretanto, como o cetoprofeno foi um dos quase duzentos compostos usados para se avaliar a aplicabilidade e a enantiosseletividade dessa coluna em fase reversa, é muito provável que as condições para a separação não tenham sido totalmente otimizadas. Assim, é possível que essa FEQ seja capaz de resolver os enantiômeros do cetoprofeno em linha de base. Armstrong *et al.*¹⁵⁹, em um trabalho publicado anteriormente, também conseguiram separar parcialmente os enantiômeros do cetoprofeno, mas para isso tiveram que utilizar duas colunas de β -CD (25 cm de comprimento cada) conectadas em série.

Por outro lado, Beeson e Vigh¹⁶⁰ não conseguiram resolver os enantiômeros do cetoprofeno ou do fenoprofeno em nenhuma das cinco diferentes FEQs derivadas de CDs que empregaram. As CDs utilizadas como seletores quirais foram a β - e a γ -CDs naturais, a (S)-hidroxipropil- β -CD, a (R,S)-hidroxipropil- β -CD e a (S)-naftiletilcarbamoil- β -CD. É importante notar que os autores falharam em promover a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno inclusive com o emprego de uma FEQ derivada da hidroxipropil- β -CD, já que essa foi a única das CDs utilizadas por Ameyibor e Stewart¹⁵⁴ capaz de promover a separação desses enantiômeros quando empregada como aditivo quiral. No entanto, Beeson e Vigh empregaram exclusivamente a acetonitrila como modificador orgânico e operaram as diferentes colunas apenas em fase reversa. Os autores deveriam ter explorado também a enantiosseletividade proporcionada por diferentes modificadores orgânicos (ainda em fase reversa), bem como a enantiosseletividade proporcionada por outros modos cromatográficos, como o modo polar orgânico ou o modo normal, quando compatíveis com as colunas empregadas. Infelizmente, sem que todas as possibilidades oferecidas por essas colunas tenham sido exploradas não se pode concluir a respeito de sua aplicabilidade na separação dos enantiômeros do cetoprofeno ou do fenoprofeno.

Em outro trabalho, cujo objetivo era comparar duas FEQs derivadas da vancomicina, Bosáková, Cuřínová e Tesařová¹⁶¹ também fracassaram ao tentar promover a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno. As FEQs comparadas foram a Chirobiotic V e a Chirobiotic V2. Aqui, mais uma vez, o insucesso pode ser atribuído ao fato de os autores terem limitado a pesquisa à utilização de um único solvente como modificador orgânico (mais especificamente, o metanol). Isso porque Péhourcq, Jarry e Bannwarth¹⁶², por outro lado, conseguiram

uma boa separação entre os enantiômeros do cetoprofeno empregando a mesma Chirobiotic V, mas investigando uma maior variedade de modificadores orgânicos. Entre estes, foram investigados o 1,4-dioxano, o 2-propanol e o tetraidrofurano, além do metanol, sendo que a melhor resolução foi alcançada com o emprego do tetraidrofurano. Ainda empregando a FEQ Chirobiotic V, Ye e Yu¹⁵⁶ também foram capazes de resolver os enantiômeros do cetoprofeno em linha de base. Para isso, utilizaram condições cromatográficas bastante semelhantes às aquelas desenvolvidas por Péhourcq, Jarry e Bannwarth¹⁶². A FEQ denominada Chirobiotic R, por sua vez, também se mostrou capaz de separar os enantiômeros do cetoprofeno, conforme demonstrado por Andersson *et al.*¹⁶³. A Chirobiotic R é uma FEQ derivada da ristocetina, outro antibiótico macrocíclico. De acordo com o trabalho de Andersson *et al.*, e dentro das condições em que ambas as FEQs foram avaliadas, a Chirobiotic R apresentou desempenho superior à Chirobiotic V na separação dos enantiômeros do cetoprofeno.

Também já foram utilizadas com sucesso na separação de diversos profenos FEQs derivadas de polissacarídeos. Dentre os seletores quirais que compõem essas fases, dois, em especial, mostraram-se capazes de promover a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno, são eles: o tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ e o tris(4-metilbenzoato) de celulose^{163,167,168}. Esses seletores são empregados nas FEQs cujos nomes comerciais são Chiralpak AD e Chiralcel OJ, respectivamente. Essas duas FEQs são originalmente constituídas de partículas de sílica com diâmetro médio de 10 µm revestidas pelos respectivos seletores poliméricos quirais (adsorvidos à sílica). Mais recentemente, foram introduzidas FEQs de maior eficiência, semelhantes às originais, constituídas de partículas de sílica com menor diâmetro médio (5 µm), as quais são denominadas

Chiralpak AD-H e Chiralcel OJ-H. Empregando esta última, Kang, Ko e Cheong¹⁶⁹ conduziram um estudo termodinâmico da separação dos enantiômeros de alguns profenos, entre os quais o cetoprofeno e o fenoprofeno. De acordo com os trabalhos encontrados na literatura, quando empregada qualquer dessas colunas, a fase móvel ideal para a separação desses enantiômeros é sempre composta por uma mistura entre hexano e isopropanol (em proporções adequadas), acrescida de uma pequena porcentagem (inferior a 0,5%) de um ácido orgânico, normalmente ácido acético ou ácido trifluoroacético. A presença desses aditivos é essencial para promover a resolução entre os enantiômeros, conforme Tang¹⁶⁸ pôde demonstrar para o cetoprofeno. Em alguns casos, a derivatização com reagentes de derivatização aquirais pode melhorar o reconhecimento quiral e, conseqüentemente, a resolução¹⁶⁷.

Devido às restrições impostas pelas primeiras FEQs derivadas de polissacarídeos (relacionadas à compatibilidade com diferentes solventes), novas FEQs derivadas de polissacarídeos foram desenvolvidas, nas quais o seletor quiral se encontra quimicamente ligado à sílica (imobilizado). Essas novas fases permitem, inclusive, a cromatografia em modo reverso. Todavia, profundas diferenças na enantiosseletividade podem ser observadas entre essas novas FEQs e aquelas originalmente desenvolvidas, mesmo quando são comparadas fases estacionárias com idênticos seletos quirais. Essas diferenças podem significar a perda total da enantiosseletividade e a necessidade de derivatização para que a resolução entre os enantiômeros possa ser alcançada^{150,151,167}.

Outras FEQs derivadas de polissacarídeos foram especificamente desenvolvidas para serem usadas com fases móveis orgânico-aquosas, como as FEQs utilizadas nas colunas Chiralpak AD-RH e Chiralcel OJ-RH. Essas colunas

empregam os mesmos seletores quirais encontrados nas colunas Chiralpak AD e Chiralcel OJ. No entanto, seu desempenho é bastante inferior ao destas últimas quando consideradas as separações obtidas para os enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno, conforme foi demonstrado por Perrin *et al.*¹⁷⁰. Além disso, foi observada uma enantiosseletividade limitada apenas, ou ausência total de enantiosseletividade, na tentativa de se separar os mesmos enantiômeros através do emprego das colunas Chiralpak AD-RH e Chiralcel OJ-RH (entre outras) em modo polar orgânico¹⁷¹. Por fim, empregando a coluna Chiralcel OJ-R e sem recorrer ao recurso da derivatização, Overbeke *et al.*¹⁷² não foram capazes de separar os enantiômeros do cetoprofeno. Por outro lado, os autores conseguiram separar os enantiômeros do fenoprofeno, muito embora isso só tenha sido possível à custa de um tempo de corrida relativamente longo.

Outros seletores quirais poliméricos também se mostraram capazes de promover a separação entre os enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno, como a *O,O'*-bis(3,5-dimetilbenzoil)-*N,N'*-dialil-L-tartardiamida¹⁷³ e a *O,O'*-bis(4-*ter*-butilbenzoil)-*N,N'*-dialil-L-tartardiamida^{174,175}. Esses seletores são utilizados nas FEQs cujos nomes comerciais são Kromasil CHI-DMB e Kromasil CHI-TBB, respectivamente. Embora essas fases estacionárias possam ser empregadas em modo reverso, na maioria das vezes a enantiosseletividade é maior em modo normal. Os enantiômeros do cetoprofeno, por exemplo, podem ser resolvidos em ambas as fases estacionárias empregando-se uma fase móvel constituída por hexano, éter *ter*-butil metílico e ácido acético, nas seguintes proporções relativas: 75:25:0,1 (v/v/v). De acordo com o publicado por Aboul-Enein¹⁷³, os enantiômeros do fenoprofeno, por sua vez, podem ser resolvidos pelo emprego da fase estacionária

Kromasil DMB e de uma fase móvel constituída por hexano, éter diisopropílico e ácido acético, nas respectivas proporções relativas: 75:25:0,1 (v/v/v).

Com base no conhecimento de que os AINEs se ligam em grande extensão às proteínas plasmáticas, várias FEQs derivadas de proteínas foram desenvolvidas e tiveram sua enantiosseletividade testada frente aos profenos. Encontram-se, entre aquelas já empregadas para a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e/ou do fenoprofeno, FEQs derivadas da glicoproteína α_1 -ácida¹⁷⁶⁻¹⁷⁹, da ovomucóide¹⁸⁰⁻¹⁸³, das albuminas séricas bovina¹⁸⁴ e humana¹⁸⁵⁻¹⁸⁷, da avidina^{182,188-190}, da flavoproteína^{182,191} e da α -quimotripsina¹⁹². Haginaka, Seyama e Kanasugi¹⁹³ demonstraram, porém, que a proteína ovomucóide não possui apreciável capacidade de promover o reconhecimento quiral. De fato, essa capacidade foi atribuída a outra proteína, a qual é comumente encontrada como impureza em meio à ovomucóide. Ainda segundo os autores, essa outra proteína responsável pelo reconhecimento quiral seria, provavelmente, a ovoglicoproteína.

Contudo, apesar da grande variedade de FEQs derivadas de proteínas disponíveis comercialmente, tais fases vêm sendo preteridas em razão de sua menor durabilidade e de seu preço mais elevado quando comparado ao de outras FEQs, conforme já mencionado no subitem 2.7.6.

Além disso, com algumas FEQs derivadas de proteínas, a adição de modificadores iônicos à fase móvel é fundamental para o controle da retenção e da enantiosseletividade, além de influenciar significativamente o formato dos picos⁹⁸. Entre os modificadores iônicos empregados com esse propósito, são comuns os reagentes de pareamento iônico catiônicos, como a dimetiloctilamina, e os ácidos carboxílicos hidrofóbicos, como os ácidos hexanóico e octanóico. No trabalho de Menzel-Soglowek, Geisslinger e Brune¹⁷⁸, por exemplo, ficou demonstrado que, sem

a adição de dimetiloctilamina, a separação entre os enantiômeros é impossível (no caso do cetoprofeno) ou insatisfatória (no caso do fenoprofeno). Entretanto, esses modificadores iônicos podem, em alguns casos, danificar a coluna¹⁷⁸. Ao mesmo tempo, é difícil removê-los da fase estacionária, o que pode ser necessário caso se pretenda realizar diferentes separações com a mesma coluna. De um modo geral, a utilização de modificadores iônicos não é recomendada quando se almeja o desenvolvimento de métodos mais robustos⁹⁸.

A tabela 2.6 apresenta alguns exemplos de condições cromatográficas em que foram utilizadas FEQs derivadas de proteínas para promover a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno.

Os enantiômeros de diversos profenos também podem ser resolvidos empregando-se algumas das FEQs do tipo Pirkle disponibilizadas comercialmente. Contudo, a maioria das FEQs do tipo Pirkle capazes de separar os enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno requer a prévia derivatização desses fármacos para que haja o reconhecimento quiral ou ainda para proporcionar uma enantiosseletividade apropriada. Algumas dessas fases estacionárias permitem a separação de ambos os fármacos sem que estes tenham que ser derivatizados. Não obstante, sem a derivatização, a enantiosseletividade é freqüentemente inadequada ou insatisfatória¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. Em alguns casos, mesmo com a derivatização, a enantiosseletividade alcançada é apenas razoável^{143,146}.

O desenvolvimento da coluna Whelk-O 1, porém, conduziu a uma FEQ do tipo Pirkle capaz de separar diversos profenos, exibindo ótima enantiosseletividade em grande parte dessas separações sem que, para isso, a derivatização dos enantiômeros seja necessária^{198,199}. Conforme já mencionado no subitem 2.7.1.1, a coluna Whelk-O 1 pode ser operada sob condições de fase normal ou reversa. No

Tabela 2.6 – Exemplos de condições cromatográficas empregadas na separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno, envolvendo diferentes FEQs derivadas de proteínas.

FEQ	Proteína	Temperatura	Fase móvel	Vazão da fase móvel	Deteção	Referência
EnantioPac 100 x 4,0 mm	Glicoproteína α_1 -ácida	15 °C	DMOA 5 mM + NaCl 100 mM em tampão fosfato 20 mM pH 6,7:IPA (99,5:0,5)	0,5 mL.min ⁻¹	UV 260 nm (CET) 220 nm (FEN)	178
Chiral-HSA* 100 x 4,0 mm	Albumina sérica humana	30 °C	HOct 5 mM em [tampão fosfato 10 mM:IPA (94:6)], pH 5,5	0,6 mL.min ⁻¹	UV 260 nm (CET)	187
Bioptic AV-1 150 x 4,6 mm	Avidina	30 °C	Tampão fosfato 125 mM pH 7,5:ACN (95:5)	0,8 mL.min ⁻¹	UV 254 nm (CET) 254 nm (FEN)	190

FEQ, fase estacionária quiral; CET, cetoprofeno; FEN, fenoprofeno; DMOA, dimetiloctilamina; NaCl, cloreto de sódio; IPA, 2-propanol; HOct, ácido octanóico; ACN, acetonitrila; UV, ultravioleta. *Equipada com coluna de guarda.

entanto, em todos os trabalhos encontrados na literatura nos quais a coluna Whelk-O 1 foi empregada para separar os enantiômeros do cetoprofeno ou do fenoprofeno, o modo cromatográfico adotado pelos respectivos autores foi o modo normal^{63,64,200-203}. Portanto, há uma carência de informações acerca do emprego da coluna Whelk-O 1 em fase reversa objetivando a separação desses fármacos.

Os seletores quirais empregados em algumas das FEQs do tipo Pirkle capazes de promover a resolução entre os enantiômeros do cetoprofeno e/ou do fenoprofeno são apresentados na tabela 2.7, juntamente com o nome comercial de algumas das colunas onde esses seletores são encontrados. A tabela 2.7 apresenta, ainda, exemplos das fases móveis utilizadas em conjunto com essas colunas para separar os fármacos supracitados, bem como a enantiosseletividade proporcionada pelas condições cromatográficas adotadas nessas separações.

Por fim, a literatura científica é relativamente rica em trabalhos onde FEQs experimentais foram utilizadas para separar os enantiômeros do cetoprofeno e/ou do fenoprofeno. Castellani, Flieger e Sinibaldi²⁰⁴, por exemplo, desenvolveram uma FEQ experimental que serviu para o estudo da separação de vários profenos e cujo seletor quiral derivava de um alcalóide do Ergot. Em um trabalho posterior, Terfloth *et al.*²⁰⁵ incorporaram em polimetilidrossiloxano o mesmo seletor quiral empregado na coluna Whelk-O 1. O polímero resultante foi imobilizado em sílica gel como suporte e empacotado em uma coluna para CLAE. A FEQ assim obtida foi então avaliada frente a diversos profenos e exibiu, de um modo geral, ótima enantiosseletividade. Também já foram desenvolvidas FEQs utilizando-se de técnicas de impressão em polímeros onde o próprio cetoprofeno serviu como modelo^{206,207}. Todavia, todas essas FEQs experimentais, ao que parece, não chegaram a ser disponibilizadas comercialmente.

Tabela 2.7 – Alguns dos seletos quirais empregados nas FEQs do tipo Pirkle utilizadas para promover a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e/ou do fenoprofeno (continua).

Seletor quiral	Coluna(s)	Fase(s) móvel(is)	α	Referência
<i>N</i> -(3,5-dinitrobenzoil)-(<i>R</i>)-fenilglicina ¹	Bakerbond DNBPG ³	HEX:IPA (97:3)	1,10 (FEN) ⁸	146
	ChiraSep DNBPG ⁴	-	-	-
	Chirex 3001 ⁵	-	-	-
	D-Phenylglycine ⁶	-	-	-
	Sumichiral OA-2000 ⁷	-	-	-
<i>N</i> -(3,5-dinitrobenzoil)-(<i>R</i>)-1-(α -naftil)glicina	Chirex 3005 ⁵	NH ₄ Ac 0,02 M em MeOH	ND (CET)	196
		NH ₄ Ac 0,03 M em H ₂ O:MeOH (5:95)	ND (CET)	197
		pH 3,5 (ajustado com ácido fórmico)		
	Sumichiral OA-2500 ⁷	NH ₄ Ac 0,03 M em H ₂ O:MeOH (5:95)	ND (CET)	194
		pH aparente 6,2		
		NH ₄ Ac 0,1 M em H ₂ O:MeOH (60:40)	1,16 (CET)	195
		NH ₄ Ac 0,02 M em MeOH	1,12 (CET)	195
		NH ₄ Ac 0,02 M em MeOH	1,12 (FEN)	195
3,5-dinitrofenilaminocarbonil-(<i>S</i>)-valina	Chirex 3010 ⁵	-	-	-
	Sumichiral OA-3100 ⁷	NH ₄ Ac 0,01 M em MeOH	1,10 (CET)	195
		NH ₄ Ac 0,01 M em MeOH	1,13 (FEN)	195
3,5-dinitrofenilaminocarbonil-(<i>R</i>)-fenilglicina	Chirex 3012 ⁵	-	-	-
	Sumichiral OA-3300 ⁷	NH ₄ Ac 0,01 M em MeOH	1,05 (CET)	195
		NH ₄ Ac 0,01 M em MeOH	1,07 (FEN)	195

Tabela 2.7 – Alguns dos seletos quirais empregados nas FEQs do tipo Pirkle utilizadas para promover a separação dos enantiômeros do cetoprofeno e/ou do fenoprofeno (conclusão).

Seletor quiral	Coluna(s)	Fase(s) móvel(is)	α	Referência
4-(3,5-dinitrobenzamido)tetraidrofenantreno ²	Whelk-O 1 ⁶	HEX:EtOH:HAc (90:10:0,1)	ND (CET)	63
		HEX:EtOH:HAc (90:10:0,1)	1,28 (CET)	200
		HEX:DCM:EtOH:HAc (95:2:3:0,5)	1,03 (CET)	201
		HEX:IPA:HAc (95:5:0,5)	1,12 (CET)	202
		HEX:IPA:HAc (70:30:0,5)	1,36 (FEN)	202

α , fator de separação; HEX, hexano; IPA, 2-propanol; NH₄Ac, acetato de amônio; MeOH, metanol; EtOH, etanol; HAc, ácido acético; DCM, diclorometano; CET, cetoprofeno; FEN, fenoprofeno; ND, o fator de separação não foi divulgado no artigo em questão. ¹A forma enantiomérica *S* deste seletor quiral também está disponível, sendo encontrada nas colunas L-Phenylglycine. ²Este seletor quiral está disponível nas formas enantioméricas *R,R* e *S,S*. ³Fabricada por Mallinckrodt Baker, Inc. ⁴Fabricada por Merck KGaA. ⁵Fabricada por Phenomenex, Inc. ⁶Fabricada por Regis Technologies, Inc. ⁷Fabricada por Sumika Chemical Analysis Service, Ltd. ⁸Os enantiômeros foram separados após a derivatização do fármaco, a qual ocorreu pela reação com cloreto de tionila e posterior reação com 1-naftilmetilamina.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho foi elaborado com os seguintes objetivos:

- Desenvolver, para o cetoprofeno e para o fenoprofeno, métodos por CLAE que permitam que os enantiômeros desses fármacos venham a ser separados e quantificados utilizando a coluna Whelk-O 1 como FEQ.
- Frente a ambos os fármacos, explorar a enantiosseletividade da coluna Whelk-O 1 tanto em fase normal quanto em fase reversa, embora a literatura registre, de um modo geral, um melhor desempenho da coluna Whelk-O 1 quando utilizada sob condições de fase normal.
- Eleger, dentre os métodos desenvolvidos para cada fármaco, aquele mais adequado à separação dos respectivos enantiômeros.
- Determinar a ordem de eluição dos enantiômeros de acordo com as condições ótimas de separação estabelecidas para cada um dos métodos eleitos.

4. JUSTIFICATIVAS

Métodos capazes de separar e/ou quantificar enantiômeros podem ser fundamentais em estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos (aqui incluídos os estudos de bioequivalência) e toxicológicos que envolvam fármacos quirais. Além disso, fármacos quirais exigem métodos enantiosseletivos para garantir sua identidade e pureza enantiomérica, bem como para estudar os fenômenos de racemização ou inversão estereosseletiva cruzada que podem prejudicar sua estabilidade. Tais métodos também podem ser aplicados na obtenção de padrões de trabalho, uma vez que a forma enantiopura de muitos fármacos quirais não se encontra disponível comercialmente.

Consideradas as diferenças farmacocinéticas⁵⁴⁻⁵⁷ e, sobretudo, as diferenças farmacodinâmicas^{39,41-44} observadas entre os enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno, a mistura racêmica desses fármacos não pode mais ser vista senão como a associação de dois fármacos distintos. Tal mudança de percepção impõe a necessidade de métodos capazes não somente de separar os enantiômeros, mas também de quantificá-los em matrizes tão diversas como medicamentos e fluidos biológicos.

Como já foi dito, o fenômeno da inversão quiral, que ocorre com o fenoprofeno⁶⁵ e, em menor grau, com o cetoprofeno^{52,63,64}, associado às demais etapas farmacocinéticas possivelmente enantiosseletivas, faz com que a concentração plasmática relativa entre os enantiômeros seja constantemente alterada após a administração da forma racêmica. Por essa razão, e em virtude da diferença farmacodinâmica entre os enantiômeros, qualquer estudo com esses fármacos que objetive correlacionar a concentração plasmática com um dado efeito

farmacológico, se conduzido com métodos analíticos não enantiosseletivos, pode resultar em informações não confiáveis ou em conclusões de muito pouco valor científico.

Adicionalmente, a tendência de comercialização de fármacos quirais sob a forma enantiopura também se verifica entre os profenos. Medicamentos contendo apenas o *S*-cetoprofeno como substância ativa já estão disponíveis comercialmente. Também é razoável supor que possam surgir novos medicamentos contendo apenas o *R*-cetoprofeno ou mesmo um dos enantiômeros do fenoprofeno, a julgar pelas pesquisas que apontam novas indicações terapêuticas para esses estereoisômeros. Os *R*-enantiômeros, em especial, apresentam grandes chances de virem a ser comercializados isoladamente, por possuírem ação analgésica e serem desprovidos de efeitos colaterais sobre a mucosa gástrica⁵¹. Ao mesmo tempo, em se tratando de fármacos enantiopuros ou de medicamentos que os contenham, o antípoda, se presente, deve ser tratado como impureza. Para tanto, mais uma vez os métodos enantiosseletivos se fazem necessários.

Já no tocante à técnica escolhida para o desenvolvimento de tais métodos, a opção por desenvolvê-los por CLAE se deve à grande aceitação da técnica, associada à sua sensibilidade, reprodutibilidade e aplicabilidade a um grande número de compostos com características físico-químicas distintas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 REAGENTES E SOLVENTES

- 1,2-Dicloroetano, grau analítico (Synth);
- 1,4-Dioxano, grau cromatográfico - linha LiChrosolv (Merck);
- 1-Butanol, grau analítico (Merck);
- 2-Butanol, grau analítico (Merck);
- 2-Propanol, grau cromatográfico - linha LiChrosolv (Merck);
- 2-Propanol, grau cromatográfico - linha OmniSolv (EMD);
- Acetato de etila, grau cromatográfico (J.T.Baker);
- Acetonitrila, grau cromatográfico - linha OmniSolv (EMD);
- Ácido acético glacial, grau analítico (Merck);
- Ácido clorídrico fumegante, grau analítico (Merck);
- Ácido fórmico, grau analítico (Merck);
- Água ultrapurificada através do sistema Milli-Q Plus, com resistividade igual a 18,2 MΩ.cm a 25 °C;
- Brometo de potássio, grau analítico (Merck);
- Diclorometano, grau cromatográfico - linha OmniSolv (EMD);
- Etanol, grau cromatográfico - linha LiChrosolv (Merck);

- Hexanos (teor de n-hexano $\geq 85,0\%$), grau cromatográfico - linha OmniSolv (EMD);
- Hexanos (teor de n-hexano $\geq 95,0\%$), grau cromatográfico - linha UltimAR (Mallinckrodt);
- Hidróxido de amônio, grau analítico (Merck);
- Metanol anidro, grau analítico - linha AQUASTAR (EMD);
- Metanol, grau cromatográfico - linha LiChrosolv (Merck);
- Oxalato de amônio monoidratado, grau analítico (Merck);
- Reagente de Karl Fischer HYDRA-POINT 5 Comp (J.T.Baker).

5.1.2 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

- (S)-(+)-Cetoprofeno - Pureza: 99% (Aldrich).

5.1.3 AMOSTRAS DOS FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

5.1.3.1 FÁRMACOS

As amostras dos fármacos empregados neste trabalho foram gentilmente doadas por diferentes indústrias farmacêuticas. Por motivos éticos, não serão apresentados os nomes das indústrias doadoras, bem como o nome dos fabricantes dos fármacos.

Todas as amostras vieram acompanhadas de seus respectivos certificados de análise.

- Cetoprofeno - Lote: 02729/2004 - Teor: 99,5% (Amostra 1);
- Cetoprofeno - Lote: JZ04092411 - Teor: 99,6% (Amostra 2);
- Fenoprofeno cálcico diidratado - Lote: 0400008035 - Teor: 99,2%.

5.1.3.2 MEDICAMENTOS

As amostras dos medicamentos empregados neste trabalho também foram gentilmente doadas por diferentes indústrias farmacêuticas. Ainda por motivos éticos, essas amostras foram identificadas por números e os nomes de seus fabricantes foram substituídos por letras, conforme listado na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Amostras dos medicamentos empregados neste trabalho.

Amostra	Laboratório	Fármaco	Apresentação	Concentração do fármaco
1	A	Cetoprofeno	Comprimidos revestidos	100 mg/comprimido
2	B	Cetoprofeno	Comprimidos revestidos	100 mg/comprimido
3	B	Cetoprofeno	Cápsulas	50 mg/cápsula
4	C	Fenoprofeno	Cápsulas	200 mg/cápsula

5.1.4 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com aquecimento, marca Fisatom, modelo 753-A;
- Aparelho para banho de ultra-som, marca Unique, modelo USC 1450;
- Aparelho para determinação de faixa de fusão, marca Stuart Scientific, modelo SMP1, equipado com termômetro calibrado do tipo *coluna de mercúrio*, com escala de -10 a 360 °C;
- Balança analítica, marca Mettler-Toledo, modelo AB204;
- Bomba de vácuo, marca Primar, modelo 141;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência, marca Shimadzu, composto pelos seguintes módulos: dois sistemas de bombeamento de solvente, ambos do modelo LC-10ADvp; sistema de degaseificação *on-line*, modelo DGU-14A; injetor automático com *loop* de volume variável (de 0,1 µL a 50 µL), modelo SIL-10ADvp; forno para coluna, modelo CTO-10ACvp; detector com arranjo de diodos UV-Vis, modelo SPD-M10Avp; controlador de sistema, modelo SCL-10Avp; operado em conjunto com o *software* Class-VP, versão 5.032, para aquisição e tratamento dos dados;
- Espectrofotômetro de UV-Vis, marca Shimadzu, modelo UV-1601, operado em conjunto com o *software* Personal Spectroscopy Software (UVPC), versão 3.91, para aquisição e tratamento dos dados;
- Espectrômetro de infravermelho, marca Bomem, série Michelson MB, modelo MB-100, operado em conjunto com o *software* GRAMS/AI, versão 7.00, para aquisição e tratamento dos dados;
- Estufa para secagem, marca Fanem, modelo 315-SE;

- Medidor de pH, marca Digimed, modelo DM-21, equipado com eletrodo combinado de pH, marca Digimed, modelo DME-CV1;
- Prensa hidráulica manual, marca Carver;
- Purificador de água, marca Millipore, modelo Milli-Q Plus;
- Termobalança, marca Shimadzu, modelo TGA-50, operada em conjunto com a interface controladora TA-50 e com o *software* TA60, versão 1.40, para aquisição e tratamento dos dados;
- Titulador automático para determinação de água pelo método de Karl Fischer, marca Metrohm, modelo 787 KF Titrino.

5.1.5 CONSUMÍVEIS E OUTROS MATERIAIS

- Coluna para CLAE (S,S)-Whelk-O 1, medindo 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 μm (100 Å), marca Regis;
- Cubetas de quartzo, com caminho ótico de 10,00 mm, marca Hellma;
- Gral e pistilo de ágata;
- Membranas filtrantes em politetrafluoretileno (PTFE), com 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm , marca Phenomenex;
- Pipeta automática de volume fixo, marca Celm, modelo Petcelm 10 μL ;
- Sistema a vácuo para filtração de solventes, marca Millipore;
- Unidades filtrantes para seringa, com carcaça em polipropileno e membrana interna em poliéster com 15 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm , marca CHROMAFIL (Macherey Nagel);
- Vidrarias diversas.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 QUALIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS: ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO

5.2.1.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO

Em um gral de ágata, foram adicionados cerca de 1 mg do fármaco e 400 mg de brometo de potássio, previamente dessecado em estufa, a 105 °C, por 3 horas. Com o auxílio de um pistilo, também de ágata, o fármaco e o brometo de potássio foram triturados e misturados até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Utilizando-se de uma prensa hidráulica, uma quantidade apropriada do material assim obtido foi transformada em uma pastilha de espessura adequada e transparência uniforme, a qual foi empregada para a obtenção do espectro de absorção no infravermelho. Esse espectro compreendeu a região entre os números de onda 670 e 2000 cm^{-1} , inclusive. Posteriormente, as posições e intensidades relativas das bandas de transmitância do espectro assim obtido foram comparadas às aquelas observadas no espectro de referência, fornecido pela farmacopéia britânica e que é apresentado no subitem 2.3.1. Além disso, no espectro obtido experimentalmente, procurou-se localizar as bandas tidas como principais e que são características de cada fármaco. Os números de onda a que correspondem essas bandas são fornecidos pela literatura e podem ser consultados no subitem 2.3.1. Todo o procedimento descrito acima foi igualmente adotado para ambos os fármacos.

5.2.1.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA

Para a obtenção do espectro de absorção no ultravioleta do cetoprofeno, foram pesados exatamente 50,0 mg do fármaco, os quais foram solubilizados em etanol de modo a obter uma solução com concentração do fármaco igual a 10 µg/mL.

Para a obtenção do espectro de absorção no ultravioleta do fenoprofeno cálcico diidratado, foram pesados exatamente 100,0 mg do fármaco, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 100,0 mL. Em seguida, adicionou-se a esse balão 5 mL de ácido acético glacial. Após a completa solubilização do fármaco, a solução assim obtida foi diluída a 100,0 mL com metanol. A nova solução, resultante dessa diluição, foi então homogeneizada e uma alíquota de 5,0 mL da mesma foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL. Por fim, essa alíquota foi diluída a 50,0 mL com metanol, de modo a obter uma solução com concentração do fármaco igual a 100 µg/mL.

Os espectros de absorção para ambos os fármacos foram obtidos em região correspondente ao ultravioleta, compreendida entre 230 e 350 nm, inclusive. A aquisição de dados foi realizada a cada 0,2 nm. Para a obtenção do espectro referente ao cetoprofeno, foi utilizado etanol como branco; já para a obtenção do espectro referente ao fenoprofeno cálcico diidratado, utilizou-se, como branco, uma solução de ácido acético em metanol a 0,5% v/v. Todas as leituras foram realizadas empregando-se cubetas de quartzo com 10,00 mm de caminho ótico. As informações obtidas a partir dos espectros de absorção foram então confrontadas com as respectivas especificações apresentadas pela farmacopéia britânica.

5.2.1.3 DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO

O procedimento adotado para determinação da faixa de fusão foi baseado naquele descrito pela farmacopéia americana (USP 30), em seus métodos gerais, no capítulo intitulado *Melting Range or Temperature*, para fármacos que se enquadram na classe I (*class I*) e com a utilização do aparelho I (*apparatus I*). Procurou-se reproduzir, tão fielmente quanto possível, o procedimento descrito na USP 30, à exceção do aparelho realmente empregado, que não é descrito por essa farmacopéia. As determinações foram realizadas em triplicata, para cada uma das amostras de cetoprofeno.

5.2.1.4 ENSAIO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CÁLCIO

O método adotado para a identificação de cálcio foi aquele descrito pela farmacopéia americana (USP 30), na monografia do fenoprofeno cálcico (teste de identificação C). Como complementação a esse teste, foi realizado também o teste de chama, conforme descrito pela mesma farmacopéia em seus métodos gerais, no capítulo intitulado *Identification Tests-General*. O procedimento completo pode ser visto abaixo.

Cerca de 1 g de fenoprofeno cálcico diidratado foram transferidos para um bécker ao qual se adicionou ácido acético em quantidade suficiente para 50 mL. O conteúdo do bécker foi então aquecido, sob agitação, até a completa solubilização do fármaco, com o auxílio de uma placa aquecedora/agitador magnético. Posteriormente, filtrou-se a solução em papel de filtro. Ao filtrado, foram então

adicionados 2 mL de uma solução de oxalato de amônio a 3,5%. Formou-se um precipitado branco, o qual foi recolhido por filtração, novamente em papel de filtro. Em seguida, o precipitado foi solubilizado em solução de ácido clorídrico 3 N, obtendo-se a solução empregada no teste de chama. Esse teste, por sua vez, consistiu em aspergir essa solução sobre a porção não-luminosa da chama produzida pela queima de gás em um bico de Bunsen, para que se observasse a coloração produzida.

Além disso, recorreu-se à análise termogravimétrica para obtenção de prova adicional de que a amostra em questão realmente correspondia ao sal cálcico diidratado de fenoprofeno. Para tanto, foram obtidas curvas TG empregando-se cadinhos de platina com aproximadamente 10 mg da amostra, além da adoção dos seguintes parâmetros instrumentais: atmosfera dinâmica de ar a $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento igual a $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, partindo da temperatura ambiente até atingir $900 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A massa do resíduo obtido após a decomposição térmica da amostra foi então comparada à massa prevista por cálculo estequiométrico, sendo ambas expressas em relação à massa original da amostra, sob a forma de porcentagem.

5.2.1.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA PELO MÉTODO DE KARL FISCHER

Adicionou-se ao vaso de titulação 20 mL de metanol anidro, os quais foram titulados com o reagente de Karl Fischer até o ponto final amperométrico, determinado automaticamente pelo titulador. Em seguida, cerca de 200 mg de fenoprofeno cálcico diidratado foram adicionados ao vaso de titulação. A amostra permaneceu sob agitação por um minuto e foi então titulada com o reagente de Karl

Fischer, até o ponto final amperométrico. Efetuou-se a titulação da amostra em triplicata. O reagente de Karl Fischer foi fatorado previamente, através da titulação, em separado, de três alíquotas de água ultrapurificada equivalentes a 10 µL cada, onde se adotou o mesmo método empregado para a titulação da amostra.

5.2.1.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA POR TERMOGRAVIMETRIA

Foram obtidas curvas TG/DTG empregando-se cadinhos de platina com aproximadamente 5 e 10 mg de fenoprofeno cálcico diidratado. Além disso, os seguintes parâmetros instrumentais foram adotados: atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento igual a 10 °C.min⁻¹, partindo da temperatura ambiente até atingir 200 °C.

5.2.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO FENOPROFENO POR CLAE EM FASE REVERSA

5.2.2.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Sempre que necessário, foram pesados 25,0 mg de fenoprofeno cálcico diidratado racêmico, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 50,0 mL. Em seguida, adicionou-se a esse balão 5 mL de metanol e 1 mL de ácido acético glacial. O balão foi então levado ao banho de ultra-som, onde permaneceu

até a completa solubilização do fármaco. Posteriormente, a solução assim obtida foi diluída a 50,0 mL com metanol. A nova solução, resultante dessa diluição, foi então homogeneizada e parte dela foi filtrada para um frasco apropriado, com o auxílio de uma unidade filtrante para seringa com membrana interna em poliéster e poros de 0,45 μm .

5.2.2.2 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS

Foram preparadas diversas fases móveis, sempre constituídas por um tampão (solvente A) e um modificador orgânico (solvente B). Ambos foram filtrados separadamente e sob pressão reduzida, através de membranas filtrantes de politetrafluoretileno com poros de 0,45 μm , previamente umedecidas com etanol. A combinação entre os solventes A e B, em proporções definidas, foi realizada pelo próprio cromatógrafo, bem como a degaseificação dos solventes, realizada *on-line*.

Foram empregados dois diferentes tampões, a saber: tampão acetato e tampão formato, ambos de amônio. A escolha entre os tampões variou em função do pH exigido nos ensaios. Ambos foram preparados pela adição, a 900 mL de água, de volumes apropriados do ácido correspondente e de hidróxido de amônio. Esses volumes variaram em função da molaridade desejada para o tampão (expressa como a concentração molar do sal formado). Posteriormente, o pH era ajustado até o valor desejado titulando-se o tampão com uma solução a 20% v/v do ácido correspondente. Por fim, adicionava-se água ultrapurificada em quantidade suficiente para 1,0 L. O volume requerido de cada reagente, para a preparação dos tampões a diferentes molaridades, está listado na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Volume requerido de cada reagente para a preparação dos tampões.

Reagente	Volume requerido / mL					
	Tampão acetato			Tampão formato		
	20 mM	25 mM	40 mM	20 mM	40 mM	50 mM
Ácido acético ¹	1,1	1,4	2,3	-	-	-
Ácido fórmico ²	-	-	-	0,8	1,5	1,9
Hidróxido de amônio ³	1,5	1,9	3,0	1,5	3,0	3,7

¹Densidade = 1,049 g/mL e concentração = 99,8%; ²densidade = 1,220 g/mL e concentração = 98%;

³densidade = 0,910 g/mL e concentração equivalente a 25% de NH₃.

5.2.2.3 CONDIÇÕES COMUNS A TODOS OS ENSAIOS

A coluna empregada foi a (S,S)-Whelk-O 1, descrita no subitem 5.1.5. Para a detecção dos analitos, empregou-se um detector com arranjo de diodos UV-Vis, operado na faixa de comprimentos de onda de 225 a 370 nm. Os cromatogramas apresentados no subitem 6.2 correspondem à detecção em 270 nm (comprimento de onda de máxima absorção). O volume de injeção adotado, por sua vez, corresponde sempre a 20 µL.

5.2.2.4 ENSAIOS PRELIMINARES

A estratégia para o desenvolvimento de um método de separação por CLAE em fase reversa para os enantiômeros do fenoprofeno envolveu a execução de um planejamento experimental fatorial fracionário, o qual está descrito no subitem 5.2.2.5. Para alguns fatores envolvidos nesse planejamento, o campo experimental pôde ser definido *a priori*. No entanto, o mesmo não foi possível para outros fatores senão após a realização de alguns ensaios preliminares. Assim sendo, uma série de

experimentos iniciais foi realizada com o intuito de se definir os níveis (mínimo e máximo) em que alguns desses fatores seriam estudados. Nessa etapa, foram investigadas: (1) a natureza do modificador orgânico utilizado, (2) a concentração desse modificador orgânico na fase móvel e (3) a vazão da fase móvel empregada (F). Os modificadores orgânicos avaliados foram o metanol e a acetonitrila. As condições cromatográficas desses ensaios preliminares estão listadas na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Condições cromatográficas empregadas nos ensaios preliminares.

Ensaio	Solvente (A)	Solvente (B)	Proporção A:B ¹	Vazão da fase móvel ²
1	Tampão acetato de amônio	Metanol	40:60	1,0
2	Tampão acetato de amônio	Metanol	50:50	1,0
3	Tampão acetato de amônio	Metanol	60:40	1,0
4	Tampão acetato de amônio	Metanol	50:50	0,5
5	Tampão acetato de amônio	Metanol	50:50	2,0
6	Tampão acetato de amônio	Acetonitrila	50:50	1,0
7	Tampão acetato de amônio	Acetonitrila	63,5:36,5	1,0

¹Em v/v; ²em mL.min⁻¹. Molaridade do tampão = 25 mM; pH do tampão = 4,5; temperatura da coluna (T_c) = 24 °C.

5.2.2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO²⁰⁸

Com a escolha do modificador orgânico a ser empregado e com a determinação dos níveis em que seriam estudados os outros dois fatores anteriormente citados, passou-se então à próxima etapa do desenvolvimento. Essa etapa teve por objetivo selecionar os fatores que mais influenciam as respostas de interesse e descartar aqueles de menor influência, para que, posteriormente, outro planejamento experimental pudesse ser empregado, o qual permitisse a obtenção de superfícies de resposta. Para tanto, foram executados os ensaios previstos em um planejamento experimental fatorial fracionário de resolução três, envolvendo 5

fatores e um total de 8 ensaios (2^{5-2}_{III}). Nesse planejamento, os fatores investigados foram:

- Fator A: temperatura da coluna (T_c);
- Fator B: vazão da fase móvel (F);
- Fator C: porcentagem de metanol na fase móvel, em v/v;
- Fator D: pH do tampão;
- Fator E: molaridade do tampão ([Tampão]).

O planejamento fatorial fracionário em questão foi construído a partir de um planejamento fatorial completo para os três primeiros fatores. O nível dos dois fatores restantes foi definido através das relações geradoras $I = -BCD$ e $I = -ACE$. Com isso, o planejamento empregado ficou definido conforme a tabela 5.4, onde os níveis dos fatores se encontram codificados.

Tabela 5.4 – Planejamento fatorial fracionário com os níveis dos fatores codificados.

Ensaio	Fator				
	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+
3	-	+	-	+	-
4	+	+	-	+	+
5	-	-	+	+	+
6	+	-	+	+	-
7	-	+	+	-	+
8	+	+	+	-	-

A, temperatura da coluna; B, vazão da fase móvel; C, porcentagem de metanol na fase móvel (v/v); D, pH do tampão; E, molaridade do tampão.

A tabela 5.5 apresenta o mesmo planejamento, agora com os níveis dos fatores apresentados conforme seus valores reais ou não-codificados.

Tabela 5.5 – Planejamento fatorial fracionário com os níveis dos fatores em seus valores não-codificados.

Ensaio	Temperatura da coluna ¹	Vazão da fase móvel ²	Fator		
			% B	pH do tampão	Molaridade do tampão ³
1	14,0	1,0	45,0	3,5	20
2	26,0	1,0	45,0	3,5	40
3	14,0	2,0	45,0	5,5	20
4	26,0	2,0	45,0	5,5	40
5	14,0	1,0	55,0	5,5	40
6	26,0	1,0	55,0	5,5	20
7	14,0	2,0	55,0	3,5	40
8	26,0	2,0	55,0	3,5	20

% B, porcentagem de metanol na fase móvel (v/v). ¹Em °C; ²em mL.min⁻¹; ³em mM.

Todos os ensaios do planejamento fatorial fracionário mostrado anteriormente foram realizados em duplicata, para que fosse possível estimar o erro experimental e, a partir daí, avaliar a significância estatística dos efeitos ($\alpha = 0,05$). As duplicatas se basearam em repetições autênticas de cada ensaio, incluindo novas preparações da amostra e da fase móvel. Os ensaios, por sua vez, foram realizados em ordem aleatória, para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados. Além disso, foram realizadas duas injeções da amostra em cada ensaio e, antes de cada um deles, o sistema foi equilibrado com a fase móvel correspondente por não menos que 1 hora, para assegurar a estabilização da linha de base.

Foram então investigados os efeitos exercidos pela mudança de nível de cada um dos fatores sobre seis diferentes respostas. Essas respostas foram escolhidas entre os parâmetros cromatográficos utilizados na avaliação dos cromatogramas (descritos no subitem 5.2.2.8), ou neles se basearam. Assim sendo, as variáveis escolhidas como respostas foram:

- Tempo de retenção referente ao segundo pico (t_{R2});
- Fator de retenção referente ao segundo pico (k_2);
- Fator de separação entre os picos (α);
- Resolução entre os picos (R_s);
- Número médio de pratos teóricos (N_M);
- Função de resposta cromatográfica proposta por Bylund, Bergens e Jacobsson^{209,210} (FRC).

A função de resposta cromatográfica proposta por Bylund, Bergens e Jacobsson, doravante denominada apenas *função de resposta cromatográfica*, é definida pela Equação 5.1:

$$FRC = \sqrt[a+b]{Q^a \times T^b} \quad , \quad (0 < FRC < 1) ; \quad (\text{Eq. 5.1})$$

onde: Q é uma variável que descreve a qualidade da separação; T é uma variável relacionada ao fator de retenção referente ao segundo pico, e a e b são constantes de atribuição de peso. Neste trabalho se atribuiu o mesmo peso (ou importância) às variáveis Q e T definindo-se a e b como iguais a 1.

A variável Q , por sua vez, é definida pela Equação 5.2:

$$Q = \frac{1}{\left(1 + e^{K \times (d - R_s)}\right)} \quad , \quad (0 < Q < 1) ; \quad (\text{Eq. 5.2})$$

onde se atribuiu o valor “15,2008” à constante K , e a d , o valor “2,5” (resolução mínima pretendida), de tal modo que Q se aproxima de 1 quando R_s é igual a 3,0 (valor desejado ou tido como ótimo para a resolução). Se R_s é igual a 2,5, entretanto, então Q é igual a 0,5.

A variável T , por outro lado, é definida pela Equação 5.3:

$$T = \frac{1}{4C^2} \times \left(\frac{k_2}{C} + C \right)^2 \times e^{\left(1 - \frac{k_2}{C^2} \right)}, \quad (0 < T \leq 1); \quad (\text{Eq. 5.3})$$

onde se atribuiu o valor “2” a C , de tal modo que T assume seu valor máximo quando k_2 é igual a 4 (valor desejado ou tido como ótimo para k_2).

5.2.2.6 PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL²¹¹

Após a análise do planejamento fatorial fracionário exposto acima, foram selecionados os fatores considerados mais importantes para a otimização do método de separação, com base nos efeitos desses fatores sobre as respostas de interesse. Assim sendo, dos cinco fatores iniciais, foram selecionados para o planejamento composto central os seguintes:

- Porcentagem de metanol na fase móvel (v/v) – Variável independente X_1 ;
- pH do tampão – Variável independente X_2 ;
- Temperatura da coluna – Variável independente X_3 .

Os dois fatores restantes, excluídos do novo planejamento, foram então fixados em valores considerados adequados aos propósitos do método em desenvolvimento. A concentração molar do tampão foi fixada em 50 mM e a vazão da fase móvel em 1,0 mL.min⁻¹. Os níveis dos fatores efetivamente investigados no novo planejamento também foram otimizados. O campo experimental para o fator *pH do tampão*, por exemplo, ficou estabelecido entre 3,06 e 4,74. Por essa razão, empregou-se apenas o tampão formato de amônio.

O planejamento composto central escolhido envolveu a realização de 23 ensaios. A parte fatorial desse planejamento compreende 8 ensaios e a parte axial, outros seis. Os ensaios restantes correspondem ao ponto central e suas replicatas, totalizando 9 ensaios. A distância axial, que representa a distância entre os pontos axiais e o ponto central do planejamento, foi estabelecida em $\pm 1,682$. Com isso, o planejamento composto central empregado ficou definido conforme a tabela 5.6, onde os níveis das variáveis independentes se encontram codificados.

Tabela 5.6 – Planejamento composto central com os níveis das variáveis independentes codificados.

Ensaio	Variável independente		
	X_1	X_2	X_3
1	- 1	- 1	- 1
2	1	- 1	- 1
3	- 1	1	- 1
4	1	1	- 1
5	- 1	- 1	1
6	1	- 1	1
7	- 1	1	1
8	1	1	1
9	- 1,682	0	0
10	1,682	0	0
11	0	- 1,682	0
12	0	1,682	0
13	0	0	- 1,682
14	0	0	1,682
15.1 a 15.9	0	0	0

X_1 , porcentagem de metanol na fase móvel (v/v); X_2 , pH do tampão; X_3 , temperatura da coluna.

A tabela 5.7 apresenta os valores não-codificados correspondentes aos cinco níveis adotados para cada uma das variáveis independentes.

Tabela 5.7 – Planejamento composto central: valores não-codificados correspondentes aos cinco níveis adotados para cada uma das variáveis independentes.

Fator	Nível				
	-1,682	-1	0	1	1,682
% B ¹	40,1	42,9	47,0	51,1	53,9
pH do tampão	3,06	3,40	3,90	4,40	4,74
Temp. da coluna ²	12,0	14,0	17,0	20,0	22,0

% B, porcentagem de metanol na fase móvel. ¹Em v/v; ²em °C.

Como no planejamento fatorial fracionário, os ensaios do planejamento composto central também foram realizados em ordem aleatória, para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados. Novamente, foram realizadas duas injeções da amostra em cada ensaio e, antes de cada um deles, o sistema foi equilibrado com a fase móvel por não menos que 1 hora, para assegurar a estabilização da linha de base.

Com a realização dos ensaios previstos pelo planejamento composto central, os cromatogramas obtidos foram então avaliados calculando-se os parâmetros cromatográficos descritos no subitem 5.2.2.8, assim como a função de resposta cromatográfica, descrita anteriormente.

Efetuados os cálculos, partiu-se então para a construção de modelos matemáticos empíricos, lineares e quadráticos, na tentativa de se descrever a relação existente entre as variáveis independentes estudadas e as seguintes respostas (ou variáveis dependentes):

- Função de resposta cromatográfica;
- Resolução entre os picos;
- Tempo de retenção referente ao segundo pico.

Cada uma das respostas foi modelada de acordo com as seguintes equações gerais:

- Para um modelo linear,

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \varepsilon; \quad (\text{Eq. 5.4})$$

- Para um modelo quadrático,

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \varepsilon; \quad (\text{Eq. 5.5})$$

onde: y é a resposta considerada e ε é o erro aleatório associado à sua determinação; X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis *porcentagem de metanol na fase móvel (v/v)*, *pH do tampão* e *temperatura da coluna*, respectivamente; β_0 , β_1 , β_2 , β_3 , β_{12} , β_{13} , β_{23} , β_{11} , β_{22} e β_{33} são parâmetros dos modelos a que se referem, para os quais foram calculados os respectivos estimadores, b_0 , b_1 , b_2 , ..., b_{33} .

Esses parâmetros foram avaliados em um nível de significância igual a 0,05. Na forma final da equação que representa cada modelo foram excluídos os termos cujos parâmetros foram considerados não-significativos. O grau de ajuste de cada modelo às respostas observadas foi determinado, por sua vez, pela análise do perfil de distribuição dos resíduos e pelo emprego do método de análise da variância (ANOVA) da regressão.

5.2.2.7 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A SEPARAÇÃO

Para se estabelecer o melhor compromisso entre a resolução e o tempo de corrida almejados, foi empregado o método de otimização simultânea proposto por Derringer e Suich²¹². Esse método se baseia na definição de uma função de desejabilidade (d) para cada resposta, com valores restritos ao intervalo $[0,1]$, onde “0” significa um valor inaceitável e “1”, o valor desejado. Posteriormente, essas funções de desejabilidade são combinadas em uma desejabilidade global (D) que, neste caso, é dada pela Equação 5.6:

$$D = \sqrt[2]{d_{R_s} \times d_{t_2}} \quad , \quad (0 < D \leq 1) ; \quad (\text{Eq. 5.6})$$

onde d_{R_s} e d_{t_2} são a função de desejabilidade para a resolução entre os picos e a função de desejabilidade para o tempo de retenção referente ao segundo pico, respectivamente.

A função de desejabilidade para a resolução entre os picos, por sua vez, é definida neste trabalho pelas seguintes equações:

$$d_{R_s} = \frac{R_s - LI}{A - LI} \quad , \quad \text{para } LI \leq R_s \leq A ; \quad (\text{Eq. 5.7})$$

$$d_{R_s} = 1 \quad , \quad \text{para } R_s > A ; \quad (\text{Eq. 5.8})$$

$$d_{R_s} = 0 \quad , \quad \text{para } R_s < LI ; \quad (\text{Eq. 5.9})$$

onde A é igual a 3,0 (valor desejado para a resolução entre os picos) e LI é igual a 2,0 (valor mínimo aceitável para a resolução).

Já a função de desejabilidade para o tempo de retenção referente ao segundo pico é definida neste trabalho pelas seguintes equações:

$$d_{t_{R2}} = \frac{t_{R2} - LI}{A - LI} \quad , \quad \text{para } LI \leq t_{R2} \leq A ; \quad (\text{Eq. 5.10})$$

$$d_{t_{R2}} = \frac{t_{R2} - LS}{A - LS} \quad , \quad \text{para } A \leq t_{R2} \leq LS ; \quad (\text{Eq. 5.11})$$

$$d_{t_{R2}} = 0 \quad , \quad \text{para } t_{R2} < LI \text{ ou para } t_{R2} > LS ; \quad (\text{Eq. 5.12})$$

onde A é igual a 15,0 (valor desejado para o tempo de retenção referente ao segundo pico, em minutos), e LI e LS são iguais a 12,0 e a 18,0, respectivamente (valores mínimo e máximo aceitáveis para o tempo de retenção referente ao segundo pico, em minutos).

Com o emprego conjunto de todas essas equações, a otimização simultânea das duas respostas ficou reduzida à maximização da desejabilidade global. Assim sendo, foi elaborada uma planilha no programa *Excel*, da Microsoft, onde foram introduzidos os modelos escolhidos para descrever a relação existente entre os fatores *porcentagem de metanol na fase móvel (v/v)*, *pH do tampão* e *temperatura da coluna* e as respostas R_s e t_{R2} . Essa planilha foi construída de tal modo que, inseridos os níveis desses fatores, o Excel fosse capaz de fornecer os valores previstos para a resolução e para o tempo de retenção referente ao segundo pico. Essas previsões, por sua vez, foram associadas às suas respectivas funções de desejabilidade, possibilitando o cálculo da desejabilidade global. Por fim, para se descobrir o nível ideal de cada um dos fatores citados acima, foi utilizada a função *Solver* do Excel.

Adicionalmente, foram construídos gráficos do tipo *superfície de resposta*, com o objetivo de se visualizar o efeito da mudança de nível dos fatores sobre as respostas de interesse. Para tanto, foram empregados os mesmos modelos matemáticos utilizados no cálculo da função de desejabilidade.

5.2.2.8 AVALIAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Na avaliação dos cromatogramas obtidos foram considerados os seguintes parâmetros cromatográficos:

- Tempo de retenção do composto não retido (t_M);
- Tempos de retenção referentes ao primeiro e ao segundo pico (t_{R1} e t_{R2} , respectivamente);
- Fatores de retenção referentes ao primeiro e ao segundo pico (k_1 e k_2 , respectivamente);
- Fator de separação entre os picos;
- Resolução entre os picos;
- Números de pratos referentes ao primeiro e ao segundo pico (N_1 e N_2 , respectivamente);
- Áreas do primeiro e do segundo pico;
- Alturas do primeiro e do segundo pico;
- Larguras* do primeiro e do segundo pico (w_1 e w_2 , respectivamente);
- Assimetrias do primeiro e do segundo pico, calculadas a 10% de suas alturas (As_1 e As_2 , respectivamente).

*Calculadas conforme a farmacopéia americana (United States Pharmacopeia).

As fórmulas adotadas para calcular alguns desses parâmetros são apresentadas abaixo:

- Fator de retenção:
$$k_i = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_M} \quad (\text{Eq. 5.13})$$

- Fator de separação entre os picos:
$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (\text{Eq. 5.14})$$

- Resolução entre os picos:
$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (\text{Eq. 5.15})$$

- Número de pratos:
$$N_i = 16 \left(\frac{t_{Ri}}{w_i} \right)^2 \quad (\text{Eq. 5.16})$$

- Assimetria de um pico a 10% de sua altura:
$$As_i = \frac{BC_i}{AB_i} ; \quad (\text{Eq. 5.17})$$

onde AB_i é a distância entre os pontos A e B, e BC_i é a distância entre os pontos B e C, conforme ilustra a figura 5.1.

Figura 5.1 – Assimetria de um pico a 10% de sua altura. O segmento de reta DE parte do ápice do pico em direção à linha de base e é perpendicular a esta. O segmento de reta AC se localiza a uma altura equivalente a 10% da altura do pico, é perpendicular ao segmento de reta DE e parte da lateral anterior do pico em direção à lateral posterior do mesmo. O ponto B é a interseção entre os dois segmentos de reta.

5.2.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO FENOPROFENO POR CLAE EM FASE NORMAL

5.2.3.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Para a realização dos ensaios 1 a 12, foram pesados 25,0 mg de fenoprofeno cálcico diidratado racêmico, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 50,0 mL. Em seguida, adicionou-se a esse balão 5 mL de etanol. O balão foi então levado ao banho de ultra-som, onde permaneceu até a completa solubilização do fármaco. Posteriormente, a solução assim obtida foi diluída a 50,0 mL com uma combinação de isômeros do hexano. A nova solução, resultante dessa diluição, foi então homogeneizada e parte dela foi filtrada para um frasco apropriado, com o auxílio de uma unidade filtrante para seringa com membrana interna em poliéster e poros de 0,45 μm .

A partir do ensaio 13, foram pesados 25,0 mg de fenoprofeno cálcico diidratado racêmico, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL. Em seguida, adicionou-se a esse balão 2,5 mL de etanol. O balão foi então levado ao banho de ultra-som, onde permaneceu até a completa solubilização do fármaco. Posteriormente, a solução assim obtida foi diluída a 25,0 mL com uma combinação de isômeros do hexano. A nova solução, resultante dessa diluição, foi então homogeneizada e uma alíquota de 5,0 mL da mesma foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL. Em seguida, essa alíquota foi diluída a 50,0 mL com a mesma combinação de isômeros do hexano. Por fim, esta última solução foi homogeneizada e parte dela foi filtrada para um frasco apropriado, com o auxílio de

uma unidade filtrante para seringa com membrana interna em poliéster e poros de 0,45 μm .

Para um dado ensaio qualquer, a combinação de isômeros do hexano utilizada na preparação da amostra foi sempre a mesma utilizada na preparação da fase móvel correspondente. Todas as soluções da amostra foram utilizadas exclusivamente dentro de um prazo máximo de 24 horas após a sua preparação. Findo esse prazo, as soluções foram substituídas por outras recém-preparadas, sempre que necessário.

5.2.3.2 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS

Foram preparadas diversas fases móveis, constituídas, de um modo geral, por uma combinação de isômeros do hexano, com teor de n-hexano igual ou superior a 85,0%, acrescida de um segundo solvente orgânico e uma pequena quantidade de ácido acético. A partir do ensaio 25, a combinação de isômeros do hexano utilizada - doravante denominada apenas *hexano* - possuía teor de n-hexano igual ou superior a 95,0%. A combinação entre os constituintes da fase móvel, em proporções definidas, foi realizada manualmente e não pelo cromatógrafo (exceto onde especificado), com o auxílio de pipetas e balões volumétricos, sendo então filtrada sob pressão reduzida, através de membrana filtrante de politetrafluoretileno com poros de 0,45 μm . A degaseificação dos solventes (ou da combinação de solventes) foi realizada *on-line*.

5.2.3.3 CONDIÇÕES COMUNS A TODOS OS ENSAIOS

Antes da realização de cada ensaio, o sistema cromatográfico foi equilibrado com a fase móvel correspondente por não menos que 1 hora, para se garantir a estabilização da linha de base. Além disso, foram realizadas ao menos duas injeções da amostra em cada ensaio, para que também fosse possível verificar o equilíbrio do sistema cromatográfico comparando-se os tempos de retenção dos analitos nas diferentes corridas cromatográficas.

A coluna empregada foi a (S,S)-Whelk-O 1, descrita no subitem 5.1.5. Para a detecção dos analitos, empregou-se um detector com arranjo de diodos UV-Vis, operado na faixa de comprimentos de onda de 225 a 370 nm. Os cromatogramas apresentados no subitem 6.3 correspondem à detecção em 272 nm. O volume de injeção adotado, por sua vez, corresponde sempre a 20 µL.

5.2.3.4 INVESTIGAÇÃO DA SELETIVIDADE DE DIFERENTES MODIFICADORES ORGÂNICOS

Inicialmente, foram investigadas as seletividades proporcionadas por 4 diferentes modificadores orgânicos, com o intuito de selecionar aquele que, juntamente com o hexano e pequena quantidade de ácido acético, pudesse proporcionar uma boa separação entre os enantiômeros do fenoprofeno. Nessa primeira etapa, os 4 modificadores orgânicos investigados foram o diclorometano, o acetato de etila, o dioxano e o 2-propanol. As fases móveis correspondentes aos diversos ensaios dessa etapa se encontram descritas na tabela 5.8. Em todos os

ensaios, a vazão da respectiva fase móvel foi mantida a 1,0 mL.min⁻¹ e a temperatura da coluna, a 24 °C.

Tabela 5.8 – Fases móveis empregadas nos ensaios 1 a 12.

Ensaio	Solvente (A)	Solvente (B)	Proporção A:B ¹
1	Hexano ²	-	100:0
2	Hexano	Diclorometano:ácido acético 100:1 v/v	60:40
3	Hexano	Diclorometano:ácido acético 100:1 v/v	80:20
4	Hexano	Acetato de etila:ácido acético 100:5 v/v	90:10
5	Hexano	Acetato de etila:ácido acético 100:5 v/v	95:5
6	Hexano	Acetato de etila:ácido acético 100:5 v/v	98:2
7	Hexano	Dioxano:ácido acético 100:5 v/v	90:10
8	Hexano	Dioxano:ácido acético 100:5 v/v	95:5
9	Hexano	Dioxano:ácido acético 100:5 v/v	98:2
10	Hexano	2-Propanol:ácido acético 100:5 v/v	90:10
11	Hexano	2-Propanol:ácido acético 100:5 v/v	95:5
12	Hexano	2-Propanol:ácido acético 100:5 v/v	98:2

¹Em v/v; ²na verdade, no ensaio 1, o solvente A consistiu em uma combinação hexano:ácido acético 100:0,5 v/v. A combinação entre os solventes A e B das fases móveis correspondentes aos ensaios 2 a 12 foi realizada pelo próprio cromatógrafo.

Após análise dos cromatogramas obtidos nos ensaios 1 a 12, o método de preparação da amostra foi modificado, conforme descrito no subitem 5.2.3.1. Os ensaios 2 e 3 foram repetidos e um novo modificador orgânico, o 1,2-dicloroetano, teve sua seletividade investigada, dando origem aos ensaios 13 a 16. As fases móveis empregadas nesses ensaios se encontram descritas na tabela 5.9. Todas as demais condições cromatográficas permaneceram as mesmas empregadas nos ensaios 1 a 12.

Tabela 5.9 – Fases móveis empregadas nos ensaios 13 a 16.

Ensaio	Solvente (A)	Solvente (B)	Proporção A:B ¹
13	Hexano	Diclorometano:ácido acético 100:1 v/v	60:40
14	Hexano	Diclorometano:ácido acético 100:1 v/v	80:20
15	Hexano	1,2-Dicloroetano:ácido acético 100:0,5 v/v	60:40
16	Hexano	1,2-Dicloroetano:ácido acético 100:0,5 v/v	80:20

¹Em v/v. Em todos os ensaios, a combinação entre os respectivos solventes A e B foi realizada pelo próprio cromatógrafo.

Avaliados todos os cromatogramas obtidos até então, e tendo o 2-propanol se mostrado o modificador orgânico mais adequado para o desenvolvimento do método, decidiu-se investigar outros solventes com propriedades semelhantes ao 2-propanol. Mais especificamente, decidiu-se investigar a influência do tamanho da cadeia carbônica de alguns alcoóis na separação dos enantiômeros do fenoprofeno. Os novos alcoóis investigados foram: o etanol, o 1-butanol e o 2-butanol. Para tanto, foram realizados os ensaios 17 a 20. Contudo, esses ensaios também foram aproveitados para se otimizar a retenção dos analitos diminuindo-se a proporção do modificador orgânico escolhido para compor a respectiva fase móvel. Desse modo, as fases móveis empregadas nos ensaios 17 a 20 foram preparadas combinando-se os seus componentes de acordo com as proporções descritas na tabela 5.10. Em todos os ensaios, mais uma vez, a vazão da respectiva fase móvel foi mantida a 1,0 mL.min⁻¹ e a temperatura da coluna, a 24 °C.

Tabela 5.10 – Fases móveis empregadas nos ensaios 17 a 20.

Ensaio	Solvente (A)	Solvente (B)	Aditivo (C)	Proporção A:B:C ¹
17	Hexano	Etanol	Ácido acético	99:1:0,5
18	Hexano	2-Propanol	Ácido acético	99:1:0,5
19	Hexano	1-Butanol	Ácido acético	99:1:0,5
20	Hexano	2-Butanol	Ácido acético	99:1:0,5

¹Em v/v/v.

Considerando-se a seletividade proporcionada pelos diferentes alcoóis, entre outras informações extraídas da análise dos cromatogramas obtidos nos ensaios 17 a 20, estabeleceu-se o 2-propanol como modificador orgânico, bem como sua proporção na fase móvel. Posteriormente, partiu-se para a otimização de outras 3 condições cromatográficas, a saber: vazão da fase móvel, temperatura da coluna e quantidade de ácido acético adicionada à fase móvel.

5.2.3.5 OTIMIZAÇÃO DA VAZÃO DA FASE MÓVEL

Para otimizar a vazão da fase móvel, foram realizados os ensaios 21 a 25, sendo que o ensaio 21 corresponde, de fato, à repetição do ensaio 18. Esses ensaios tiveram por objetivo observar o efeito que a diminuição da vazão iria exercer sobre a resolução e, em caso de aumento desta última, encontrar o melhor compromisso entre esse aumento e o aumento do tempo de corrida (este último representado pelo aumento do tempo de retenção referente ao segundo pico). As respectivas condições cromatográficas empregadas nos ensaios 21 a 25 se encontram descritas na tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Condições cromatográficas empregadas nos ensaios 21 a 25.

Ensaio	Fase móvel ¹	Vazão da fase móvel ²	Temperatura da coluna ³
21	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	1,0	24
22	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,9	24
23	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,8	24
24	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,7	24
25	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,6	24

¹Proporções entre os componentes dadas em v/v/v; ²em mL.min⁻¹; ³em °C.

5.2.3.6 OTIMIZAÇÃO DA TEMPERATURA DA COLUNA

Para otimizar a temperatura da coluna, foram realizados os ensaios 26 a 30, sendo que o ensaio 26 corresponde, de fato, à repetição do ensaio 24. Esses novos ensaios tiveram por objetivo observar o efeito que a diminuição da temperatura iria exercer sobre a resolução. Novamente, procurou-se determinar o melhor conjunto de condições cromatográficas com base em um compromisso entre a resolução obtida em cada ensaio e o tempo de corrida correspondente. As respectivas condições cromatográficas empregadas nos ensaios 26 a 30 se encontram descritas na tabela 5.12.

Tabela 5.12 – Condições cromatográficas empregadas nos ensaios 26 a 30.

Ensaio	Fase móvel ¹	Vazão da fase móvel ²	Temperatura da coluna ³
26	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,7	24
27	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,7	21
28	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,7	18
29	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,7	15
30	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,7	12

¹Proporções entre os componentes dadas em v/v/v; ²em mL.min⁻¹; ³em °C. A combinação de isômeros do hexano aqui empregada possuía teor de n-hexano igual ou superior a 95,0%.

5.2.3.7 OTIMIZAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁCIDO ACÉTICO EMPREGADA NA FASE MÓVEL

Para otimizar a quantidade de ácido acético empregada na fase móvel, foram realizados os ensaios 31 a 36, sendo que o ensaio 31 corresponde, de fato, à repetição do ensaio 30. Nesta etapa, o melhor conjunto de condições cromatográficas foi determinado com base não apenas na resolução e no tempo de corrida obtidos em cada ensaio, mas também em diversas outras respostas, como a assimetria dos picos, o número médio de pratos teóricos e o fator de retenção referente ao segundo pico. As respectivas condições cromatográficas empregadas nos ensaios 31 a 36 se encontram descritas na tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Condições cromatográficas empregadas nos ensaios 31 a 36.

Ensaio	Fase móvel ¹	Vazão da fase móvel ²	Temperatura da coluna ³
31	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5	0,7	12
32	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,4	0,7	12
33	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,3	0,7	12
34	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,2	0,7	12
35	Hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,1	0,7	12
36	Hexano:2-propanol 99:1	0,7	12

¹Proporções entre os componentes dadas em v/v/v (ensaios 31 a 35) ou em v/v (ensaio 36); ²em mL.min⁻¹; ³em °C. A combinação de isômeros do hexano aqui empregada possuía teor de n-hexano igual ou superior a 95,0%.

5.2.3.8 AVALIAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Os cromatogramas obtidos nos ensaios 17 a 35 foram avaliados da mesma maneira já descrita no subitem 5.2.2.8.

5.2.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO CETOPROFENO POR CLAE EM FASE REVERSA

5.2.4.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Para o ensaio 1, a amostra foi preparada da seguinte maneira: 25,0 mg de cetoprofeno racêmico foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 50,0 mL. Em seguida, adicionou-se a esse balão 5 mL de etanol. O balão foi então levado ao banho de ultra-som, onde permaneceu até a completa solubilização do fármaco. Posteriormente, a solução assim obtida foi diluída a 50,0 mL com tampão acetato de amônio 25 mM pH 4,5. A nova solução, resultante dessa diluição, foi então homogeneizada e parte dela foi filtrada para um frasco apropriado, com o auxílio de uma unidade filtrante para seringa com membrana interna em poliéster e poros de 0,45 μ m. Porém, diante da necessidade de diminuição do sinal analítico, a concentração da amostra foi reduzida para os ensaios posteriores, conforme apresentado abaixo.

Para todos os demais ensaios, foram pesados (sempre que necessário) 25,0 mg de cetoprofeno racêmico, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL. Em seguida, adicionou-se a esse balão 5 mL de etanol. O balão foi então levado ao banho de ultra-som, onde permaneceu até a completa solubilização do fármaco. Posteriormente, a solução assim obtida foi diluída a 25,0 mL com o tampão apropriado*. A nova solução, resultante dessa diluição, foi então homogeneizada e uma alíquota de 5,0 mL da mesma foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL. Em seguida, essa alíquota foi diluída a 50,0 mL com o

*A amostra e a fase móvel utilizadas num dado ensaio qualquer foram preparadas sempre com o mesmo tampão.

mesmo tampão empregado anteriormente. Por fim, esta última solução foi homogeneizada e parte dela foi filtrada para um frasco apropriado, com o auxílio de uma unidade filtrante para seringa com membrana interna em poliéster e poros de 0,45 μm .

5.2.4.2 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS

As diversas fases móveis utilizadas foram preparadas de modo idêntico ao já descrito no subitem 5.2.2.2.

As quantidades de ácido fórmico* e de hidróxido de amônio** requeridos para preparar 1,0 L de tampão formato de amônio 25 mM correspondem a 1,0 mL e a 1,9 mL, respectivamente. Todavia, uma quantidade adicional de ácido fórmico é necessária para ajustar o pH do tampão ao valor desejado.

5.2.4.3 CONDIÇÕES COMUNS A TODOS OS ENSAIOS

A coluna empregada foi a (S,S)-Whelk-O 1, descrita no subitem 5.1.5. Para a detecção dos analitos, empregou-se um detector com arranjo de diodos UV-Vis, operado na faixa de comprimentos de onda de 225 a 370 nm. Os cromatogramas apresentados no subitem 6.4 correspondem à detecção em 254 nm (embora o comprimento de onda de máxima absorção tenha variado entre 258 e 260 nm, dependendo da fase móvel utilizada). O volume de injeção adotado, por sua vez, corresponde sempre a 20 μL .

*Densidade = 1,220 g/mL e concentração = 98%; **densidade = 0,910 g/mL e concentração equivalente a 25% de NH_3 .

5.2.4.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

As condições cromatográficas correspondentes aos diversos ensaios realizados durante a tentativa de desenvolvimento do método se encontram descritas nas tabelas 5.14, 5.15 e 5.16. Os cromatogramas obtidos nesses ensaios foram avaliados da mesma maneira já descrita no subitem 5.2.2.8.

Tabela 5.14 – Investigação da seletividade de diferentes modificadores orgânicos.

Ensaio	Solvente A	Solvente B	Proporção A:B ¹
1	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 4,5	Metanol	50:50
2	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 4,5	Metanol	70:30
3	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 4,5	Etanol	74,8:25,2
4	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 4,5	2-propanol	77,3:22,7
5	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 4,5	Acetonitrila	77,2:22,8

¹Em v/v. $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 24 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 5.15 – Experimentos com diferentes valores de pH para o tampão.

Ensaio	Solvente A	Solvente B	Proporção A:B ¹
6	Tampão formato de amônio 25 mM pH 3,0	Etanol	75:25
7	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 5,5	Etanol	75:25

¹Em v/v. $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 24 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 5.16 – Diminuição da temperatura da coluna e diminuição da vazão da fase móvel.

Ensaio	Fase móvel ¹	Vazão da fase móvel ²	Temperatura da coluna ³
8	Tampão acetato de amônio:etanol 75:25	1,0	12
9	Tampão acetato de amônio:etanol 75:25	0,9	12
10	Tampão acetato de amônio:etanol 75:25	0,8	12
11	Tampão acetato de amônio:etanol 75:25	0,7	12

¹Proporções entre os componentes dadas em v/v; ²em $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; ³em $^\circ\text{C}$. Molaridade do tampão = 25 mM; pH do tampão = 5,5.

5.2.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO CETOPROFENO POR CLAE EM FASE NORMAL

5.2.5.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Sempre que necessário, foram pesados 25,0 mg de cetoprofeno racêmico, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL. Em seguida, adicionou-se a esse balão 2,5 mL de diclorometano. O balão foi então levado ao banho de ultra-som, onde permaneceu até a completa solubilização do fármaco. Posteriormente, a solução assim obtida foi diluída a 25,0 mL com hexano*. A nova solução, resultante dessa diluição, foi então homogeneizada e uma alíquota de 5,0 mL da mesma foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL. Em seguida, essa alíquota foi diluída a 50,0 mL com hexano. Por fim, esta última solução foi homogeneizada e parte dela foi filtrada para um frasco apropriado, com o auxílio de uma unidade filtrante para seringa com membrana interna em poliéster e poros de 0,45 µm.

5.2.5.2 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS

Foram preparadas diversas fases móveis, constituídas, de um modo geral, por hexano e/ou diclorometano, acrescido(s) de um modificador orgânico alcoólico e uma pequena quantidade de ácido acético ou acetato de amônio. Este último, quando empregado, foi adicionado à fase móvel previamente solubilizado em etanol.

*Em todo o subitem 5.2.5, o termo *hexano* se refere, na verdade, a uma combinação de isômeros do hexano com teor de n-hexano igual ou superior a 95,0%.

Os alcoóis empregados como modificadores orgânicos foram o 2-propanol e o etanol. A combinação entre os constituintes da fase móvel, em proporções definidas, foi realizada manualmente e não pelo cromatógrafo (exceto onde especificado), com o auxílio de pipetas e balões volumétricos, sendo então filtrada sob pressão reduzida, através de membrana filtrante de politetrafluoretileno com poros de 0,45 µm. A degaseificação dos solventes (ou da combinação de solventes) foi realizada *on-line*.

5.2.5.3 CONDIÇÕES COMUNS A TODOS OS ENSAIOS

Antes da realização de cada ensaio, o sistema cromatográfico foi equilibrado com a fase móvel correspondente por não menos que 1 hora, para assegurar a estabilização da linha de base. Além disso, foram realizadas ao menos duas injeções da amostra em cada ensaio, para que também fosse possível verificar o equilíbrio do sistema cromatográfico comparando-se os tempos de retenção dos analitos nas diferentes corridas cromatográficas. A vazão adotada para a fase móvel corresponde sempre a 1,0 mL.min⁻¹.

A coluna empregada foi a (S,S)-Whelk-O 1, descrita no subitem 5.1.5. Para a detecção dos analitos, empregou-se um detector com arranjo de diodos UV-Vis, operado na faixa de comprimentos de onda de 225 a 370 nm. Os cromatogramas apresentados no subitem 6.5 correspondem à detecção em 254 nm. O volume de injeção adotado, por sua vez, corresponde sempre a 20 µL.

5.2.5.4 ENSAIOS PRELIMINARES

A estratégia para o desenvolvimento de um método de separação por CLAE em fase normal para os enantiômeros do cetoprofeno foi baseada na execução de um planejamento experimental do tipo *planejamento de mistura*, o qual está descrito no subitem 5.2.5.5. Esse planejamento teve por objetivo determinar a melhor fase móvel para o método estabelecendo a proporção ideal entre aqueles componentes previamente selecionados para compor essa fase móvel. Por proporção ideal, entende-se aquela capaz de conduzir ao melhor compromisso entre a resolução e o tempo de corrida.

Os solventes hexano e diclorometano foram escolhidos *a priori* para compor, juntamente com um álcool e um aditivo de fase móvel, as diversas fases móveis empregadas na execução do planejamento em questão. Contudo, antes que os ensaios previstos pelo planejamento de mistura pudessem ser realizados, alguns ensaios preliminares tiveram que ser conduzidos com o intuito de se definir qual modificador orgânico alcoólico e qual aditivo de fase móvel viriam a ser adotados. As fases móveis empregadas nesses ensaios preliminares se encontram descritas na tabela 5.17.

Tabela 5.17 – Fases móveis empregadas nos ensaios preliminares.

Ensaio	Solvente (A)	Solvente (B)	Aditivo (C)	Proporção ¹
1	Hexano	2-Propanol	Ácido acético	90:10:0,1
2	Hexano	2-Propanol	Ácido acético	99:1:0,1
3	Diclorometano	2-Propanol	Ácido acético	90:10:0,1
4	Diclorometano	2-Propanol	Ácido acético	99:1:0,1
5	Hexano	Etanol	Ácido acético	90:10:0,1
6	Hexano	Etanol	Acetato de amônio ²	90:10
7	Diclorometano	Etanol	Acetato de amônio ²	90:10

¹Proporção A:B:C, em v/v/v, para os ensaios em que o ácido acético foi o aditivo empregado, e proporção A:B, em v/v, para os ensaios onde o acetato de amônio foi o aditivo empregado;
²empregado em concentração equivalente a 0,02 M. $T_c = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.5.5 PLANEJAMENTO DE MISTURA²¹³

Com base na avaliação das separações obtidas nos ensaios preliminares, estabeleceu-se o etanol como o modificador orgânico alcoólico a ser utilizado, de tal modo que, para compor as misturas binárias e terciárias empregadas no planejamento de mistura, fez-se uso dos seguintes solventes:

- Hexano – Componente 1;
- Diclorometano – Componente 2;
- Etanol – Componente 3.

No entanto, para manter o tempo de eluição dos enantiômeros dentro de limites razoáveis, a participação do etanol na composição das diversas fases móveis foi restringida a concentrações entre 10,0% e 20,0% (inclusive). Essa decisão limitou a participação dos outros componentes a concentrações entre 0,0% e 90,0% (todas as porcentagens expressas em v/v). Além disso, adicionou-se acetato de amônio, em concentração equivalente a 1,0 g/L, a todas as fases móveis empregadas neste planejamento. A decisão por empregar esse aditivo em particular também foi fundamentada na avaliação das separações obtidas nos ensaios preliminares.

O planejamento de mistura adotado envolveu a realização de 9 ensaios distintos (9 diferentes fases móveis ou *misturas*), tendo sido definido conforme a tabela 5.18. Nessa tabela, são apresentadas as proporções reais dos componentes em cada uma das misturas (c_i). Na tabela 6.19, por sua vez, as proporções entre os componentes são apresentadas em termos de pseudocomponentes (X_i).

Tabela 5.18 – Proporção real de cada solvente nas diversas fases móveis empregadas no planejamento de mistura.

Mistura	c_1	c_2	c_3
1	0,900	0,000	0,100
2	0,000	0,900	0,100
3	0,800	0,000	0,200
4	0,000	0,800	0,200
5	0,000	0,850	0,150
6	0,850	0,000	0,150
7	0,450	0,450	0,100
8	0,400	0,400	0,200
9	0,425	0,425	0,150

c_1 , proporção real de hexano; c_2 , proporção real de diclorometano; c_3 , proporção real de etanol.

Tabela 5.19 – Proporção de cada solvente nas diversas fases móveis empregadas no planejamento de mistura, agora expressa em termos de pseudocomponentes.

Mistura	X_1	X_2	X_3
1	1,000	0,000	0,000
2	0,000	1,000	0,000
3	0,889	0,000	0,111
4	0,000	0,889	0,111
5	0,000	0,944	0,056
6	0,944	0,000	0,056
7	0,500	0,500	0,000
8	0,444	0,444	0,111
9	0,472	0,472	0,056

X_1 , proporção de hexano em termos de pseudocomponentes; X_2 , proporção de diclorometano em termos de pseudocomponentes; X_3 , proporção de etanol em termos de pseudocomponentes.

Para expressar em termos de pseudocomponentes a proporção de cada solvente nas diversas fases móveis, empregou-se a seguinte equação:

$$X_i = \frac{c_i - a_i}{1 - \sum_{i=1}^q a_i} \quad ; \quad (\text{Eq. 5.18})$$

onde a_i é o limite inferior estabelecido para a proporção de um dado solvente.

A temperatura da coluna foi mantida a 12 °C durante todos os ensaios do planejamento de mistura. Estes, por sua vez, foram realizados em duplicata, as quais se basearam em repetições autênticas de cada ensaio, incluindo novas preparações da amostra e da fase móvel. Para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados, os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Após a realização dos ensaios previstos pelo planejamento de mistura, os cromatogramas obtidos foram avaliados calculando-se os parâmetros cromatográficos já descritos no subitem 5.2.2.8. Efetuados os cálculos, partiu-se então para a construção de modelos matemáticos empíricos (lineares, quadráticos e cúbicos especiais), na tentativa de se descrever a relação existente entre a proporção de cada componente na fase móvel e as seguintes respostas:

- Resolução entre os picos;
- Tempo de retenção referente ao segundo pico;
- Logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico $[\ln(k_2)]$.

Cada uma das respostas foi modelada de acordo com as seguintes equações gerais:

- Para um modelo linear,

$$y = \beta_1^* X_1 + \beta_2^* X_2 + \beta_3^* X_3 + \varepsilon; \quad (\text{Eq. 5.19})$$

- Para um modelo quadrático,

$$y = \beta_1^* X_1 + \beta_2^* X_2 + \beta_3^* X_3 + \beta_{12}^* X_1 X_2 + \beta_{13}^* X_1 X_3 + \beta_{23}^* X_2 X_3 + \varepsilon; \quad (\text{Eq. 5.20})$$

- Para um modelo cúbico especial,

$$y = \beta_1^* X_1 + \beta_2^* X_2 + \beta_3^* X_3 + \beta_{12}^* X_1 X_2 + \beta_{13}^* X_1 X_3 + \beta_{23}^* X_2 X_3 + \beta_{123}^* X_1 X_2 X_3 + \varepsilon ; \quad (\text{Eq. 5.21})$$

onde: y é a resposta considerada e ε é o erro aleatório associado à sua determinação; X_1 , X_2 e X_3 são as proporções (expressas em termos de pseudocomponentes) de hexano, diclorometano e etanol na fase móvel, respectivamente; β_1^* , β_2^* , β_3^* , β_{12}^* , β_{13}^* , β_{23}^* , e β_{123}^* são parâmetros dos modelos a que se referem, para os quais foram calculados os estimadores correspondentes, b_1^* , b_2^* , b_3^* , ..., b_{123}^* .

Esses parâmetros foram avaliados em um nível de significância igual a 0,05. O grau de ajuste de cada modelo às respostas observadas foi determinado pela análise do perfil de distribuição dos resíduos e pelo emprego do método de análise da variância (ANOVA) da regressão.

5.2.5.6 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A SEPARAÇÃO

Para se estabelecer o melhor compromisso entre a resolução e o tempo de corrida almejados, foi empregado novamente, e de modo semelhante ao já apresentado no subitem 5.2.2.7, o método de otimização simultânea proposto por Derringer e Suich. Entretanto, a desejabilidade global (D), neste caso, é dada pela Equação 5.22:

$$D = \sqrt[2]{d_{R_s} \times d_{\ln(k_2)}} \quad , \quad (0 < D \leq 1) ; \quad (\text{Eq. 5.22})$$

onde d_{R_s} e $d_{\ln(k_2)}$ são a função de desejabilidade para a R_s e a função de desejabilidade para o $\ln(k_2)$, respectivamente.

A função de desejabilidade para a R_s é definida, aqui, pelas mesmas equações apresentadas no subitem 5.2.2.7 (equações 5.7, 5.8 e 5.9). Já a função de desejabilidade para o $\ln(k_2)$ é definida, neste trabalho, pelas seguintes equações:

$$d_{\ln(k_2)} = \left(\frac{\ln k_2 - LI}{A - LI} \right)^{0,1} \quad , \quad \text{para } LI \leq d_{\ln(k_2)} \leq A ; \quad (\text{Eq. 5.23})$$

$$d_{\ln(k_2)} = \left(\frac{\ln k_2 - LS}{A - LS} \right)^{0,1} \quad , \quad \text{para } A \leq d_{\ln(k_2)} \leq LS ; \quad (\text{Eq. 5.24})$$

$$d_{\ln(k_2)} = 0 \quad , \quad \begin{array}{l} \text{para } d_{\ln(k_2)} < LI \text{ ou} \\ \text{para } d_{\ln(k_2)} > LS ; \end{array} \quad (\text{Eq. 5.25})$$

onde A é aproximadamente igual a 1,3863 [valor desejado para o $\ln(k_2)$, sendo k_2 igual a 4,0], e LI e LS são aproximadamente iguais a 1,0986 e a 1,7918, respectivamente [valores mínimo e máximo aceitáveis para o $\ln(k_2)$, sendo k_2 igual a 3,0 e a 6,0, respectivamente].

Mais uma vez, com o emprego conjunto de todas essas equações, a otimização simultânea das duas respostas ficou reduzida à maximização da desejabilidade global. Assim sendo, uma nova planilha foi elaborada no programa *Excel*, da Microsoft, onde foram introduzidos os modelos escolhidos para descrever

a relação existente entre a proporção de cada componente na fase móvel e as respostas R_s e $\ln(k_2)$. Essa planilha foi construída de tal modo que, inserida a proporção de cada componente, o Excel fosse capaz de fornecer os valores previstos para a resolução e para o tempo de retenção referente ao segundo pico [este último obtido a partir do $\ln(k_2)$ e da equação 5.13]. Essas previsões, por sua vez, foram associadas às suas respectivas funções de desejabilidade, possibilitando o cálculo da desejabilidade global. Finalmente, para se descobrir a proporção ideal de cada solvente, foi utilizada a função *Solver* do Excel.

5.2.5.7 AVALIAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Os cromatogramas obtidos durante a realização dos ensaios previstos pelo planejamento de mistura foram avaliados da mesma maneira já descrita no subitem 5.2.2.8.

5.2.5.8 DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ENANTIÔMEROS

Para determinar a ordem de eluição dos enantiômeros foram preparadas três diferentes soluções. A primeira delas consistiu em uma solução de cetoprofeno racêmico, preparada conforme descrito anteriormente, no subitem 5.2.5.1 (Solução 1). A segunda solução foi preparada de modo semelhante à primeira, substituindo-se a amostra de cetoprofeno racêmico pelo padrão de (S)-(+)-cetoprofeno (Solução 2). A terceira e última solução foi preparada a partir das duas primeiras, adicionando-se

2,0 mL da solução de (S)-(+)-cetoprofeno a 5,0 mL da solução de cetoprofeno racêmico (Solução 3). Posteriormente, essas soluções foram analisadas de acordo com as condições estabelecidas para o método (já otimizado – vide subitem 6.5.2.4). A ordem de eluição dos enantiômeros pôde então ser determinada por meio do aumento observado na área de um dos picos, quando comparados os cromatogramas obtidos a partir da análise das soluções 1 e 3*.

5.2.6 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS SELECIONADOS ÀS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS

As amostras de medicamentos listadas no subitem 5.1.3.2 foram analisadas de acordo com os métodos escolhidos para a separação dos enantiômeros de seus respectivos fármacos, cetoprofeno ou fenoprofeno. Essas amostras foram preparadas para as análises pesando-se o equivalente a 25 mg do fármaco correspondente e procedendo-se às diluições conforme descrito nos subitens 5.2.3.1 e 5.2.5.1, de acordo com o fármaco em questão. Em ambos os casos, o método selecionado foi aquele em que os enantiômeros são separados por CLAE em fase normal. A seletividade desses métodos frente às amostras analisadas foi avaliada por meio dos recursos oferecidos pelo detector de arranjo de diodos (análise da pureza dos picos). Os excipientes que compõem as matrizes dos medicamentos analisados são apresentados a seguir:

- Amostra 1: açúcar refinado, amido de milho, dextrina, estearato de magnésio, lactose monoidratada, Opadry® Enteric YP-6-2125 e polacrilina potássica;

*A solução 2 foi analisada apenas para se assegurar a qualidade do padrão empregado.

- Amostra 2: amarelo de quinolina (laca), bicarbonato de sódio, celulose microcristalina, citrato de trietila, copolímero do ácido metacrílico, copovidona, dióxido de silício, dióxido de titânio, estearato de magnésio, hipromelose, lactose monoidratada, laurilsulfato de sódio, macrogol, silicato de magnésio e simeticona;
- Amostra 3: carboxipolimetileno, estearato de magnésio, lactose monoidratada e talco;
- Amostra 4: celulose microcristalina e dimeticona.

6. RESULTADOS

6.1 QUALIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS: ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO

6.1.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO

As figuras 6.1, 6.2 e 6.3 apresentam os espectros de absorção na região do infravermelho obtidos a partir das amostras de cetoprofeno e de fenoprofeno cálcico diidratado.

Figura 6.1 – Cetoprofeno (Amostra 1): espectro de absorção no infravermelho, obtido a partir de dispersão em pastilhas de KBr.

Figura 6.2 – Cetoprofeno (Amostra 2): espectro de absorção no infravermelho, obtido a partir de dispersão em pastilhas de KBr.

Figura 6.3 – Fenoprofeno cálcico diidratado: espectro de absorção no infravermelho, obtido a partir de dispersão em pastilhas de KBr.

A tabela 6.1 apresenta os números de onda referentes às bandas principais, de acordo com os espectros de absorção no infravermelho obtidos experimentalmente a partir das amostras já citadas. Para fins de comparação, a tabela também apresenta os números de onda referentes às bandas principais conforme encontrados na literatura. As prováveis atribuições dessas bandas foram descritas no subitem 2.3.1 (tabelas 2.2 e 2.3).

Tabela 6.1 – Números de onda referentes às bandas principais: valores experimentais e aqueles descritos pela literatura.

Fármaco	Números de onda referentes às bandas principais / cm^{-1}					
CET (Referência)	690	714	1226	1284	1656	1693
CET (Amostra 1)	691	717	1229	1285	1655	1697
CET (Amostra 2)	691	717	1229	1285	1655	1697
FCD (Referência)	696	1211	1225	1248	1268	1562
FCD (Amostra)	696	1211	1226	1246	1266	1560

CET, cetoprofeno; FCD, fenoprofeno cálcico diidratado. Em negrito estão os valores descritos pela literatura, tomados como referência.

6.1.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA

As figuras 6.4, 6.5 e 6.6 apresentam os espectros de absorção no ultravioleta obtidos a partir das amostras de cetoprofeno e de fenoprofeno cálcico diidratado.

Figura 6.4 – Cetoprofeno (Amostra 1): espectro de absorção no ultravioleta. O número 1 indica a absorvância em 255 nm.

Figura 6.5 – Cetoprofeno (Amostra 2): espectro de absorção no ultravioleta. O número 1 indica a absorvância em 255 nm.

Figura 6.6 – Fenoprofeno cálcico diidratado: espectro de absorção no ultravioleta. Os números 1, 2 e 3 indicam as absorvâncias em 266, 272 e 278 nm, respectivamente.

A tabela 6.2 traz os valores experimentais que foram confrontados com as especificações pertinentes fornecidas pela farmacopéia britânica, na monografia do cetoprofeno.

Tabela 6.2 – Cetoprofeno: valores de absorvância e absorvância específica, em comprimentos de onda de interesse.

Amostra	λ	Absorvância	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$
Cetoprofeno (Amostra 1)	254,0*	0,6670	667,0
	255,0	0,6649	664,9
Cetoprofeno (Amostra 2)	254,2*	0,6555	655,5
	255,0	0,6547	654,7

λ , comprimento de onda, em nm; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$, absorvância específica. *Comprimento de onda referente ao máximo de absorção obtido experimentalmente.

A tabela 6.3 traz os valores experimentais que foram confrontados com as especificações pertinentes fornecidas pela farmacopéia britânica, na monografia do fenoprofeno cálcico.

Tabela 6.3 – Fenoprofeno cálcico diidratado: valores de absorvância e absorvância específica, em comprimentos de onda de interesse.

Amostra	λ	Absorvância	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$
Fenoprofeno cálcico diidratado	266,0	0,5820	58,2
	272,0*	0,6709	67,1
	278,0	0,6053	60,5
	278,2*	0,6056	60,6

λ , comprimento de onda (em nm); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$, absorvância específica. *Comprimentos de onda referentes aos máximos de absorção obtidos experimentalmente.

6.1.3 DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO

Para ambas as amostras de cetoprofeno, a fusão foi observada entre 92 e 97 °C.

6.1.4 ENSAIO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CÁLCIO

Na realização do ensaio para identificação de cálcio, pôde-se observar a formação de um precipitado branco insolúvel, após a reação do fármaco com o oxalato de amônio, em meio constituído por ácido acético. Posteriormente, esse precipitado se mostrou solúvel em ácido clorídrico 3 M. O teste de chama, por sua vez, evidenciou o aparecimento de uma coloração vermelho-amarelada transitória.

Além disso, a decomposição térmica da amostra de fenoprofeno cálcico diidratado, durante a análise termogravimétrica, conduziu à obtenção de um resíduo cuja massa se revelou equivalente a 10,81% da massa originalmente submetida à análise (média de duas determinações).

Tabela 6.4 – Valores teórico e experimental para a porcentagem de resíduo obtida após decomposição térmica do fenoprofeno cálcico diidratado em presença de oxigênio.

	Massa molecular relativa	Valor teórico	Valor experimental
Fenoprofeno cálcico diidratado	558,64	100,00%	-
Óxido de cálcio (resíduo)	56,08	10,04%	10,81%*

*Média de duas determinações.

Figura 6.7 – Fenoprofeno cálcico diidratado: curva TG obtida a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de ar – Ensaio 1 (tomada de ensaio = 10,203 mg).

Figura 6.8 – Fenoprofeno cálcico diidratado: curva TG obtida a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de ar – Ensaio 2 (tomada de ensaio = 10,443 mg).

6.1.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA PELO MÉTODO DE KARL FISCHER

As tabelas 6.5 e 6.6 se referem à padronização da solução de Karl Fischer e à determinação do teor de água na amostra de fenoprofeno cálcico diidratado, respectivamente. Segundo o método de Karl Fischer, essa amostra contém 6,18% de água (média de três determinações). A quantidade de água na molécula do $(C_{15}H_{13}O_3)_2Ca \cdot 2H_2O$, calculada estequiometricamente, corresponde a 6,45%.

Tabela 6.5 – Padronização da solução de Karl Fischer.

Amostra	TE	Volume gasto ¹	Média	DP	CV
Água ultrapurificada	10	2,126	2,131	0,058	2,73%
	10	2,076			
	10	2,192			

TE, tomada de ensaio (em μ L); DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação. ¹Referente à solução de Karl Fischer (em mL).

Tabela 6.6 – Determinação do teor de água na amostra de fenoprofeno cálcico diidratado.

Amostra	TE	Volume gasto ¹	Teor de água	Média	DP	CV
Fenoprofeno cálcico diidratado	206,0	2,802	6,38%	6,18%	0,27%	4,30%
	202,1	2,702	6,27%			
	203,9	2,554	5,88%			

TE, tomada de ensaio (em mg); DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação. ¹Referente à solução de Karl Fischer (em mL).

6.1.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA POR TERMOGRAVIMETRIA

A determinação do teor de água por termogravimetria indicou que a amostra de fenoprofeno cálcico diidratado contém 6,30% de água (média de duas determinações), conforme pode ser observado nas figuras 6.9 e 6.10.

Figura 6.9 – Fenoprofeno cálcico diidratado: curvas TG/DTG obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio – Ensaio 1 (tomada de ensaio = 5,035 mg).

Figura 6.10 – Fenoprofeno cálcico diidratado: curvas TG/DTG obtidas a 10 °C/min e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio – Ensaio 2 (tomada de ensaio = 10,299 mg).

6.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO FENOPROFENO POR CLAE EM FASE REVERSA

6.2.1 ENSAIOS PRELIMINARES

O quadro 6.1 apresenta os cromatogramas obtidos durante os ensaios preliminares.

Quadro 6.1 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase reversa: ensaios preliminares – Ensaios 1 a 5 – Fase móvel = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 4,5:metanol; $T_c = 24^\circ\text{C}$ (**Ensaio 1**: % B = 60,0%, $F = 1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **ensaio 2**: % B = 50,0%, $F = 1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **ensaio 3**: % B = 40,0%, $F = 1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **ensaio 4**: % B = 50,0%, $F = 0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **ensaio 5**: % B = 50,0%, $F = 2,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) – Ensaios 6 e 7 – Fase móvel = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 4,5:acetonitrila; $F = 1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $T_c = 24^\circ\text{C}$ (**Ensaio 6**: % B = 50,0%; **ensaio 7**: % B = 36,5%).

6.2.2 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

6.2.2.1 AVALIAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS

As tabelas 6.7 e 6.8 apresentam a avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios previstos no planejamento fatorial fracionário. Cada resultado apresentado nessas tabelas representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

Após as tabelas, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas condições cromatográficas correspondentes a cada ensaio (quadro 6.2).

Tabela 6.7 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 1 a 4 previstos no planejamento fatorial fracionário.

Resposta	Ensaio							
	1	1*	2	2*	3	3*	4	4*
Tempo de retenção (não-retido)	3,18	3,17	3,15	3,17	1,67	1,66	1,60	1,59
Tempo de retenção (1º pico)	18,55	17,78	13,96	13,43	3,61	3,69	3,27	3,15
Tempo de retenção (2º pico)	21,75	20,88	15,80	15,23	4,11	4,21	3,63	3,50
Fator de retenção (2º pico)	5,84	5,59	4,01	3,81	1,46	1,53	1,26	1,20
Fator de separação	1,21	1,21	1,17	1,18	1,26	1,26	1,22	1,22
Resolução	2,64	2,59	2,11	2,12	1,85	1,80	1,58	1,55
Pratos teóricos (1º pico)	4.720	4.420	4.743	4.599	3.441	3.201	3.821	3.756
Pratos teóricos (2º pico)	4.220	4.016	4.590	4.522	3.098	2.856	3.595	3.452
Pratos teóricos (média)	4.470	4.218	4.666	4.561	3.269	3.028	3.708	3.604
Área (1º pico)	1.823.132	1.883.798	1.872.535	1.857.359	0.957.974	0.983.241	0.932.788	0.930.740
Área (2º pico)	1.829.968	1.892.667	1.910.283	1.892.609	0.988.513	1.016.895	0.974.641	0.976.264
Área (média)	1.826.550	1.888.232	1.891.409	1.874.984	0.973.243	1.000.068	0.953.715	0.953.502
Área% (1º pico)	49,91%	49,89%	49,50%	49,53%	49,22%	49,16%	48,91%	48,81%
Área% (2º pico)	50,10%	50,12%	50,50%	50,47%	50,79%	50,84%	51,10%	51,19%
Altura (1º pico)	43.644	44.157	59.735	59.850	100.429	97.021	115.447	116.768
Altura (2º pico)	35.330	35.740	52.519	52.593	84.755	81.084	101.650	101.642
Altura (média)	39.487	39.948	56.127	56.221	92.592	89.052	108.548	109.205
Largura USP (1º pico)	1,08	1,07	0,81	0,79	0,25	0,26	0,21	0,21
Largura USP (2º pico)	1,34	1,32	0,94	0,91	0,30	0,32	0,24	0,24
Largura USP (média)	1,21	1,20	0,87	0,85	0,27	0,29	0,23	0,23
Assimetria - 10% (1º pico)	1,39	1,54	1,23	1,31	1,19	1,25	1,25	1,32
Assimetria - 10% (2º pico)	1,69	1,86	1,37	1,47	1,32	1,40	1,29	1,35
Assimetria - 10% (média)	1,54	1,70	1,30	1,39	1,26	1,32	1,27	1,34
CRF	0,9251	0,8772	0,0535	0,0551	0,0067	0,0047	0,0009	0,0007

*Duplicata do ensaio correspondente.

Tabela 6.8 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 5 a 8 previstos no planejamento fatorial fracionário.

Resposta	Ensaio							
	5	5*	6	6*	7	7*	8	8*
Tempo de retenção (não-retido)	3,22	3,20	3,17	3,19	1,64	1,62	1,59	1,59
Tempo de retenção (1º pico)	5,03	4,98	4,72	4,58	4,08	4,07	3,63	3,52
Tempo de retenção (2º pico)	5,46	5,42	4,97	4,88	4,55	4,54	3,96	3,83
Fator de retenção (2º pico)	0,69	0,69	0,57	0,53	1,77	1,81	1,49	1,41
Fator de separação	1,24	1,25	1,16	1,22	1,20	1,19	1,16	1,16
Resolução	1,58	1,44	1,15	1,01	1,46	1,41	1,16	1,10
Pratos teóricos (1º pico)	6.732	4.585	7.590	4.453	2.795	2.637	2.988	2.722
Pratos teóricos (2º pico)	5.382	4.578	8.219	3.385	2.836	2.646	2.969	2.662
Pratos teóricos (média)	6.057	4.582	7.904	3.919	2.815	2.642	2.978	2.692
Área (1º pico)	1.854.054	1.846.552	1.751.022	1.782.140	0.947.565	0.986.610	0.894.085	0.939.250
Área (2º pico)	1.991.944	1.954.333	1.916.753	2.024.448	0.977.050	1.028.725	0.944.976	1.003.928
Área (média)	1.922.999	1.900.443	1.833.888	1.903.294	0.962.307	1.007.667	0.919.531	0.971.589
Área% (1º pico)	48,21%	48,59%	47,73%	46,82%	49,24%	48,96%	48,62%	48,34%
Área% (2º pico)	51,80%	51,42%	52,27%	53,18%	50,77%	51,05%	51,39%	51,67%
Altura (1º pico)	194.596	165.738	214.831	165.470	80.782	82.518	88.752	92.321
Altura (2º pico)	162.651	146.475	218.262	176.317	73.218	74.164	83.442	86.838
Altura (média)	178.623	156.106	216.546	170.893	77.000	78.341	86.097	89.580
Largura USP (1º pico)	0,25	0,29	0,22	0,28	0,31	0,32	0,27	0,27
Largura USP (2º pico)	0,30	0,32	0,22	0,34	0,35	0,35	0,29	0,30
Largura USP (média)	0,27	0,31	0,22	0,31	0,33	0,34	0,28	0,28
Assimetria - 10% (1º pico)	1,18	1,20	-	-	1,16	0,60	-	-
Assimetria - 10% (2º pico)	1,27	1,33	-	-	1,18	1,23	-	-
Assimetria - 10% (média)	1,23	1,27	-	-	1,17	0,91	-	-
CRF	0,0008	0,0003	0,0000	0,0000	0,0004	0,0002	0,0000	0,0000

*Duplicata do ensaio correspondente; (-) não foi possível calcular devido à sobreposição dos picos.

Quadro 6.2 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase reversa: planejamento fatorial fracionário – Ensaios 1 a 8 (**ensaio 1**: fase móvel = tampão HCO_2NH_4 20 mM pH 3,5:metanol 55:45, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_c = 14^\circ \text{C}$; **ensaio 2**: fase móvel = tampão HCO_2NH_4 40 mM pH 3,5:metanol 55:45, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_c = 26^\circ \text{C}$; **ensaio 3**: fase móvel = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 20 mM pH 5,5:metanol 55:45, $F = 2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_c = 14^\circ \text{C}$; **ensaio 4**: fase móvel = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 40 mM pH 5,5:metanol 55:45, $F = 2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_c = 26^\circ \text{C}$; **ensaio 5**: fase móvel = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 40 mM pH 5,5:metanol 45:55, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_c = 14^\circ \text{C}$; **ensaio 6**: fase móvel = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 20 mM pH 5,5:metanol 45:55, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_c = 26^\circ \text{C}$; **ensaio 7**: fase móvel = tampão HCO_2NH_4 40 mM pH 3,5:metanol 45:55, $F = 2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_c = 14^\circ \text{C}$; **ensaio 8**: fase móvel = tampão HCO_2NH_4 20 mM pH 3,5:metanol 45:55, $F = 2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_c = 26^\circ \text{C}$).

6.2.2.2 CÁLCULO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS

As tabelas 6.9 a 6.14 apresentam, para cada uma das seis variáveis escolhidas como resposta, os resultados referentes às estimativas calculadas para os efeitos principais (relacionados à ação isolada de cada um dos 5 fatores investigados) e para os efeitos relacionados a duas das 10 interações possíveis entre dois desses fatores. As mesmas tabelas apresentam, ainda, o valor calculado para a estimativa da média global das respostas que seriam obtidas com a realização de todos os ensaios previstos pelo planejamento fatorial completo correspondente. Adicionalmente, são fornecidos dados que permitem concluir acerca da significância estatística dessas estimativas ($\alpha = 0,05$).

Tabela 6.9 – Análise do planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}_{III}), tendo como resposta a variável *tempo de retenção referente ao segundo pico* (em minutos).

Contraste	Efeito	Erro puro	Estatística t^1	Valor- p	Intervalo de confiança ²
Média	7,92	0,07	119,28	0,000	7,77 a 8,07
Efeitos principais					
I_A	-1,89	0,13	-14,24	0,000	-2,20 a -1,59
I_B	-7,76	0,13	-58,41	0,000	-8,06 a -7,45
I_C	-6,44	0,13	-48,46	0,000	-6,74 a -6,13
I_D	-6,79	0,13	-51,17	0,000	-7,10 a -6,49
I_E	-1,31	0,13	-9,84	0,000	-1,61 a -1,00
Interações					
I_{AB}	1,26	0,13	9,51	0,000	0,96 a 1,57
I_{AD}	1,33	0,13	10,03	0,000	1,03 a 1,64

I , contraste; A, temperatura da coluna (°C); B, vazão da fase móvel (mL.min⁻¹); C, porcentagem de metanol na fase móvel (v/v); D, pH do tampão; E, molaridade do tampão. ¹Calculada com 8 graus de liberdade; ² $\alpha = 0,05$. Os valores considerados significativos se encontram em negrito.

Tabela 6.10 – Análise do planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}_{III}), tendo como resposta a variável *fator de retenção referente ao segundo pico*.

Contraste	Efeito	Erro puro	Estatística t^1	Valor- p	Intervalo de confiança ²
Média	2,10	0,02	95,37	0,000	2,05 a 2,16
Efeitos principais					
I_A	-0,64	0,04	-14,47	0,000	-0,74 a -0,54
I_B	-1,22	0,04	-27,75	0,000	-1,33 a -1,12
I_C	-1,97	0,04	-44,61	0,000	-2,07 a -1,87
I_D	-2,22	0,04	-50,36	0,000	-2,32 a -2,12
I_E	-0,40	0,04	-8,98	0,000	-0,50 a -0,29
Interações					
I_{AB}	0,34	0,04	7,59	0,000	0,23 a 0,44
I_{AD}	0,43	0,04	9,85	0,000	0,33 a 0,54

I , contraste; A, temperatura da coluna (°C); B, vazão da fase móvel (mL.min⁻¹); C, porcentagem de metanol na fase móvel (v/v); D, pH do tampão; E, molaridade do tampão. ¹Calculada com 8 graus de liberdade; ² $\alpha = 0,05$. Os valores considerados significativos se encontram em negrito.

Tabela 6.11 – Análise do planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}_{III}), tendo como resposta a variável *fator de separação entre os picos*.

Contraste	Efeito	Erro puro	Estatística t^1	Valor- p	Intervalo de confiança ²
Média	1,21	0,00	310,01	0,000	1,20 a 1,21
Efeitos principais					
I_A	-0,04	0,01	-5,20	0,001	-0,06 a -0,02
I_B	0,00	0,01	0,32	0,759	-0,02 a 0,02
I_C	-0,02	0,01	-2,17	0,062	-0,03 a 0,00
I_D	0,04	0,01	5,60	0,001	0,03 a 0,06
I_E	0,00	0,01	0,33	0,747	-0,02 a 0,02
Interações					
I_{AB}	0,00	0,01	0,50	0,631	-0,01 a 0,02
I_{AD}	-0,01	0,01	-0,64	0,537	-0,02 a 0,01

I , contraste; A, temperatura da coluna (°C); B, vazão da fase móvel (mL.min⁻¹); C, porcentagem de metanol na fase móvel (v/v); D, pH do tampão; E, molaridade do tampão. ¹Calculada com 8 graus de liberdade; ² $\alpha = 0,05$. Os valores considerados significativos se encontram em negrito.

Tabela 6.12 – Análise do planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}_{III}), tendo como resposta a variável *resolução entre os picos*.

Contraste	Efeito	Erro puro	Estatística t^1	Valor- p	Intervalo de confiança ²
Média	1,66	0,01	119,20	0,000	1,63 a 1,69
Efeitos principais					
I_A	-0,37	0,03	-13,42	0,000	-0,44 a -0,31
I_B	-0,34	0,03	-12,26	0,000	-0,41 a -0,28
I_C	-0,74	0,03	-26,60	0,000	-0,81 a -0,68
I_D	-0,33	0,03	-11,76	0,000	-0,39 a -0,26
I_E	-0,00	0,03	-0,16	0,874	-0,07 a 0,06
Interações					
I_{AB}	0,09	0,03	3,30	0,011	0,03 a 0,16
I_{AD}	0,03	0,03	1,03	0,334	-0,04 a 0,09

I , contraste; A, temperatura da coluna (°C); B, vazão da fase móvel (mL.min⁻¹); C, porcentagem de metanol na fase móvel (v/v); D, pH do tampão; E, molaridade do tampão. ¹Calculada com 8 graus de liberdade; ² $\alpha = 0,05$. Os valores considerados significativos se encontram em negrito.

Tabela 6.13 – Análise do planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}_{III}), tendo como resposta a variável *número médio de pratos teóricos*.

Contraste	Efeito	Erro puro	Estatística t^1	Valor- p	Intervalo de confiança ²
Média	4070	267	15,21	0,000	3453 a 4686
Efeitos principais					
I_A	369	535	0,69	0,510	-865 a 1602
I_B	-1955	535	-3,65	0,006	-3189 a -721
I_C	258	535	0,48	0,642	-975 a 1492
I_D	879	535	1,64	0,139	-355 a 2112
I_E	20	535	0,04	0,972	-1214 a 1253
Interações					
I_{AB}	-62	535	-0,12	0,911	-1296 a 1172
I_{AD}	181	535	0,34	0,744	-1053 a 1414

I , contraste; A, temperatura da coluna (°C); B, vazão da fase móvel (mL.min⁻¹); C, porcentagem de metanol na fase móvel (v/v); D, pH do tampão; E, molaridade do tampão. ¹Calculada com 8 graus de liberdade; ² $\alpha = 0,05$. Os valores considerados significativos se encontram em negrito.

Tabela 6.14 – Análise do planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}_{III}), tendo como resposta a variável *função de resposta cromatográfica*.

Contraste	Efeito	Erro puro	Estatística t^1	Valor- p	Intervalo de confiança ²
Média	0,1204	0,0030	40,19	0,000	0,1134 a 0,1273
Efeitos principais					
I_A	-0,2131	0,0060	-35,58	0,000	-0,2270 a -0,1993
I_B	-0,2373	0,0060	-39,62	0,000	-0,2511 a -0,2235
I_C	-0,2403	0,0060	-40,11	0,000	-0,2541 a -0,2264
I_D	-0,2372	0,0060	-39,60	0,000	-0,2510 a -0,2234
I_E	-0,2127	0,0060	-35,52	0,000	-0,2266 a -0,1989
Interações					
I_{AB}	0,2106	0,0060	35,15	0,000	0,1967 a 0,2244
I_{AD}	0,2104	0,0060	35,13	0,000	0,1966 a 0,2242

I , contraste; A, temperatura da coluna (°C); B, vazão da fase móvel (mL.min⁻¹); C, porcentagem de metanol na fase móvel (v/v); D, pH do tampão; E, molaridade do tampão. ¹Calculada com 8 graus de liberdade; ² $\alpha = 0,05$. Os valores considerados significativos se encontram em negrito.

As figuras 6.11 a 6.16 apresentam gráficos que ilustram mais claramente o efeito provocado pela mudança de nível de cada fator sobre as seis respostas de interesse, segundo as estimativas apresentadas nas tabelas 6.9 a 6.14. Esses gráficos pressupõem que as interações entre os fatores não são significativas e que, portanto, a alteração nas respostas é atribuída apenas aos efeitos principais. Os intervalos de confiança em todos os gráficos correspondem a um coeficiente de confiança de 95%.

Figura 6.11 – Gráfico da estimativa do efeito provocado pela mudança de nível de cada fator sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico ($\alpha = 0,05$).

Figura 6.12 – Gráfico da estimativa do efeito provocado pela mudança de nível de cada fator sobre o fator de retenção referente ao segundo pico ($\alpha = 0,05$).

Figura 6.13 – Gráfico da estimativa do efeito provocado pela mudança de nível de cada fator sobre o fator de separação entre os picos ($\alpha = 0,05$).

Figura 6.14 – Gráfico da estimativa do efeito provocado pela mudança de nível de cada fator sobre a resolução entre os picos ($\alpha = 0,05$).

Figura 6.15 – Gráfico da estimativa do efeito provocado pela mudança de nível de cada fator sobre o número médio de pratos teóricos ($\alpha = 0,05$).

Figura 6.16 – Gráfico da estimativa do efeito provocado pela mudança de nível de cada fator sobre a função de resposta cromatográfica ($\alpha = 0,05$).

A tabela 6.15 resume a influência dos fatores investigados sobre as respostas de interesse, ainda pressupondo que as interações entre os fatores não são significativas.

Tabela 6.15 – Resumo da influência dos fatores investigados sobre as respostas de interesse.

Fator	Resposta					
	t_{R2}^1	k_2^1	α^2	R_s^2	N_M	FRC
↑ T_c	↓	↓	↓	↓	-	↓
↑ F	↓	↓	-	↓	↓	↓
↑ % B	↓	↓	-	↓	-	↓
↑ pH do tampão	↓	↓	↑	↓	-	↓
↑ [Tampão]	↓	↓	-	-	-	↓

↑, aumento; ↓, diminuição. ¹Respostas relacionadas ao tempo de corrida; ²respostas relacionadas à separação entre os enantiômeros.

O emprego do planejamento fatorial fracionário 2_{III}^{5-2} , no entanto, confunde os efeitos principais com as interações entre os fatores e não há garantias de que estas sejam insignificantes. Portanto, para a adequada interpretação dos resultados já apresentados, os padrões de confundimento relacionados aos efeitos principais, de acordo com o planejamento empregado, são apresentados na tabela 6.16.

Tabela 6.16 – Relação entre os contrastes da fração 2_{III}^{5-2} e os efeitos do fatorial completo 2^5 .

Padrões de confundimento	
I_I	→ Média + $\frac{1}{2}ABDE$ - $\frac{1}{2}(ACE + BCD)$
I_A	→ A + BDE - (CE + ABCD)
I_B	→ B + ADE - (CD + ABCE)
I_C	→ C + ABCDE - (AE + BD)
I_D	→ D + ABE - (BC + ACDE)
I_E	→ E + ABD - (AC + BCDE)
I_{AB}	→ AB + DE - (ACD + BCE)
I_{AD}	→ AD + BE - (ABC + CDE)

I , contraste.

6.2.3 PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL

6.2.3.1 AVALIAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS

As tabelas 6.17, 6.18 e 6.19 apresentam a avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios previstos no planejamento composto central. Cada resultado apresentado nessas tabelas representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

Após as tabelas, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas diferentes condições cromatográficas empregadas em cada ensaio (quadros 6.3 e 6.4).

Tabela 6.17 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 1 a 8 previstos no planejamento composto central.

Resposta	Ensaio							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo de retenção (não-retido) ¹	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03
Tempo de retenção (1º pico)	16,82	9,37	15,17	8,44	15,38	8,38	12,74	7,69
Tempo de retenção (2º pico)	19,48	10,62	17,82	9,55	17,73	9,31	14,66	8,55
Fator de retenção (2º pico)	5,43	2,51	4,88	2,15	4,85	2,07	3,84	1,82
Fator de separação	1,19	1,20	1,22	1,21	1,19	1,18	1,20	1,19
Resolução	2,34	1,86	2,46	1,82	2,29	1,53	2,24	1,57
Pratos teóricos (1º pico)	4.271	3.473	4.023	3.467	4.305	3.278	4.288	3.464
Pratos teóricos (2º pico)	3.893	3.523	3.558	3.457	4.055	3.357	3.976	3.450
Pratos teóricos (média)	4.082	3.498	3.791	3.462	4.180	3.318	4.132	3.457
Área (1º pico)	1.878.325	1.837.350	1.909.646	1.857.201	1.836.233	1.844.380	1.901.986	1.846.196
Área (2º pico)	1.896.430	1.884.753	1.923.856	1.902.486	1.856.045	1.920.639	1.940.880	1.924.728
Área (média)	1.887.377	1.861.051	1.916.751	1.879.843	1.846.139	1.882.509	1.921.433	1.885.462
Área% (1º pico)	49,76%	49,36%	49,82%	49,40%	49,73%	48,99%	49,50%	48,96%
Área% (2º pico)	50,24%	50,64%	50,19%	50,60%	50,27%	51,02%	50,51%	51,04%
Altura (1º pico)	45.083	72.962	49.099	82.228	48.617	79.547	60.326	89.816
Altura (2º pico)	37.210	65.584	39.148	73.129	40.961	73.696	50.489	81.938
Altura (média)	41.146	69.273	44.124	77.678	44.789	76.622	55.407	85.877
Largura USP (1º pico)	1,03	0,64	0,96	0,57	0,94	0,59	0,78	0,52
Largura USP (2º pico)	1,25	0,72	1,20	0,65	1,11	0,64	0,93	0,58
Largura USP (média)	1,14	0,68	1,08	0,61	1,03	0,62	0,86	0,55
Assimetria - 10% (1º pico)	1,56	1,30	1,71	1,37	1,50	1,30	1,61	1,36
Assimetria - 10% (2º pico)	1,83	1,42	2,04	1,50	1,74	1,35	1,88	1,43
Assimetria - 10% (média)	1,70	1,36	1,87	1,43	1,62	1,33	1,74	1,39
CRF	0,2733	0,0078	0,5897	0,0054	0,1958	0,0006	0,1345	0,0008

¹Tempo médio em que ocorreu o primeiro distúrbio na linha de base, considerando-se todos os ensaios.

Tabela 6.18 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 9 a 15.2 previstos no planejamento composto central.

Resposta	Ensaio							
	9	10	11	12	13	14	15.1	15.2
Tempo de retenção (não-retido) ¹	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03
Tempo de retenção (1º pico)	19,74	7,25	11,26	9,40	12,89	9,83	11,46	11,19
Tempo de retenção (2º pico)	23,06	8,04	12,81	10,71	14,99	11,00	13,10	12,76
Fator de retenção (2º pico)	6,61	1,65	3,23	2,53	3,95	2,63	3,32	3,21
Fator de separação	1,20	1,19	1,19	1,21	1,21	1,17	1,19	1,19
Resolução	2,48	1,45	1,97	2,03	2,27	1,68	2,05	2,00
Pratos teóricos (1º pico)	4.410	3.133	3.776	3.980	3.771	3.616	3.803	3.779
Pratos teóricos (2º pico)	3.817	3.206	3.759	3.808	3.565	3.588	3.715	3.714
Pratos teóricos (média)	4.114	3.169	3.767	3.894	3.668	3.602	3.759	3.747
Área (1º pico)	1.909.291	1.915.389	1.868.499	1.823.827	1.904.063	1.920.230	1.934.049	1.844.545
Área (2º pico)	1.914.092	2.019.511	1.913.713	1.877.543	1.930.674	1.989.725	1.974.011	1.885.781
Área (média)	1.911.691	1.967.450	1.891.106	1.850.685	1.917.368	1.954.978	1.954.030	1.865.163
Área% (1º pico)	49,94%	48,68%	49,40%	49,28%	49,65%	49,11%	49,49%	49,45%
Área% (2º pico)	50,06%	51,33%	50,60%	50,73%	50,35%	50,89%	50,51%	50,56%
Altura (1º pico)	39.214	93.939	63.655	76.552	56.665	73.836	65.314	63.334
Altura (2º pico)	31.201	87.594	56.378	66.074	47.593	66.703	56.513	55.392
Altura (média)	35.208	90.766	60.016	71.313	52.129	70.269	60.913	59.363
Largura USP (1º pico)	1,19	0,52	0,73	0,60	0,84	0,65	0,74	0,73
Largura USP (2º pico)	1,50	0,57	0,84	0,70	1,00	0,74	0,86	0,84
Largura USP (média)	1,34	0,55	0,78	0,65	0,92	0,69	0,80	0,79
Assimetria - 10% (1º pico)	1,78	1,31	1,34	1,47	1,47	1,38	1,42	1,40
Assimetria - 10% (2º pico)	2,13	1,34	1,48	1,66	1,72	1,48	1,61	1,57
Assimetria - 10% (média)	1,96	1,32	1,41	1,56	1,60	1,43	1,52	1,49
CRF	0,6306	0,0003	0,0171	0,0282	0,1774	0,0020	0,0325	0,0216

¹Tempo médio em que ocorreu o primeiro distúrbio na linha de base, considerando-se todos os ensaios.

Tabela 6.19 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 15.3 a 15.9 previstos no planejamento composto central.

Resposta	Ensaio						
	15.3	15.4	15.5	15.6	15.7	15.8	15.9
Tempo de retenção (não-retido) ¹	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03
Tempo de retenção (1º pico)	11,43	10,54	11,08	11,31	11,42	11,45	11,42
Tempo de retenção (2º pico)	13,01	11,94	12,62	12,93	13,06	13,11	13,06
Fator de retenção (2º pico)	3,29	2,94	3,17	3,27	3,31	3,33	3,31
Fator de separação	1,19	1,19	1,19	1,20	1,20	1,20	1,20
Resolução	1,99	1,86	1,97	2,04	2,05	2,06	2,07
Pratos teóricos (1º pico)	3.807	3.605	3.734	3.790	3.801	3.777	3.843
Pratos teóricos (2º pico)	3.714	3.558	3.654	3.700	3.713	3.685	3.765
Pratos teóricos (média)	3.761	3.582	3.694	3.745	3.757	3.731	3.804
Área (1º pico)	1.928.581	1.822.544	1.896.130	1.944.462	1.891.093	1.903.110	1.834.952
Área (2º pico)	1.973.400	1.878.793	1.936.414	1.985.744	1.934.044	1.947.015	1.876.662
Área (média)	1.950.990	1.850.668	1.916.272	1.965.103	1.912.568	1.925.062	1.855.807
Área% (1º pico)	49,43%	49,24%	49,48%	49,48%	49,44%	49,43%	49,44%
Área% (2º pico)	50,58%	50,76%	50,53%	50,53%	50,56%	50,57%	50,56%
Altura (1º pico)	65.273	65.101	65.475	66.041	64.085	63.918	62.469
Altura (2º pico)	57.020	57.708	57.180	57.506	55.494	55.468	54.155
Altura (média)	61.146	61.404	61.328	61.774	59.789	59.693	58.312
Largura USP (1º pico)	0,74	0,70	0,73	0,73	0,74	0,75	0,74
Largura USP (2º pico)	0,86	0,80	0,84	0,85	0,86	0,87	0,85
Largura USP (média)	0,80	0,75	0,78	0,79	0,80	0,81	0,80
Assimetria - 10% (1º pico)	1,42	1,41	1,41	1,41	1,43	1,41	1,40
Assimetria - 10% (2º pico)	1,60	1,56	1,59	1,58	1,62	1,60	1,59
Assimetria - 10% (média)	1,51	1,48	1,50	1,50	1,52	1,50	1,50
CRF	0,0203	0,0078	0,0179	0,0309	0,0331	0,0353	0,0376

¹Tempo médio em que ocorreu o primeiro distúrbio na linha de base, considerando-se todos os ensaios.

Quadro 6.3 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase reversa: planejamento composto central – Ensaios 1 a 8 – Fase móvel = tampão HCO_2NH_4 50 mM:metanol; $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (**Ensaio 1**: % B = 42,9%, pH do tampão = 3,40, $T_c = 14^\circ\text{C}$; **ensaio 2**: % B = 51,1%, pH do tampão = 3,40, $T_c = 14^\circ\text{C}$; **ensaio 3**: % B = 42,9%, pH do tampão = 4,40, $T_c = 14^\circ\text{C}$; **ensaio 4**: % B = 51,1%, pH do tampão = 4,40, $T_c = 14^\circ\text{C}$; **ensaio 5**: % B = 42,9%, pH do tampão = 3,40, $T_c = 20^\circ\text{C}$; **ensaio 6**: % B = 51,1%, pH do tampão = 3,40, $T_c = 20^\circ\text{C}$; **ensaio 7**: % B = 42,9%, pH do tampão = 4,40, $T_c = 20^\circ\text{C}$; **ensaio 8**: % B = 51,1%, pH do tampão = 4,40, $T_c = 20^\circ\text{C}$).

Quadro 6.4 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase reversa: planejamento composto central – Ensaios 9 a 15.1 – Fase móvel = tampão HCO_2NH_4 50 mM:metanol; $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (**Ensaio 9**: % B = 40,1%, pH do tampão = 3,90, $T_c = 17^\circ \text{C}$; **ensaio 10**: % B = 53,9%, pH do tampão = 3,90, $T_c = 17^\circ \text{C}$; **ensaio 11**: % B = 47,0%, pH do tampão = 3,06, $T_c = 17^\circ \text{C}$; **ensaio 12**: % B = 47,0%, pH do tampão = 4,74, $T_c = 17^\circ \text{C}$; **ensaio 13**: % B = 47,0%, pH do tampão = 3,90, $T_c = 12^\circ \text{C}$; **ensaio 14**: % B = 47,0%, pH do tampão = 3,90, $T_c = 22^\circ \text{C}$; **ensaio 15.1**: % B = 47,0%, pH do tampão = 3,90, $T_c = 17^\circ \text{C}$).

6.2.3.2 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

Partindo-se dos dados obtidos com a realização dos ensaios previstos no planejamento composto central, foram construídos modelos matemáticos lineares e quadráticos, na tentativa de se descrever a relação existente entre as variáveis independentes estudadas e as respostas de interesse. As equações matemáticas obtidas seguem a forma geral descrita no subitem 5.2.2.5. Os intervalos de confiança calculados para os parâmetros dessas equações são apresentados na tabela 6.20 (o nível de significância adotado corresponde a 0,05).

Tabela 6.20 – Intervalos de confiança calculados para os parâmetros das equações que descrevem os modelos lineares e quadráticos, apresentados em função das respostas às quais esses modelos se aplicam.

Modelo		Resposta		
		<i>FRC</i>	<i>R_s</i>	<i>t_{R2}</i>
Linear	$\beta_0 =$	0,100 ± 0,005	2,004 ± 0,031	13,214 ± 0,182
	$\beta_1 =$	-0,164 ± 0,006	-0,313 ± 0,041	-4,168 ± 0,236
	$\beta_2 =$	0,020 ± 0,006	0,014 ± 0,041	-0,739 ± 0,236
	$\beta_3 =$	-0,061 ± 0,006	-0,135 ± 0,041	-1,021 ± 0,236
Quadrático	$\beta_0 =$	0,026 ± 0,008	2,010 ± 0,050	12,844 ± 0,290
	$\beta_1 =$	-0,164 ± 0,006	-0,313 ± 0,041	-4,168 ± 0,236
	$\beta_2 =$	0,020 ± 0,006	0,014 ± 0,041	-0,739 ± 0,236
	$\beta_3 =$	-0,061 ± 0,006	-0,135 ± 0,041	-1,021 ± 0,236
	$\beta_{12} =$	-0,032 ± 0,008	-0,009 ± 0,053	0,362 ± 0,308
	$\beta_{13} =$	0,065 ± 0,008	-0,039 ± 0,053	0,327 ± 0,308
	$\beta_{23} =$	-0,047 ± 0,008	-0,010 ± 0,053	-0,136 ± 0,308
	$\beta_{11} =$	0,102 ± 0,006	-0,009 ± 0,038	0,956 ± 0,218
	$\beta_{22} =$	-0,001 ± 0,006	0,003 ± 0,038	-0,385 ± 0,218
	$\beta_{33} =$	0,023 ± 0,006	-0,005 ± 0,038	0,052 ± 0,218

Os valores em negrito indicam parâmetros significativos em um nível de significância igual a 0,05.

Foram excluídos dos modelos originais os termos cujos parâmetros não se mostraram estatisticamente diferentes de zero. Posteriormente, os parâmetros restantes foram recalculados, de tal modo que os modelos finais obtidos são descritos conforme as equações a seguir:

- Resposta: função de resposta cromatográfica.

Modelo linear: $FRC = 0,100 - 0,164X_1 + 0,020X_2 - 0,061X_3$

Modelo quadrático: $FRC = 0,026 - 0,164X_1 + 0,020X_2 - 0,061X_3 -$

$0,032X_1X_2 + 0,065X_1X_3 - 0,047X_2X_3 + 0,102X_1^2 + 0,023X_3^2$

- Resposta: resolução entre os picos.

Modelo linear: $R_s = 2,004 - 0,313X_1 - 0,135X_3$

Modelo quadrático: excluídos os termos cujos parâmetros não são estatisticamente significantes, o modelo quadrático fica reduzido a um modelo linear.

- Resposta: tempo de retenção referente ao segundo pico.

Modelo linear: $t_{R2} = 13,214 - 4,168X_1 - 0,739X_2 - 1,021X_3$

Modelo quadrático: $t_{R2} = 12,875 - 4,168X_1 - 0,739X_2 - 1,021X_3 +$

$0,362X_1X_2 + 0,327X_1X_3 + 0,956X_1^2 - 0,385X_2^2$

6.2.3.3 AVALIAÇÃO DO GRAU DE AJUSTE DOS MODELOS

A seguir, são apresentados o gráfico de distribuição dos resíduos e a análise da variância (ANOVA) referentes a cada modelo.

- Resposta: função de resposta cromatográfica – modelo linear.

Figura 6.17 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo linear para $FRC = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.21 – Análise da variância do modelo linear para $FRC = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	0,424	3	0,141
Resíduos	0,262	19	0,014
Falta de ajuste	0,261	11	0,024
Erro puro	0,001	8	0,000
Total	0,686	22	
% de variação explicada: 61,80%			
% máxima de variação explicável: 99,89%			
$MQ_R/MQ_r = 10,25$		$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 242,17$	
$F_{3,19} = 3,13$		$F_{11,8} = 3,31$	
$(MQ_R/MQ_r)/F_{3,19} = 3,28$		$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{11,8} = 73,10$	

ν , graus de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

- Resposta: função de resposta cromatográfica – modelo quadrático.

Figura 6.18 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo quadrático para $FRC = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.22 – Análise da variância do modelo quadrático para $FRC = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	0,658	8	0,082
Resíduos	0,028	14	0,002
Falta de ajuste	0,027	6	0,004
Erro puro	0,001	8	0,000
Total	0,686	22	
% de variação explicada: 95,95%			
% máxima de variação explicável: 99,89%			
$MQ_R/MQ_r = 41,58$		$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 45,74$	
$F_{8,14} = 2,70$		$F_{6,8} = 3,58$	
$(MQ_R/MQ_r)/F_{8,14} = 15,41$		$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{6,8} = 12,77$	

ν , grau de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

- Resposta: resolução entre os picos – modelo linear.

Figura 6.19 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo linear para $R_s = f(X_1, X_3)$.

Tabela 6.23 – Análise da variância do modelo linear para $R_s = f(X_1, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	1,593	2	0,796
Resíduos	0,082	20	0,004
Falta de ajuste	0,047	12	0,004
Erro puro	0,034	8	0,004
Total	1,674	22	
% de variação explicada: 95,13%			
% máxima de variação explicável: 97,96%			
$MQ_R/MQ_r = 195,14$		$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 0,92$	
$F_{2,20} = 3,49$		$F_{12,8} = 3,28$	
$(MQ_R/MQ_r)/F_{2,20} = 55,87$		$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{12,8} = 0,28$	

ν , graus de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

- Resposta: tempo de retenção referente ao segundo pico – modelo linear.

Figura 6.20 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo linear para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.24 – Análise da variância do modelo linear para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	258,939	3	86,313
Resíduos	21,825	19	1,149
Falta de ajuste	20,685	11	1,880
Erro puro	1,140	8	0,143
Total	280,764	22	
% de variação explicada: 92,23%			
% máxima de variação explicável: 99,59%			
$MQ_R/MQ_r = 75,14$		$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 13,20$	
$F_{3,19} = 3,13$		$F_{11,8} = 3,31$	
$(MQ_R/MQ_r)/F_{3,19} = 24,03$		$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{11,8} = 3,98$	

ν , grau de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

- Resposta: tempo de retenção referente ao segundo pico – modelo quadrático.

Figura 6.21 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo quadrático para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.25 – Análise da variância do modelo linear para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	277,760	7	39,680
Resíduos	2,971	15	0,198
Falta de ajuste	1,831	7	0,262
Erro puro	1,140	8	0,143
Total	280,764	22	
% de variação explicada: 98,93%			
% máxima de variação explicável: 99,59%			
$MQ_R/MQ_r = 200,32$		$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 1,84$	
$F_{7,15} = 2,71$		$F_{7,8} = 3,50$	
$(MQ_R/MQ_r)/F_{7,15} = 74,01$		$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{7,8} = 0,52$	

ν , graus de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

As figuras 6.22 e 6.23 apresentam, respectivamente, o histograma e o gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos deixados pelo modelo linear que descreve a resolução entre os picos em função das variáveis *porcentagem de metanol na fase móvel (v/v)* e *temperatura da coluna*. As figuras 6.24 e 6.25 apresentam, respectivamente, o histograma e o gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático que descreve o tempo de retenção referente ao segundo pico em função das variáveis *porcentagem de metanol na fase móvel (v/v)*, *pH do tampão* e *temperatura da coluna*.

Figura 6.22 – Histograma dos resíduos brutos deixados pelo modelo linear para $R_s = f(X_1, X_3)$. Os resíduos são iguais ou menores que o limite da categoria.

Figura 6.23 – Gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos deixados pelo modelo linear para $R_s = f(X_1, X_3)$.

Figura 6.24 – Histograma dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$. Os resíduos são iguais ou menores que o limite da categoria.

Figura 6.25 – Gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$.

6.2.3.4 OBTENÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTA

- Resposta: resolução entre os picos.
Modelo empregado: linear.

Figura 6.26 – Resolução em função da temperatura da coluna e da porcentagem de metanol na fase móvel (v/v): plano descrito pela equação $R_s = 2,004 - 0,313.X_1 - 0,135.X_3$ (pH do tampão fixado em 3,90).

Figura 6.27 – Resolução em função da temperatura da coluna e da porcentagem de metanol na fase móvel (v/v): perfil de resposta descrito pela equação $R_s = 2,004 - 0,313.X_1 - 0,135.X_3$.

- Resposta: tempo de retenção referente ao segundo pico.
Modelo empregado: quadrático.

Figura 6.28 – Tempo de retenção referente ao segundo pico em função da temperatura da coluna e da porcentagem de metanol na fase móvel (v/v): superfície quadrática descrita pela equação $t_{R2} = 12,875 - 4,168X_1 - 0,739X_2 - 1,021X_3 + 0,362X_1X_2 + 0,327X_1X_3 + 0,956X_1^2 - 0,385X_2^2$ (pH do tampão fixado em 3,90).

Figura 6.29 – Tempo de retenção referente ao segundo pico em função do pH do tampão e da porcentagem de metanol na fase móvel (v/v): superfície quadrática descrita pela equação $t_{R2} = 12,875 - 4,168X_1 - 0,739X_2 - 1,021X_3 + 0,362X_1X_2 + 0,327X_1X_3 + 0,956X_1^2 - 0,385X_2^2$ (temperatura da coluna fixada em 17 °C).

Figura 6.30 – Tempo de retenção referente ao segundo pico em função do pH do tampão e da temperatura da coluna: superfície quadrática descrita pela equação $t_{R2} = 12,875 - 4,168X_1 - 0,739X_2 - 1,021X_3 + 0,362X_1X_2 + 0,327X_1X_3 + 0,956X_1^2 - 0,385X_2^2$ [porcentagem de metanol na fase móvel (v/v) fixada em 47%].

6.2.4 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A SEPARAÇÃO

Empregando-se o método proposto por Derringer e Suich, a otimização simultânea das respostas R_s e t_{R2} estabeleceu os seguintes níveis para as variáveis:

- Porcentagem de metanol na fase móvel (v/v): 44,6%;
- pH do tampão: 4,74;
- Temperatura da coluna: 12 °C.

De acordo com os modelos empregados, essas condições corresponderiam a uma resolução igual a 2,41 e a um tempo de retenção referente ao segundo pico igual a 14,98 minutos. As desejabilidades individuais alcançadas para essas respostas foram 0,4128 e 0,9927, respectivamente, correspondendo a uma desejabilidade global igual a 0,6401.

Incluindo a molaridade do tampão e a vazão da fase móvel, as condições cromatográficas estabelecidas pelo método então são:

- Fase móvel: tampão formato de amônio (50 mM, pH 4,74):metanol 55,4:44,6 (v/v);
- Vazão da fase móvel: 1,0 mL.min⁻¹;
- Temperatura da coluna: 12 °C.

6.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO FENOPROFENO POR CLAE EM FASE NORMAL

6.3.1 INVESTIGAÇÃO DA SELETIVIDADE DE DIFERENTES MODIFICADORES ORGÂNICOS

Em conjunto, os quadros 6.5 e 6.6 apresentam cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas diferentes condições cromatográficas representadas pelos ensaios 1 a 16.

A tabela 6.26, por sua vez, apresenta a avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 17 a 20 (os quais correspondem à investigação da seletividade dos diferentes alcoóis empregados na presente etapa). Cada resultado apresentado nessa tabela representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

Após a tabela 6.26, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas diferentes condições cromatográficas representadas pelos ensaios 17 a 20 (quadro 6.7).

Quadro 6.5 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase normal: investigação da seletividade de diferentes modificadores orgânicos – Ensaio 1 a 8 – $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 24^\circ \text{C}$ [Ensaio 1: fase móvel = hexano:ácido acético 100:0,5; **ensaio 2**: fase móvel = hexano:(diclorometano:ácido acético 100:1) 60:40; **ensaio 3**: fase móvel = hexano:(diclorometano:ácido acético 100:1) 80:20; **ensaio 4**: fase móvel = hexano:(acetato de etila:ácido acético 100:5) 90:10; **ensaio 5**: fase móvel = hexano:(acetato de etila:ácido acético 100:5) 95:5; **ensaio 6**: fase móvel = hexano:(acetato de etila:ácido acético 100:5) 98:2; **ensaio 7**: fase móvel = hexano:(dioxano:ácido acético 100:5) 90:10; **ensaio 8**: fase móvel = hexano:(dioxano:ácido acético 100:5) 95:5].

Quadro 6.6 – Separação dos enantiômeros do fenpropfeno por CLAE em fase normal: investigação da seletividade de diferentes modificadores orgânicos – Ensaio 9 a 16 – $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 24^\circ \text{C}$ [Ensaio 9: fase móvel = hexano:(dioxano:ácido acético 100:5) 98:2; **ensaio 10**: fase móvel = hexano:(2-propanol:ácido acético 100:5) 90:10; **ensaio 11**: fase móvel = hexano:(2-propanol:ácido acético 100:5) 95:5; **ensaio 12**: fase móvel = hexano:(2-propanol:ácido acético 100:5) 98:2; **ensaio 13**: fase móvel = hexano:(diclorometano:ácido acético 100:1) 60:40; **ensaio 14**: fase móvel = hexano:(diclorometano:ácido acético 100:1) 80:20; **ensaio 15**: fase móvel = hexano:(1,2-dicloroetano:ácido acético 100:0,5) 60:40; **ensaio 16**: fase móvel = hexano:(1,2-dicloroetano:ácido acético 100:0,5) 80:20].

Tabela 6.26 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 17 a 20, durante a investigação da seletividade de diferentes alcoóis.

Resposta	Ensaio			
	17	18	19	20
Tempo de retenção (não-retido) ¹	2,65	2,65	2,65	2,65
Tempo de retenção (1º pico)	9,14	8,14	7,48	8,28
Tempo de retenção (2º pico)	9,99	9,12	8,27	9,29
Fator de retenção (2º pico)	2,78	2,45	2,13	2,51
Fator de separação	1,13	1,18	1,16	1,18
Resolução	2,53	3,44	3,12	3,41
Pratos teóricos (1º pico)	16.943	15.103	14.393	14.490
Pratos teóricos (2º pico)	10.535	14.172	16.454	13.337
Pratos teóricos (média)	13.739	14.638	15.423	13.913
Área (1º pico)	372.339	379.455	099.796	091.190
Área (2º pico)	385.951	387.133	101.481	091.132
Área (média)	379.145	383.294	100.638	091.161
Área% (1º pico)	49,11%	49,50%	49,58%	50,02%
Área% (2º pico)	50,90%	50,50%	50,42%	49,99%
Altura (1º pico)	30.185	32.974	09.580	07.632
Altura (2º pico)	23.203	28.482	09.012	06.455
Altura (média)	26.694	30.728	09.296	07.043
Largura USP (1º pico)	0,28	0,26	0,25	0,28
Largura USP (2º pico)	0,39	0,31	0,26	0,32
Largura USP (média)	0,34	0,29	0,26	0,30
Assimetria - 10% (1º pico)	1,34	1,39	1,35	1,40
Assimetria - 10% (2º pico)	1,19	1,41	1,35	1,37
Assimetria - 10% (média)	1,27	1,40	1,35	1,38

¹Calculado de acordo com as seguintes fórmulas: $t_M = V_M/F$ e $V_M \approx 0,5.L.d_c^2$, onde t_M corresponde ao tempo de retenção de um composto não-retido, V_M corresponde ao volume intersticial da coluna e L e d_c correspondem ao comprimento e ao diâmetro interno da coluna, respectivamente.

Quadro 6.7 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase normal: investigação da seletividade de diferentes modificadores orgânicos – Ensaio 17 a 20 – $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 24^\circ \text{C}$ (**Ensaio 17**: fase móvel = hexano:etanol:ácido acético 99:1:0,5; **ensaio 18**: fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5; **ensaio 19**: fase móvel = hexano:1-butanol:ácido acético 99:1:0,5; **ensaio 20**: fase móvel = hexano:2-butanol:ácido acético 99:1:0,5).

6.3.2 OTIMIZAÇÃO DA VAZÃO DA FASE MÓVEL

A tabela 6.27 apresenta a avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 21 a 25. Cada resultado apresentado nessa tabela representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

A tabela 6.28, por sua vez, apresenta a avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da vazão da fase móvel. Análise semelhante é apresentada sob a forma de um gráfico de barras na figura 6.31.

Após a figura 6.31, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas diferentes condições cromatográficas representadas pelos ensaios 21 a 25 (quadro 6.8).

Tabela 6.27 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 21 a 25, durante a otimização da vazão da fase móvel.

Resposta	Ensaio				
	21	22	23	24	25
Tempo de retenção (não-retido) ¹	2,65	2,94	3,31	3,78	4,41
Tempo de retenção (1º pico)	8,14	9,51	10,81	12,37	14,47
Tempo de retenção (2º pico)	9,12	10,67	12,13	13,89	16,25
Fator de retenção (2º pico)	2,45	2,43	2,67	2,68	2,69
Fator de separação	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18
Resolução	3,44	3,55	3,60	3,64	3,65
Pratos teóricos (1º pico)	15.103	16.114	16.412	16.193	16.240
Pratos teóricos (2º pico)	14.172	14.794	15.125	15.547	15.634
Pratos teóricos (média)	14.638	15.454	15.768	15.870	15.937
Área (1º pico)	0.379.455	0.423.029	0.480.123	0.552.042	0.643.555
Área (2º pico)	0.387.133	0.422.506	0.480.130	0.553.884	0.643.345
Área (média)	0.383.294	0.422.767	0.480.126	0.552.963	0.643.450
Área% (1º pico)	49,50%	50,03%	50,00%	49,92%	50,01%
Área% (2º pico)	50,50%	49,97%	50,00%	50,09%	49,99%
Altura (1º pico)	32.974	32.009	32.274	32.371	32.480
Altura (2º pico)	28.482	27.310	27.741	28.282	28.313
Altura (média)	30.728	29.659	30.007	30.327	30.397
Largura USP (1º pico)	0,26	0,30	0,34	0,39	0,46
Largura USP (2º pico)	0,31	0,35	0,39	0,45	0,52
Largura USP (média)	0,29	0,33	0,37	0,42	0,49
Assimetria - 10% (1º pico)	1,39	1,37	1,36	1,37	1,36
Assimetria - 10% (2º pico)	1,41	1,37	1,37	1,37	1,37
Assimetria - 10% (média)	1,40	1,37	1,37	1,37	1,36

¹Calculado de acordo com as seguintes fórmulas: $t_M = V_M/F$ e $V_M \approx 0,5.L.d_c^2$, onde t_M corresponde ao tempo de retenção de um composto não-retido, V_M corresponde ao volume intersticial da coluna e L e d_c correspondem ao comprimento e ao diâmetro interno da coluna, respectivamente.

Tabela 6.28 – Avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da vazão da fase móvel.

Ensaio	Vazão da fase móvel ¹	↑ R_s (A1)	↑ t_{R2} (A2)	Razão A2/A1
21	1,0	-	-	-
22	0,9	3,09	16,91	5,47
23	0,8	1,52 (4,66)	13,71 (32,94)	8,99
24	0,7	1,06 (5,77)	14,55 (52,28)	13,74
25	0,6	0,39 (6,19)	16,96 (78,11)	42,99

↑ R_s , aumento da resolução (em %); ↑ t_{R2} , aumento do tempo de retenção referente ao segundo pico (em %). ¹Em mL.min⁻¹. Todos os aumentos foram calculados em relação ao ensaio imediatamente anterior; os valores entre parêntesis, contudo, expressam os aumentos quando calculados em relação ao ensaio 21.

Figura 6.31 – Avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da vazão da fase móvel. Os aumentos foram calculados em relação ao ensaio imediatamente anterior.

Quadro 6.8 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase normal: otimização da vazão da fase móvel – Ensaios 21 a 25 – Fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5; $T_c = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Ensaio 21**: $F = 1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **ensaio 22**: $F = 0,9\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **ensaio 23**: $F = 0,8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **ensaio 24**: $F = 0,7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **ensaio 25**: $F = 0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

6.3.3 OTIMIZAÇÃO DA TEMPERATURA DA COLUNA

A tabela 6.29 apresenta a avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 26 a 30. Cada resultado apresentado nessa tabela

representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

A tabela 6.30, por sua vez, apresenta a avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da temperatura da coluna. A mesma análise é apresentada sob a forma de um gráfico de barras na figura 6.32.

Após a figura 6.32, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas diferentes condições cromatográficas representadas pelos ensaios 26 a 30 (quadro 6.9).

Tabela 6.29 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 26 a 30, durante a otimização da temperatura da coluna.

Resposta	Ensaio				
	26	27	28	29	30
Tempo de retenção (não-retido) ¹	3,78	3,78	3,78	3,78	3,78
Tempo de retenção (1º pico)	12,02	12,22	12,33	12,42	12,52
Tempo de retenção (2º pico)	13,53	13,81	13,98	14,16	14,38
Fator de retenção (2º pico)	2,58	2,65	2,70	2,75	2,81
Fator de separação	1,18	1,19	1,19	1,20	1,21
Resolução	3,70	3,85	3,96	4,12	4,36
Pratos teóricos (1º pico)	16.348	16.544	16.452	16.317	16.290
Pratos teóricos (2º pico)	15.138	15.255	15.484	15.258	15.292
Pratos teóricos (média)	15.743	15.899	15.968	15.787	15.791
Área (1º pico)	0.591.028	0.595.033	0.599.220	0.600.407	0.602.538
Área (2º pico)	0.598.285	0.605.620	0.603.773	0.608.540	0.610.171
Área (média)	0.594.656	0.600.326	0.601.496	0.604.473	0.606.354
Área% (1º pico)	49,70%	49,56%	49,82%	49,67%	49,69%
Área% (2º pico)	50,31%	50,44%	50,19%	50,33%	50,32%
Altura (1º pico)	35.649	35.596	35.421	34.929	34.591
Altura (2º pico)	30.825	30.391	30.401	29.795	29.289
Altura (média)	33.237	32.993	32.911	32.362	31.940
Largura USP (1º pico)	0,38	0,38	0,39	0,39	0,39
Largura USP (2º pico)	0,44	0,45	0,45	0,46	0,47
Largura USP (média)	0,41	0,42	0,42	0,43	0,43
Assimetria - 10% (1º pico)	1,41	1,39	1,38	1,39	1,40
Assimetria - 10% (2º pico)	1,43	1,41	1,41	1,42	1,43
Assimetria - 10% (média)	1,42	1,40	1,39	1,40	1,41

¹Calculado de acordo com as seguintes fórmulas: $t_M = V_M/F$ e $V_M \approx 0,5.L.d_c^2$, onde t_M corresponde ao tempo de retenção de um composto não-retido, V_M corresponde ao volume intersticial da coluna e L e d_c correspondem ao comprimento e ao diâmetro interno da coluna, respectivamente.

Tabela 6.30 – Avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da temperatura da coluna.

Ensaio	Temperatura da Coluna ¹	↑ R_s (A1)	↑ t_{R2} (A2)	Razão A1/A2
26	24	-	-	-
27	21	4,11	2,07	1,99
28	18	7,07	3,38	2,09
29	15	11,60	4,69	2,47
30	12	18,01	6,34	2,84

↑ R_s , aumento da resolução (em %); ↑ t_{R2} , aumento do tempo de retenção referente ao segundo pico (em %). ¹Em °C. Todos os aumentos foram calculados em relação ao ensaio 26.

Figura 6.32 – Avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da temperatura da coluna. Todos os aumentos foram calculados em relação ao ensaio 26.

Quadro 6.9 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase normal: otimização da temperatura da coluna – Ensaio 26 a 30 – Fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5; $F = 0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (**Ensaio 26**: $T_c = 24^\circ\text{C}$; **ensaio 27**: $T_c = 21^\circ\text{C}$; **ensaio 28**: $T_c = 18^\circ\text{C}$; **ensaio 29**: $T_c = 15^\circ\text{C}$; **ensaio 30**: $T_c = 12^\circ\text{C}$).

6.3.4 OTIMIZAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁCIDO ACÉTICO EMPREGADA NA FASE MÓVEL

A tabela 6.31 apresenta a avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 31 a 35. Cada resultado apresentado nessa tabela

representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

A tabela 6.32, por sua vez, apresenta a avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da quantidade de ácido acético empregada na fase móvel. A mesma análise é apresentada sob a forma de um gráfico de barras na figura 6.33.

Após a figura 6.33, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas diferentes condições cromatográficas representadas pelos ensaios 31 a 35 (quadro 6.10).

Tabela 6.31 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 31 a 35, durante a otimização da quantidade de ácido acético empregada na fase móvel.

Resposta	Ensaio				
	31	32	33	34	35
Tempo de retenção (não-retido) ¹	3,78	3,78	3,78	3,78	3,78
Tempo de retenção (1º pico)	12,75	13,38	13,89	14,57	10,10
Tempo de retenção (2º pico)	14,81	15,60	16,46	17,49	12,41
Fator de retenção (2º pico)	2,92	3,13	3,36	3,63	2,28
Fator de separação	1,23	1,23	1,25	1,27	1,37
Resolução	4,75	4,84	5,29	5,77	5,90
Pratos teóricos (1º pico)	16.583	16.362	16.075	16.221	13.324
Pratos teóricos (2º pico)	15.636	15.675	15.303	15.886	13.063
Pratos teóricos (média)	16.109	16.018	15.689	16.054	13.193
Área (1º pico)	0.577.643	0.556.895	0.574.609	0.822.134	0.414.864
Área (2º pico)	0.580.316	0.558.311	0.574.195	0.803.933	0.400.690
Área (média)	0.578.980	0.557.603	0.574.402	0.813.034	0.407.777
Área% (1º pico)	49,89%	49,95%	50,02%	50,56%	50,87%
Área% (2º pico)	50,12%	50,05%	49,98%	49,44%	49,13%
Altura (1º pico)	32.898	30.082	29.687	40.515	26.026
Altura (2º pico)	27.408	25.229	24.371	32.769	20.606
Altura (média)	30.153	27.655	27.029	36.642	23.316
Largura USP (1º pico)	0,40	0,42	0,44	0,46	0,35
Largura USP (2º pico)	0,48	0,50	0,53	0,56	0,43
Largura USP (média)	0,44	0,46	0,49	0,51	0,39
Assimetria - 10% (1º pico)	1,45	1,43	1,44	1,43	1,53
Assimetria - 10% (2º pico)	1,46	1,43	1,47	1,49	1,52
Assimetria - 10% (média)	1,45	1,43	1,45	1,46	1,52

¹ Calculado de acordo com as seguintes fórmulas: $t_M = V_M/F$ e $V_M \approx 0,5.L.d_c^2$, onde t_M corresponde ao tempo de retenção de um composto não-retido, V_M corresponde ao volume intersticial da coluna e L e d_c correspondem ao comprimento e ao diâmetro interno da coluna, respectivamente.

Tabela 6.32 – Avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da quantidade de ácido acético empregada na fase móvel.

Ensaio	Proporção entre os componentes da fase móvel ¹	↑ R_s (A1)	↑ t_{R2} (A2)	Razão A1/A2
31	99:1:0,5	-	-	-
32	99:1:0,4	1,79	5,34	0,34
33	99:1:0,3	11,36	11,11	1,02
34	99:1:0,2	21,27	18,07	1,18
35	99:1:0,1	24,09	-16,21	-

↑ R_s , aumento da resolução (em %); ↑ t_{R2} , aumento do tempo de retenção referente ao segundo pico (em %). ¹Em v/v/v (os componentes da fase móvel são: hexano:2-propanol:ácido acético, nessa ordem). Todos os aumentos foram calculados em relação ao ensaio 31.

Figura 6.33 – Avaliação do efeito observado sobre a resolução e sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico, quando da diminuição da quantidade de ácido acético empregada na fase móvel. Todos os aumentos foram calculados em relação ao ensaio 31.

Quadro 6.10 – Separação dos enantiômeros do fenopropeno por CLAE em fase normal: otimização da quantidade de ácido acético empregada na fase móvel – Ensaios 31 a 36 – $F = 0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 12^\circ\text{C}$ (**Ensaio 31**: fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,5; **ensaio 32**: fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,4; **ensaio 33**: fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,3; **ensaio 34**: fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,2; **ensaio 35**: fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,1; **ensaio 36**: fase móvel = hexano:2-propanol 99:1).

6.3.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A SEPARAÇÃO

Por meio da análise dos dados gerados durante as diversas etapas de desenvolvimento e otimização do método, as seguintes condições cromatográficas foram estabelecidas:

- Fase móvel: hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,2 v/v/v;
- Vazão da fase móvel: 0,7 mL.min⁻¹;
- Temperatura da coluna: 12 °C.

A figura 6.34 apresenta uma ampliação do cromatograma correspondente ao ensaio 34 (já apresentado no quadro 6.10). As condições cromatográficas posteriormente estabelecidas para o método foram as mesmas empregadas nesse ensaio.

Figura 6.34 – Cromatograma representativo das separações alcançadas com o emprego das condições cromatográficas estabelecidas para o método.

6.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO CETOPROFENO POR CLAE EM FASE REVERSA

6.4.1 AVALIAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS

A tabela 6.33 apresenta a avaliação dos cromatogramas obtidos durante a tentativa de desenvolvimento do método. Cada resultado apresentado nessa tabela representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

Após as tabelas, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas condições cromatográficas correspondentes a cada ensaio (quadros 6.11 e 6.12).

Tabela 6.33 – Avaliação dos cromatogramas.

Resposta	Ensaio										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tempo de retenção (não-retido) ¹	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65
Tempo de retenção (1º pico)	5,00	14,17	14,03	16,41	8,64	19,45	7,33	9,42	10,41	11,73	13,61
Tempo de retenção (2º pico)	5,16	15,02	15,10	17,81	8,83	20,64	7,94	10,50	11,62	13,09	15,19
Fator de retenção (2º pico)	0,95	4,68	4,71	5,73	2,34	6,80	2,00	2,97	3,39	3,95	4,74
Fator de separação	1,07	1,07	1,09	1,10	1,03	1,07	1,13	1,16	1,16	1,15	1,14
Resolução	0,40	0,93	1,19	1,31	0,30	1,01	1,27	1,45	1,50	1,53	1,59
Pratos teóricos (1º pico)	2.919	4.655	4.642	4.354	2.456	5.088	4.345	3.076	3.253	3.394	3.629
Pratos teóricos (2º pico)	2.549	3.572	3.978	3.916	3.391	4.174	3.706	2.648	2.795	2.912	3.103
Pratos teóricos (média)	2.734	4.113	4.310	4.135	2.923	4.631	4.025	2.862	3.024	3.153	3.366
Área (1º pico)	13.187.900	3.226.104	3.379.255	3.510.340	2.708.518	3.432.820	3.342.529	3.422.130	3.790.759	4.285.796	4.911.655
Área (2º pico)	21.561.607	4.048.400	3.823.144	3.853.582	4.877.353	4.072.974	3.746.187	3.644.394	4.020.113	4.528.139	5.182.285
Área (média)	17.374.753	3.637.252	3.601.199	3.681.961	3.792.935	3.752.897	3.544.358	3.533.262	3.905.436	4.406.968	5.046.970
Área% (1º pico)	37,96%	44,35%	46,92%	47,67%	35,71%	45,74%	47,16%	48,43%	48,53%	48,63%	48,66%
Área% (2º pico)	62,05%	55,65%	53,08%	52,33%	64,29%	54,26%	52,85%	51,58%	51,47%	51,37%	51,34%
Altura (1º pico)	1.587.155	107.319	106.437	90.004	244.921	83.596	194.040	128.468	130.874	133.426	135.648
Altura (2º pico)	1.768.898	99.851	97.261	81.776	280.752	79.756	172.870	108.978	111.411	113.252	114.323
Altura (média)	1.678.027	103.585	101.849	85.890	262.837	81.676	183.455	118.723	121.143	123.339	124.986
Largura USP (1º pico)	0,37	0,83	0,83	1,00	0,70	1,09	0,45	0,68	0,73	0,81	0,90
Largura USP (2º pico)	0,41	1,01	0,96	1,14	0,61	1,28	0,52	0,82	0,88	0,97	1,09
Largura USP (média)	0,39	0,92	0,89	1,07	0,66	1,19	0,48	0,75	0,81	0,89	1,00
Assimetria - 10% (1º pico)	-	-	-	-	-	-	-	1,54	1,57	1,62	1,67
Assimetria - 10% (2º pico)	-	-	-	-	-	-	-	1,64	1,69	1,75	1,84
Assimetria - 10% (média)	-	-	-	-	-	-	-	1,59	1,63	1,69	1,76

¹Calculado de acordo com as seguintes fórmulas: $t_M = V_M/F$ e $V_M \approx 0,5.L.d_c^2$, onde t_M corresponde ao tempo de retenção de um composto não-retido, V_M corresponde ao volume intersticial da coluna e L e d_c correspondem ao comprimento e ao diâmetro interno da coluna, respectivamente; (-) não foi possível calcular devido à sobreposição dos picos.

Quadro 6.11 – Separação dos enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase reversa: Ensaios 1 a 8 (**ensaio 1**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 4,5:metanol 50:50, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_C = 24^\circ \text{C}$; **ensaio 2**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 4,5:metanol 70:30, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_C = 24^\circ \text{C}$; **ensaio 3**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 4,5:etanol 74,8:25,2, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_C = 24^\circ \text{C}$; **ensaio 4**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 4,5:2-propanol 77,3:22,7, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_C = 24^\circ \text{C}$; **ensaio 5**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 4,5:acetonitrila 77,2:22,8, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_C = 24^\circ \text{C}$; **ensaio 6**: FM = tampão HCO_2NH_4 25 mM pH 3,0:etanol 75:25, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_C = 24^\circ \text{C}$; **ensaio 7**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 5,5:etanol 75:25, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_C = 24^\circ \text{C}$; **ensaio 8**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 5,5:etanol 75:25, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $T_C = 12^\circ \text{C}$).

Quadro 6.12 – Separação dos enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase reversa: Ensaio 9 a 11 (**Ensaio 9**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 5,5:etanol 75:25, $F = 0,9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T_C = 12^\circ\text{C}$; **ensaio 10**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 5,5:etanol 75:25, $F = 0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T_C = 12^\circ\text{C}$; **ensaio 11**: FM = tampão $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 25 mM pH 5,5:etanol 75:25, $F = 0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T_C = 12^\circ\text{C}$).

6.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO CETOPROFENO POR CLAE EM FASE NORMAL

6.5.1 ENSAIOS PRELIMINARES

O quadro 6.13 apresenta os cromatogramas obtidos durante os ensaios preliminares.

Quadro 6.13 – Separação dos enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase normal: ensaios preliminares – $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 24^\circ \text{C}$ (**Ensaio 1**: fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 90:10:0,1; **ensaio 2**: fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,1; **ensaio 3**: fase móvel = diclorometano:2-propanol:ácido acético 90:10:0,1; **ensaio 4**: fase móvel = diclorometano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,1; **ensaio 5**: fase móvel = hexano:etanol:ácido acético 90:10:0,1; **ensaio 6**: fase móvel = hexano:etanol 90:10 + $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 0,02 M; **ensaio 7**: fase móvel = diclorometano:etanol 90:10 + $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 0,02 M).

6.5.2 PLANEJAMENTO DE MISTURA

6.5.2.1 AVALIAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS

As tabelas 6.34 e 6.35 apresentam a avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios previstos no planejamento de mistura. Cada resultado apresentado nessas tabelas representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

Após as tabelas, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas condições cromatográficas correspondentes a cada ensaio (quadros 6.14 e 6.15).

Tabela 6.34 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 1 a 5 previstos no planejamento de mistura.

Resposta	Ensaio									
	1	1*	2	2*	3	3*	4	4*	5	5*
Tempo de retenção (não-retido)**	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65
Tempo de retenção (1º pico)	33,08	34,59	10,89	11,09	14,88	15,96	6,14	6,32	7,40	7,56
Tempo de retenção (2º pico)	36,64	38,25	11,40	11,62	16,20	17,40	6,34	6,52	7,67	7,85
Fator de retenção (2º pico)	12,85	13,46	3,31	3,39	5,13	5,58	1,40	1,47	1,90	1,97
Fator de separação	1,12	1,11	1,06	1,06	1,11	1,11	1,05	1,06	1,06	1,06
Resolução	2,87	2,90	1,14	1,16	2,15	2,20	0,68	0,71	0,87	0,88
Pratos teóricos (1º pico)	12.812	13.088	10.298	10.242	10.363	10.551	8.313	8.539	9.765	9.859
Pratos teóricos (2º pico)	12.530	13.489	9.557	9.587	9.996	10.165	7.496	7.640	8.633	8.654
Pratos teóricos (média)	12.671	13.288	9.927	9.914	10.179	10.358	7.904	8.089	9.199	9.256
Área (1º pico)	3.616.510	3.474.795	3.712.458	3.736.680	3.529.685	3.538.471	3.283.924	3.218.016	3.452.555	3.316.552
Área (2º pico)	3.662.175	3.508.264	4.173.254	4.206.887	3.648.953	3.643.909	4.252.511	4.052.089	4.234.076	4.065.971
Área (média)	3.639.342	3.491.529	3.942.856	3.971.783	3.589.319	3.591.190	3.768.217	3.635.053	3.843.316	3.691.261
Área% (1º pico)	49,69%	49,76%	47,08%	47,04%	49,17%	49,27%	43,39%	44,07%	44,92%	44,93%
Área% (2º pico)	50,32%	50,24%	52,92%	52,96%	50,83%	50,74%	56,62%	55,93%	55,09%	55,08%
Altura (1º pico)	75.607	70.205	226.884	222.859	149.216	140.906	369.574	347.536	320.311	302.650
Altura (2º pico)	67.537	64.430	220.014	216.757	135.856	128.138	398.438	369.714	325.400	305.761
Altura (média)	71.572	67.317	223.449	219.808	142.536	134.522	384.006	358.625	322.855	304.205
Largura USP (1º pico)	1,17	1,21	0,43	0,44	0,59	0,62	0,27	0,27	0,30	0,31
Largura USP (2º pico)	1,31	1,32	0,47	0,48	0,65	0,69	0,29	0,30	0,33	0,34
Largura USP (média)	1,24	1,27	0,45	0,46	0,62	0,66	0,28	0,29	0,32	0,32
Assimetria - 10% (1º pico)	1,23	1,22	-	-	1,28	1,26	-	-	-	-
Assimetria - 10% (2º pico)	1,29	1,28	-	-	1,33	1,31	-	-	-	-
Assimetria - 10% (média)	1,26	1,25	-	-	1,31	1,28	-	-	-	-

*Duplicata do ensaio correspondente; **calculado de acordo com as seguintes fórmulas: $t_M = V_M/F$ e $V_M \approx 0,5 \cdot L \cdot d_c^2$, onde t_M corresponde ao tempo de retenção de um composto não-retido, V_M corresponde ao volume intersticial da coluna e L e d_c correspondem ao comprimento e ao diâmetro interno da coluna, respectivamente; (-) não foi possível calcular devido à sobreposição dos picos.

Tabela 6.35 – Avaliação dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios 6 a 9 previstos no planejamento de mistura.

Resposta	Ensaio							
	6	6*	7	7*	8	8*	9	9*
Tempo de retenção (não-retido)**	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65
Tempo de retenção (1º pico)	20,46	21,12	15,12	14,98	8,22	7,93	10,44	10,45
Tempo de retenção (2º pico)	22,45	23,17	16,27	16,13	8,69	8,37	11,11	11,13
Fator de retenção (2º pico)	7,49	7,76	5,15	5,10	2,29	2,16	3,20	3,21
Fator de separação	1,11	1,11	1,09	1,09	1,08	1,08	1,09	1,09
Resolução	2,46	2,48	1,85	1,86	1,35	1,31	1,55	1,57
Pratos teóricos (1º pico)	11.470	11.592	10.388	10.309	9.816	9.983	10.194	10.131
Pratos teóricos (2º pico)	11.109	11.228	10.105	10.026	9.225	9.323	9.819	9.741
Pratos teóricos (média)	11.289	11.410	10.247	10.167	9.520	9.653	10.006	9.936
Área (1º pico)	3.582.850	3.600.019	3.665.541	3.799.926	3.600.558	3.458.469	3.693.622	3.600.350
Área (2º pico)	3.647.297	3.671.297	3.824.022	3.951.540	3.964.169	3.878.236	3.930.760	3.839.268
Área (média)	3.615.073	3.635.658	3.744.782	3.875.733	3.782.363	3.668.352	3.812.191	3.719.809
Área% (1º pico)	49,56%	49,51%	48,94%	49,03%	47,60%	47,14%	48,45%	48,40%
Área% (2º pico)	50,45%	50,49%	51,06%	50,98%	52,41%	52,86%	51,56%	51,61%
Altura (1º pico)	115.163	113.040	154.868	162.023	278.477	281.384	226.655	219.573
Altura (2º pico)	103.415	101.316	143.517	149.349	265.314	269.176	212.528	205.902
Altura (média)	109.289	107.178	149.192	155.686	271.896	275.280	219.591	212.737
Largura USP (1º pico)	0,77	0,79	0,60	0,59	0,33	0,32	0,41	0,42
Largura USP (2º pico)	0,85	0,88	0,65	0,65	0,36	0,35	0,45	0,45
Largura USP (média)	0,81	0,83	0,62	0,62	0,35	0,33	0,43	0,43
Assimetria - 10% (1º pico)	1,26	1,25	1,21	1,21	-	-	1,25	1,26
Assimetria - 10% (2º pico)	1,32	1,32	1,21	1,22	-	-	1,20	1,22
Assimetria - 10% (média)	1,29	1,28	1,21	1,21	-	-	1,23	1,24

*Duplicata do ensaio correspondente; **calculado de acordo com as seguintes fórmulas: $t_M = V_M/F$ e $V_M \approx 0,5.L.d_c^2$, onde t_M corresponde ao tempo de retenção de um composto não-retido, V_M corresponde ao volume intersticial da coluna e L e d_c correspondem ao comprimento e ao diâmetro interno da coluna, respectivamente; (-) não foi possível calcular devido à sobreposição dos picos.

Quadro 6.14 – Separação dos enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase normal: planejamento de mistura – ensaios 1 a 8 – $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 12^\circ \text{C}$ (**ensaio 1:** fase móvel = hexano:etanol 90:10; **ensaio 2:** fase móvel = diclorometano:etanol 90:10; **ensaio 3:** fase móvel = hexano:etanol 80:20; **ensaio 4:** fase móvel = diclorometano:etanol 80:20; **ensaio 5:** fase móvel = diclorometano:etanol 85:15; **ensaio 6:** fase móvel = hexano:etanol 85:15; **ensaio 7:** fase móvel = hexano:diclorometano:etanol 45:45:10; **ensaio 8:** fase móvel = hexano:diclorometano:etanol 40:40:20). Todas as fases móveis continham ainda $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ em concentração equivalente a 1,0 g/L.

Quadro 6.15 – Separação dos enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase normal: planejamento de mistura – ensaio 9 – $F = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $T_c = 12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Ensaio 9**: fase móvel = hexano:diclorometano:etanol 42,5:42,5:15). A fase móvel continha ainda $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ em concentração equivalente a $1,0 \text{ g/L}$.

6.5.2.2 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

Partindo-se dos dados obtidos com a realização dos ensaios previstos no planejamento de mistura, foram construídos modelos matemáticos lineares, quadráticos e cúbicos especiais, na tentativa de se descrever a relação existente entre a proporção de cada componente na fase móvel e as respostas de interesse. As equações matemáticas obtidas seguem a forma geral descrita no subitem 5.2.5.5. Os intervalos de confiança calculados para os parâmetros dessas equações são apresentados na tabela 6.36 (o nível de significância adotado corresponde a 0,05).

Tabela 6.36 – Intervalos de confiança calculados para os parâmetros das equações que descrevem os modelos lineares, quadráticos e cúbicos especiais, apresentados em função das respostas às quais esses modelos se aplicam.

Modelo		Resposta		
		R_s	t_{R2}	$\ln(k_2)$
Linear	$\beta_1^* =$	2,795 ± 0,076	30,17 ± 4,18	2,491 ± 0,131
	$\beta_2^* =$	1,099 ± 0,076	11,76 ± 4,18	1,062 ± 0,131
	$\beta_3^* =$	-3,128 ± 0,773	-79,21 ± 42,58	-5,981 ± 1,339
Quadrático	$\beta_1^* =$	2,876 ± 0,027	36,25 ± 1,80	2,576 ± 0,045
	$\beta_2^* =$	1,145 ± 0,027	11,16 ± 1,80	1,201 ± 0,045
	$\beta_3^* =$	9,946 ± 6,162	571,49 ± 402,75	20,196 ± 10,123
	$\beta_{12}^* =$	-0,573 ± 0,095	-23,86 ± 6,22	-0,980 ± 0,156
	$\beta_{13}^* =$	-15,081 ± 6,926	-798,39 ± 452,70	-28,965 ± 11,378
	$\beta_{23}^* =$	-14,396 ± 6,926	-667,96 ± 452,70	-30,028 ± 11,378
Cúbico especial	$\beta_1^* =$	2,881 ± 0,028	36,90 ± 1,32	2,575 ± 0,050
	$\beta_2^* =$	1,150 ± 0,028	11,81 ± 1,32	1,200 ± 0,050
	$\beta_3^* =$	10,041 ± 5,951	583,06 ± 282,23	20,178 ± 10,672
	$\beta_{12}^* =$	-0,637 ± 0,133	-31,62 ± 6,32	-0,968 ± 0,239
	$\beta_{13}^* =$	-15,295 ± 6,695	-824,31 ± 317,51	-28,926 ± 12,006
	$\beta_{23}^* =$	-14,610 ± 6,695	-693,88 ± 317,51	-29,988 ± 12,006
	$\beta_{123}^* =$	1,365 ± 2,055	165,39 ± 97,46	-0,254 ± 3,685

Os valores em negrito indicam parâmetros significativos em um nível de significância igual a 0,05.

O que diferencia o modelo quadrático do modelo cúbico especial é a inclusão, neste último, de um termo que expressa a interação entre os 3 componentes da fase móvel. Em outras palavras, se for excluído o termo $\beta_{123}^* X_1 X_2 X_3$ do modelo cúbico especial, este fica reduzido a um modelo quadrático. Como pode ser observado na tabela acima, no modelo cúbico especial ajustado às respostas R_s e $\ln(k_2)$, o parâmetro β_{123}^* foi considerado não-significativo, o que equivale a dizer que não há razões para se acreditar que β_{123}^* seja diferente de zero. Assim sendo, se β_{123}^* é igual a zero, então o respectivo termo $\beta_{123}^* X_1 X_2 X_3$ é nulo. Conseqüentemente, a adoção de um modelo cúbico especial não se justifica e, portanto, para as respostas R_s e $\ln(k_2)$, esses modelos não serão mais abordados.

Assim sendo, os modelos obtidos para cada resposta foram os seguintes:

- Resposta: resolução entre os picos.

Modelo linear:

$$R_s = 2,795X_1 + 1,099X_2 - 3,128X_3$$

ou

$$R_s = 3,454c_1 + 1,569c_2 - 3,128c_3$$

Modelo quadrático:

$$R_s = 2,876X_1 + 1,145X_2 + 9,946X_3 - 0,573X_1X_2 - 15,081X_1X_3 - 14,396X_2X_3$$

ou

$$R_s = 3,952c_1 + 1,944c_2 + 9,946c_3 - 0,707c_1c_2 - 18,619c_1c_3 - 17,773c_2c_3$$

- Resposta: tempo de retenção referente ao segundo pico.

Modelo linear:

$$t_{R2} = 30,17X_1 + 11,76X_2 - 79,21X_3$$

ou

$$t_{R2} = 42,32c_1 + 21,87c_2 - 79,21c_3$$

Modelo quadrático:

$$t_{R2} = 36,25X_1 + 11,16X_2 + 571,49X_3 - 23,86X_1X_2 - 798,39X_1X_3 - 667,96X_2X_3$$

ou

$$t_{R2} = 75,35c_1 + 31,37c_2 + 571,49c_3 - 29,45c_1c_2 - 985,67c_1c_3 - 824,64c_2c_3$$

Modelo cúbico especial:

$$t_{R2} = 36,90X_1 + 11,81X_2 + 583,06X_3 - 31,62X_1X_2 - 824,31X_1X_3 - \\ 693,88X_2X_3 + 165,39X_1X_2X_3$$

ou

$$t_{R2} = 77,98c_1 + 34,00c_2 + 583,06c_3 - 61,72c_1c_2 - 1017,66c_1c_3 - \\ 856,64c_2c_3 + 226,88c_1c_2c_3$$

- Resposta: logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico.

Modelo linear:

$$\ln(k_2) = 2,491X_1 + 1,062X_2 - 5,981X_3$$

ou

$$\ln(k_2) = 3,433c_1 + 1,844c_2 - 5,981c_3$$

Modelo quadrático:

$$\ln(k_2) = 2,576X_1 + 1,201X_2 + 20,196X_3 - 0,980X_1X_2 - 28,965X_1X_3 - \\ 30,028X_2X_3$$

ou

$$\ln(k_2) = 4,194c_1 + 2,797c_2 + 20,196c_3 - 1,210c_1c_2 - 35,760c_1c_3 - \\ 37,072c_2c_3$$

6.5.2.3 AVALIAÇÃO DO GRAU DE AJUSTE DOS MODELOS

A seguir, são apresentados o gráfico de distribuição dos resíduos e a análise da variância (ANOVA) referentes a cada modelo.

- Resposta: resolução entre os picos – modelo linear.

Figura 6.35 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo linear para $R_s = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.37 – Análise da variância do modelo linear para $R_s = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	8,670	2	4,335
Resíduos	0,082	15	0,005
Falta de ajuste	0,078	6	0,013
Erro puro	0,003	9	0,000
Total	8,751	17	
% de variação explicada: 99,07%			
% máxima de variação explicável: 99,96%			
$MQ_R/MQ_r = 796,59$		$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 34,08$	
$F_{2,15} = 3,68$		$F_{6,9} = 3,37$	
$(MQ_R/MQ_r)/F_{2,15} = 216,33$		$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{6,9} = 10,10$	

ν , graus de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

- Resposta: resolução entre os picos – modelo quadrático.

Figura 6.36 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo quadrático para $R_s = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.38 – Análise da variância do modelo quadrático para $R_s = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	8,747	5	1,749
Resíduos	0,005	12	0,000
Falta de ajuste	0,001	3	0,000
Erro puro	0,003	9	0,000
Total	8,751	17	
% de variação explicada: 99,95%			
% máxima de variação explicável: 99,96%			
$MQ_R/MQ_r = 4551,24$		$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 1,02$	
$F_{5,12} = 3,11$		$F_{3,9} = 3,86$	
$(MQ_R/MQ_r)/F_{5,12} = 1465,36$		$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{3,9} = 0,26$	

ν , graus de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

Em relação à resposta *tempo de retenção referente ao segundo pico*, todos os modelos propostos apresentaram significativa falta de ajuste. Por essa razão, são apresentados o gráfico de distribuição dos resíduos e a análise completa da variância referentes apenas ao modelo com menor falta de ajuste (modelo cúbico especial). A tabela 6.39, entretanto, apresenta alguns dados extraídos da análise da variância dos 3 modelos, com o intuito de possibilitar a comparação entre eles.

Tabela 6.39 – Análise da variância do modelos linear, quadrático e cúbico especial para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$.

Modelo	MQ_{faj}/MQ_{ep}	ν_{faj}	ν_{ep}	$F_{faj,ep}$	R^2
Linear	153,11	6	9	3,37	0,8377
Quadrático	21,57	3	9	3,86	0,9871
Cúbico especial	11,75	2	9	4,26	0,9943

MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro; ν_{faj} , graus de liberdade associados ao cálculo de MQ_{faj} ; ν_{ep} , graus de liberdade associados ao cálculo de MQ_{ep} ; R^2 , coeficiente de determinação. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

- Resposta: tempo de retenção referente ao segundo pico – modelo cúbico especial.

Figura 6.37 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo cúbico especial para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.40 – Análise da variância do modelo cúbico especial para $t_{R2} = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	1519,8	6	253,3
Resíduos	8,7	11	0,8
Falta de ajuste	6,3	2	3,1
Erro puro	2,4	9	0,3
Total	1528,4	17	

% de variação explicada: 99,43%

% máxima de variação explicável: 99,84%

$MQ_R/MQ_r = 320,73$	$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 11,75$
$F_{6,11} = 3,09$	$F_{2,9} = 4,26$
$(MQ_R/MQ_r)/F_{6,11} = 103,64$	$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{2,9} = 2,76$

ν , graus de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

- Resposta: logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico – modelo linear.

Figura 6.38 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo linear para $\ln(k_2) = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.41 – Análise da variância do modelo linear para $\ln(k_2) = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	7,712	2	3,856
Resíduos	0,245	15	0,016
Falta de ajuste	0,236	6	0,039
Erro puro	0,009	9	0,001
Total	7,957	17	

% de variação explicada: 96,92%
 % máxima de variação explicável: 99,89%

$MQ_R/MQ_r = 235,89$	$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 39,09$
$F_{2,15} = 3,68$	$F_{6,9} = 3,37$
$(MQ_R/MQ_r)/F_{2,15} = 64,06$	$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{6,9} = 11,59$

ν , graus de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

- Resposta: logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico – modelo quadrático.

Figura 6.39 – Gráfico da distribuição dos resíduos deixados pelo modelo quadrático para $\ln(k_2) = f(X_1, X_2, X_3)$.

Tabela 6.42 – Análise da variância do modelo quadrático para $\ln(k_2) = f(X_1, X_2, X_3)$.

Fonte de variação	Soma quadrática	ν	Média quadrática
Regressão	7,945	5	1,589
Resíduos	0,012	12	0,001
Falta de ajuste	0,003	3	0,001
Erro puro	0,009	9	0,001
Total	7,957	17	
% de variação explicada: 99,84%			
% máxima de variação explicável: 99,89%			
$MQ_R/MQ_r = 1531,78$		$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 1,12$	
$F_{5,12} = 3,11$		$F_{3,9} = 3,86$	
$(MQ_R/MQ_r)/F_{5,12} = 493,19$		$(MQ_{faj}/MQ_{ep})/F_{3,9} = 0,29$	

ν , graus de liberdade; MQ_R , média quadrática devida à regressão; MQ_r , média quadrática residual; MQ_{faj} , média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} , média quadrática devida ao erro puro. As estatísticas F foram calculadas em um nível de significância igual a 0,05.

As figuras 6.40 e 6.41 apresentam, respectivamente, o histograma e o gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático que descreve a relação existente entre a proporção de cada componente na fase móvel e a resolução entre os picos. As figuras 6.42 e 6.43 apresentam, respectivamente, o histograma e o gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático que descreve a relação existente entre a proporção de cada componente na fase móvel e o logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico.

Figura 6.40 – Histograma dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático para $R_s = f(X_1, X_2, X_3)$. Os resíduos são iguais ou menores que o limite da categoria.

Figura 6.41 – Gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático para $R_s = f(X_1, X_2, X_3)$.

Figura 6.42 – Histograma dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático para $\ln(k_2) = f(X_1, X_2, X_3)$. Os resíduos são iguais ou menores que o limite da categoria.

Figura 6.43 – Gráfico de probabilidade normal dos resíduos brutos deixados pelo modelo quadrático para $\ln(k_2) = f(X_1, X_2, X_3)$.

6.5.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A SEPARAÇÃO

Empregando-se o método proposto por Derringer e Suich, a otimização simultânea das respostas R_s e $\ln(k_2)$ conduziu à seguinte proporção entre os componentes da fase móvel:

- Hexano:diclorometano:etanol 81,5:0:18,5 (v/v/v).

De acordo com os modelos empregados, essa proporção corresponderia a uma resolução igual a 2,25 e a um tempo de retenção referente ao segundo pico igual a 18,06 minutos [$\ln(k_2) = 1,76$; $k_2 = 5,83$]. As desejabilidades individuais alcançadas para essas respostas foram 0,2538 e 0,7678, respectivamente, correspondendo a uma desejabilidade global igual a 0,4414.

Incluindo a vazão da fase móvel e a temperatura da coluna, as condições cromatográficas estabelecidas pelo método então são:

- Fase móvel: hexano:etanol 81,5:18,5 (v/v) + acetato de amônio 1,0 g/L;
- Vazão da fase móvel: 1,0 mL.min⁻¹;
- Temperatura da coluna: 12 °C.

6.5.4 DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ENANTIÔMEROS

A tabela 6.43 apresenta as áreas de cada pico (em relação à soma das áreas de ambos os picos, e expressas em porcentagem), nos cromatogramas obtidos a partir da análise das soluções 1 e 3, conforme subitem 5.2.5.8.

Tabela 6.43 – Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros

Solução	$A_1\%$	$A_2\%$
1	49,48	50,52
3	35,49	64,52

$A_1\%$, área do primeiro pico; $A_2\%$, área do segundo pico (relativas à soma das áreas de ambos os picos e expressas em porcentagem). Solução 1 = cetoprofeno racêmico; Solução 3 = cetoprofeno racêmico + padrão de (S)-(+)-cetoprofeno.

6.6 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS SELECIONADOS ÀS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS

A tabela 6.44 apresenta a análise dos cromatogramas que foram obtidos aplicando-se os métodos selecionados às amostras de medicamentos, conforme descrito no subitem 5.2.6. A análise dos cromatogramas se limitou ao cálculo dos parâmetros cromatográficos t_{R2} e R_s , além da avaliação da pureza dos picos. Cada resultado apresentado na tabela 6.44 representa a média entre outros dois resultados obtidos através da injeção em duplicata da amostra.

Após as tabelas, são apresentados cromatogramas que exemplificam as separações atingidas nas condições cromatográficas correspondentes a cada ensaio (quadros 6.16).

Tabela 6.44 – Aplicação dos métodos selecionados às amostras de medicamentos.

Amostra	Fármaco	t_{R2}	R_s	PP_{T1}	PP_{T2}	PP_{3P1}	PP_{3P2}
1	CET	21,19	2,48	100,0	100,0	0,9800	0,9912
2	CET	21,48	2,50	100,0	100,0	0,9832	0,9997
3	CET	21,89	2,51	100,0	100,0	0,9970	0,9969
4	FCD	34,65	5,29	100,0	100,0	0,9972	0,9841

PP_{T1} , pureza de pico total (*total peak purity*) referente ao primeiro pico; PP_{T2} , pureza de pico total referente ao segundo pico; PP_{3P1} , pureza de pico em três pontos (*three point peak purity*) referente ao primeiro pico; PP_{3P2} , pureza de pico em três pontos referente ao segundo pico; CET, cetoprofeno; FCD, fenoprofeno cálcico diidratado.

Quadro 6.16 – Aplicação dos métodos selecionados às amostras de medicamentos – Amostras 1 a 3 (medicamentos contendo cetoprofeno): fase móvel = hexano:etanol 81,5:18,5 + $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 1,0 g/L; $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 12^\circ \text{C}$ – Amostra 4 (medicamento contendo fenoprofeno cálcico diidratado): fase móvel = hexano:2-propanol:ácido acético 99:1:0,2; $F = 0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $T_c = 12^\circ \text{C}$.

7. DISCUSSÃO

7.1 QUALIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS: ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO

Para que as amostras dos fármacos pudessem ser empregadas no desenvolvimento dos métodos de separação, era necessário, primeiramente, qualificá-las através da confirmação de suas identidades químicas. Para tanto, foram realizados ensaios de identificação selecionados com base nas exigências da farmacopéia britânica para a correta identificação do cetoprofeno e do fenoprofeno cálcico.

Assim sendo, todos os ensaios previstos por essa farmacopéia para a identificação dos fármacos supracitados foram realizados, à exceção da cromatografia em camada delgada (teste D), que consta entre os ensaios de identificação do cetoprofeno. Embora esse ensaio não tenha sido realizado, não houve prejuízos à identificação das amostras de cetoprofeno, pois, de acordo com a farmacopéia britânica, a cromatografia em camada delgada não é obrigatória para garantir a identidade do fármaco em questão. Na verdade, na monografia do cetoprofeno, tal técnica se apresenta como parte de uma alternativa à espectrometria de absorção no infravermelho, a qual pode ser empregada em substituição a esta última apenas em casos especiais.

Além disso, muito embora a escolha dos ensaios de identificação tenha se dado com base nas exigências da farmacopéia britânica, métodos equivalentes descritos pela farmacopéia americana foram empregados em alguns casos específicos. Esse foi o caso do ensaio para a determinação da faixa de fusão das

amostras de cetoprofeno, onde, em substituição ao método descrito pela farmacopéia britânica, empregou-se aquele descrito pela farmacopéia americana, embora com pequenas modificações. Também foi esse o caso do ensaio para a identificação de cálcio, exigido na monografia do fenoprofeno cálcico, onde novamente se adotou, por questões de praticidade, o método equivalente descrito pela farmacopéia americana.

Em relação à amostra de fenoprofeno cálcico, além dos demais ensaios exigidos para sua identificação, foi realizada também a determinação do seu teor de água, com o propósito de confirmar que o fármaco se apresentava sob a forma diidratada. Para essa finalidade, foram empregados dois métodos distintos: o método de Karl Fisher (que é o método farmacopéico) e a análise termogravimétrica.

Os resultados dos ensaios de identificação adotados confirmaram a identidade das amostras de cada fármaco.

A espectrometria de absorção no infravermelho evidenciou boa concordância entre os valores experimentais obtidos e aqueles descritos na literatura para os números de onda referentes às bandas principais, que são características dos espectros de cada fármaco (tabela 6.1). Não apenas as posições, mas também as intensidades relativas das bandas de transmitância dos espectros obtidos experimentalmente foram comparadas àquelas observadas nos espectros de referência, sendo possível observar um elevado grau de correspondência entre os respectivos espectros (figuras 2.9, 2.11, 6.1, 6.2 e 6.3).

No tocante aos ensaios de identificação por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, segundo a farmacopéia britânica, uma solução de cetoprofeno, preparada conforme descrito no subitem 5.2.1.2, deve apresentar um máximo de absorção em 255 nm (± 2 nm), quando examinada entre 230 e 350 nm. Além disso, a

absorvância específica no comprimento de onda de máxima absorção deve estar compreendida entre 615 e 680. De acordo com a tabela 6.2, é possível verificar que as amostras de cetoprofeno atenderam a ambas as especificações.

Uma solução de fenoprofeno cálcico, por sua vez, quando preparada conforme descrito no subitem 5.2.1.2 e analisada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta entre 230 e 350 nm, deve apresentar (ainda segundo a farmacopéia britânica) dois máximos de absorção: um em 272 e o outro em 278 nm, além de um ombro em 266 nm. Além disso, os valores das absorvâncias devem estar próximos a 0,70 e a 0,65, nos máximos em 272 e em 278 nm, respectivamente. De fato, a análise do espectro de absorção no ultravioleta referente à amostra de fenoprofeno cálcico diidratado revela claramente a presença de dois máximos de absorção, bem como um ombro anterior a esses máximos (figura 6.6). Tanto os máximos de absorção, como o ombro, ocorreram nos comprimentos de onda mencionados pela farmacopéia britânica. Adicionalmente, houve boa concordância entre os valores de absorvância experimentais e aqueles descritos por essa mesma farmacopéia (tabela 6.3). Portanto, a amostra de fenoprofeno cálcico diidratado também atendeu às especificações adotadas para o ensaio de identificação por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Essa mesma amostra apresentou, ainda, o comportamento característico dos sais de cálcio quando submetida ao teste para a identificação desse metal. Além disso, a presença de cálcio na amostra foi corroborada também pela análise termogravimétrica. Por meio dessa técnica se pôde observar que a decomposição térmica da amostra, em presença de oxigênio, conduziu a resíduos compatíveis com a formação de óxido de cálcio, uma vez que a massa desses resíduos se aproxima daquela prevista por meio de cálculo estequiométrico (tabela 6.4, figuras 6.7 e 6.8).

Ao mesmo tempo, as determinações do teor de água da amostra de fenoprofeno cálcico diidratado forneceram resultados que também estão de acordo com as especificações da farmacopéia britânica, segundo a qual esse fármaco deve conter entre 5,0 e 8,0% de água. Além disso, pôde-se observar boa concordância entre os resultados obtidos pelo método oficial e aqueles obtidos por termogravimetria (tabela 6.6, figuras 6.9 e 6.10).

Por fim, e de volta às amostras de cetoprofeno, o ensaio para a determinação da faixa de fusão dessas amostras também atestou a identidade das mesmas, visto que essas se fundiram dentro da faixa de fusão especificada pela farmacopéia americana (compreendida entre 92 e 97 °C, inclusive).

Com as amostras dos fármacos devidamente identificadas, pôde-se então dar início ao desenvolvimento dos métodos de separação.

7.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO FENOPROFENO POR CLAE EM FASE REVERSA

A estratégia para o desenvolvimento de um método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno teve início com a realização de alguns ensaios preliminares, conforme descrito no subitem 5.2.2.4. Conforme já foi dito, esses ensaios tiveram por objetivo definir o campo experimental que seria posteriormente investigado por meio de um planejamento experimental fatorial fracionário. Mais especificamente, esses experimentos foram conduzidos para possibilitar a escolha do modificador orgânico que seria utilizado como *Solvente B*, assim como para determinar em que proporções este seria empregado nas diversas fases móveis que

viriam a ser investigadas. Adicionalmente, alguns desses experimentos foram realizados com o intuito de se definir os níveis em que o fator *vazão da fase móvel* seria investigado no planejamento fatorial fracionário. Para tanto, era necessário verificar se a coluna iria suportar, diante das fases móveis empregadas, a pressão gerada por uma vazão correspondente a $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ou se, por outro lado, uma vazão de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ não resultaria em tempos de retenção inaceitáveis (muito longos).

Entre os modificadores orgânicos mais comumente empregados em CLAE em fase reversa estão a acetonitrila, o metanol e o tetraidrofurano. Desses, apenas o tetraidrofurano não teve sua seletividade investigada durante os ensaios preliminares, devido à incompatibilidade que apresenta com o material polimérico de alguns componentes do cromatógrafo utilizado. A acetonitrila, por sua vez, apresentou uma seletividade muito pobre ou mesmo nenhuma seletividade dentro das condições experimentais empregadas (quadro 6.1 – ensaios 6 e 7). Por outro lado, o metanol apresentou uma seletividade promissora e, por essa razão, foi o solvente escolhido para compor a fase móvel do método em desenvolvimento (quadro 6.1 – ensaios 1 a 5). Para manter o tempo de retenção dos enantiômeros dentro de limites aceitáveis, observou-se também que as porcentagens de metanol empregadas nos próximos experimentos deveriam ser preferencialmente superiores a 40% (vide quadro 6.1 – ensaio 3).

Com relação à vazão da fase móvel, observou-se que, a $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a pressão gerada no sistema era consideravelmente elevada. No entanto, como essa pressão estava ainda dentro dos limites suportados pela coluna, estabeleceu-se $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ como o nível superior em que o fator *vazão da fase móvel* seria investigado no planejamento fatorial fracionário. Como nível inferior, foi estabelecida a vazão de

1,0 mL.min⁻¹, uma vez que uma vazão de 0.5 mL.min⁻¹ resultou em um aumento desnecessário do tempo de corrida, já que este não se traduziu em um aumento expressivo da resolução (quadro 6.1 – ensaios 2 e 4).

Para todos os outros fatores, entretanto, o campo experimental investigado durante o planejamento fatorial fracionário pôde ser definido *a priori*. Esse foi o caso, por exemplo, para o fator *temperatura da coluna*. É sabido que, em geral, quanto menor a temperatura, maior a seletividade exibida pelas fases estacionárias quirais⁹⁸. Assim sendo, não havia razão para se definir uma temperatura relativamente alta como nível superior (acima da temperatura ambiente, por exemplo). O nível inferior, por sua vez, foi definido com base nas limitações impostas pelo forno empregado para controlar a temperatura da coluna, o qual é incapaz de manter temperaturas inferiores a 15 °C abaixo da temperatura do ambiente onde se encontra o cromatógrafo ($T_F \geq T_A - 15\text{ °C}$)*.

No tocante aos níveis estabelecidos para o fator *pH do tampão*, esses foram definidos com base no pKa do fenoprofeno, o qual é 4,5. Sendo o fenoprofeno um fármaco ácido e ionizável, era importante investigar a seletividade da coluna Whelk-O 1 frente às formas dissociada e não-dissociada do fármaco, bem como estabelecer uma relação entre o estado de dissociação do fármaco e a sua retenção pela coluna. Essa foi a razão pela qual os níveis para o fator *pH do tampão* foram estabelecidos em ± 1 unidade a partir do pKa do fármaco; porque, nesses valores de pH, o fenoprofeno é encontrado predominantemente ionizado e não-ionizado (acima de 90% em cada caso). Além disso, esses níveis estão, é claro, dentro dos limites de pH suportados pela coluna Whelk-O 1, a qual pode ser utilizada numa faixa de pH que se estende de 2,5 a 7,5.

* T_F , temperatura do forno; T_A , temperatura ambiente.

Os níveis adotados para o fator molaridade do tampão, por sua vez, foram arbitrariamente fixados em 20 e 40 mM, porque esses níveis cobrem razoavelmente a faixa de concentração recomendada para as soluções tampão empregadas em CLAE (que é de 10 a 50 mM).

Os dados obtidos através dos experimentos realizados de acordo com o planejamento fatorial fracionário (tabelas 6.7 e 6.8) permitiram o cálculo das estimativas dos efeitos de todos os 5 fatores sobre cada uma das 6 respostas escolhidas (tabelas 6.9 a 6.14). Os valores das estimativas dos efeitos principais, com seus respectivos intervalos de confiança, foram apresentados nas figuras 6.11 a 6.16. Contudo, em se tratando de um planejamento fatorial fracionário, deve ser lembrado que os efeitos principais são confundidos com efeitos de ordem mais alta (interações).

Planejamentos fatoriais completos não são normalmente empregados para realizar a triagem de fatores devido ao grande número de experimentos envolvidos. Em um planejamento fatorial completo, o número de experimentos ($N = l^n$) corresponde a todas as possíveis combinações entre os fatores selecionados (n) e seus níveis (l). Isso quer dizer que, para 5 fatores investigados em dois níveis, um total de 32 experimentos seria necessário. Por outro lado, em planejamentos fatoriais fracionários, o número de experimentos é reduzido, uma vez que as interações são consideradas insignificantes. Infelizmente, isso nem sempre corresponde à realidade, especialmente em CLAE, onde não é incomum que duas ou mais variáveis interajam entre si. Mesmo assim, a opção por um planejamento fatorial fracionário pode se revelar uma boa decisão, pois, com relativa frequência, um ou mais efeitos se apresentam estatisticamente insignificantes e, assim, alguns fatores podem ser excluídos de estudos posteriores.

Esse foi o caso, por exemplo, do fator *molaridade do tampão*, se forem consideradas apenas as respostas *fator de separação entre os picos*, *resolução entre os picos* e *número médio de pratos teóricos* (figuras 6.13 a 6.15). Além disso, se as interações entre os fatores forem consideradas não-significativas, então seria possível afirmar que quanto maior a molaridade do tampão, menores são o tempo e o fator de retenção referentes ao segundo pico (figuras 6.11 e 6.12). Com base nessas conclusões, o fator *molaridade do tampão* foi excluído do conjunto de fatores selecionados para o planejamento composto central e seu nível foi fixado em 50 mM para todos os experimentos posteriores. Essa decisão foi tomada porque, fixando a molaridade do tampão em seu nível mais alto (dentro da faixa de concentrações recomendadas), esperava-se obter tempos de retenção menores sem que isso acarretasse prejuízos para a resolução entre os picos.

Contudo, o efeito do fator *molaridade do tampão* sobre a função de resposta cromatográfica foi considerado significativo, assim como o efeito dos demais fatores sobre essa mesma resposta (figura 6.16). Porém, como a molaridade do tampão não afeta a resolução entre os picos, e como seu efeito sobre o fator de retenção do segundo enantiômero é relativamente pouco significativo, então é possível que essa conclusão esteja equivocada. Provavelmente, o efeito atribuído à molaridade do tampão sobre a função de resposta cromatográfica é causado, na verdade, por uma das interações que se confundem com esse efeito principal. De qualquer maneira, os resultados apresentados na figura 6.16 não contribuíram para a exclusão de nenhum dos fatores.

A temperatura da coluna, por sua vez, exerce um efeito significativo sobre todas as respostas, à exceção do *número médio de pratos teóricos*. Uma elevação na temperatura da coluna conduz a uma diminuição da resolução entre os picos

(figura 6.14) assim como em todas as respostas relacionadas à retenção dos analitos (figuras 6.11 a 6.13). Essa diminuição da resolução pode ser atribuída a uma diminuição correspondente no fator de separação entre os picos (ou seletividade). Embora já se soubesse antes de qualquer experimentação que um aumento da temperatura da coluna geralmente contribui para a diminuição da enantiosseletividade exibida pela coluna Whelk-O 1, era importante saber o quanto este efeito seria significativo quando comparado aos possíveis efeitos de outros fatores sobre a enantiosseletividade. Entretanto, somente os fatores *temperatura da coluna* e *pH do tampão* exercem efeitos significativos sobre o fator de separação entre os picos. Além disso, esses efeitos são contrários um ao outro.

Como pode ser visto na figura 6.13, um aumento no pH do tampão conduz a um aumento no fator de separação. Todavia, esse aumento no fator de separação não se traduz, como esperado, em um aumento na resolução entre os picos. Na verdade, a resolução diminui com o aumento do pH do tampão (figura 6.14). Esse aparente paradoxo poderia ser explicado se o aumento do fator de separação viesse acompanhado por uma diminuição da eficiência da coluna, atribuída ao alargamento relativo dos picos. O alargamento dos picos a um valor de pH mais elevado pode ocorrer porque amostras iônicas interagem com os silanóis presentes nas partículas de sílica da coluna, resultando em picos caudados. Todas as colunas constituídas por partículas de sílica contêm silanóis acessíveis. Os efeitos desses silanóis são mais evidentes quando o pH da fase móvel é superior a 3,5, porque nessa condição há uma maior concentração de silanóis ionizados. No entanto, as interações entre os analitos e os silanóis podem ser minimizadas empregando uma fase móvel de baixo pH ($2,0 < \text{pH} < 3,5$), uma maior concentração do tampão, ou escolhendo tampões cujos cátions são fortemente atraídos pelos silanóis, como os cátions NH_4^+ ²¹⁴.

Como, na verdade, os resultados demonstraram que o pH do tampão não tem efeito significativo sobre o número médio de pratos teóricos – a medida da eficiência da coluna – (figura 6.15), então a diminuição da resolução só pode ser atribuída a uma diminuição do fator de retenção dos enantiômeros relativamente superior ao aumento do fator de separação (vide equação 7.1 abaixo). De fato, os resultados demonstram que, pelo menos dentro do campo experimental investigado, variar o pH do tampão é a maneira mais efetiva de afetar o fator de retenção dos enantiômeros (figura 6.12).

A segunda maneira mais efetiva para promover mudanças no fator de retenção dos enantiômeros é variar a porcentagem de metanol na fase móvel. Realmente, a porcentagem de metanol na fase móvel possui um efeito significativo sobre todas as respostas estudadas, à exceção do *fator de separação entre os picos* e do *número médio de pratos teóricos*. Quanto maior a porcentagem de metanol na fase móvel, menor a resolução entre os picos. O mesmo pode ser dito em relação ao tempo e ao fator de retenção referentes ao segundo pico.

A resolução entre dois picos pode ser expressa em termos de três parâmetros cromatográficos (k , α e N), como definido pela bem conhecida equação 7.1:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times (\alpha - 1) \times \frac{k}{k + 1} \quad (\text{Eq. 7.1})$$

onde N é o número de pratos da coluna, α é o fator de separação e k é o fator de retenção médio entre dois picos adjacentes.

Pela análise da equação acima se pode concluir que um aumento na porcentagem de metanol na fase móvel diminui a resolução por meio da redução no

fator de retenção médio, uma vez que o número médio de pratos e o fator de separação não são significativamente afetados por esse aumento (figuras 6.12, 6.13 e 6.15).

Finalmente, o fator *vazão da fase móvel*, além do efeito óbvio que exerce sobre o tempo (e sobre o fator) de retenção dos analitos, também afeta a resolução entre os picos e o número médio de pratos teóricos. Na verdade, esse foi o único fator a afetar o número médio de pratos teóricos (figura 6.15). Verifica-se que um aumento na vazão da fase móvel reduz a eficiência da coluna, pois, de um modo geral, há um alargamento dos picos na medida em que a vazão aumenta, conforme explicado pela equação de van Deemter²¹⁵. Por outro lado, a mudança na vazão da fase móvel não afeta significativamente o fator de separação entre os picos (figura 6.13), uma vez que o tempo de retenção de cada enantiômero é afetado igualmente. Além disso, por diminuir ao mesmo tempo o número médio de pratos teóricos e o fator de retenção médio sem, contudo, afetar o fator de separação, um aumento na vazão da fase móvel pode levar a uma diminuição significativa da resolução entre os picos (figura 6.14), conforme explicado pela equação 7.1. Levando tudo isso em consideração, uma maior vazão da fase móvel parece não apresentar vantagens sobre a vazão usual de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, uma vez que os tempos de retenção podem ser diminuídos por um aumento no pH do tampão sem comprometer a resolução entre os picos tanto quanto uma maior vazão da fase móvel o faria. Além disso, a vida útil da coluna é aumentada se ela não for submetida a pressões mais elevadas. Assim sendo, o fator *vazão da fase móvel* foi excluído do conjunto de fatores selecionados para planejamento composto central e seu nível foi fixado em $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para todos os experimentos posteriores.

Como consequência, os três fatores restantes selecionados para o planejamento composto central foram: *porcentagem de metanol na fase móvel (v/v)*, *pH do tampão* e *temperatura da coluna*. A princípio, para esse planejamento, apenas uma variável seria utilizada como resposta: a função de resposta cromatográfica proposta por Bylund *et al.*

Em cromatografia, a avaliação da qualidade de uma separação é muito freqüentemente baseada em vários critérios. De fato, o resultado de um processo de otimização de um método cromatográfico depende muito do critério de otimização selecionado. Várias funções de resposta cromatográfica já foram sugeridas para auxiliar o analista no processo de tomada de decisão. Essas funções de resposta cromatográfica refletem normalmente um compromisso entre o tempo de corrida cromatográfica e a qualidade da separação, mas, infelizmente, ainda não foi desenvolvida nenhuma função de resposta geral que fosse capaz de descrever adequadamente todas as separações. Uma boa revisão de algumas das funções de resposta cromatográfica já propostas pode ser encontrada no artigo de Siouffi e Phan-Tan-Luu²¹⁰.

Neste trabalho, tentou-se usar uma função de resposta cromatográfica em particular, proposta por Bylund *et al.*²⁰⁹, a qual foi especialmente desenvolvida para a separação de enantiômeros. Infelizmente, não foi possível modelar satisfatoriamente essa função de resposta cromatográfica ajustando os modelos propostos (equações 5.4 e 5.5) aos dados apresentados nas tabelas 6.17 a 6.19. Por essa razão, decidiu-se modelar diretamente as respostas *resolução entre os picos* e *tempo de retenção referente ao segundo pico* e, posteriormente, empregar a metodologia de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich²¹². Dessa forma, seria possível encontrar

o melhor compromisso entre estas duas últimas respostas sem que uma função de resposta cromatográfica fosse necessária.

As estimativas dos parâmetros dos modelos ajustados a cada uma das três respostas mencionadas acima são apresentadas na tabela 6.20. Pela análise dos dados dessa tabela se pode observar que, excluindo-se do modelo quadrático ajustado à resposta *resolução entre os picos* os termos relacionados a parâmetros não-significativos, obtém-se então um modelo linear. Além disso, e ainda considerando a mesma resposta, é interessante notar que o parâmetro correspondente ao efeito principal do fator *pH do tampão* foi considerado não-significativo, diferentemente do que foi observado durante o planejamento fatorial fracionário. Com isso, pode-se concluir que, se o pH varia dentro de uma faixa mais estreita, seu efeito sobre a resolução é desprezível. Entretanto, uma pequena variação no pH do tampão continua a afetar significativamente o tempo de retenção dos enantiômeros.

De fato, todos os termos considerados não-significativos ($\alpha = 0,05$) foram excluídos de seus respectivos modelos. A qualidade do ajuste de cada novo modelo (sem os termos não-significativos) foi avaliada pela análise de suas variâncias. Os resultados são apresentados nas tabelas 6.21 a 6.25.

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 6.21 e 6.22, ambos os modelos propostos para a função de resposta cromatográfica apresentaram significativa falta de ajuste, muito embora a adição de termos quadráticos ao modelo linear tenha resultado em um modelo bastante superior. Por essa razão, o uso da função de resposta cromatográfica foi abandonado em favor da otimização direta das outras duas respostas. O modelo linear para a resposta *tempo de retenção referente ao segundo pico* também foi beneficiado pela adição de alguns termos

quadráticos, pois, enquanto esse modelo apresenta significativa falta de ajuste e explica apenas 92,23% da variação observada, o modelo quadrático é bem ajustado e explica 98,23% da mesma variação (tabelas 6.24 e 6.25). A resposta *resolução entre os picos*, por sua vez, é bem descrita por um modelo linear, o qual é capaz de explicar 95,13% da variação observada e não apresenta falta de ajuste significativa (tabela 6.23).

Para as respostas *função de resposta cromatográfica e tempo de retenção referente ao segundo pico*, a superioridade dos modelos quadráticos pode ser claramente observada comparando-se os resíduos deixados por ambos os modelos (linear e quadrático) nos respectivos gráficos de distribuição dos resíduos (gráficos 6.17, 6.18, 6.20 e 6.21).

Com relação aos modelos propostos para as respostas *resolução entre os picos e tempo de retenção referente ao segundo pico*, nenhuma evidência foi encontrada que possa sugerir que os resíduos deixados por esses modelos não sigam uma distribuição normal. Isso pode ser confirmado observando-se as figuras 6.22 a 6.25, mais particularmente os gráficos de probabilidade normal dos resíduos. Esse fato é importante, pois a normalidade evidenciada na distribuição dos resíduos torna legítima a análise da variância desses modelos.

A superfície e o perfil de resposta gerados pelo modelo linear proposto para a resposta *resolução entre os picos* são apresentados nas figuras 6.26 e 6.27. As figuras 6.28 a 6.30, por sua vez, apresentam as superfícies de resposta descritas pelo modelo quadrático proposto para a resposta *tempo de retenção referente ao segundo pico*. Analisando essas figuras se pode perceber que a resolução pode ser melhorada diminuindo-se a porcentagem de metanol na fase móvel ou diminuindo-se a temperatura. Todavia, é definitivamente mais vantajoso diminuir a temperatura,

uma vez que o aumento correspondente observado no tempo de retenção dos enantiômeros seria menor (considerando, claro, variações equivalentes nos níveis de ambos os fatores capazes de promover o mesmo aumento na resolução entre os picos). Além disso, é evidente que, como o pH do tampão não afeta a resolução (dentro do novo domínio experimental), seria mais vantajoso fixá-lo em seu nível mais elevado (pH 4.74), de modo a obtermos tempos de retenção menores. De fato, essas conclusões estão de acordo com o que foi sugerido pela metodologia proposta por Derringer e Suich, quando da otimização simultânea das respostas *resolução entre os picos e tempo de retenção referente ao segundo pico*.

Os valores alcançados para a desejabilidade global e, em especial, para a desejabilidade individual referente à resolução entre os picos ficaram aquém das expectativas. Não obstante, uma boa separação entre os enantiômeros foi alcançada. Essa separação, porém, não foi total; pelo menos, não dentro dos limites impostos para o tempo de retenção dos enantiômeros. Por outro lado, os ensaios demonstraram que é possível alcançar uma separação em linha de base à custa de corridas cromatográficas mais longas.

7.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO FENOPROFENO POR CLAE EM FASE NORMAL

A estratégia adotada para o desenvolvimento de um método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno por CLAE em fase normal diferiu completamente daquela adotada em fase reversa. Em fase reversa, devido ao grande número de variáveis inicialmente consideradas, preferiu-se adotar uma

abordagem multivariada, enquanto que, em fase normal, a abordagem foi exclusivamente univariada.

O primeiro passo no desenvolvimento do método consistiu em selecionar um solvente que apresentasse uma boa seletividade frente aos enantiômeros do fenoprofeno. Na CLAE em fase normal, as diferenças entre as seletividades exibidas por diferentes solventes são governadas, em um primeiro momento, pela capacidade de localização desses solventes. Por essa razão, foram investigados solventes que possuem e que não possuem essa capacidade. Entre os solventes com capacidade de localização, a seletividade pode ainda ser radicalmente diferente em virtude de outras características do solvente como, por exemplo, seu caráter básico ou não, ou ainda a presença de grupos doadores de prótons. Entre os solventes sem capacidade de localização investigados estão o diclorometano e o 1,2-dicloroetano. Entre aqueles com capacidade de localização, teve-se o cuidado de investigar solventes com características distintas, como o acetato de etila (não-básico), o dioxano (básico) e o 2-propanol (o qual possui grupo doador de prótons).

Os quadros 6.5 e 6.6 apresentam os cromatogramas obtidos durante a investigação da seletividade desses solventes. Pela análise desses cromatogramas, pôde-se observar que o único solvente a apresentar total ausência de seletividade foi o dioxano (ensaio 7, 8 e 9), ao passo em que o grau de seletividade entre os demais solventes foi bastante variado. O diclorometano e o 1,2-dicloroetano apresentaram uma seletividade muito pequena, que dificilmente possibilitaria a resolução dos enantiômeros em linha de base mesmo com a otimização de outras condições cromatográficas. Entre ambos, o 1,2-dicloroetano apresentou a pior seletividade, além de resultar em uma maior retenção dos enantiômeros. No ensaio 16, por exemplo, não foi observada a eluição dos enantiômeros mesmo após 30

minutos de corrida. Os dois solventes mais promissores foram o acetato de etila e o 2-propanol, sendo que o último apresentou uma seletividade ligeiramente superior. Pôde-se observar também que é possível alcançar uma resolução bastante razoável entre os enantiômeros em uma fase móvel constituída apenas por hexano e ácido acético (ensaio 1), muito embora o tempo de corrida seja bastante insatisfatório (acima de 30 minutos).

No entanto, uma das observações mais importantes obtidas pela análise dos cromatogramas apresentados nos quadros 6.5 e 6.6 diz respeito à importância da solução diluente utilizada para solubilizar a amostra. Pôde-se observar que, quando a polaridade dessa solução era maior que a polaridade da fase móvel, havia uma conseqüente deterioração no formato dos picos. Essa deterioração pôde ser observada nos ensaios 2, 3, 6 e 12, e ela fica evidente se forem comparados os ensaios 2 e 3 com os ensaios 13 e 14. Essa observação conduziu a uma mudança na preparação da amostra, adotada a partir do ensaio 13. Com essa mudança, a concentração de etanol na solução diluente final ficou limitada a 1% v/v.

Tendo o 2-propanol se mostrado o solvente mais promissor, decidiu-se então investigar a seletividade de outros alcoóis. A tabela 6.26 apresenta a análise dos cromatogramas obtidos durante essa investigação. Com base nos dados apresentados nessa tabela, não foi possível estabelecer uma relação entre a seletividade exibida pelos diferentes alcoóis e o tamanho da cadeia carbônica dos mesmos. O 2-propanol continuou sendo o solvente a exibir a melhor seletividade, ao lado do 2-butanol. Entretanto, a resolução entre os picos foi ligeiramente superior com o emprego do 2-propanol, mas é provável que essa diferença não seja significativa. Pôde-se observar também que a altura dos picos foi consideravelmente menor com o emprego do 1-butanol e do 2-butanol. Todavia, isso se deve

provavelmente ao fato de terem sido empregados 1-butanol e 2-butanol de grau analítico e não grau cromatográfico, uma vez que a maior absorvidade apresentada pelos solventes de grau analítico (relacionada à presença de impurezas) contribui para a diminuição do sinal analítico gerado pela passagem do analito na célula do detector. Assim, optou-se pelo 2-propanol como modificador orgânico, passando-se em seguida à otimização de outras condições cromatográficas.

A vazão da fase móvel foi a primeira condição cromatográfica otimizada após a escolha do modificador orgânico. A avaliação dos cromatogramas obtidos durante essa etapa de otimização é apresentada na tabela 6.27. Os dados apresentados nessa tabela mostram que a resolução entre os picos (R_s) aumenta gradualmente com a diminuição da vazão. No entanto, a porcentagem de aumento obtida sobre a resolução (A1) é menor a cada decréscimo de $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ imposto à vazão da fase móvel, ao passo em que o aumento observado sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico (A2) se mantém mais ou menos constante. Dessa maneira, quando a vazão atinge $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a razão A2/A1 aumenta significativamente, de tal modo que não é vantajoso adotar uma vazão para a fase móvel inferior a $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (vide tabela 6.28 e figura 6.31). Com a diminuição da vazão da fase móvel de $1,0$ para $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, conseguiu-se um aumento de 5,77% sobre a resolução. Em contrapartida, o tempo de retenção referente ao segundo pico teve um aumento superior a 50%, embora tenha se mantido ainda dentro de limites aceitáveis. Observou-se também um aumento da eficiência da coluna (superior a 8%) e uma ligeira diminuição da assimetria dos picos. O fator de separação, entretanto, permaneceu constante.

Posteriormente, decidiu-se otimizar a temperatura da coluna. A tabela 6.29 apresenta a avaliação dos cromatogramas obtidos nessa etapa de otimização do

método. De acordo com os dados dessa tabela, pôde-se concluir que o principal efeito da diminuição da temperatura da coluna se faz notar sobre a resolução. Com a diminuição da temperatura da coluna de 24 para 12 °C, observou-se um aumento da resolução (A1) aproximadamente igual 18%. Por outro lado, o aumento observado sobre o tempo de retenção referente ao segundo pico (A2) foi de apenas 6,34%. Além disso, a razão A1/A2 aumenta progressivamente com a diminuição da temperatura da coluna (vide tabela 6.30 e figura 6.32). Ao mesmo tempo, e diferentemente do que foi observado durante a diminuição da vazão da fase móvel, o fator de separação aumenta com a diminuição da temperatura da coluna, o que explica, em parte, o aumento da resolução entre os picos.

A última condição cromatográfica a ser otimizada foi a quantidade de ácido acético empregada na fase móvel. A avaliação dos cromatogramas obtidos durante essa etapa de otimização é apresentada na tabela 6.31. A interpretação dos dados dessa tabela é dificultada pelos resultados do ensaio 35, onde algumas respostas (especialmente os tempos de retenção) apresentaram valores que contrariam a tendência observada nos ensaios anteriores. Contudo, o ensaio 35 foi repetido algumas vezes e os resultados obtidos foram semelhantes entre as repetições. De qualquer modo, se forem desconsiderados os resultados do ensaio 35, então se pode dizer que, com a diminuição da quantidade de ácido acético empregada na fase móvel, há um aumento do tempo de retenção dos enantiômeros, acompanhado de um aumento do fator de separação e da resolução entre os picos. Contudo a presença de ácido acético na fase móvel é fundamental, como mostra o ensaio 36 (quadro 6.10). Na ausência de ácido acético na fase móvel, os picos se apresentam extremamente caudados e a resolução entre eles fica seriamente prejudicada. Como os resultados do ensaio 35 foram considerados atípicos, estabeleceu-se a fase

móvel empregada no ensaio 34 como aquela que corresponde à condição otimizada. Isso porque, nesse ensaio, obteve-se a maior razão entre o aumento da resolução e o aumento do tempo de retenção referente ao segundo pico, mantendo-se o tempo de corrida dentro de limites aceitáveis (vide tabela 6.32 e figura 6.33).

Assim sendo, após o desenvolvimento e a otimização do método de separação, foi possível alcançar a resolução em linha de base dos enantiômeros do fenoprofeno em um tempo de corrida inferior a 20 minutos, empregando-se a CLAE em fase normal.

7.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO CETOPROFENO POR CLAE EM FASE REVERSA

A estratégia adotada para o desenvolvimento de um método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase reversa também foi baseada em uma abordagem univariada. O primeiro passo no desenvolvimento do método consistiu em selecionar um solvente que apresentasse uma boa seletividade frente aos enantiômeros do cetoprofeno. Foram então testados dois dos modificadores orgânicos mais comumente usados em fase reversa, acetonitrila e metanol, além de dois outros alcoóis, etanol e 2-propanol. O primeiro modificador orgânico testado foi o metanol (ensaio 1). No ensaio 2, a porcentagem de metanol na fase móvel foi diminuída, com o intuito de ajustar o fator de retenção referente ao segundo pico para dentro de um intervalo aceitável (entre 3,0 e 5,0). Nos ensaios posteriores (ensaios 3 a 5), a porcentagem adotada para os demais modificadores orgânicos foi calculada com a ajuda de um nomógrafo, tendo por base a

porcentagem de metanol empregada no ensaio 2. No entanto, mesmo com a ajuda de um nomógrafo, os tempos de retenção obtidos variaram bastante entre os ensaios 2 a 5. Entre os solventes testados, a acetonitrila apresentou a pior seletividade. Etanol e 2-propanol foram os solventes mais promissores, apresentando uma seletividade quase idêntica entre si. Contudo, o etanol foi o modificador orgânico escolhido, devido à maior solubilidade do cetoprofeno nesse solvente.

Em seguida, verificou-se a influência do pH do tampão sobre a resolução entre os picos. Para tanto, utilizou-se dois tampões distintos: tampão formato de amônio 25 mM pH 3,0 e tampão acetato de amônio 25 mM pH 5,5. Esses valores de pH foram escolhidos de maneira a se trabalhar abaixo e acima do pKa do fármaco (que é 4,5). O emprego de um pH menos ácido se mostrou mais promissor, em virtude do maior fator de separação alcançado em pH 5,5. Por essa razão, adotou-se o tampão acetato de amônio 25 mM pH 5,5 para todos os demais ensaios. Além disso, foi observada uma redução dramática no tempo de retenção dos enantiômeros quando este último tampão foi empregado.

Por fim, decidiu-se diminuir a temperatura da coluna e a vazão da fase móvel na tentativa de se alcançar uma resolução satisfatória entre os enantiômeros. Todavia, embora a diminuição da temperatura da coluna tenha permitido um pequeno aumento do fator de separação, a diminuição da vazão exerceu o efeito oposto, o que não era esperado. De qualquer maneira, foi observado um aumento da resolução com a diminuição da vazão da fase móvel, muito embora esse aumento não tenha sido expressivo. Adicionalmente, observou-se um aumento significativo da assimetria dos picos.

Os resultados obtidos durante a tentativa de desenvolvimento do método podem ser vistos na tabela 6.33 e nos quadros 6.11 e 6.12. Diante desses resultados, concluiu-se que outras ações objetivando a otimização do método não seriam muito promissoras, uma vez que a resolução máxima obtida até então estava ainda longe de ser satisfatória. Assim sendo, o desenvolvimento de um método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase reversa foi abandonado, na esperança de que a fase normal se mostrasse mais adequada à separação desses enantiômeros.

7.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO PARA OS ENANTIÔMEROS DO CETOPROFENO POR CLAE EM FASE NORMAL

Para o desenvolvimento de um método de separação para os enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase normal, optou-se novamente por uma abordagem multivariada. Neste caso, a abordagem consistiu em otimizar a fase móvel empregando-se um planejamento experimental do tipo *planejamento de mistura*, conforme descrito no subitem 5.2.5.5. Dois dos componentes da fase móvel foram escolhidos *a priori*, hexano e diclorometano. Esses solventes são comumente empregados em fases móveis binárias, misturados a outros solventes mais polares, como éter *ter*-butil metílico, acetato de etila, tetraidrofurano, 2-propanol, etc., embora também possa ser empregada uma mistura binária entre ambos. Em CLAE em fase normal, a retenção dos analitos diminui na medida em que a polaridade da fase móvel aumenta. Como o hexano e o diclorometano possuem uma significativa diferença de polaridade, optou-se por utilizar ambos em uma fase móvel ternária, de

maneira que a retenção dos enantiômeros pudesse ser controlada variando-se apenas a proporção entre esses dois solventes. Um terceiro solvente, mais polar (um álcool), seria então adicionado à fase móvel, de modo a proporcionar a seletividade desejada. Além disso, esse terceiro solvente forneceria, obviamente, uma opção adicional para o controle da retenção dos enantiômeros. Além disso, seria necessária a presença de um aditivo de fase móvel que minimizasse a assimetria dos picos (ou, em outras palavras, a ocorrência de picos caudados). Para fármacos ácidos, como é o caso do cetoprofeno, o aditivo normalmente empregado é o ácido acético ou o acetato de amônio.

Para que pudessem ser escolhidos o terceiro solvente e o aditivo de fase móvel mais apropriado, foram realizados alguns experimentos preliminares. Nesses experimentos, foram testados dois diferentes alcoóis, o 2-propanol e o etanol, além dos dois aditivos de fase móvel citados anteriormente. Devido à sua baixa solubilidade em 2-propanol, o acetato de amônio não foi empregado em conjunto com esse solvente. Os cromatogramas obtidos nos ensaios preliminares são apresentados no quadro 6.13. Pode-se perceber, pela análise desses cromatogramas, que as melhores separações foram atingidas empregando-se o acetato de amônio como aditivo de fase móvel, o que determinou a sua escolha e a sua utilização em todos os experimentos futuros. Conseqüentemente, o etanol foi escolhido para ser o terceiro solvente a compor as misturas investigadas no planejamento de mistura. Os ensaios preliminares também ajudaram a estabelecer, com base nos tempos de retenção obtidos, as proporções mínima e máxima em que esse solvente seria utilizado.

Para os ensaios previstos pelo planejamento de mistura, decidiu-se manter a temperatura da coluna em 12 °C, uma vez que já se sabia, *a priori*, que temperaturas

inferiores favoreceriam a enantiosseletividade exibida pela coluna Whelk-O 1. Além disso, os métodos desenvolvidos anteriormente haviam demonstrado ser verdadeira essa relação entre a temperatura e a enantiosseletividade exibida pela coluna. A variável vazão da fase móvel, por sua vez, não foi otimizada, tendo sido fixada em $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para todos os ensaios.

No tocante ao planejamento de mistura, pretendia-se, inicialmente, ajustar os modelos matemáticos propostos (equações 5.19 a 5.21) a duas respostas apenas: a resolução entre os picos e o tempo de retenção referente ao segundo pico. Contudo, como não foi possível modelar satisfatoriamente esta última resposta, tentou-se então modelar a resposta *logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico*.

As estimativas dos parâmetros dos modelos ajustados a cada uma das três respostas mencionadas acima são apresentadas na tabela 6.36. Pela análise dos dados dessa tabela se pode observar que, para as respostas *resolução entre os picos* e *logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico*, a adoção do modelo cúbico especial não se justifica, uma vez que a estimativa do parâmetro β_{123}^* foi considerada não significativa ($\alpha = 0,05$).

A qualidade do ajuste de cada um dos modelos obtidos foi avaliada pela análise de suas variâncias. Os resultados são apresentados nas tabelas 6.37 a 6.42.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 6.39, todos os modelos propostos para a resposta *tempo de retenção referente ao segundo pico* apresentaram significativa falta de ajuste, muito embora os modelos quadrático e cúbico especial tenham se revelado bastante superiores em relação ao modelo linear.

Os modelos lineares propostos para as respostas *resolução entre os picos e logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico* também apresentaram significativa falta de ajuste, diferentemente dos modelos quadráticos propostos para essas mesmas respostas (tabelas 6.37, 6.38, 6.41 e 6.42). A superioridade dos modelos quadráticos pode ser claramente observada comparando-se os resíduos deixados por esses modelos com os resíduos deixados pelos modelos lineares, os quais podem ser vistos nos respectivos gráficos de distribuição dos resíduos (gráficos 6.35, 6.36, 6.38 e 6.39). Além disso, nenhuma evidência foi encontrada que possa sugerir que os resíduos deixados pelos modelos quadráticos não sigam uma distribuição normal. Isso pode ser confirmado através das figuras 6.40 a 6.43, mais particularmente nos gráficos de probabilidade normal dos resíduos.

A otimização simultânea das respostas *resolução entre os picos e logaritmo neperiano do fator de retenção referente ao segundo pico* acabou por estabelecer uma fase móvel binária para o método, a qual não contém diclorometano. Os valores alcançados para a desejabilidade global bem como para as desejabilidades individuais ficaram muito aquém das expectativas, especialmente a desejabilidade individual referente à resolução entre os picos. Para que a resolução entre os picos não fosse ainda mais comprometida, permitiu-se inclusive que o fator de retenção referente ao segundo pico fosse superior a 5,0 (o fabricante da coluna recomenda que este esteja entre 3,0 e 5,0). Mesmo assim, não foi possível separar os enantiômeros em linha de base dentro dos limites impostos para o tempo de corrida. De qualquer maneira, a resolução obtida foi muito superior àquela alcançada em fase reversa.

Nas condições otimizadas estabelecidas para o método, e empregando a coluna (S,S)-Whelk-O 1, pôde-se observar que o (S)-(+)-cetoprofeno elui após o (R)-(-)-cetoprofeno, conforme demonstram os resultados da tabela 6.43. Contudo, como a coluna Whelk-O 1 está disponível em ambas as formas enantioméricas, uma inversão da ordem de eluição pode ser facilmente obtida substituindo-se a coluna utilizada pela (R,R)-Whelk-O 1.

7.6 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS SELECIONADOS ÀS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS

Boas separações entre os enantiômeros foram alcançadas ao se aplicar os métodos selecionados às amostras de medicamentos. Contudo, uma diferença significativa foi observada com relação aos parâmetros cromatográficos *resolução entre os picos* e *tempo de retenção referente ao segundo pico*, quando comparados os valores obtidos durante a otimização dos métodos com aqueles obtidos durante a aplicação dos métodos às amostras de medicamentos. No caso específico do método desenvolvido para a separação dos enantiômeros do cetoprofeno por CLAE em fase normal, a resolução alcançada durante a análise dos medicamentos foi aproximadamente 11% maior (em média) do que aquela prevista pelo modelo matemático proposto durante a otimização do método. Por outro lado, o tempo de retenção obtido foi 19% superior (em média) àquele previsto matematicamente. No caso do método desenvolvido para a separação dos enantiômeros do fenoprofeno por CLAE em fase normal, os resultados foram ainda mais desanimadores, muito embora tenha sido possível resolver os enantiômeros em linha de base durante a análise do medicamento. A resolução obtida foi aproximadamente 8% inferior àquele

alcançada durante a otimização do método e o tempo de retenção praticamente dobrou.

Infelizmente, um longo tempo se passou entre o desenvolvimento dos métodos e a aplicação destes às amostras de medicamentos. Nesse intervalo, a coluna foi utilizada diversas vezes, com vários solventes distintos, alternando inclusive entre os modos normal e reverso. Assim, é possível que as diferenças observadas possam ser atribuídas a um provável desgaste da coluna.

Por outro lado, é possível afirmar, com base na análise de pureza dos picos apresentada na tabela 6.44, que os métodos se mostraram seletivos em relação às amostras analisadas (um pico pode ser considerado livre de interferentes se os valores calculados para a pureza de pico total e para a pureza de pico em três pontos se aproximam de 100,0 e de 1,0, respectivamente). Contudo, os métodos desenvolvidos não foram validados, uma vez que não foi possível obter padrões de todos os enantiômeros, os quais seriam necessários à validação completa dos métodos.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os métodos desenvolvidos e frente a ambos os fármacos, cetoprofeno e fenoprofeno, a enantiosseletividade exibida pela coluna Whelk-O 1 em fase normal se revelou superior àquela exibida em fase reversa, o que determinou a escolha dos métodos baseados em fase normal.

Mesmo assim, foi possível desenvolver, para os enantiômeros do fenoprofeno, um método de separação satisfatório por CLAE em fase reversa, o qual apresentou tempos de retenção adequados e uma resolução aceitável, embora não em linha de base. Contudo, seria possível obter uma resolução em linha de base caso fossem adotados, durante a otimização do método, critérios menos exigentes para a aceitação dos tempos de retenção observados. Para os enantiômeros do cetoprofeno, por outro lado, não foi possível desenvolver um método de separação razoável por CLAE em fase reversa.

No entanto, empregando a CLAE em fase normal, foi possível desenvolver métodos de separação satisfatórios para os enantiômeros de ambos os fármacos. Todavia, o método de separação para os enantiômeros do fenoprofeno se revelou bastante superior, em termos de resolução, quando comparado àquele desenvolvido para os enantiômeros do cetoprofeno.

Portanto, diante dos resultados obtidos tanto em fase normal quanto em fase reversa, pode-se afirmar que a enantiosseletividade exibida pela coluna Whelk-O 1 frente aos enantiômeros do fenoprofeno é maior que aquela exibida frente aos enantiômeros do cetoprofeno. Além disso, pode-se afirmar também que a diminuição da temperatura da coluna sempre favorece a enantiosseletividade, ao mesmo tempo em que aumenta a retenção dos enantiômeros.

Neste trabalho, métodos univariados e multivariados foram aplicados com sucesso no desenvolvimento dos métodos de separação. Entretanto, embora a abordagem multivariada permita uma maior compreensão do sistema cromatográfico em desenvolvimento, a esperada redução no número de experimentos necessários para se chegar às condições otimizadas não foi observada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DRAYER, D.E. The early history of stereochemistry. In: WAINER, I.W., ed. **Drug stereochemistry**: analytical methods and pharmacology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.1-24. (Clinical pharmacology, v.18).
2. SOLOMONS, T.W.G. Estereoquímica: moléculas quirais. In: _____. **Química orgânica**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996. v.1, p.184-230.
3. MOSS, G.P. Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). **Pure and Applied Chemistry**, v.68, n.12, p.2193-2222, 1996.
4. WAINER, I.W.; MARCOTE, A.A. Stereochemical terms and concepts: an overview. In: WAINER, I.W., ed. **Drug stereochemistry**: analytical methods and pharmacology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.25-34. (Clinical pharmacology, v.18).
5. VIEDMA, C. Enantiomeric crystallization from DL-aspartic and DL-glutamic acids: implications for biomolecular chirality in the origin of life. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v.31, n.6, p.501-509, 2001.
6. HE, Y.J.; QI, F.; QI, S.C. Effect of earth's orbital chirality on elementary particles and unification of chiral asymmetries in life on different levels. **Medical Hypotheses**, v.54, n.5, p.783-785, 2000.
7. BAILEY, J. Chirality and the origin of life. **Acta Astronautica**, v.46, n.10, p.627-631, 2000.
8. BRENNAN, E.; FUGANTI, C.; SERRA, S. Enantioselective perception of chiral odorants. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.14, n.1, p.1-42, 2003.
9. ABOUL-ENEIN, H.Y.; BASHA, L.I.A Chirality and drug hazards. In: ABOUL-ENEIN, H.Y.; WAINER, I.W., eds. **The impact of stereochemistry on drug development and use**. New York: John Wiley, 1997. p.1-19. (Chemical analysis, v.142).
10. OTT, R.J.; GIACOMINI, K.M. Stereoselective transport of drugs across epithelia. In: WAINER, I.W., ed. **Drug stereochemistry**: analytical methods and pharmacology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.281-314. (Clinical pharmacology, v.18).

11. MASON, J.P.; HUTT, A.J. Stereochemical aspects of drug metabolism. In: ABOUL-ENEIN, H.Y.; WAINER, I.W., eds. **The impact of stereochemistry on drug development and use**. New York: John Wiley, 1997. p.45-105. (Chemical analysis, v.142).
12. NOCTOR, T.A.G. Enantioselective binding of drugs to plasma proteins. In: WAINER, I.W., ed. **Drug stereochemistry: analytical methods and pharmacology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.337-364. (Clinical pharmacology, v.18).
13. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V. Formas farmacêuticas: considerações biofarmacêuticas. In: _____. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p.65-112.
14. KARIM, A.; MADHU, C.; COOK, C. Bioequivalency determination of racemic drug formulations: is stereospecific assay essential? In: REDDY, I.K.; MEHVAR, R., eds. **Chirality in drug design and development**. New York: Marcel Dekker, 2004. p.393-418.
15. SRINIVAS, N.R. Role of stereoselective assays in bioequivalence studies of racemic drugs: have we reached a consensus? **Journal of Clinical Pharmacology**, v.44, n.2, p.115-119, 2004.
16. MIDHA, K.K.; MCKAY, G.; RAWSON, M.J.; HUBBARD, J.W. The impact of stereoisomerism in bioequivalence studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.87, n.7, p.797-802, 1998.
17. KARIM, A. Enantioselective assays in comparative bioavailability studies of racemic drug formulations: nice to know or need to know? **Journal of Clinical Pharmacology**, v.36, n.6, p.490-499, 1996.
18. MEHVAR, R.; JAMALI, F. Bioequivalence of chiral drugs: stereospecific versus non-stereospecific methods. **Clinical Pharmacokinetics**, v.33, n.2, p.122-141, 1997.
19. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for Human Use. **Investigation of Chiral Active Substances**. 3CC29A. 1993. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/3cc29aen.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2007.

20. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for Human Use. **Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence**. CPMP/EWP/QWP/1401/98. 2001. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/140198en.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2007.
21. UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for Industry on Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products: General Considerations**. Rockville: FDA, 2003. 23p.
22. GARCIA-ARIETA, A.; ABAD-SANTOS, F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A.; VARAS-POLO, Y.; NOVALBOS, J.; LAPARIDIS, N.; GALLEGOS-SANDIN, S.; ORFANIDIS, K.; TORRADO, J. An eutomer/distomer ratio near unity does not justify non-enantiospecific assay methods in bioequivalence studies. **Chirality**, v.17, n.8, p.470-475, 2005.
23. CROSSLEY, R. Chirality and aspects of drug development. In: _____. **Chirality and the biological activity of drugs**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p.161-187. (New directions in organic and biological chemistry).
24. ALVAREZ, C.; TORRADO, J.J.; CADORNIGA, R. Stereoselective drug release from ketoprofen and ricobendazole matrix tablets. **Chirality**, v.11, n.8, p.611-615, 1999.
25. SOLINÍS, M.A.; DE LA CRUZ, Y.; CALVO, B.; HERNANDEZ, R.M.; GASCON, A.R.; GONI, I.; GURRUCHAGA, M.D.; PEDRAZ, J.L. Release of salbutamol sulphate and ketoprofen enantiomers from matrices containing HPMC and cellulose derivatives. **Chirality**, v.14, n.10, p.806-813, 2002.
26. SOLINÍS, M.A.; DE LA CRUZ, Y.; HERNANDEZ, R.M.; GASCON, A.R.; CALVO, B.; PEDRAZ, J.L. Release of ketoprofen enantiomers from HPMC K100M matrices-diffusion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.239, n.1/2, p.61-68, 2002.
27. VALLIAPPAN, K.; KANNAN, K.; MANAVALAN, R.; MURALIDHARAN, C. Evaluation of stereoselective dissolution of racemic ketoprofen from formulations containing chiral excipients. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.65, n.3, p.253-259, 2003.

28. 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.
29. AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL, J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.1, n.10, p.753-768, 2002.
30. STRONG, M. FDA policy and regulation of stereoisomers: paradigm shift and the future of safer, more effective drugs. **Food and Drug Law Journal**, v.54, n.3, p.463-487, 1999.
31. HUTT, A.J.; VALENTOVÁ, J. The chiral switch: the development of single enantiomer drugs from racemates. **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae**, v.50, p.7-23, 2003.
32. UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research. **FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs**. 2003. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm>. Acesso em: 11 mar. 2007.
33. CANADA. Health Canada. **Guidance for industry: stereochemical issues in chiral drug development**. 1998. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/stereo_e.pdf. Acesso em: 11 mar. 2007.
34. VLASSES, P.H.; ROTMENSCH, H.H.; SWANSON, B.N.; IRVIN, J.D.; JOHNSON, C.L.; FERGUSON, R.K. Indacrinone: natriuretic and uricosuric effects of various ratios of its enantiomers in healthy men. **Pharmacotherapy**, v.4, n.5, p.272-277, 1984.
35. JAIN, A.K.; MICHAEL, R.; RYAN, J.R.; MCMAHON, F.G. Antihypertensive and biochemical effects of indacrinone enantiomers. **Pharmacotherapy**, v.4, n.5, p.278-283, 1984.
36. STINSON, S.C. Chiral pharmaceuticals. **Chemical and Engineering News**, v.79, n.40, p.79-97, 2001.

37. SANTORO, M.I.R.M.; SINGH, A.K. Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.259-268, 2001.
38. INSEL, P.A. Fármacos analgésico-antipiréticos e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W., GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.450-480.
39. EVANS, A.M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: enantioselectivity, clinical implications, and special reference to S(+)-ibuprofen. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.36, suppl.12, p.7S-15S, 1996.
40. DEF 2004/2005: dicionário de especialidades farmacêuticas. 33.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2004. p.291, p.663-664.
41. CARABAZA, A.; CABRE, F.; ROTLLAN, E.; GOMEZ, M.; GUTIERREZ, M.; GARCIA, M.L.; MAULEÓN, D. Stereoselective inhibition of inducible cyclooxygenase by chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.36, n.6, p.505-512, 1996.
42. BONEBERG, E.M.; ZOU, M.H.; ULRICH, V. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(-)- and S(+)-ibuprofen. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.36, suppl.12, p.16S-19S, 1996.
43. BRUNE, K.; GEISSLINGER, G.; MENZEN-SOGLOWEK, S. Pure enantiomers of 2-arylpropionic acids: tools in pain research and improved drugs in rheumatology. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.32, n.10, p.944-952, 1992.
44. WILLIAMS, K.M. Enantiomers in arthritic disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v.46, n.2, p.273-295, 1990.
45. CALDWELL, J.; HUTT, A.J.; FOURNEL-GIGLEUX, S. The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. **Biochemical Pharmacology**, v.37, n.1, p.105-114, 1988.

46. MASCAGNI, P.; SABBATINI, V.; BIORDI, L.; MARTINOTTI, S.; ALLEGRETTI, M.; MARULLO, A.; CASELLI, G.; BERTINI, R. *R* and *S* isomers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production. **European Cytokine Network**, v.11, n.2, p.185-192, 2000.
47. BERTINI, R.; CASELLI, G. Analgesic effect of ketoprofen is mainly associated to its *R*-enantiomer: role of cytokine modulation. **Analgesia**, v.4, n.2, p.181-186, 1999.
48. GHEZZI, P.; MELILLO, G.; MEAZZA, C.; SACCO, S.; PELLEGRINI, L.; ASTI, C.; PORZIO, S.; MARULLO, A.; SABBATINI, V.; CASELLI, G.; BERTINI, R. Differential contribution of *R* and *S* isomers in ketoprofen anti-inflammatory activity: role of cytokine modulation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.287, n.3, p.969-974, 1998.
49. COOPER, S.A.; REYNOLDS, D.C.; REYNOLDS, B.; HERSH, E.V. Analgesic efficacy and safety of (*R*)-ketoprofen in postoperative dental pain. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.38, suppl.2, p.11S-18S, 1998.
50. JERUSSI, T.P.; CAUBET, J.F.; MCCRAY, J.E.; HANDLEY, D.A. Clinical endoscopic evaluation of the gastroduodenal tolerance to (*R*)-ketoprofen, (*R*)-flurbiprofen, racemic ketoprofen, and paracetamol: a randomized, single-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.38, suppl.2, p.19S-24S, 1998.
51. OSSIPOV, M.H.; JERUSSI, T.P.; REN, K.; SUN, H.; PORRECA, F. Differential effects of spinal (*R*)-ketoprofen and (*S*)-ketoprofen against signs of neuropathic pain and tonic nociception: evidence for a novel mechanism of action of (*R*)-ketoprofen against tactile allodynia. **Pain**, v.87, n.2, p.193-199, 2000.
52. JAMALI, F.; BROCKS, D.R. Clinical pharmacokinetics of ketoprofen and its enantiomers. **Clinical Pharmacokinetics**, v.19, n.3, p.197-217, 1990.
53. FOSTER, R.T.; JAMALI, F.; RUSSELL, A.S.; ALBALLA, S.R. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in healthy subjects following single and multiple doses. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.77, n.1, p.70-73, 1988.

54. LAGRANGE, F.; PÉHOURCQ, F.; BANNWARTH, B.; LENG, J.J.; SAUX, M.C. Passage of *S*(+)- and *R*(-)-ketoprofen across the human isolated perfused placenta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.12, n.3, p.286-291, 1998.
55. SAKAI, T.; MARUYAMA, T.; SAKO, T.; AHMED, S.; ZUIDEMA, X.; FUJIYAMA, C.S.; OTAGIRI, M. Stereoselective serum protein binding of ketoprofen in liver diseases. **Enantiomer**, v.4, n.5, p.477-482, 1999.
56. BERTUCCI, C. Enantioselective inhibition of the binding of rac-profens to human serum albumin induced by lithocholate. **Chirality**, v.13, n.7, p.372-378, 2001.
57. CHUANG, V.T.G.; OTAGIRI, M. Stereoselective binding of human serum albumin. **Chirality**, v.18, n.3, p.159-166, 2006.
58. LAPICQUE, F.; MULLER, N.; PAYAN, E.; DUBOIS, N.; NETTER, P. Protein binding and stereoselectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v.25, n.2, p.115-123, 1993.
59. ABERG, G.; CIOFALO, V.B.; PENDLETON, R.G.; RAY, G.; WEDDLE, D. Inversion of (*R*)- to (*S*)-ketoprofen in eight animal species. **Chirality**, v.7, n.5, p.383-387, 1995.
60. SAN MARTÍN, M.F.; SORACI, A.; FOGEL, F.; TAPIA, O.; ISLAS, S. Chiral inversion of (*R*)-(-)-fenoprofen in guinea-pigs pretreated with clofibrate. **Veterinary Research Communications**, v.26, n.4, p.323-332, 2002.
61. IGARZA, L.; SORACI, A.; AUZA, N.; ZEBALLOS, H. Chiral inversion of (*R*)-ketoprofen: influence of age and differing physiological status in dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v.26, n.1, p.29-37, 2002.
62. CASTRO, E.; SORACI, A.; FOGEL, F.; TAPIA, O. Chiral inversion of *R*(-)-fenoprofen and ketoprofen enantiomers in cats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.23, n.5, p.265-271, 2000.
63. RUDY, A.C.; LIU, Y.; BRATER, C.; HALL, S.D. Stereoselective pharmacokinetics and inversion of (*R*)-ketoprofen in healthy volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.38, suppl.2, p.3S-10S, 1998.

64. GRUBB, N.G.; RUDY D.W.; BRATER, D.C.; HALL, S.D. Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen and ketoprofen glucuronide in end-stage renal disease: evidence for a 'futile cycle' of elimination. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.48, n.4, p.494-500, 1999.
65. RUBIN, A.; KNADLER, M.P.; HO, P.P.K.; BECHTOL, L.D.; WOLEN, R.L. Stereoselective inversion of (*R*)-fenoprofen to (*S*)-fenoprofen in humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.74, n.1, p.82-84, 1985.
66. EUROPEAN Pharmacopoeia. 5.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2004. v.2, p.1874.
67. UNITED STATES Pharmacopeia. 29.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.1218.
68. CLARKE, E.G.C. **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceutical body fluids and post-mortem material**. 3.ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. p.1156.
69. LIVERSIDGE, G.G. Ketoprofen. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v.10, p.443-471, 1981.
70. NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. **Infrared absorption spectroscopy**. 2.ed. San Francisco: Holden-Day, 1977. p.26, 39.
71. BRITISH Pharmacopoeia 2005. London: Stationery Office, 2005. v.1, p.813.
72. UNITED STATES Pharmacopeia. 29.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.892, 3207.
73. CLARKE, E.G.C. **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceutical body fluids and post-mortem material**. 3.ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. p.1027.
74. WARD, C.K.; SCHIRMER, R.E. Fenoprofen calcium. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v.6, p.161-182, 1977.

75. MAIER, N.M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **Journal of Chromatography, A**, v.906, n.1/2, p.3-33, 2001.
76. ANDERSSON, S.; ALLENMARK, S.G. Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.54, n.1-3, p.11-23, 2002.
77. TERFLOTH, G. Enantioseparations in super- and subcritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.906, n.1/2, p.301-307, 2001.
78. SCHURIG, V. Separation of enantiomers by gas chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.906, n.1/2, p.275-299, 2001.
79. SCHULTE, M.; STRUBE, J. Preparative enantioseparation by simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.906, n.1/2, p.399-416, 2001.
80. FOUCAULT, A.P. Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.906, n.1/2, p.365-378, 2001.
81. FRANCOTTE, E.R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. **Journal of Chromatography, A**, v.906, n.1/2, p.379-397, 2001.
82. ZHANG, Y.; WU, D.R.; WANG-IVERSON, D.B.; TYMIAK, A.A. Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.10, n.8, p.571-577, 2005.
83. RIEKKOLA, M.-L.; JONSSON, J.Å.; SMITH, R.M. Terminology for analytical capillary electromigration techniques (IUPAC Recommendations 2003). **Pure and Applied Chemistry**, v.76, n.2, p.443-451, 2004.
84. HA, P.T.T.; HOOGMARTENS, J.; VAN SCHEPDAEL, A. Recent advances in pharmaceutical applications of chiral capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.1, p.1-11, 2006.

85. LAMMERHOFER, M. Chiral separations by capillary electromigration techniques in nonaqueous media. I. Enantioselective nonaqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography, A**, v.1068, n.1, p.3-30, 2005.
86. LAMMERHOFER, M. Chiral separations by capillary electromigration techniques in nonaqueous media. II. Enantioselective nonaqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography, A**, v.1068, n.1, p.31-57, 2005.
87. OTSUKA, K.; TERABE, S. Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants. **Journal of Chromatography, A**, v.875, n.1/2, p.163-178, 2000.
88. WISTUBA, D.; SCHURIG, V. Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.875, n.1/2, p.255-276, 2000.
89. NISHI, H. Enantiomer separation of drugs by electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.735, n.1/2, p.57-76, 1996.
90. BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v.28, n.4, p.683-691, 2005.
91. HOLZGRABE, U.; BRINZ, D.; KOPEC, S.; WEBER, C.; BITAR, Y. Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? **Electrophoresis**, v.27, n.12, p.2283-2292, 2006.
92. AGILENT TECHNOLOGIES. **Guide to capillaries, reagents and supplies for CE and CEC**. 2002. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/scripts/LiteraturePDF.asp?iWHID=29594>. Acesso em: 26 abr. 2007.
93. ETTRE, L.S. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). **Pure and Applied Chemistry**, v.65, n.4, p.819-872, 1993.
94. ABOUL-ENEIN, H.Y.; EL-AWADY, M.I.; HEARD, C.M.; NICHOLLS, P.J. Application of thin-layer chromatography in enantiomeric chiral analysis: an overview. **Biomedical Chromatography**, v.13, n.8, p.531-537, 1999.

95. KRASIKOV, V.D. Contemporary planar chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v.58, n.8, p.706-719, 2003. [Review].
96. WALL, P.E. Introduction and history. In: _____. **Thin-layer chromatography: a modern practical approach**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005. p.1-5. (RSC chromatography monographs).
97. POOLE, C.F. Planar chromatography at the turn of the century. **Journal of Chromatography, A**, v.856, n.1/2, p.399-427, 1999.
98. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L.; KERN, J.; KIRKLAND, K. Chiral separations. In: SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York: John Wiley, 1997. p.537-615.
99. GAL, J. Indirect methods for the chromatographic resolution of drug enantiomers. In: WAINER, I.W., ed. **Drug stereochemistry: analytical methods and pharmacology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.65-106. (Clinical pharmacology, v.18).
100. SRINIVAS, N.R. Evaluation of experimental strategies for the development of chiral chromatographic methods based on diastereomer formation. **Biomedical Chromatography**, v.18, n.4, p.207-233, 2004.
101. VADIM, A.D. Analytical chiral separation methods (IUPAC Recommendations 1997). **Pure and Applied Chemistry**, v.69, n.7, p.1469-1474, 1997.
102. THOMPSON, R. A practical guide to HPLC enantioseparations for pharmaceutical compounds. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, n.7/8, p.1215-1231, 2005.
103. WAINER, I.W.; DOYLE, T.D. Application of high-performance liquid chromatographic chiral stationary phases to pharmaceutical analysis: direct enantiomeric resolution of amide derivatives of 1-phenyl-2-aminopropane. **Journal of Chromatography, A**, v.259, p.465-472, 1983.
104. REGIS TECHNOLOGIES. **The Regis Pirkle-concept chiral HPLC column: its nature, care, and use**. Disponível em: http://www.registech.com/chiral/care_and_use.html. Acesso em: 13 maio 2007.

105. WAINER, I.W. HPLC chiral stationary phases for the stereochemical resolution of enantiomeric compounds: the current state of the art. In: _____, ed. **Drug stereochemistry: analytical methods and pharmacology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.139-182. (Clinical pharmacology, v.18).
106. THUNBERG, L.; ANDERSSON, S.; ALLENMARK, S.; VESSMAN, J. Preparative resolution of drug racemates to study the chiroptical properties of their enantiomers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, n.3/4, p.431-439, 2002.
107. PURDIE, N.; SWALLOWS, K.A. Analytical applications of polarimetry, optical rotatory dispersion, and circular dichroism. **Analytical Chemistry**, v.61, n.2, p.77A-89A, 1989.
108. LINDER, S.W.; YANIK, G.W.; BOBBITT, D.R. Evaluation of laser-based polarimetry for the determination of enantiomeric excess (ee) at the extremes of the ee scale. **Microchemical Journal**, v.76, n.1/2, p.105-112, 2004.
109. BOBBITT, D.R.; LINDER, S.W. Recent advances in chiral detection for high performance liquid chromatography. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v.20, n.3, p.111-123, 2001.
110. PURDIE, N.; SWALLOWS, K.A. Circular dichroism – I. Theory and practice. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v.9, n.3, p.94-97, 1990.
111. ROTHCHILD, R. NMR methods for determination of enantiomeric excess. **Enantiomer**, v.5, n.5, p.457-471, 2000.
112. TADEUSIAK, E.J.; CIESIELSKI, W.; OLEJNICZAK, S. The determination of enantiomeric excess of valine by ODESSA solid-state NMR experiment. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.44, n.10, p.905-908, 2006.
113. WENZEL, T.J.; WILCOX, J.D. Chiral reagents for the determination of enantiomeric excess and absolute configuration using NMR spectroscopy. **Chirality**, v.15, n.3, p.256-270, 2003.
114. LADANYI, L.; SZILAGYI, I.; HERMECZ, I. Thermoanalytic determination of the enantiomeric purity of selegiline. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, v.62, n.5, p.231-236, 1992.

115. STEFAN, R.-I.; VAN STADEN, J.F.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Molecular recognition in chiral discrimination. **Crystal Engineering**, v.4, n.2/3, p.113-118, 2001.
116. EL-HADY, D.A.; SELIEM, M.M.; GOTTI, R.; EL-MAALI, N.A. Novel voltammetric method for enantioseparation of racemic methotrexate: determination of its enantiomeric purity in some pharmaceuticals. **Sensors and Actuators: B, Chemical**, v.113, n.2, p.978-988, 2006.
117. STADEN, R.I.S.V.; HOLO, L. Enantioselective, potentiometric membrane electrodes based on cyclodextrins for the determination of l-histidine. **Sensors and Actuators: B, Chemical**, v.120, n.2, p.399-402, 2007.
118. RINALDI, P.L. The determination of absolute configuration using nuclear magnetic resonance techniques. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.15, n.4, p.291-352, 1982.
119. POLAVARAPU, P.L. Renaissance in chiroptical spectroscopic methods for molecular structure determination. **Chemical Record**, v.7, n.2, p.125-126, 2007.
120. STEPHENS, P.J.; DEVLIN, F.J.; CHEESEMAN, J.R.; FRISCH, M.J.; BORTOLINI, O.; BESSE, P. Determination of absolute configuration using *ab initio* calculation of optical rotation. **Chirality**, v.15, suppl., p.S57-64, 2003.
121. MCCANN, D.M.; STEPHENS, P.J. Determination of absolute configuration using density functional theory calculations of optical rotation and electronic circular dichroism: chiral alkenes. **Journal of Organic Chemistry**, v.71, n.16, p.6074-6098, 2006.
122. KUPPENS, T.; BULTINCK, P.; LANGENAEKER, W. Determination of absolute configuration via vibrational circular dichroism. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.1, n.3, p.269-275, 2004.
123. FREEDMAN, T.B.; CAO, X.; DUKOR, R.K.; NAFIE, L.A. Absolute configuration determination of chiral molecules in the solution state using vibrational circular dichroism. **Chirality**, v.15, n.9, p.743-758, 2003.
124. FLACK, H.D.; BERNARDINELLI, G. Absolute structure and absolute configuration. **Acta Crystallographica: Section A**, v.55, Part 5, p.908-915, 1999.

125. ROUSSEL, C.; DEL RIO, A.; PIERROT-SANDERS, J.; PIRAS, P.; VANTHUYNE, N. Chiral liquid chromatography contribution to the determination of the absolute configuration of enantiomers. **Journal of Chromatography, A**, v.1037, n.1/2, p.311-328, 2004.
126. DAVIES, N.M. Methods of analysis of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.691, n.2, p.229-261, 1997.
127. MULLANGI, R.; YAO, M.; SRINIVAS, N.R. Resolution of enantiomers of ketoprofen by HPLC: a review. **Biomedical Chromatography**, v.17, n.7, p.423-434, 2003.
128. MCKAY, S.W.; MALLIN, D.N.B.; SHRUBSALL, P.R.; SWANN, B.P. Analysis of Benoxaprofen and other α -methylarylacetic acids using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.170, n.2, p.482-485, 1979.
129. SALLUSTIO, B.S.; ABAS, A.; HAYBALL, P.J.; PURDIE, Y.J.; MEFFIN, P.J. Enantiospecific high-performance liquid chromatographic analysis of 2-phenylpropionic acid, ketoprofen and fenoprofen. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.374, n.2, p.329-337, 1986.
130. HAYBALL, P.J.; NATION, R.L.; BOCHNER, F.; LE LEU, R.K. Enantiospecific analysis of ketoprofen in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.570, n.2, p.446-452, 1991.
131. THOMASON, M.J.; HUNG, Y.-F.; RHYS-WILLIAMS, W.; HANLON, G.W.; LLOYD, A.W. Indirect enantiomeric separation of 2-arylpropionic acids and structurally related compounds by reversed phase HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, n.11, p.1765-1774, 1997.
132. PANUS, P.C.; TOBER-MEYER, B.; FERSLEW, K.E. Tissue extraction and high-performance liquid chromatographic determination of ketoprofen enantiomers. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.705, n.2, p.295-302, 1998.
133. ZHAO, H.; MU, Z.; LI, H.; QIU, Z. Determination of the optical purity of ketoprofen by reversed-phase HPLC after derivatization with *R*-(+)- α -methylbenzylamine. **Xinan Shifan Daxue Xuebao**, v.25, n.2, p.160-163, 2000.

134. ZHAO, H.; MU, Z.; LI, H.; QIU, S. Separation of enantiomeric ketoprofen by pre-column chiral derivatization reversed-phase HPLC. **Zhongguo Yao Xue Za Zhi**, v.35, n.3, p.194-196, 2000.
135. MU, Z.; LI, H.; QIU, Z. Separation of enantiomeric ketoprofen by pre-column chiral derivatization RP-HPLC. **Xinan Shifan Daxue Xuebao**, v.27, n.1, p.69-72, 2002.
136. BJÖRKMAN, S. Determination of the enantiomers of ketoprofen in blood plasma by ion-pair extraction and high-performance liquid chromatography of leucinamide derivatives. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.414, n.2, p.465-471, 1987.
137. FOSTER, R.T.; JAMALI, F. High-performance liquid chromatographic assay of ketoprofen enantiomers in human plasma and urine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.416, n.2, p.388-393, 1987.
138. MEHVAR, R.; JAMALI, F. Stereospecific high-performance liquid chromatographic (HPLC) assay of fenoprofen enantiomers in plasma and urine. **Pharmaceutical Research**, v.5, n.1, p.53-56, 1988.
139. VOLLAND, C.; SUN, H.; BENET, L.Z. Stereoselective analysis of fenoprofen and its metabolites. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.534, p.127-138, 1990.
140. PALYLYK, E.L.; JAMALI, F. Simultaneous determination of ketoprofen enantiomers and probenecid in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.568, n.1, p.187-196, 1991.
141. MEHVAR, R.; JAMALI, F.; PASUTTO, F.M. Liquid-chromatographic assay of ibuprofen enantiomers in plasma. **Clinical Chemistry**, v.34, n.3, p.493-496, 1988.
142. LUAN, Y.; DU, Z.; ZHANG, D.; ZHAO, R.; HUANG, Z. Enantiospecific analysis of ketoprofen by RP-HPLC with chiral precolumn derivatization. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v.21, n.4, p.281-283, 2001.

143. SANTA, T.; LUO, J.; LIM, C.K.; IMAI, K. Enantiomeric separation and detection by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry of 2-arylpropionic acids derivatized with benzofurazan fluorescent reagents. **Biomedical Chromatography**, v.12, n.2, p.73-77, 1998.
144. IWAKI, K.; BUNRIN, T.; KAMEDA, Y.; YAMAZAKI, M. Resolution and sensitive detection of carboxylic acid enantiomers using fluorescent chiral derivatization reagents by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.662, n.1, p.87-93, 1994.
145. AL-KINDY, S.; SANTA, T.; FUKUSHIMA, T.; HOMMA, H.; IMAI, K. 1-(5-dimethylamino-1-naphthalenesulphonyl)-(S)-3-aminopyrrolidine (DNS-Apy) as a fluorescence chiral labelling reagent for carboxylic acid enantiomers. **Biomedical Chromatography**, v.11, n.3, p.137-142, 1997.
146. WAINER, I.W.; DOYLE, T.D. Application of high-performance liquid chromatographic chiral stationary phases to pharmaceutical analysis: structural and conformational effects in the direct enantiomeric resolution of α -methylarylacetic acid antiinflammatory agents. **Journal of Chromatography, A**, v.284, p.117-124, 1984.
147. CROWTHER, J.B.; COVEY, T.R.; DEWEY, E.A.; HENION, J.D. Liquid chromatographic/mass spectrometric determination of optically active drugs. **Analytical Chemistry**, v.56, n.14, p.2921-2926, 1984.
148. PIRKLE, W.H.; MCCUNE, J.E. Improved chiral stationary phase for the separation of the enantiomers of chiral acids as their anilide derivatives. **Journal of Chromatography, A**, v.471, p.271-281, 1989.
149. KAKODKAR, S.V.; ZIEF, M. Resolution of derivatized acids and amines on JTB-X: A new urea bonded chiral stationary phase. **Chirality**, v.2, n.2, p.124-127, 1990.
150. VAN OVERBEKE, A.; BAEYENS, W.; VAN DEN BOSSCHE, W.; DEWAELE, C. Enantiomeric separation of amide derivatives of some 2-arylpropionic acids by HPLC on a cellulose-based chiral stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.12, n.7, p.911-916, 1994.
151. VAN OVERBEKE, A.; BAEYENS, W.; VAN DEN BOSSCHE, W.; DEWAELE, C. Separation of 2-arylpropionic acids on a cellulose based chiral stationary phase by RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.12, n.7, p.901-909, 1994.

152. ABOUL-ENEIN, H.Y.; VAN OVERBEKE, A.; VANDER WEKEN, G.; BAEYENS, W.; ODA, H.; DEPREZ, P.; DE KRUIF, A. HPLC on Chiralcel OJ-R for enantiomer separation and analysis of ketoprofen, from horse plasma, as the 9-aminophenanthrene derivative. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.50, n.3, p.291-296, 1998.
153. FUKUSHIMA, T.; SANTA, T.; HOMMA, H.; AL-KINDY, S.M.; IMAI, K. Enantiomeric separation and detection of 2-arylpropionic acids derivatized with [(N,N-dimethylamino)sulfonyl]benzofurazan reagents on a modified cellulose stationary phase by high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v.69, n.9, p.1793-1799, 1997.
154. AMEYIBOR, E.; STEWART, J.T. Enantiomeric HPLC separation of selected chiral drugs using native and derivatized β -cyclodextrins as chiral mobile phase additives. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.20, n.6, p.855-869, 1997.
155. AMEYIBOR, E.; STEWART, J.T. HPLC determination of ketoprofen enantiomers in human serum using a nonporous octadecylsilane 1.5 μ m column with hydroxypropyl β -cyclodextrin as mobile phase additive. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.17, n.1, p.83-88, 1998.
156. YE, X.; YU, X. Enantiomeric separation of ketoprofen by HPLC using Chirobiotic V CSP and vancomycin as chiral mobile phase additives. **Yaoxue Xuebao**, v.38, n.3, p.211-214, 2003.
157. GUO, Z.; WANG, H.; ZHANG, Y. Chiral separation of ketoprofen on an achiral C8 column by HPLC using norvancomycin as chiral mobile phase additives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.1, p.310-314, 2006.
158. ZHONG, Q.; HE, L.; BEESLEY, T.E.; TRAHANOVSKY, W.S.; SUN, P.; WANG, C.; ARMSTRONG, D.W. Development of dinitrophenylated cyclodextrin derivatives for enhanced enantiomeric separations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.1115, n.1/2, p.19-45, 2006.
159. ARMSTRONG, D.W.; WARD, T.J.; ARMSTRONG, R.D.; BEESLEY, T.E. Separation of drug stereoisomers by the formation of β -cyclodextrin inclusion complexes. **Science**, v.232, n.4754, p.1132-1135, 1986.

160. BEESON, M.D.; VIGH, G. Examination of the retention behavior of underivatized profen enantiomers on cyclodextrin silica stationary phases. **Journal of Chromatography, A**, v.634, n.2, p.197-204, 1993.
161. BOSÁKOVÁ, Z.; CUŘÍNOVÁ, E.; TESAŘOVÁ, E. Comparison of vancomycin-based stationary phases with different chiral selector coverage for enantioselective separation of selected drugs in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.1088, n.1/2, p.94-103, 2005.
162. PÉHOURCQ, F.; JARRY, C.; BANNWARTH, B. Chiral resolution of flurbiprofen and ketoprofen enantiomers by HPLC on a glycopeptide-type column chiral stationary phase. **Biomedical Chromatography**, v.15, n.3, p.217-222, 2001.
163. ANDERSSON, M.E.; ASLAN, D.; CLARKE, A.; ROERAADE, J.; HAGMAN, G. Evaluation of generic chiral liquid chromatography screens for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography, A**, v.1005, n.1/2, p.83-101, 2003.
164. OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; KAIDA, Y.; HATADA, K.; INOTSUME, N.; NAKANO, M. Direct chromatographic separation of 2-arylpropionic acid enantiomers using tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)s of cellulose and amylose as chiral stationary phases. **Chirality**, v.1, n.3, p.239-242, 1989.
165. CARR, R.A.; CAILLÉ, G.; NGOC, A.H.; FOSTER, R.T. Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of ketoprofen in human plasma and urine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.668, n.1, p.175-181, 1995.
166. LOVLIN, R.; VAKILY, M.; JAMALI, F. Rapid, sensitive and direct chiral high-performance liquid chromatographic method for ketoprofen enantiomers. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.679, n.1/2, p.196-198, 1996.
167. VAN OVERBEKE, A.; BAEYENS, W.; DEWAELE, C. Comparative study on the enantiomeric separation of several non-steroidal anti-inflammatory drugs on two cellulose-based chiral stationary phases. **Journal of Liquid Chromatography**, v.18, n.12, p.2427-2443, 1995.
168. TANG, Y. Significance of mobile phase composition in enantioseparation of chiral drugs by HPLC on a cellulose-based chiral stationary phase. **Chirality**, v.8, n.1, p.136-142, 1996.

169. KANG, G.W.; KO, J.H.; CHEONG, W.J. Thermodynamic study of enantioseparation of arylpropionic acids with a Chiralcel OJ-H stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, n.4, p.513-526, 2005.
170. PERRIN, C.; MATTHIJS, N.; MANGELINGS, D.; GRANIER-LOYAUX, C.; MAFTOUH, M.; MASSART, D.L.; HEYDEN, Y.V. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals part II. Reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.966, n.1/2, p.119-134, 2002.
171. MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y.V. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar organic solvent chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.1111, n.1, p.48-61, 2006.
172. VAN OVERBEKE, A.; BAEYENS, W.; ODA, H.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Direct enantiomeric HPLC separation of several 2-arylpropionic acids, barbituric acids and benzodiazepines on chiralcel OJ-R chiral stationary phase. **Chromatographia**, v.43, n.11-12, p.599-606, 1996.
173. ABOUL-ENEIN, H.Y. Chiral separation of some non-steroidal anti-inflammatory drugs on tartardiamide DMB chiral stationary phase by HPLC. **Journal of Separation Science**, v.26, n.6-7, p.521-524, 2003.
174. LIU, X.; WANG, J.; SHANG, Z.; YU, Y. Direct enantiomeric separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by high performance liquid chromatography. **Fenxi Huaxue**, v.29, n.9, p.993-996, 2001.
175. YOON, T.H.; KIM, I.H. Chiral separation of ketoprofen racemate by using Chirex[®] 3005 and Kromasil[®] CHI-II chiral column. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.21, n.2, p.521-526, 2004.
176. HERMANSSON, J.; ERIKSSON, M. Direct liquid chromatographic resolution of acidic drugs using a chiral α_1 -acid glycoprotein column (Enantiopac[®]). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.9, n.2/3, p.621-639, 1986.
177. SCHILL, G.; WAINER, I.W.; BARKAN, S.A. Chiral separations of cationic and anionic drugs on an α_1 -acid glycoprotein-bonded stationary phase (Enantiopac[®]). II. Influence of mobile phase additives and pH on chiral resolution and retention. **Journal of Chromatography, A**, v.365, p.73-88, 1986.

178. MENZEL-SOGLOWEK, S.; GEISSLINGER, G.; BRUNE, K. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketoprofen, ibuprofen and fenoprofen in plasma using a chiral α_1 -acid glycoprotein column. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.532, n.2, p.295-303, 1990.
179. HERMANSSON, J.; HERMANSSON, I. Dynamic modification of the chiral bonding properties of a Chiral-AGP column by organic and inorganic additives. **Journal of Chromatography, A**, v.666, n.1/2, p.181-191, 1994.
180. MIWA, T.; MIYAKAWA, T.; KAYANO, M.; MIYAKE, Y. Application of an ovomucoid-conjugated column for the optical resolution of some pharmaceutically important compounds. **Journal of Chromatography, A**, v.408, p.316-322, 1987.
181. ODA, Y.; ASAKAWA, N.; YOSHIDA, Y.; SATO, T. On-line determination and resolution of the enantiomers of ketoprofen in plasma using coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.10, n.1, p.81-87, 1992.
182. MANO, N.; ODA, Y.; ASAKAWA, N.; YOSHIDA, Y.; SATO, T.; MIWA, T. Studies of ovomucoid-, avidin-, conalbumin- and flavoprotein-conjugated chiral stationary phases for separation of enantiomers by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.687, n.2, p.223-232, 1994.
183. WANG, X.-J.; CAO, G.-F.; XU, S.-W. Enantiomeric separation of ketoprofen on an ovomucoid column. **Sepeu**, v.18, n.6, p.536-538, 2000.
184. ALLENMARK, S.; ANDERSSON, S. Optical resolution of some biologically active compounds by chiral liquid chromatography on BSA-silica (Resolvosil) columns. **Chirality**, v.1, n.2, p.154-160, 1989.
185. NOCTOR, T.A.G.; FELIX, G.; WAINER, I.W. Stereochemical resolution of enantiomeric 2-aryl propionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs on a human serum albumin based high-performance liquid chromatographic chiral stationary phase. **Chromatographia**, v.31, n.1/2, p.55-59, 1991.
186. WANG, H.; ZOU, H.; LU, M.; LI, R.; ZHANG, Y. Enantiomeric separation of drugs on human serum albumin column. **Fenxi Huaxue**, v.26, n.1, p.68-72, 1998.

187. BAEYENS, W.R.; VAN DER WEKEN, G.; HAUSTRAETE, J.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; CORVELEYN, S.; REMON, J.P.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; DEPREZ, P. Application of the restricted-access precolumn packing material alkyl-diol silica in a column-switching system for the determination of ketoprofen enantiomers in horse plasma. **Journal of Chromatography, A**, v.871, n.1/2, p.153-161, 2000.
188. MIWA, T.; MIYAKAWA, T.; MIYAKE, Y. Characteristics of an avidin-conjugated column in direct liquid chromatographic resolution of racemic compounds. **Journal of Chromatography, A**, v.457, p.227-233, 1988.
189. ODA, Y.; ASAKAWA, N.; ABE, S.; YOSHIDA, Y.; SATO T. Avidin protein-conjugated column for direct injection analysis of drug enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.572, n.1/2, p.133-141, 1991.
190. SMET, E.; STAELENS, L.; VANDER HEYDEN, Y.; BAEYENS, W.R.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; VAN DER WEKEN, G.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M. Optimization of the chiral separation of some 2-arylpropionic acids on an avidin column by modeling a combined response. **Chirality**, v.13, n.9, p.556-567, 2001.
191. MANO, N.; ODA, Y.; ASAKAWA, N.; YOSHIDA, Y.; SATO, T. Development of a flavoprotein column for chiral separation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.623, n.2, p.221-228, 1992.
192. MARLE, I.; KARLSSON, A.; PETTERSSON, C. Separation of enantiomers using α -chymotrypsin-silica as a chiral stationary phase. **Journal of Chromatography, A**, v.604, n.2, p.185-196, 1992.
193. HAGINAKA, J.; SEYAMA, C.; KANASUGI, N. The absence of chiral recognition ability in ovomucoid: ovoglycoprotein-bonded HPLC stationary phases for chiral recognition. **Analytical Chemistry**, v.67, n.15, p.2539-2547, 1995.
194. YAGI, M.; SHIBUKAWA, A.; NAKAGAWA, T. Direct injection analysis of ketoprofen enantiomers in plasma using column-switching high-performance liquid chromatography system. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.38, n.9, p.2513-2517, 1990.

195. ÔI, N.; KITAHARA, H.; AOKI, F.; KISU, N. Direct separation of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with amide and urea derivatives bonded to silica gel as chiral stationary phases. **Journal of Chromatography, A**, v.689, n.2, p.195-201, 1995.
196. BOISVERT, J.; CAILLÉ, G.; MCGILVERAY, I.J.; QURESHI, S.A. Quantification of ketoprofen enantiomers in human plasma based on solid-phase extraction and enantioselective column chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.690, n.1/2, p.189-193, 1997.
197. EICHHOLD, T.H.; BAILEY, R.E.; TANGUAY, S.L.; HOKE, II, S.H. Determination of (*R*)- and (*S*)-ketoprofen in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry following automated solid-phase extraction in the 96-well format. **Journal of Mass Spectrometry**, v.35, n.4, p.504-511, 2000.
198. PIRKLE, W.H.; WELCH, C.J.; LAMM, B. Design, synthesis, and evaluation of an improved enantioselective naproxen selector. **Journal of Organic Chemistry**, v.57, n.14, p.3854-3860, 1992.
199. PIRKLE, W.H.; WELCH, C.J. An improved chiral stationary phase for the chromatographic separation of underivatized naproxen enantiomers. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.15, n.11, p.1947-1955, 1992.
200. GRUBB, N.G.; RUDY, D.W.; HALL, S.D. Stereoselective high-performance liquid chromatographic analysis of ketoprofen and its acyl glucuronides in chronic renal insufficiency. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.678, n.2, p.237-244, 1996.
201. AL KATHEERI, N.A.; WASFI, I.A.; LAMBERT, M.; SAEED, A.; KHAN, I.A. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers after intravenous administration of racemate in camels: effect of gender. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.23, n.3, p.137-143, 2000.
202. BAEYENS, W.R.G.; VAN DER WEKEN, G.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; REYGAERTS, S.; SMET, E. Comparison of the enantiomeric separation of some 2-arylpropionic acids on a novel Pirkle-concept stationary packing by narrow-bore and conventional liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v.14, n.1, p.58-60, 2000.

203. LIANG, Y.; SONG, H.; FU, C.; ZHENG, W. Direct enantiomeric scale detection of some non-steroidal anti-inflammatory drugs by high performance liquid chromatography. **Fenxi Huaxue**, v.31, n.10, p.1253-1255, 2003.
204. CASTELLANI, L.; FLIEGER, M.; SINIBALDI, M. Enantiomer separation of 2-arylpropionic acids on an ergot alkaloid-based stationary phase microbore column application. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.17, n.17, p.3695-3703, 1994.
205. TERFLOTH, G.J.; PIRKLE, W.H.; LYNAM, K.G.; NICOLAS, E.C. Broadly applicable polysiloxane-based chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.705, n.2, p.185-194, 1995.
206. LEI, J.D.; TAN, T.W. Chiral separation of ketoprofen and thermodynamic study in molecular imprinting. **Acta Chimica Sinica**, v.60, n.7, p.1279-1283, 2002.
207. JIANG, J.G.; REN, J.C.; XU, L.X.; WANG, H.Y. Separation of racemic ketoprofen by molecularly imprinted polymer. **Fenxi Shiyanshi**, v.23, n.3, p.56-58, 2004.
208. NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Quando as variáveis são muitas. In: _____. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 2003. p.149-200.
209. BYLUND, D.; BERGENS, A.; JACOBSSON, S.P. Optimisation of chromatographic separations by use of a chromatographic response function, empirical modelling and multivariate analysis. **Chromatographia**, v.44, n.1/2, p.74-80, 1997.
210. SIOUFFI, A.M.; PHAN-TAN-LUU, R. Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography, A**, v.892, n.1/2, p.75-106, 2000.
211. NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Andando na superfície de resposta. In: _____. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 2003. p.251-300.
212. DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, n.4, p.214-219, 1980.

213. NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como modelar misturas. In: _____. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 2003. p.301-347.
214. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Ionic samples: reversed-phase, ion-pair and ion-exchange HPLC. In: _____. **Practical HPLC Method Development**. 2.ed. New York: John Wiley, 1997. p.293-349.
215. VAN DEEMTER, J.J.; ZUIDERWEG, F.J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, v.5, n.6, p.271-289, 1956.