

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**RESOLUÇÃO DE MISTURAS RACÊMICAS POR ACOPLAMENTO DE  
CRISTALIZAÇÃO A CROMATOGRAFIA EM LEITO MÓVEL**

**SIMULADO:**

**ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A PRODUÇÃO DE S-CETAMINA**

**Enga. Geórgia de Oliveira Figueiredo Barros**

Mestranda

**Prof. Dr. Everson Alves Miranda**

Orientador

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título  
de Mestre em Engenharia Química

Campinas, Abril de 2005

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	7/Unicamp
	B278r
V	EX
TOMBO BCI	64480
PROC.	16-P-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	22/06/05
Nº CPD	

Bibid: 35 3951

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

B278r

Barros, Geórgia de Oliveira Figueiredo

Resolução de misturas racêmicas por acoplamento de cristalização a cromatografia em leito móvel simulado: estudos fundamentais para a produção de *S*-cetamina / Geórgia de Oliveira Figueiredo Barros.--Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Everson Alves Miranda

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cristalização. 2. Enantiômeros. 3. Solubilidade. 4. Cetamina. 5. Enantiômeros – Separação. 6. Diagramas de fase. I. Miranda, Everson Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Resolution of racemic mixtures coupling crystallization and simulated moving bed chromatography: fundamental studies for *S*-ketamine production.

Palavras-chave em Inglês: Crystallization, Enantiomers, Solubility, Ketamine, Separation Enantiomers e Phase diagrams

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Cesar Costapinto Santana e Rosana Emi Tamagawa

Data da defesa: 25/04/2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

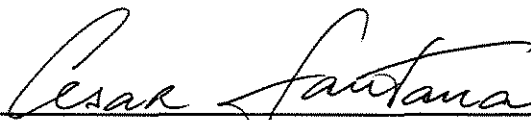
**Resolução de Misturas Racêmicas por Acoplamento de  
Cristalização a Cromatografia em Leito Móvel Simulado:  
Estudos Fundamentais para a Produção de S-Cetamina**

Dissertação de Mestrado defendida por Georgia de Oliveira Figueiredo Barros e aprovada em 25 de abril de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



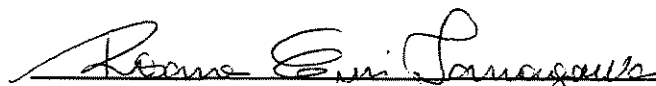
---

Prof. Dr. Everson Alves Miranda - Orientador



---

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana (titular)



---

Dr<sup>a</sup>. Rosana Emi Tamagawa (titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Geórgia de Oliveira Figueiredo Barros em 25 de abril de 2005.



---

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

À minha família, por tudo que sou.

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao Prof. Everson, pela presença constante, pela confiança, incentivo e amizade, e pelas possibilidades de crescimento profissional.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Cesar Santana pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto, por ceder o espectrofotômetro de infravermelho e a coluna cromatográfica, e pela participação na qualificação.

À Prof. Dra. Marisa Beppu pelas valiosas sugestões na qualificação.

À Cristália Produtos Farmacêuticos, pelo fornecimento dos enantiômeros puros e da mistura racêmica da cetamina.

Ao André pelas difrações de raios-X. Aos alunos do Laboratório de Biosseparações Marco Garcia, Vinícius, e especialmente Ivanildo, pela cooperação e por compartilharem os conhecimentos de cromatografia. À Rosana, ao Sérgio e à Ana pelas ajudas nas análises de infravermelho, na conversão do cloridrato e nas fotos dos cristais.

Aos colegas de laboratório Ana Paula, Cibele, Cristiane, Érika, Fabi, Goran, Igor, Isa, Ivanildo, Luciana, Mariana, Marina, Moysés, Paula, Rosana e Tashima pela convivência e boa vontade em todos os momentos. Àqueles que foram mais que colegas, obrigada pela companhia e amizade, pelas filosofias e alegrias, que tornaram leves as dificuldades.

Aos amigos Alex, Álvaro, Kathleen, Fernanda, Lauro, Lourdes, Lucy, Mário, Sérgio e Verônica, pelos momentos de descanso, pela diversão e por preencherem minha vida em Campinas.

Aos meus pais e irmãos pelo suporte incondicional.

Aos demais professores e funcionários da FEQ.

E a todos que, independentemente do trabalho, fizeram parte da minha vida neste período.

*“Sempre faço o que penso não conseguir,  
para aprender o que não sei.”*

Pablo Picasso

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>v</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>vi</b>
Letras latinas .....	vi
Siglas e abreviações .....	vi
<b>CAPÍTULO 01: INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Escopo .....	1
1.2. Relevância da produção de isômeros puros .....	2
1.3. Metodologias de resolução de misturas racêmicas .....	4
1.3.1. Leito móvel simulado (LMS) .....	4
1.3.2. Cristalização .....	5
1.4. Cetamina .....	7
1.5. Colocação do problema .....	8
1.6. Objetivo .....	9
1.7. Etapas do trabalho .....	10
<b>CAPÍTULO 02: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
2.1. Métodos de resolução de misturas racêmicas .....	12
2.1.1. Cristalização por formação de diastereômeros .....	12
2.1.2. Cristalização de misturas racêmicas parcialmente resolvidas .....	13
2.2. Caracterização do tipo de cristal formado .....	17
2.3. Diagramas de solubilidade .....	20
2.4. Acoplamento de cristalização a cromatografia em leito móvel simulado .....	23
2.5. Solubilidade e força motriz para cristalização .....	24



<b>CAPÍTULO 03: MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Cetamina e demais reagentes .....	27
3.1.1. Recuperação dos isômeros.....	27
3.1.2. Transformação dos isômeros da forma de cloridrato para a forma base.....	28
3.2. Difração de raios-X.....	29
3.3. Espectroscopia de infravermelho .....	29
3.4. Determinação de solubilidade.....	30
3.5. Cinética de solubilidade .....	30
3.6. Cinética de cristalização.....	31
3.7. Determinação do ponto eutético .....	31
3.8. Determinação do diagrama de fases.....	32
3.9. Ensaio de cristalização em batelada .....	32
3.10. Análises quantitativas e qualitativas por CLAE .....	33
<b>CAPÍTULO 04: RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
4.1. Caracterização do tipo de cristal formado.....	35
4.1.1. Espectroscopia de infravermelho .....	36
4.1.2. Difração de raios-X .....	38
4.1.3. Determinação de solubilidade.....	41
4.2. Determinação do diagrama de solubilidade .....	44
4.2.1. Experimentos preliminares.....	44
4.2.2. Determinação do ponto eutético.....	47
4.2.3. Determinação do diagrama de solubilidade.....	49
4.3. Ensaio de cristalização em batelada .....	52
<b>CAPÍTULO 05: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>57</b>
5.1. Conclusões .....	57
5.2. Sugestões para trabalhos futuros .....	58
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## RESUMO

A separação de enantiômeros em altos níveis de pureza enantiomérica é atualmente um requerimento da indústria farmacêutica. No entanto, altas purezas estão sendo alcançadas neste sistema com comprometimento da produtividade. O acoplamento do leito móvel simulado (LMS) a uma etapa de cristalização pode resultar num processo de maior produtividade global. A escolha do método de cristalização para a resolução de misturas racêmicas por cristalização é dependente do tipo de cristal (conglomerado ou composto racêmico) e da localização do ponto eutético no diagrama de solubilidade. O ponto eutético define a mínima pureza enantiomérica que deve ser fornecida pelo LMS para assegurar que a cristalização irá produzir somente um dos enantiômeros puros.

A cetamina é um anestésico que possui um isômero R com indesejáveis efeitos colaterais. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de conhecimento básico (identificação do tipo de racemato e seu ponto eutético no diagrama de solubilidade) para o acoplamento do LMS a uma etapa de cristalização a fim de produzir o isômero S da cetamina em pureza enantiomérica e produtividade alta.

Para caracterizar a natureza cristalina da cetamina, difração de raios-X e espectroscopia de infravermelho da mistura racêmica e dos enantiômeros puros foram realizados e as curvas de solubilidade em função da temperatura foram determinadas. As diferenças entre os difratogramas de raios-X, dos espectros de infravermelho e entre as inclinações das curvas de solubilidade dos enantiômeros puros e da mistura racêmica indicaram a formação de composto racêmico. O diagrama parcial de equilíbrio de fases foi construído e a razão R:S do ponto eutético foi determinada (75:25). Os ensaios de cristalização em batelada com soluções de proporção inicial S:R de 80:20 foram realizados a 25°C em reatores encamisados (volumes de 20 e 30 mL), a concentrações iniciais entre 150 g/L e 250 g/L. No estágio atual da pesquisa, rendimento e produtividade foram 71,91% e 6,51 g/(L h). Para todas as condições, cristais de S-cetamina com 100% de pureza enantiomérica foram obtidos.

## ABSTRACT

The resolution of enantiomers to high levels of enantiomeric purity is presently a requirement in the pharmaceutical industry. However, high purities are reached with this system at the expenses of productivity. Coupling of simulated moving bed (SMB) to a crystallization step can result in a process with a overall higher productivity. The choice of crystallization method for the resolution of racemic mixtures is dependent on the crystal type (conglomerate or racemic compound) and on the location of the eutetic point on the solubility diagram. Eutectic point is the minimum enantiomeric purity that has to be delivered by the SMB to assure that crystallization will produce just one pure isomer.

Ketamine is a anesthetic that has a R-isomer with undesirable side-effect. The objective of this work was the development of basic knowledge for a process (identification of the type of racemate and its eutetic point in the solubility diagram) coupling the SMB to a crystalization step in order to produce the S-isomer of ketamine at high enantiomeric purity and productivity.

To characterize the crystalline nature of ketamine, X-ray diffraction and infrared spectroscopy of the racemic mixture and pure enantiomers were performed and the solubility curve as a function of temperature was built. The difference between powder X-ray patterns, infrared spectra, and solubility curve slopes of the pure enantiomers and the racemic mixture indicated racemic compound formation. The partial equilibrium phase diagram was constructed and the R:S ratio of the eutectic point was determined (75:25). Batch crystallization assays with initial S:R enantiomeric ratio of 80:20 was carried out at 25°C in a double walled close glass container (volume 20 or 30 mL), at initial concentration between 150 and 250 g/L. At the present stage of this research, yield and productivity were 71,91% and 6,51 g/L h. For all conditions, 100% enantiomeric pure S-ketamine crystals were obtained.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1 – Esquema dos tipos de cristais gerados pela cristalização da mistura racêmica. ....	6
Figura 1.2 – Estrutura dos enantiômeros da cetamina. ....	7
Figura 1.3 - Acoplamento de LMS e cristalização na produção de enantiômeros puros.....	9
Figura 2.1 – Representação esquemática dos diagramas de solubilidade ternários a temperatura constante para os casos de isômeros que formam conglomerados ou compostos racêmicos.....	15
Figura 2.2 – Representação esquemática dos diagramas de ponto de fusão para os casos de isômeros que formam conglomerados ou compostos racêmicos.....	17
Figura 3.1 – Amostras de cetamina fornecidas pela Cristália: enantiômero R, mistura racêmica e enantiômero S.....	28
Figura 4.1 – Espectro de infravermelho ATR da mistura racêmica e do enantiômero S-cetamina obtidos com filme formado sobre o elemento de ATR (cristal de germânio).....	37
Figura 4.2 – Difrátogramas de raios-X da mistura racêmica e do enantiômero S-cetamina.....	40
Figura 4.3 - Cinéticas de solubilidade da cetamina: mistura racêmica; enantiômero S e enantiômero R a 5°C e a 25°C. ....	42

Figura 4.4 – Solubilidade em etanol anidro da mistura racêmica de cetamina, <i>S</i> -cetamina e <i>R</i> -cetamina.....	43
Figura 4.5 – Curvas de calibração da mistura racêmica de cetamina. Comprimento de onda de 254 nm e 245 nm.....	45
Figura 4.6 – Determinação do tempo de equilíbrio da cristalização de soluções com proporções dos enantiômeros R:S de 80:20 a 25°C.....	48
Figura 4.7 – Diagramas de equilíbrio do sistema <i>R</i> -cetamina/etanol/ <i>S</i> -cetamina a 25°C representados nas formas triangular e retangular.....	50
Figura 4.8 – Cristais formados por cristalização em batelada de 20 mL a 25°C sob agitação magnética.....	53
Figura 4.9 – Cristais formados por cristalização em batelada de 20 mL a 25°C sob agitação magnética.....	54
Figura 4.10 – Cristais formados por cristalização em batelada de 30 mL a 25°C sob agitação mecânica de 260 rpm.....	56

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 4.1 – Principais ângulos de varredura da difração de raios-X para o enantiômero S-cetamina e a mistura racêmica.....	39
Tabela 4.2 – Composição dos cristais formados por soluções de proporção inicial 75:25 de R:S a 25°C.....	49
Tabela 4.3 – Parâmetros operacionais dos ensaios de cristalização de soluções de proporção inicial 80:20 de S:R a 25°C.....	52

## NOMENCLATURA

### Letras latinas

E = ponto eutético

c = concentração da solução supersaturada

c\* = concentração da solução saturada

R<sup>2</sup> = coeficiente de correlação

### Siglas e abreviações

LMS = leite móvel simulado

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

RPB = recuperação e purificação de bioprodutos

LEBp = Laboratório de Engenharia de Bioprocessos

FEQ = Faculdade de Engenharia Química

DPB = Departamento de Processos Biotecnológicos

DSC = calorimetria diferencial de varredura

CGL = cromatografia gás-líquido

LMAF-Dimet = Laboratório de Metalografia e Análises de Falhas da Divisão de  
Metalurgia

IPT = Instituto de Pesquisas Tecnológicas

ATR = reflexão total atenuada

MCTA = triacetato de celulose microcristalina

## CAPÍTULO 01

### INTRODUÇÃO

#### 1.1. Escopo

O escopo deste projeto é a aplicação de princípios de Engenharia Química, especificamente técnicas de recuperação e purificação (ou "downstream processing") na produção de fármacos. Frequentemente, números elevados de operações seqüenciais são necessários até que o nível de pureza requerido para a aplicação de um produto seja atingido, sendo que maiores níveis de pureza são exigidos no caso de moléculas aplicadas como fármacos.

Este trabalho é complementar a outras pesquisas de precipitação e cristalização que vêm sendo desenvolvidas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) da FEQ-UNICAMP, sob coordenação do Prof. Dr. Everson A. Miranda, que incluem uso de eletrólitos voláteis na precipitação e cristalização de proteínas, estudos de determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos de cristalização de proteínas baseado no tempo de indução e monitoramento espectroscópico de supersaturação de proteínas em cristalização. Trata-se também de uma colaboração com o Laboratório de Biosseparações do DPB-FEQ-UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana, que vem, de forma pioneira em nosso país, desenvolvendo a tecnologia de leito móvel



simulado (LMS) aplicada a bioprocessos e produtos farmacêuticos, já tendo alcançado êxito importante na resolução de mistura racêmica da cetamina.

## 1.2. Relevância da produção de isômeros puros

A história da isomeria ótica pode ter seu começo traçado em 1815, o ano no qual o físico francês Jean Baptiste Biot descobriu o fenômeno da atividade ótica: a habilidade de uma substância desviar o plano de polarização da luz. Em seguida, Louis Pasteur fez uma série de observações que o levaram a uma proposta significativa: a atividade ótica observada em certas substâncias orgânicas é uma consequência da sua assimetria molecular que produz substâncias com imagens especulares não-superponíveis (Sheldon, 1993). Em 1848, Pasteur descobriu que o ácido tartárico sintetizado se diferenciava daquele obtido a partir de plantas porque o primeiro se cristalizava em duas formas, versões de duas imagens especulares, ou enantiômeros (Cartwright *et al.*, 2004).

Dá-se o nome de compostos quirais a moléculas que apresentam centros assimétricos gerando assim isômeros cujas imagens especulares não são passíveis de superposição. Cada um destes isômeros também é chamado de enantiômero. Uma das configurações é denominada R (do latim *rectus*, direito) e a outra é denominada S (do latim *sinister*, esquerdo). Misturas equimolares destas duas moléculas são chamadas de misturas racêmicas (Sheldon, 1993). Os enantiômeros compartilham as mesmas propriedades físicas, exceto a sua influência na rotação da luz polarizada, isto é, eles são opticamente ativos e idênticos quimicamente, exceto quando reagem com outros compostos quirais. Todos os aminoácidos, com exceção da glicina, são quirais; os componentes essenciais da vida (proteínas, carboidratos e DNA) são construídos a partir de componentes opticamente ativos. Todavia, é notável (embora não seja ainda totalmente compreendido) que, ao contrário das moléculas sintetizadas artificialmente, todos os aminoácidos naturalmente encontrados em organismos vivos possuem a mesma orientação ótica (Juza *et al.*, 2000).

A talidomida é um fármaco quiral que, na década de 60, foi administrado para mulheres grávidas como mistura racêmica (isto é, uma mistura dos enantiômeros em proporções iguais). Depois de um tempo, foi percebido que somente um dos enantiômeros é benéfico e ao outro foi creditada a responsabilidade por má-formações fetais e outros defeitos de nascimento (Juza *et al.*, 2000).

Apesar do conhecimento do papel da estereoquímica existir desde o início da terapia com drogas farmacológicas, Blumenstein (1997) afirma que apenas nos anos 90 se intensificou o interesse na produção de isômeros puros devido a um crescente rigor na validação de processos, em parte pelos avanços nos métodos analíticos estereossensitivos.

A ação biológica desejada em um composto racêmico é a do enantiômero chamado eutômero. A ação do outro isômero, o distômero, é variada. Existem distômeros que não exercem efeitos colaterais. Como exemplo, o S-propranolol, um beta-bloqueador utilizado em controle de hipertensão, é 130 vezes mais ativo que o R-propranolol, o que significa que este último, em termos práticos, é inativo. No caso da cetamina, enquanto a S-cetamina tem efeitos anestésicos sendo empregada em cirurgias, o distômero (*R*-cetamina) possui propriedades indesejáveis – efeitos alucinógenos e agitação. Um terceiro caso é aquele em que os dois isômeros apresentam valores terapêuticos independentes, como no caso do propoxifeno. O dextropropoxifeno ((2R,3S)-(+)-dextropropoxifeno) é um analgésico ao passo que o levopropoxifeno ((2S,3R)-(-)-levopropoxifeno) é um antitussígeno (Sheldon, 1993).

O processamento de compostos quirais possui um importante papel na indústria de fármacos e de pesticidas, sendo que a separação de enantiômeros em altos níveis de pureza é uma necessidade da indústria farmacêutica.

Cerca de 40% de todos os fármacos vendidos em 2000 eram enantiômeros puros (Stinson, 2001). De acordo com Schroer *et al.* (2001), o mercado mundial de drogas quirais em 1998 foi de cerca de 96 bilhões de dólares. Seguindo uma tendência de crescimento, somente os fármacos constituídos por

um único enantiômero movimentaram 133 bilhões de dólares em 2001 e estima-se que as vendas mundiais de drogas quirais atingirão 200 bilhões de dólares em 2008 (Stinson, 2001).

### **1.3. Metodologias de resolução de misturas racêmicas**

A produção de enantiômeros puros pode se dar através da síntese de uma mistura racêmica da qual se separa o composto de interesse ou pela síntese assimétrica, quando apenas um dos enantiômeros é produzido. Rekoske (2001) afirma que, apesar da síntese assimétrica possuir a limitação de baixos rendimentos e do desafio representado pelo desenvolvimento de métodos de separação de enantiômeros ser menor que o representado pela síntese enantioselectiva, estas diferentes rotas são competitivas entre si e as questões econômicas envolvidas numa decisão final não são elementares. Por outro lado, segundo Profir *et al.* (2002), os métodos mais efetivos em termos de custo para a produção de enantiômeros puros são os métodos de produção de racêmicos com posterior resolução desta mistura.

Dentre as metodologias de separação dos enantiômeros puros a partir de uma mistura racêmica estão os métodos de cristalização, de resoluções cinéticas, métodos de combinação de resolução cinética e reação, métodos baseados em membranas líquidas e métodos cromatográficos. No entanto, a cristalização, juntamente com a adsorção, são os dois métodos mais importantes para produção de enantiômeros puros, inclusive no aspecto custo (Profir *et al.*, 2002; Schroer, 2001; Crosby, 1997).

#### **1.3.1. Leito móvel simulado (LMS)**

O leito móvel simulado é um sistema cromatográfico contínuo que simula o movimento do leito (fase estacionária) relativo à fase líquida através do uso de colunas cromatográficas posicionadas de maneira a formar um sistema cíclico dividido em quatro seções. Entre cada uma das seções, válvulas automáticas

controlam e mudam seqüencialmente as entradas e saídas alternadas de tampão de alimentação, refinado, eluição e extrato. Além de possibilitar alimentação contínua, este sistema propicia gradientes de concentração mais altos entre as fases sólida e líquida, o que facilita a transferência de massa, aumentando assim a eficiência no uso do adsorvente (Lim *et al.*, 1995). Aplicações de LMS existem em processamento de fármacos, cosméticos, em química fina e na indústria de perfumes.

Na indústria farmacêutica, o destaque do uso de LMS é na separação de enantiômeros. Existem relatos de separações a altas purezas e em quantidades convenientes para testes clínicos e até mesmo em escala de produção comercial (Juza *et al.*, 2000). As variedades de fases estacionárias capazes de realizar separações de moléculas quirais produzidas pela indústria farmacêutica faz do LMS uma área de pesquisa extremamente fértil e de potencial ainda não totalmente explorado.

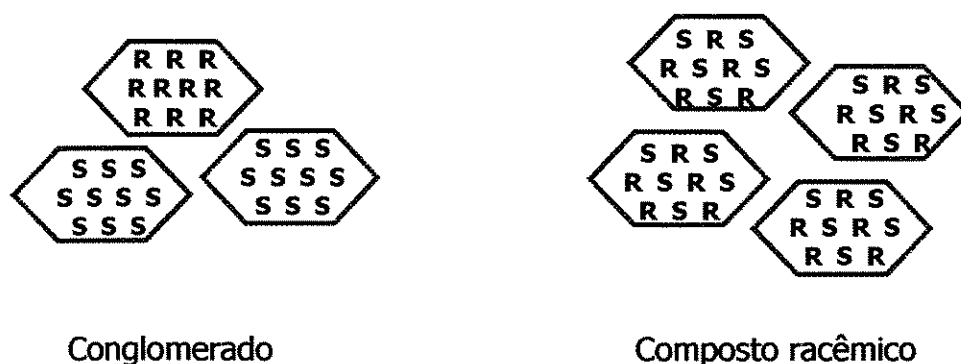
No entanto, algumas limitações do LMS existem e têm sido contornadas. Uma vez que o alto custo de operação pode ser compensado devido ao contexto técnico-econômico global do processo, uma limitação desta tecnologia que necessita de atenção é que, apesar de ser capaz de produzir um dos enantiômeros altamente purificado, a alta pureza neste sistema é conseguida com comprometimento de produtividade.

### **1.3.2. Cristalização**

Em 1990, a venda anual de 12 produtos quirais obtidos puros por cristalização somou a quantia de mais de 9 bilhões de dólares (Sheldon, 1993). Levando-se em consideração o aumento de 50 para 75% dos produtos quirais no conjunto dos produtos farmacêuticos desde 1990, o valor de venda destes 12 produtos deve se situar hoje na casa dos 14 bilhões de dólares.

No entanto, a resolução de misturas racêmicas por cristalização é considerada ainda longe de ser preditiva. A escolha do método de cristalização, (entre diferentes métodos diretos e indiretos) para separação de um determinado

produto é dependente do tipo de cristal que é gerado quando uma mistura racêmica é cristalizada (Figura 1.1). Conglomerado é o nome dado para o produto desta cristalização constituído por cristais individuais das formas R e S; é, assim, uma mistura dos dois cristais. Compostos racêmicos são o resultado da cristalização a partir de misturas racêmicas quando um só tipo de cristal é gerado - ambas as formas S e R estão presentes na rede cristalina do cristal. Cerca de 10% dos compostos orgânicos formam conglomerados e os 90% restantes, compostos racêmicos (Jacques *et al.*, 1981).



**Figura 1.1** – Esquema dos tipos de cristais gerados pela cristalização da mistura racêmica.

Racematos que formam conglomerados podem ser resolvidos por cristalização direta: uma das formas cristalizará se a fase líquida for supersaturada e semeada com cristais desta forma específica. Por outro lado, substâncias que formam compostos racêmicos, ao terem suas soluções supersaturadas, irão gerar cristais que não separam as formas R e S. Assim, há o impedimento do uso de cristalização direta para o caso da formação de compostos racêmicos. No entanto, a resolução parcial de racematos que formam compostos racêmicos por um método adequado como a cromatografia, permite que a cristalização direta seja aplicada à resolução destas misturas racêmicas.

A cristalização direta é preferível em termos de custo efetivo quando comparada com os outros processos de cristalização por, principalmente, um ponto específico: não se trata de um processo multietapas (Profir *et al.*, 2002). Uma vez que os outros processos tratam da transformação do produto a ser cristalizado em um segundo composto através da introdução de reagentes diversos e a cristalização direta não, esta última técnica é vantajosa por gerar cristais mais puros que não necessitam de processamento posterior.

Assim, a determinação do tipo de mistura racêmica que forma uma determinada molécula quiral é essencial para que se possa projetar um processo de resolução via cristalização.

#### 1.4. Cetamina

A cetamina, como já foi mencionado, tem importante aplicação farmacêutica. Este anestésico quiral tem se mostrado útil em procedimentos diagnósticos e cirurgias superficiais de curta duração que precisam de intensa analgesia (como a troca de curativos em grandes queimados) (Wannmacherl, 1998). No entanto, segundo Nishizawa *et al.* (2000) em doses similares às usadas para anestesia, efeitos psíquicos indesejáveis, como ilusões, sonhos não usuais ou delírios são mais comumente seguintes à administração da *R*-cetamina, que do racemato ou da *S*-cetamina em humanos.

Trata-se por cetamina o composto (*R/S*)-2-(2-clorofenil)2-metilamino ciclohexanona (Figura 1.2).



Figura 1.2 – Estrutura dos enantiômeros da cetamina.

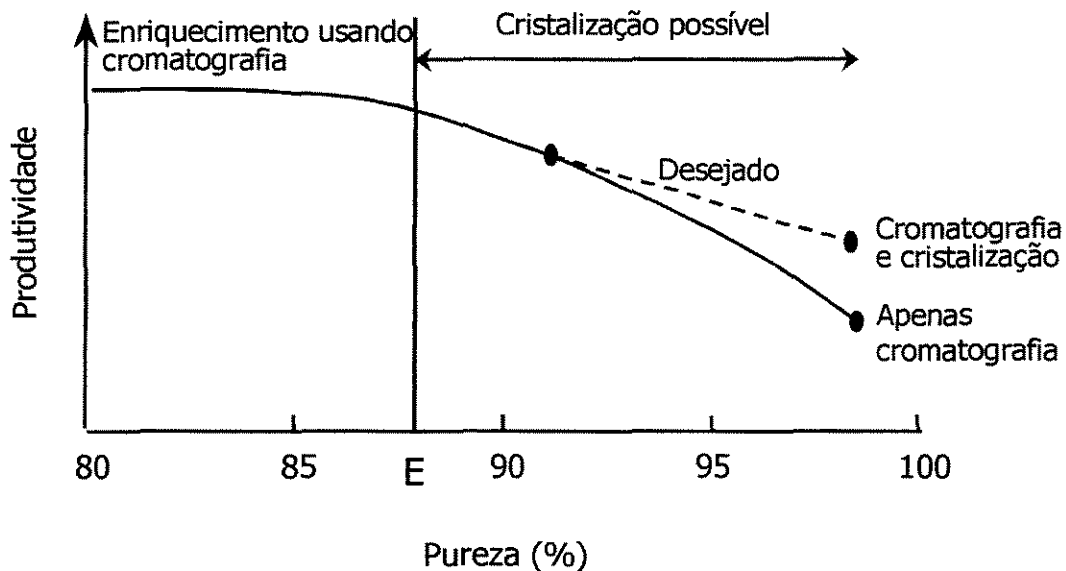
A cetamina é um produto relativamente caro: o preço da S-cetamina grau reagente é equivalente à cerca de US\$ 50.000,00/kg (catálogo Sigma, 2000-2001). Seu cloridrato (forma em que é comercializada) é um pó branco cristalino, sendo 1,15 mg do hidrocloreto de cetamina equivalente a 1 mg de cetamina base. Segundo farmacopéias, apresenta solubilidade (m/v) de 1 em 4 de água, 1 em 14 de álcool, 1 em 60 de álcool anidro e clorofórmio, 1 em 6 de álcool metílico, e é praticamente insolúvel em éter (Reynolds, 1989). A solução formada pela dissolução de 1 g em 5 mL de água é límpida e incolor. Possui massa molecular de 274,2, ponto de fusão entre 258 e 261°C, e pH entre 3,5 e 4,1 numa solução 1:10 (USP, 1985).

### 1.5. Colocação do problema

A cromatografia em LMS tem caminhado na direção de se tornar a operação padrão na separação de enantiômeros, independentemente da propriedade da molécula formar conglomerados ou compostos racêmicos quando cristalizada. No entanto, altas purezas só são alcançadas com este sistema com comprometimento da produtividade. Lorenz *et al.* (2001), baseado no trabalho pioneiro de Lim *et al.* (1995), demonstraram que cristalização pode ser uma operação unitária adicionada à jusante de uma etapa de LMS para se ter um processo global de alta pureza mas com produtividade mais alta que no caso do uso de apenas LMS, como esquematizado na Figura 1.3. Nesta figura, a linha contínua representa a variação da produtividade com a pureza desejada, que é decrescente. Idealmente, o emprego de LMS para se produzir um produto de pureza acima do ponto eutético (E) e o uso de cristalização do enantiômero enriquecido pode gerar produto de alta pureza com produtividade acima daquela obtida apenas com LMS.

Este ganho em produtividade no processo conjunto é função de se poder operar o LMS a uma pureza de extrato mais baixa que, no entanto, possui um valor crítico mínimo, o ponto eutético. Para saber se o acoplamento de cristalização a cromatografia pode ser utilizado, é necessário conhecer o diagrama

de fases do composto em questão. A posição do ponto eutético no diagrama de equilíbrio sólido-líquido fornecerá a concentração mínima que deverá ser atingida pela etapa de leito móvel simulado.



**Figura 1.3** - Acoplamento de LMS e cristalização na produção de enantiômeros puros (adaptado de Lorenz *et al.*, 2001)

No entanto, cristalização de misturas de composição acima do ponto eutético não é garantia de ganho de produtividade global. Esta precisa ser determinada com a realização de experimentos de cristalização partindo-se de soluções com proporções dos compostos S e R acima do ponto eutético. No caso da cetamina, ao nosso conhecimento, não há relatos na literatura de diagrama de solubilidade, nem a informação se esta forma conglomerado ou composto racêmico após cristalização em etanol.

## 1.6. Objetivo

Este trabalho visou a obtenção de informações fundamentais para a etapa de cristalização a ser acoplada a jusante do LMS no processo de produção de S-cetamina. Para tal, foram realizadas as seguintes etapas:



- Caracterização do sistema S-cetamina/etanol/R-cetamina quanto ao tipo de cristal formado;
- Determinação do diagrama de solubilidade para este sistema;
- Estimativa de rendimento e produtividade da etapa de cristalização.

Através do diagrama de fases, pode ser definida a pureza mínima a ser fornecida pelo LMS para que, sob condições de supersaturação, se tenha somente a formação de cristais de S-cetamina. O rendimento e a produtividade da cristalização, além de avaliarem esta etapa especificamente, possibilitam o cálculo da produtividade do processo global.

### 1.7. Etapas do trabalho

Executou-se esta pesquisa em quatro etapas. A primeira etapa consistiu na caracterização do sistema e seus componentes através do estudo da solubilidade, espectroscopia de infravermelho e difração de raios-X. As solubilidades dos enantiômeros puros e da mistura racêmica foram determinadas a diferentes temperaturas. As comparações tanto dos valores de solubilidade, como da superposição de espectros de infravermelho e dos difratogramas de raios-X, indicaram o tipo de sistema formado.

Em uma segunda etapa, a localização do ponto eutético no diagrama foi realizada de forma preliminar para orientar os experimentos de determinação de pontos de equilíbrio. Devido a pouca disponibilidade dos isômeros puros, e sabendo-se que o diagrama de solubilidade na faixa entre o racemato e o enantiômero S é sempre simétrico à faixa entre o racemato e o enantiômero R, determinou-se o diagrama parcial utilizando-se soluções com excesso de R. A análise de composição via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos cristais obtidos a partir de misturas de altas proporções de R revelou a presença apenas da forma R para determinadas proporções R:S iniciais. Quando se notou a presença dos dois enantiômeros nos cristais formados, teve-se a indicação de que a mistura estava abaixo do ponto eutético.

A terceira etapa da pesquisa compreendeu a coleta de dados de equilíbrio para a determinação do diagrama parcial de equilíbrio de fases para outras proporções R:S diferentes das determinadas na etapa anterior. Com a determinação da concentração de solvente e a proporção de S e R na fase líquida, foi possível a obtenção de um ponto da curva de solubilidade no diagrama de fases. Cada mistura com proporção inicial específica de S e R resultou em um ponto do diagrama.

A quarta e última etapa constou da cristalização de misturas artificiais ricas em S-cetamina com proporção deste enantiômero acima do ponto eutético. Rendimento e produtividade foram estimados.

## CAPÍTULO 02

### REVISÃO DE LITERATURA

#### **2.1. Métodos de resolução de misturas racêmicas**

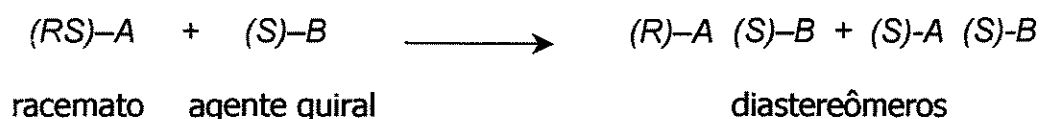
Existem dois tipos de cristais de racematos. Os conglomerados, que são simples justaposições de cristais dos dois enantiômeros, são relativamente raros. Encontrados com maior frequência, os compostos racêmicos são os casos cujos cristais contêm os dois enantiômeros em proporções iguais. Segundo Secor (1963), uma vez que a composição racêmica é o estado de máxima entropia, todas as outras composições tenderão a mudar espontaneamente na direção da razão 1:1 dos isômeros. Os métodos de cristalização por formação de diastereômeros e de misturas racêmicas parcialmente resolvidas, descritos a seguir, são operados segundo este fenômeno.

##### **2.1.1. *Cristalização por formação de diastereômeros***

Do ponto de vista prático, é muito importante se o racemato forma ou não um conglomerado, uma vez que este é suscetível à cristalização direta: uma das formas cristalizará se a fase líquida for supersaturada e semeada com cristais desta forma específica. Se o composto não forma conglomerados, diferentes métodos, tais como formação de sais com ácidos ou bases aquirais e formação de

diastereômeros, transformam a substância em misturas racêmicas que formam conglomerados, para que se possa realizar a cristalização direta (Sheldon, 1993).

O método mais comum de resolução de compostos racêmicos é a formação de sais diastereoméricos a partir de enantiômeros e outro agente quiral. É a chamada resolução clássica (Schroer *et al.*, 2001). Quando um ácido racêmico A é combinado com uma base opticamente pura B, uma mistura de dois sais diastereoméricos, cujas propriedades físicas se diferem, é formada:



Estas misturas são, portanto, suscetíveis à separação por métodos físicos como a cristalização. Análogo à cristalização direta de misturas enantioméricas, um conhecimento da forma do diagrama de fases das misturas diastereoméricas é um guia essencial para a resolução (Sheldon, 1993). É estimado que 20 a 25% dos diastereômeros em solução possuem diagrama de fases com somente um eutético (Schroer *et al.*, 2001).

Samant e Chandalla (1985) utilizaram cristalização por formação de diastereômeros e apresentaram dados experimentais de diagramas de fases para os conglomerados formados. Diagramas de fase sólido-líquido experimentais para conglomerados também foram apresentados por Wang *et al.* (2002) e Wang *et al.* (2003).

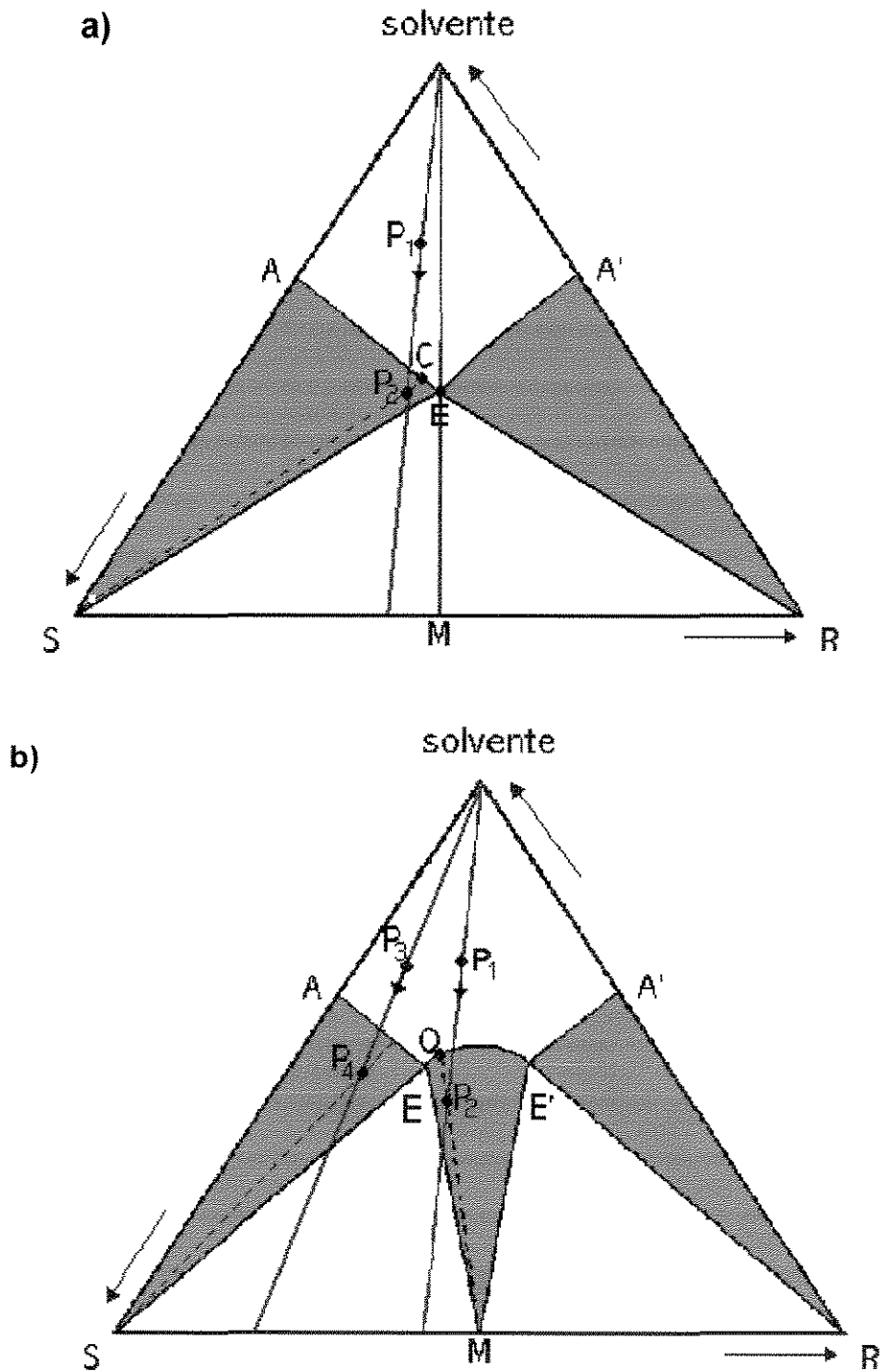
### **2.1.2. Cristalização de misturas racêmicas parcialmente resolvidas**

A cristalização direta é preferível em termos de custo efetivo quando comparada com os outros processos de cristalização por, principalmente, um ponto específico: não se trata de um processo multietapas (Profir *et al.*, 2002). Segundo Wang *et al.* (2003), apesar da cristalização direta poder somente ser aplicada para conglomerados e não ser adequada para compostos racêmicos, ela

ainda é possível de ser aplicada para purificar misturas de compostos racêmicos parcialmente resolvidos.

A cristalização de uma mistura parcialmente resolvida, sob condições de equilíbrio, irá gerar ou um enantiômero puro, ou um racemato, dependendo da sua composição. Com a finalidade de saber se uma mistura de composto racêmico parcialmente resolvida pode ser enriquecida por cristalização, é necessário conhecer a forma exata do diagrama de fases.

A solubilidade é freqüentemente invocada para explicar o enriquecimento enantiomérico obtido através da cristalização de misturas parcialmente resolvidas. Estas cristalizações, por envolverem mudanças de composição, formação e desaparecimento de fases, podem ser representadas nos diagramas de fases sólido-líquido, que serão diferentes para conglomerados e compostos racêmicos. Diagramas de fases triangulares para o caso de misturas parcialmente resolvidas estão apresentados esquematicamente na Figura 2.1. Nestes diagramas triangulares, as composições podem ser representadas por pontos dentro de um triângulo, sendo que cada ponto representa uma composição única e cada vértice do diagrama representa os respectivos componentes puros (Hougen *et al.*, 1964). As frações molares dos três componentes de um sistema ternário somadas equivalem a uma unidade. Assim, se as distâncias de um ponto dentro do triângulo equilátero às laterais forem medidas paralelamente, a soma delas é igual à extensão de um dos lados do triângulo, o que completa uma unidade (Atkins, 1986). Cada uma das três possíveis misturas binárias é representada por uma das linhas laterais e a área acima da isoterma de saturação até o vértice representante do solvente puro representa as soluções insaturadas (Mersmman, 2001). Uma importante propriedade do diagrama triangular se refere à linha reta que une um vértice a um ponto na lateral oposta. Tratando-se da linha que une o vértice correspondente ao solvente puro à lateral oposta, qualquer ponto nesta linha apresenta a mesma proporção dos dois enantiômeros, podendo ser utilizada para demonstrar mudança de composição no sistema por adição ou retirada de solvente.



**Figura 2.1** – Representação esquemática dos diagramas de solubilidade ternários a temperatura constante para os casos de isômeros que formam conglomerados (a) ou compostos racêmicos (b). As áreas cinzas correspondem às composições que levam à cristalização de um dos enantiômeros puros ou da mistura racêmica.

No caso de racematos que formam conglomerados (Figura 2.1a), uma mistura de composição  $P_1$ , ao ser submetida a uma evaporação do solvente, terá sua concentração modificada no sentido da seta representada no diagrama esquemático. Após se passar a curva de solubilidade AE, será gerada uma mistura com cristais puros do enantiômero S e uma solução enriquecida, relativamente à inicial, no enantiômero R. Por exemplo, na condição  $P_2$ , têm-se os cristais de S em equilíbrio com uma solução de composição C. Se a solução inicial for uma mistura racêmica, após a remoção do solvente ela atingirá a composição E, o ponto eutético. Quando mais solvente é removido depois do sistema atingir a composição E, a quantidade de solução decresce, mas sua composição permanece constante (Atkins, 1986). Nota-se que este ponto possui a menor proporção de solvente em relação à massa total do sistema, que qualquer outro ponto da curva de solubilidade, o que significa a solução em equilíbrio de maior concentração. Continuando a concentração do sistema, ocorre a sua solidificação, com a formação de ambos os cristais (S e R). Desta forma, a menos que se tenha uma mistura de concentração igual à do ponto eutético, antes da formação de uma fase única (sólida), sempre se formarão cristais de um só enantiômero quando se fizer a remoção do solvente de uma solução contendo os dois enantiômeros.

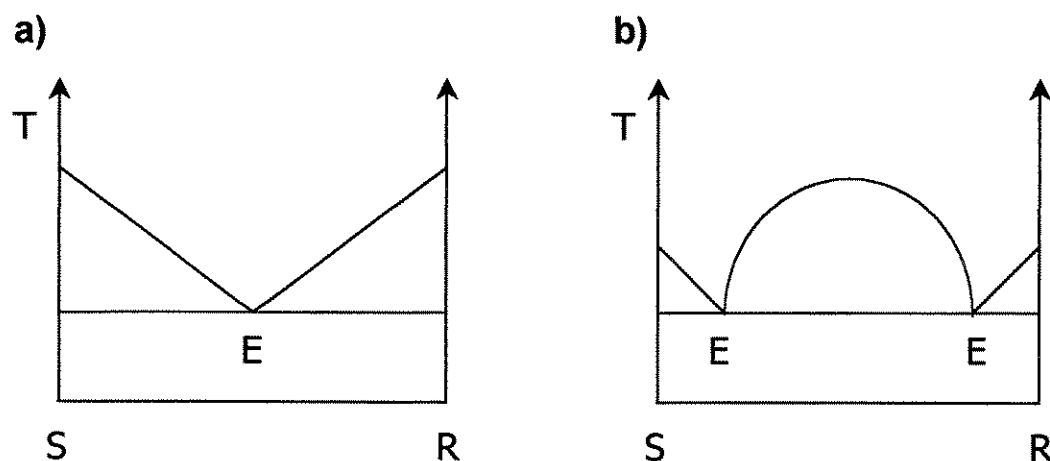
Já substâncias que formam os compostos racêmicos possuem um diagrama mais complexo com a existência de dois pontos eutéticos (Figura 2.1b), o que faz necessário que se tenha uma mistura inicial de composição de um dos enantiômeros acima de um dos pontos eutéticos para que este seja cristalizado puro. Um sistema de composição  $P_3$  irá gerar, após concentração além da linha AE, uma mistura de composição  $P_4$ , que contém cristais do composto S em equilíbrio com uma solução enriquecida de R em relação à solução inicial. Por outro lado, se o sistema não tem excesso em um dos componentes acima de um dos pontos eutéticos, enantiômeros puros não serão formados. Neste caso, partindo-se do mesmo ponto  $P_1$ , e realizando-se a evaporação do solvente, após se atingir a curva EE', haverá a formação da mistura racêmica. No ponto  $P_2$ , ocorre a formação de cristais de M, em equilíbrio com a solução O.

Assim, a determinação do tipo de mistura racêmica que forma uma determinada molécula quiral é essencial para que se possa projetar um processo de resolução via cristalização.

## 2.2. Caracterização do tipo de cristal formado

A escolha do método de resolução, assim como suas probabilidades de sucesso, dependem do tipo ao qual o racemato pertence no estado sólido. Essas considerações conferem importância para a caracterização dos cristais do racemato (Jacques *et al.*, 1981).

De acordo com Sheldon (1993), as duas classes de racematos, conglomerados e compostos racêmicos, são prontamente diferenciadas através dos seus diagramas de ponto de fusão (Figura 2.2), também chamados de diagramas de fase binários.



**Figura 2.2** – Representação esquemática dos diagramas de ponto de fusão para os casos de isômeros que formam conglomerados (a) ou compostos racêmicos (b).

Para a determinação experimental do diagrama binário de ponto de fusão a técnica mais utilizada atualmente é a calorimetria diferencial de varredura, DSC,



como utilizado por Gallis *et al.* (1996), Kommuru *et al.* (1998), Li *et al.* (1999), Lorenz *et al.* (2002) e Pella e Restelli (1983). Adicionalmente, o trabalho de Gallis *et al.* (1996) checou a consistência dos dados termodinâmicos determinados experimentalmente através do “software” Prophase.

Em alguns textos consultados, o diagrama de fases binário de ponto de fusão é calculado por meio das equações de Schröder-van Laar e Prigogine-Defay (Brock *et al.*, 1991). Em outros, esta determinação teórica é somada à comparação com dados experimentais obtidos através de DSC (Burger *et al.*, 1997, Jabrane *et al.*, 1995, Leitão *et al.*, 2002, Lorenz e Seidel-Morgenstern, 2002; Nematik *et al.*, 1997, Rustichelli *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003).

Jabrane *et al.* (1995), também utilizando DSC, realizaram estudos do comportamento térmico dos enantiômeros, verificando-se um processo de vitrificação e determinando-se a temperatura de transição vítrea. Li *et al.* (1999) realizaram estudos relacionando as variáveis termodinâmicas energia livre de Gibbs, entropia de mistura, entalpia de formação e temperatura de fusão, com a formação de conglomerados ou de compostos racêmicos e Zhang *et al.* (2003) utilizaram variáveis termodinâmicas e o diagrama de fases binário, além de difração de raios-X e DSC para classificar o racemato do ibuprofeno de sódio como conglomerado.

Alternativamente ao diagrama binário de ponto de fusão, para a identificação do tipo de cristal formado, difratogramas de raios-X ou espectroscopia de infravermelho podem ser usados; para cada uma destas técnicas, os espectros ou difratogramas dos enantiômeros são idênticos ao do racemato quando este forma um conglomerado, mas diferentes dos espectros ou difratogramas do racemato que forma composto racêmico (Sheldon, 1993).

Pella e Restelli (1983) e Li *et al.* (1999) abordam o tipo de cristal formado através da cristalização e métodos para caracterização destes cristais – conglomerados ou compostos racêmicos – por meio de análises de difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. Wang *et al.* (2003) além de determinarem o diagrama de fases binário para os

enantiômeros de N-metilefedrina, também utilizaram difração de raios-X e espectroscopia de infravermelho para afirmarem que o cristal formado pela mistura equimolar deste composto é um conglomerado.

Os cristais formados pelo racemato do ibuprofeno, na sua forma de base, existem como um composto racêmico. Vários critérios indicam que o racemato que forma composto racêmico do ibuprofeno é muito mais estável que o correspondente racemato que forma conglomerado. No entanto, após a conversão para a forma de sal de sódio, foi observado que o racemato resultante forma um conglomerado quando é cristalizado. O mesmo fenômeno é frequentemente observado para outros ácidos e bases orgânicos (Zhang *et al.*, 2003). A mistura equimolar do cloridrato de propanolol também foi classificada por Wang *et al.* (2002) como formadora de conglomerado utilizando análises de difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear.

Lorenz e Seidel-Morgenstern (2002) estudaram os diagramas de fase binário e ternário do ácido mandélico em água. A partir do diagrama de ponto de fusão, o sistema enantiomérico formado pelo ácido mandélico foi identificado como um composto racêmico, sendo a solubilidade do racemato considerada alta comparada à dos enantiômeros. Além disso, o diagrama ternário revelou uma forte dependência da solubilidade em relação à temperatura, indicando que tanto a evaporação quanto o resfriamento podem ser aplicados como técnicas de cristalização.

Já o trabalho de Rustichelli *et al.* (1999) trata da caracterização do cristal formado pelo racemato de um fármaco bloqueador de canal de cálcio (verapamil HCl e galopamil HCl) empregando técnicas como espectroscopia de infravermelho, difração de raios-X e DSC. Os resultados definiram as propriedades do estado sólido dos compostos e mostraram que a mistura equimolar forma cristais que existem como um composto racêmico. A difração de raios-X também foi utilizada por Li e Grant (1996) para classificar os cristais da mistura racêmica da efedrina 2-naftalenosulfonato como um composto racêmico.

Outro método utilizado para a caracterização do tipo de cristal formado é a comparação das solubilidades do enantiômero puro e da mistura racêmica. É reconhecido que num conglomerado o racemato é mais solúvel que os enantiômeros que o constituem. Uma regra empírica – a de Meyerhoffer – trata do aspecto quantitativo dessa diferença de solubilidade. A chamada “Regra do Dobro da Solubilidade” afirma que um conglomerado possui uma solubilidade igual à soma das solubilidades dos enantiômeros correspondentes. Meyerhoffer propôs essa regra considerando a pressão de vapor, uma vez que um gás pode ser pensado como uma solução sob vácuo. A pressão de vapor é igual à soma das pressões de vapor dos constituintes. A substituição do vácuo por um solvente inerte e da pressão de vapor pela concentração da solução leva à proposição de que um conglomerado deve ser duas vezes mais solúvel que cada um dos enantiômeros, com a condição de que o solvente não tenha efeito (associativo ou dissociativo) sobre a solução (Jacques, 1981). Ainda segundo Jacques (1981), mesmo se ocorre solvatação, a solubilidade dos compostos racêmicos não está relacionada à solubilidade dos enantiômeros, diferentemente do que ocorre com os conglomerados, podendo ser maior ou menor.

### 2.3. Diagramas de solubilidade

O conhecimento detalhado de dados fundamentais de equilíbrio sólido-líquido expressos no diagrama de fases é essencial para projetar e otimizar o processo de cristalização (Lorenz e Seidel-Morgenstern, 2002).

A construção de diagramas de fase binários a partir de medidas de temperaturas de fusão das misturas racêmicas, assim como dos enantiômeros correspondentes, tem sido tradicionalmente utilizada para identificar a natureza das espécies racêmicas. Uma vez que a composição do ponto eutético não se modifica quando a temperatura é alterada, o diagrama de fases binário também pode ser utilizado para determinação do ponto eutético quando os racematos em questão formam compostos racêmicos, como nos trabalhos de Burger *et al.* (1997), Jabrane *et al.* (1995), Kaspereit *et al.* (2002), Leitão *et al.* (2002) e Lorenz

e Seidel-Morgenstern (2002). Entretanto, o exame das temperaturas de fusão isoladamente pode não ser adequado em alguns casos, já que a estrutura racêmica no ponto de fusão não é necessariamente a mesma que a temperatura ambiente, devido a possíveis transformações desta estrutura. Além disso, os diagramas de fases binários de certos compostos orgânicos não podem ser preparados porque o aquecimento levaria à decomposição da amostra. Neste sentido, o diagrama de solubilidade é mais útil no entendimento da natureza das espécies racêmicas (Wang *et al.*, 2003).

De maior interesse nos estudos de resolução de misturas por procedimentos de cristalização, são os sistemas ternários consistindo do isômero S, isômero R e solvente. Enquanto no sistema binário é possível representar ambas as variáveis temperatura e composição num plano, num sistema ternário isso requer um gráfico tridimensional. Alternativamente, se é satisfatório a consideração de uma temperatura constante, o diagrama de fases ternário pode ser plotado em duas dimensões (Secor, 1963). Segundo Lorenz e Seidel-Morgenstern (2002), geralmente menos disponíveis que o diagrama de fase de ponto de fusão, os dados de solubilidade para sistemas enantioméricos em solventes adequados resultam no diagrama de fases ternário do sistema R-enantiômero/ S-enantiômero/ solvente. A razão da escassez de dados parece ser o significativo tempo de exposição necessário para medidas clássicas de solubilidade e, no caso de produtos de valor agregado, a comparativamente grande quantidade de amostra requerida para tais medidas.

Tavares *et al.* (1999) propuseram um sistema para estudos de equilíbrio sólido-líquido baseado nas transformações de fase associadas com os efeitos termais. O sistema é utilizado para determinação das solubilidades de sais, não podendo ser utilizado no presente trabalho, devido à grande quantidade de amostra requerida. Medidas de solubilidade também foram estudadas por Mohan *et al.* (2002) mostrando a possibilidade de se determinar curvas de solubilidade de sistemas quirais onde quantidades muito pequenas de amostras são disponíveis para estudos de diagramas de solubilidade, usando o DSC. Este método também é utilizado e comparado com a determinação de solubilidade clássica no trabalho

de Lorenz e Seidel-Morgenstern (2002), que concluiu que em adição ao método clássico comumente utilizado, o DSC pode ser recomendado quando somente pequena quantidade de amostra está disponível ou quando são necessários dados a altas pressões ou temperaturas.

Medidas de solubilidade através de DSC também foram estudadas por Lorenz *et al.* (2002). Comparou-se este método com a determinação de solubilidade clássica, mostrando-se a possibilidade de se determinar curvas de solubilidade de sistemas quirais onde quantidades muito pequenas de amostras são disponíveis para estudos de diagramas de solubilidade. A partir das curvas de solubilidade calculadas e das curvas de solubilidade obtidas experimentalmente para os enantiômeros puros e para a mistura racêmica de ácido mandélico foram calculados os coeficientes de atividade.

Diagrama de fases podem ser prontamente construídos através das medidas de solubilidades de variadas misturas dos dois enantiômeros e determinação de seu equilíbrio (Mullin, 2001). Seguindo este princípio, os trabalhos de Kaspereit *et al.* (2002), Lorenz *et al.* (2001), Lorenz *et al.* (2002), Lorenz e Seidel-Morgenstern (2004), e Lorenz e Seidel-Morgenstern (2002) apresentaram diagramas de solubilidade ternários do ácido mandélico em água determinados experimentalmente. Kaspereit *et al.* ainda determinou diagramas de solubilidade para o ácido mandélico utilizando como solvente uma composição de água e acetonitrila (95:5) e para um fármaco em acetonitrila. Wang *et al.* (2002) apresentou o diagrama de solubilidade para o cloridrato de propanolol.

Para a determinação do diagrama de solubilidade são necessárias medidas de concentração para se determinar purezas enantioméricas tanto dos cristais como das soluções em equilíbrio com eles. Cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE e cromatografia gás-líquido, CGL, são os métodos mais precisos para tais análises. A escolha do método é parcialmente determinada pela volatilidade e estabilidade térmica do produto em questão. Ressonância magnética nuclear, embora menos precisa, é conveniente para análises rápidas (Sheldon, 1993). Métodos estereoseletivos para determinação dos enantiômeros

da cetamina por CLAE são descritos por Yanagihara *et al.* (2000) além de Svensson e Gustafsson (1995).

#### **2.4. Acoplamento de cristalização a cromatografia em leito móvel simulado**

Lim *et al.* (1995) utilizaram um processo de cristalização adicionado à jusante de métodos cromatográficos contínuos para realizar separações de misturas racêmicas de praziquantel. O diagrama ternário de solubilidade foi utilizado para se determinar qual a pureza enantiomérica da solução fornecida pelo LMS para que a etapa de cristalização fosse viável e, adicionalmente, o efeito da pureza do fluxo de refinado do processo cromatográfico sobre a recuperação de um dos enantiômeros do praziquantel puro foi estudada mostrando que quanto maior a pureza do fluxo, maior a recuperação do enantiômero.

Seguindo este caminho, Lorenz *et al.* (2001) e Kaspereit *et al.* (2002) propõem o sistema de acoplamento de leito móvel simulado e cristalização para separação de enantiômeros. Visando a futura avaliação do processo, foram determinados experimentalmente as isotermas de adsorção e os diagramas de solubilidade para o ácido mandélico. Além do ácido mandélico, Kaspereit *et al.* (2002) determinaram a isoterma de adsorção e o diagrama de solubilidade de um componente intermediário da produção de um fármaco não-citado e apresentaram a variação de produtividade da etapa de cromatografia em relação à pureza do produto final obtida para o ácido mandélico e o fármaco em questão. Os autores advertem que o acoplamento de processos sugerido desperta questões relacionadas à etapa de criação da supersaturação requerida a partir da solução proveniente da unidade cromatográfica. A supersaturação criada não deve ser muito alta, porque levaria à saída da região do diagrama de solubilidade em que há a formação de cristais de somente um dos enantiômeros. Destacaram também a possibilidade da inclusão de solvente nos cristais.

Posteriormente, Strohleim *et al.* (2003) desenvolveram e apresentaram um método para otimização de um processo híbrido acoplando unidades de cromatografia e cristalização utilizando dois sistemas como exemplos: um

intermediário de uma droga cardiovascular e o ácido mandélico. Foi objetivo do estudo desenvolver regras gerais para determinar para quais sistemas a etapa de cristalização adicional é benéfica e acima de qual pureza o fluxo de produto do LMS tem que estar enriquecido. Os autores destacam que a concentração da fração proveniente do leito móvel simulado e a recuperação de solvente por evaporação ou destilação, ou com o uso de membranas, assim como a recuperação do produto final por precipitação ou cristalização seguidos de liofilização ou filtração e secagem devem ser considerados num projeto do processo completo. Foram realizados também, estudos de custos de produção para o processo híbrido, assim como estudos de rendimento e produtividade: observou-se que o rendimento é nulo quando a pureza da alimentação se aproxima da pureza do ponto eutético e é igual a 1 quando a pureza da alimentação se aproxima de 100%.

Neste mesmo trabalho de Strohlein *et al.* (2003), uma vez que a solução-mãe depois da cristalização ainda está enriquecida no enantiômero desejado, foi estudado também o reciclo desta solução para a alimentação do reator de cristalização, mas apesar do aumento da quantidade de produto na saída do processo, foi comprovado que o rendimento global deste processo não foi influenciado pelo reciclo. Já quando a solução-mãe resultante da cristalização é unida à alimentação do LMS, pode-se concluir que o reciclo aumenta a eficiência do processo híbrido e diminui os custos específicos de separação. Um custo de separação específico mínimo é equivalente a um diâmetro de coluna mínimo e a um volume de fase estacionária mínimo. A produtividade e o rendimento do cristizador são os parâmetros de maior influência no diâmetro das colunas da unidade de LMS e, portanto, nos custos de operação específicos. Considerando que o enantiômero de interesse está no fluxo de refinado, os autores afirmam que uma pureza de refinado ótima entre a pureza do ponto eutético e 100% de pureza só existe se a produtividade do refinado com 100% de pureza for menor que metade da produtividade do refinado com pureza igual a do ponto eutético.

## 2.5. Solubilidade e força motriz para cristalização

Um pré-requisito para a cristalização a partir de uma solução (o método mais comum e utilizado para compostos oticamente ativos) é que a concentração de soluto na solução exceda sua solubilidade no equilíbrio, para se criar a força motriz do processo, a supersaturação (Wood, 1997). O trabalho de Nývlt *et al.* (2001) aborda os tipos de força motriz para o processo de cristalização e em que condições cada uma é utilizada.

A solubilidade de um componente em um solvente é a quantidade total dissolvida no estado de equilíbrio. Em geral, a solubilidade depende da temperatura, então curvas de solubilidade ou tabelas são obtidas relacionando estas duas variáveis. A solubilidade ou condição de saturação é experimentalmente determinada pelo aquecimento de uma suspensão e observação da temperatura na qual os sólidos são completamente dissolvidos. Acima desta temperatura a solução está insaturada. Quando novamente resfriamos a mesma solução, temperaturas abaixo daquela de saturação podem ser alcançadas sem a formação de nenhum cristal. Nessa região, a solução é chamada supersaturada.

A diferença entre a concentração da solução supersaturada ( $c$ ) e a concentração da solução saturada ( $c^*$ ) é a chamada supersaturação absoluta, a qual é a força motriz para o processo de cristalização:

$$\Delta c = c - c^* \quad (\text{equação 2.2})$$

Segundo Nývlt *et al.* (2001), na prática industrial, iniciando com uma solução saturada binária, a supersaturação pode ser criada de diversas maneiras, (resfriamento, evaporação, mudança de meio ou reação química) dependendo da solubilidade do soluto, ou mais precisamente, do coeficiente angular da curva de solubilidade versus temperatura,  $dc^*/dT$ . Quando a curva de solubilidade versus temperatura é íngreme, a cristalização por resfriamento é a técnica mais adequada. No caso de dependência moderada da solubilidade em relação à temperatura, o resfriamento adiabático é indicado, e quando há dependência



negativa da solubilidade em relação à temperatura, a evaporação isotérmica é o método mais indicado. Ainda segundo Nýlvt *et al.* (2001), em casos nos quais o resfriamento do sistema conduz à formação de uma quantidade suficiente de cristais, o resfriamento é adequado, não sendo este o único caminho e tampouco o mais econômico.

A escolha do método de geração da supersaturação para cristalizar uma substância também depende das propriedades desejadas do produto e de aspectos econômicos.

De acordo com Lorenz e Seidel-Morgenstern (2002), para um processo de cristalização por resfriamento ser operado a fim de recuperar a substância sólida a partir da solução, a condição mais favorável ocorre na região de maior efeito da temperatura na solubilidade.

Na maioria das cristalizações com intenções de isolamento de moléculas opticamente ativas variados métodos são utilizados, mas particularmente faz-se uso de resfriamento de uma solução saturada (Wood, 1997).

Paralelos ao tema deste trabalho, assuntos referentes ao processo de cristalização de enantiômeros como os efeitos da nucleação secundária na geração de compostos quirais assimétricos (Buhse *et al.*, 2000, Cartwright *et al.*, 2004, Kondepudi e Sabanayagam, 1993), influência do excesso enantiomérico no crescimento de cristais (Beilles *et al.*, 2001), separação quiral por diferença de tamanho (Yokota *et al.*, 2004) e estudo sobre redução de pureza nas resoluções de misturas racêmicas (Matsuoka, 1997, Toyokura *et al.*, 1997) foram encontrados, mas não serão abordados.

## CAPÍTULO 03

### MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cetamina e demais reagentes

A mistura racêmica de cetamina [(R/S)-2-(2-chlorofenil)2-metilamino ciclohexanona] e seus enantiômeros de alta pureza (pureza maior que 98% segundo análise por CLAE), nas formas de base e cloridrato, foram fornecidos pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (Itapira, SP) (Figura 3.1). Álcool etílico anidro obtido da LabSynth (Brasil) foi utilizado como solvente. Para as análises por CLAE, a fase móvel álcool etílico anidro grau HPLC foi adquirida da J. T. Baker (México).

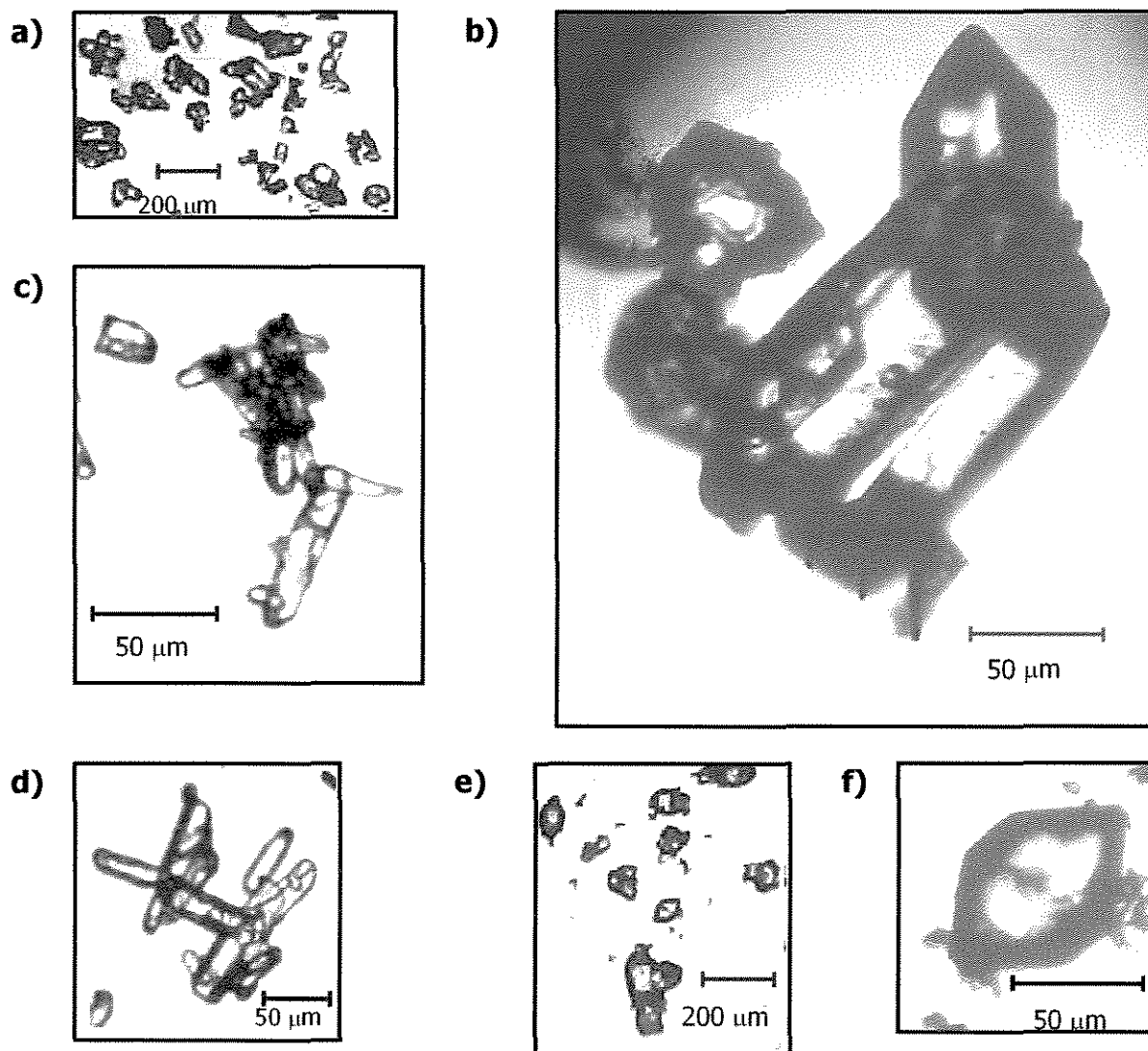
Uma vez que a quantidade de amostra requerida para os experimentos era menor que a massa disponível, os procedimentos de recuperação das amostras de isômeros já utilizadas e de conversão da cetamina da forma cloridrato para a forma base foram implementados.

##### 3.1.1. Recuperação dos isômeros

As soluções utilizadas para os experimentos de determinação de solubilidade foram submetidas à evaporação do solvente em rotavapor, com o objetivo de serem reutilizadas nas etapas seguintes do trabalho. Por CLAE,

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

analisou-se soluções de concentração 0,5 mg/mL e fez-se uma comparação da pureza das amostras de enantiômeros puros obtidas pelo método de recuperação com as amostras de enantiômeros puros fornecida pela Cristália.



**Figura 3.1** – Amostras de cetamina fornecidas pela Cristália: enantiômero R (a) e (b), mistura racêmica (c) e (d), enantiômero S (e) e (f).

### 3.1.2. Transformação dos isômeros da forma de cloridrato para a forma base

A uma solução aquosa de cetamina na forma de cloridrato, sob agitação magnética, foi adicionada lentamente uma solução de bicarbonato de sódio até

que se atingisse pH próximo de 11 (para garantir meio básico para a reação), medindo-se o pH da solução através de papel indicador Merck (Alemanha). Esta solução foi deixada sob agitação durante 16 h para que a reação de conversão ocorresse. Por meio de extração por solvente em funil de separação, utilizando diclorometano, a cetamina foi recuperada na fase superior. As soluções de cetamina em diclorometano obtidas foram, então, submetidas à evaporação do solvente em rotavapor, com o objetivo de eliminação do solvente. Da mesma forma que a recuperação dos isômeros, compararam-se as amostras resultantes com as fornecidas pela Cristália em termos de concentração medida por CLAE.

### 3.2. Difração de raios-X

Análises de difração de raios-X foram realizadas em um difratômetro de raios-X Shimadzu XRD6000 (Japão), com uma varredura contínua do espectro utilizando a metodologia do pó com uma velocidade de 0,020°/s, radiação de  $K\alpha$ -Cu de comprimento de onda de  $1,5406 \times 10^{-10}$  m e rotação do corpo de prova de 40 rpm. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Metalografia e Análises de Falhas da Divisão de Metalurgia (LMAF-Dimet) do IPT-SP.

### 3.3. Espectroscopia de infravermelho

Um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier modelo Protégé 460 (Nicolet, EUA) com um acessório ATR horizontal de germânio foi utilizado para se determinar os espectros de estado sólido da mistura racêmica, da *R*-cetamina e da *S*-cetamina. Solução de cetamina em etanol anidro foi vertida sobre o elemento de germânio e esperou-se que o etanol evaporasse a temperatura ambiente de forma que um filme da amostra se formasse, a fim de garantir um contato íntimo da amostra com a placa de germânio. As varreduras do espectro foram realizadas com uma resolução de  $8 \text{ cm}^{-1}$ , sendo executadas 150 varreduras para cada espectro obtido.

### 3.4. Determinação de solubilidade

A solubilidade dos compostos em etanol anidro, solvente usado como fase móvel nas separações de cetamina por LMS nos estudos em desenvolvimento no Laboratório de Biosseparações do DPB-FEQ-UNICAMP, foi determinada mantendo uma suspensão de uma certa massa do composto em 1,0 mL de solvente em tubos Eppendorf, sob constante agitação (aproximadamente 60 rpm) em uma mesa agitadora Quimis Q-225M (Brasil), a temperatura constante mantida por circulação da água de um banho termostático TE-2000, marca Tecnal (Brasil). As concentrações iniciais destas suspensões variaram de 50 a 230 mg/mL. O tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido foi determinado previamente através de ensaios cinéticos de solubilidade (descritos a seguir). Após este tempo, a suspensão era submetida a uma centrifugação de 2000g por 2 min em uma microcentrífuga de bancada NT800, marca Nova Técnica (Brasil), a fim de separar os sólidos e verificar visualmente a existência de uma fase sólida, o que indicava a supersaturação da solução. Um volume de fase líquida era pipetado, e a absorbância desta fase a 245 nm medida em um espectrofotômetro DU640 (Beckman, EUA).

### 3.5. Cinética de solubilidade

Utilizando sistemas idênticos aos utilizados para a determinação de solubilidade (frascos do tipo Eppendorf selados, com um mínimo de volume de ar, para se minimizar evaporação do etanol e entrada de água do banho), os ensaios para a determinação das cinéticas de solubilidade da cetamina (cristais de R, S e racemato), foram realizados às temperaturas de 5 e 25 °C. Para representar cada tempo 5 frascos foram retirados da agitação para que as concentrações das suas soluções fossem determinadas. Depois de separada da fase sólida por meio de centrifugação, cada solução foi diluída e analisada por espectrofotometria de luz ultravioleta. As medidas de absorbância foram realizadas em intervalos de tempo até que as concentrações obtidas se mostrassem estáveis, indicando que o equilíbrio foi atingido.

### 3.6. Cinética de cristalização

Frascos contendo volumes de 1,0 mL de suspensões de concentrações iniciais de 300 mg/mL com proporções de R:S de aproximadamente 80:20 foram submetidos a agitação a 45°C até a dissolução e posterior repouso a 25°C para que ocorresse a formação de cristais. A partir do momento da formação de cristais, a cada intervalo de tempo, dois frascos foram retirados da agitação e tiveram suas soluções separadas por centrifugação a 2000g durante 2 minutos. Medidas de concentração de cetamina em cada uma das soluções foram realizadas em intervalos de tempo até que as concentrações obtidas se mostrassem estáveis, indicando que o equilíbrio foi atingido.

### 3.7. Determinação do ponto eutético

A determinação do ponto eutético foi realizada a partir de 1,0 mL de soluções de concentração 300 mg/mL com proporções decrescentes do enantiômero R: 90, 80, 78, 76, 74, 72 e 70% em relação ao total de R e S. Os ensaios, feitos em duplicata, foram realizados em frascos do tipo Eppendorf selados, com um mínimo de volume de ar, para se minimizar evaporação do etanol e entrada de água do banho. Os tubos foram imersos em um recipiente isolado termicamente com água a temperatura constante de 45°C mantida por circulação da água de um banho termostático TE-2000, marca Tecnal (Brasil). Este recipiente foi submetido a constante agitação em uma mesa agitadora Quimis Q-225M (Brasil) durante 2 h (até que os sólidos se dissolvessem completamente). Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso a 25°C num banho termostático por 30 h para se atingir o equilíbrio. Após este tempo, a suspensão era submetida a uma centrifugação de aproximadamente 2000g por 2 min em uma centrífuga 5804 R, marca Eppendorf (Alemanha), a fim de separar a fase líquida da sólida. Soluções de aproximadamente 50 mg/mL foram preparadas com as fases sólidas obtidas e analisadas por CLAE. Utilizando a área dos picos obtidos por integração no “software” Breeze (Waters, EUA) determinou-se a proporção de R e S nas soluções por meio das curvas de calibração previamente construídas.

A detecção da forma S nos cristais indicava que o ponto eutético havia sido ultrapassado.

### 3.8. Determinação do diagrama de fases

O diagrama de fases parcial do sistema *S*-cetamina/*R*-cetamina/etanol foi determinado de forma semelhante à localização do ponto eutético, sendo que para a construção do diagrama de fases, foram utilizadas as fases líquidas que estavam em equilíbrio com os cristais formados. Após a cristalização e a posterior separação da fase sólida em centrífuga a temperatura controlada de 25°C, a fase líquida foi filtrada em membranas Millex da Millipore (EUA) com 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro e a massa de 1,0 mL desta solução foi medida a fim de se obter sua densidade. Esta solução foi então diluída até se atingir uma concentração de aproximadamente 50 mg/mL para ter as concentrações de R e S determinadas por CLAE. Excluindo-se da densidade a massa referente às concentrações dos enantiômeros em 1,0 mL de solução obtidas por análise por CLAE, determinou-se a porcentagem de massa de solvente presente na amostra. A partir das porcentagens de massa de cada componente em relação à massa total do sistema em equilíbrio, foi plotado o diagrama ternário. Para o diagrama retangular, plotou-se o inverso da concentração de cetamina total (volume de solvente necessário para dissolver 1 g de cetamina) em função da porcentagem da massa de cetamina.

### 3.9. Ensaio de cristalização em batelada

Os ensaios que possibilitaram as estimativas do rendimento e produtividade da etapa de cristalização utilizaram soluções com proporção inicial S:R de 80:20 a diferentes concentrações iniciais (variando de 150 mg/mL a 250 mg/mL). As suspensões originadas da mistura da cetamina com o etanol foram submetidas a aquecimento a 45°C durante 1 h para que os sólidos se dissolvessem formando uma solução. A seguir, a temperatura foi diminuída até

alcançar 25°C e deu-se início à etapa de cristalização. Estes ensaios foram realizados em dois reatores encamisados diferentes. Volumes de 20 mL das soluções de concentração inicial 250 mg/L e 150 mg/L foram submetidas a agitação magnética em reator de 5 cm de altura e 3 cm de diâmetro durante 20 h, enquanto um volume de 30 mL da solução de concentração inicial 150 mg/mL foi submetido a 4 h de agitação mecânica a 260 rpm em um agitador Ika Labor Technik (Alemanha) com impelidor de pás inclinadas (45°) de 3 cm posicionado a 1/3 do fundo de um reator de 5,5 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro. As soluções de equilíbrio foram filtradas em membranas de 0,45 µm de poro e diluídas para se atingir concentrações dentro da faixa linear da curva de calibração da análise por CLAE que se seguiu. Os sólidos foram colocados numa estufa com circulação de ar Nova Ética (Brasil) a 35°C durante 30 min para eliminação dos resíduos de solvente e, a seguir, tiveram suas massas medidas em balança semi-analítica Quimis modelo Q-500L210C (Brasil). A partir dos cristais formados foram preparadas soluções de aproximadamente 50 mg/mL e suas composições foram analisadas por CLAE. Rendimento (massa cristalizada por massa de S-cetamina acima da saturação na alimentação) e produtividade (massa de S-cetamina cristalizada por volume de cristalizador por tempo) foram estimados.

### 3.10. Análises quantitativas e qualitativas por CLAE

Em um CLAE da Waters (EUA), com uma coluna de 0,77 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, com fase estacionária de triacetato de celulose microcristalina (MCTA), as determinações foram realizadas utilizando método implementado pelo Laboratório de Biosseparações do DPB-FEQ-UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana, baseado no trabalho de Blaschke (1986). O volume de amostra foi de 20 µL e álcool etílico anidro foi utilizado como fase móvel a uma vazão de 1,0 mL/min.

Soluções de mistura racêmica com concentrações variando de 0,25 g/L a 145 g/L foram preparadas e injetadas no cromatógrafo para a construção da curva de calibração. A fim de checar se existia uma diferença significativa entre os



comprimentos de onda 254 nm e 245 nm, realizou-se um Teste t Pareado utilizando o "software" Origin.

## CAPÍTULO 04

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. Caracterização do tipo de cristal formado

Os experimentos previstos para caracterização do tipo de cristal formado pela mistura racêmica da cetamina foram a espectroscopia de infravermelho, a difração de raios-X e a determinação das curvas de solubilidade a diferentes temperaturas, que foram realizadas para o racemato e para os enantiômeros puros.

Segundo Rustichelli *et al.* (1999), as comparações por superposição tanto dos espectros de infravermelho como dos difratogramas de raios-X, indicam o tipo de sistema formado pois, para cada espectroscopia, estes espectros serão idênticos para o enantiômero puro e para o racemato apenas no caso deste ser um conglomerado.

No caso das solubilidades, de acordo com Jacques *et al.* (1981), um conglomerado possui solubilidade igual à soma das solubilidades dos enantiômeros puros correspondentes. Diferentemente da situação para conglomerados, a solubilidade de um composto racêmico não está diretamente relacionada com a de seus enantiômeros, podendo ser maior ou menor.

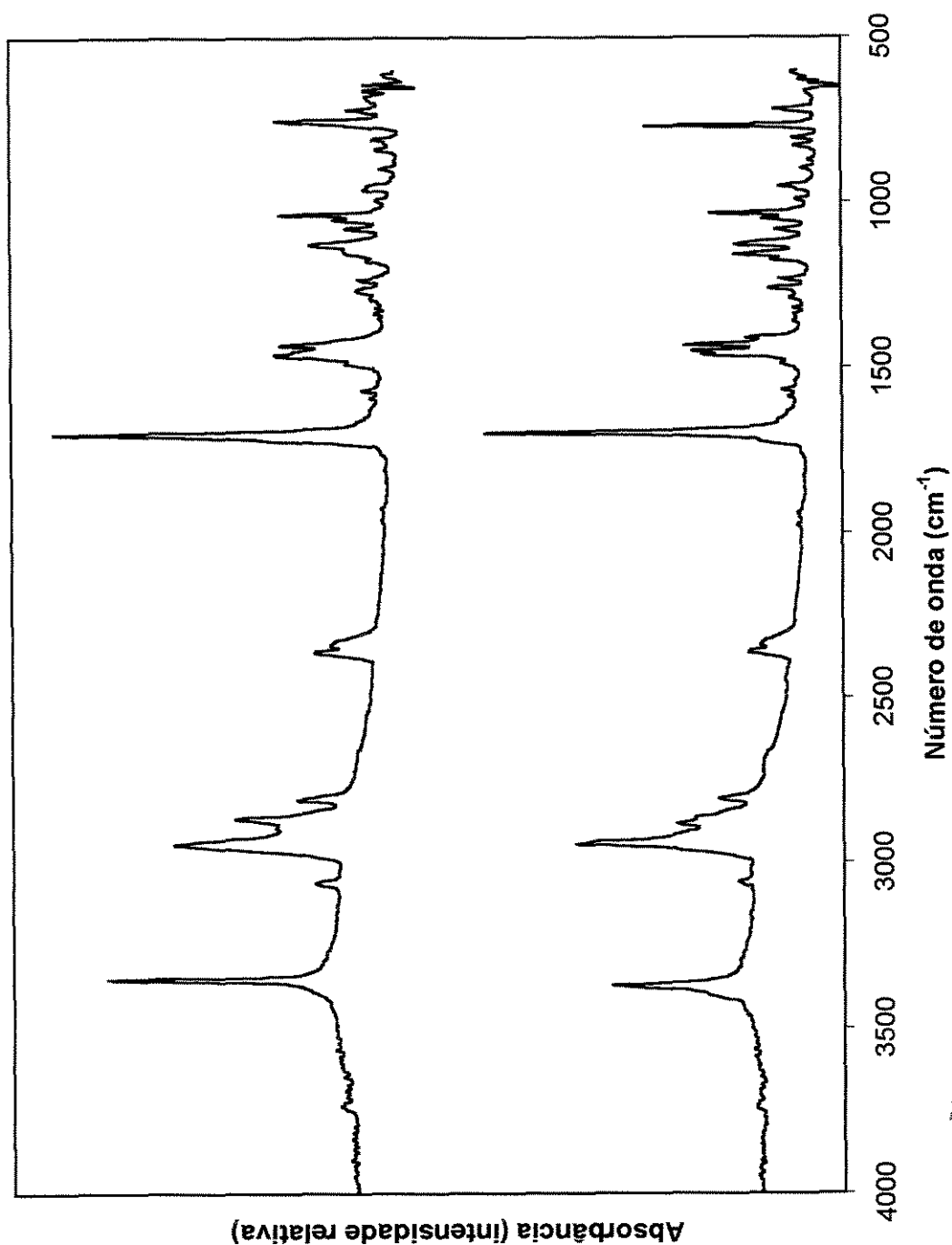
Quando os espectros são diferentes e a solubilidade do racemato não é o dobro da solubilidade dos enantiômeros, o cristal formado é um composto racêmico, ou seja, é uma combinação dos dois enantiômeros. Existe ainda a possibilidade deste racemato ser um polimorfo de um conglomerado, ou cristais com solvente incorporado, porém, quando as amostras são isoladas em condições similares, esta possibilidade é minimizada (Wood, 1997).

#### **4.1.1. Espectroscopia de infravermelho**

Os espectros de infravermelho da S-cetamina e da mistura racêmica no estado sólido (Figura 4.1) apresentaram picos semelhantes, relacionados às vibrações das principais ligações entre os componentes da amostra. As vibrações alifáticas C-H estão representadas na região entre 3000 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  do espectro, sendo as vibrações relativas ao hidrogênio aromático as situadas próximas do número de onda 3000  $\text{cm}^{-1}$ , assim como as referentes ao número de onda 2800  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos grupos metil. Outro pico de destaque em ambas amostras é o referente ao número de onda 1700  $\text{cm}^{-1}$ , que é atribuído às ligações dos grupos carbonila.

No entanto, distintas vibrações são presentes principalmente próximos ao número de onda 2900  $\text{cm}^{-1}$  (dentro da faixa correspondente aos grupos alifáticos), próximo a 3400  $\text{cm}^{-1}$  (referente a ligações N-H), e na faixa entre 700 e 800  $\text{cm}^{-1}$  devido às ligações C-Cl. Além disso, pequenas diferenças na faixa compreendendo do número de onda 1500 a 700  $\text{cm}^{-1}$  confirmam que há diferença entre as substâncias, o que não ocorre quando espectros dos dois enantiômeros puros são sobrepostos. De acordo com o afirmado por Rustichelli *et al.* (1999) e Wood (1997), estas diferenças nos espectros obtidos para a mistura racêmica e para os isômeros puros indicam a que a mistura equimolar dos enantiômeros da cetamina no estado sólido é um composto racêmico.

As vibrações diferenciadas de algumas ligações sugerem que diferentes empacotamentos das moléculas ocorrem na formação dos cristais, e a estes diferentes tipos de organização das moléculas no estado sólido podem ser atribuídas as diferenças nas propriedades físicas destas substâncias.



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**Figura 4.1** – Espectro de infravermelho ATR da mistura racêmica (espectro superior) e do enantiômero S-cetamina (espectro inferior) obtidos com filme formado sobre o elemento de ATR (cristal de germânio).

#### 4.1.2. Difração de raios-X

Os principais picos obtidos na difração de raios-X, que apresentaram intensidade relativa acima de 10%, estão listados na Tabela 4.1. Nos difratogramas, a posição dos ângulos de varredura onde os principais picos (em termos de intensidade relativa) foram encontrados não são coincidentes para a mistura racêmica e o enantiômero S (Figura 4.2). O ângulo de difração  $2\theta$  é determinado pelo espaçamento entre um conjunto de planos do cristal.

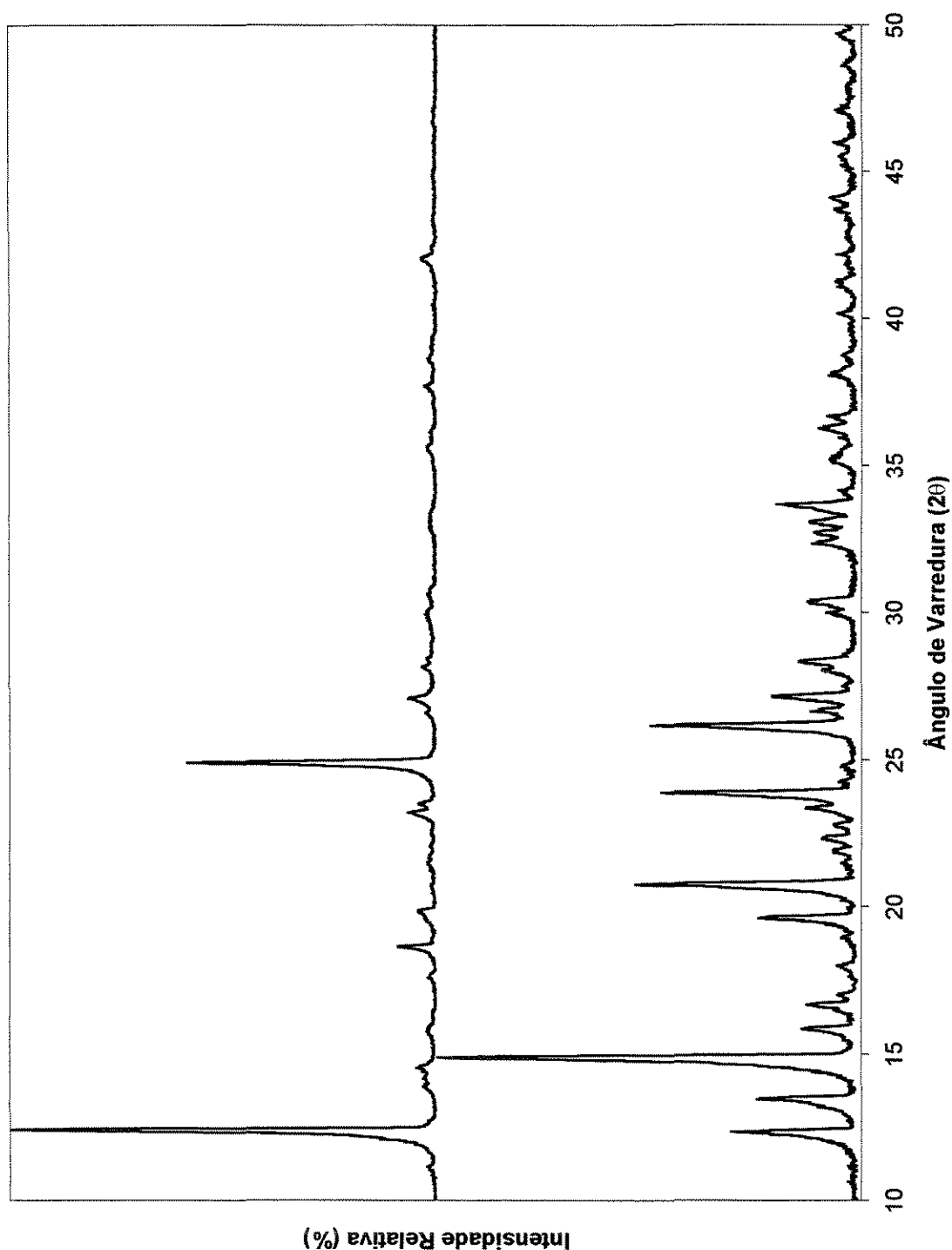
A diferença entre os espectros também pode ser visualizada pela diferença de intensidade dos picos, sendo que esta intensidade das linhas depende do tipo e número de centros de reflexão de átomos que existe em cada conjunto de planos do cristal (Skoog, 1985). As diferenças de localização entre os picos de maior intensidade de cada amostra, entre os picos de segunda maior intensidade e assim sucessivamente, confirmam a existência de empacotamentos distintos dos cristais sugerida pela espectroscopia de infravermelho, e seguindo o afirmado por Rustichelli *et al.* (1999) e Wood (1997), os difratogramas obtidos para a mistura racêmica e para os isômeros puros indicaram que o cristal formado é um composto racêmico.

O menor número de linhas significativas do espectro da mistura racêmica pode ser atribuído a uma maior cristalinidade deste sólido, já que um menor número de planos foi encontrado na amostra. Da mesma forma, devido a maior quantidade de planos do enantiômero puro, pode-se concluir que este forma um sólido amorfo, quando comparado à mistura racêmica. Esta característica denota uma maior organização dos cristais de mistura racêmica, resultando numa maior estabilidade desta substância, que pode ser responsável pela diferença das propriedades físicas dos enantiômeros em relação à mistura equimolar destes dois isômeros.

**Tabela 4.1** – Principais\* ângulos de varredura da difração de raios-X para o enantiômero S-cetamina e a mistura racêmica.

<i>ângulo (2θ)</i>	<i>escala relativa (%)</i>	
	<i>S-cetamina</i>	<i>RS-cetamina</i>
12,36	30,64	--
12,42	--	100,00
13,46	24,53	--
14,88	100,00	--
15,86	13,82	--
16,66	12,70	--
19,62	24,16	--
20,76	53,18	--
23,34	12,95	--
23,90	47,07	--
24,90	--	58,65
26,16	49,44	--
26,64	11,96	--
27,18	20,92	--
28,34	14,69	--
30,38	12,45	--
32,36	11,58	--
33,08	12,08	--
33,70	19,80	--

\* Estão representados os picos que apresentaram intensidade relativa acima de 10%.



**Figura 4.2** – Difratoogramas de raios-X da mistura racêmica (espectro superior) e do enantiômero S-cetamina (espectro inferior). Velocidade de 0,020°/s, radiação de  $K\alpha$ -Cu de comprimento de onda de  $1,5406 \times 10^{-10}$  m e rotação do corpo de prova de 40 rpm.

#### 4.1.3. Determinação de solubilidade

Primeiramente, por meio de experimentos cinéticos, determinou-se um tempo mínimo para que se pudesse considerar que, no sistema utilizado para a determinação de solubilidade, o equilíbrio tivesse sido alcançado (Figura 4.3). Observando as cinéticas de solubilidade nas temperaturas de 5 e 25°C para os três compostos, pode-se notar que a partir do tempo de aproximadamente 10 h, em todos os casos, as soluções já haviam atingido o equilíbrio.

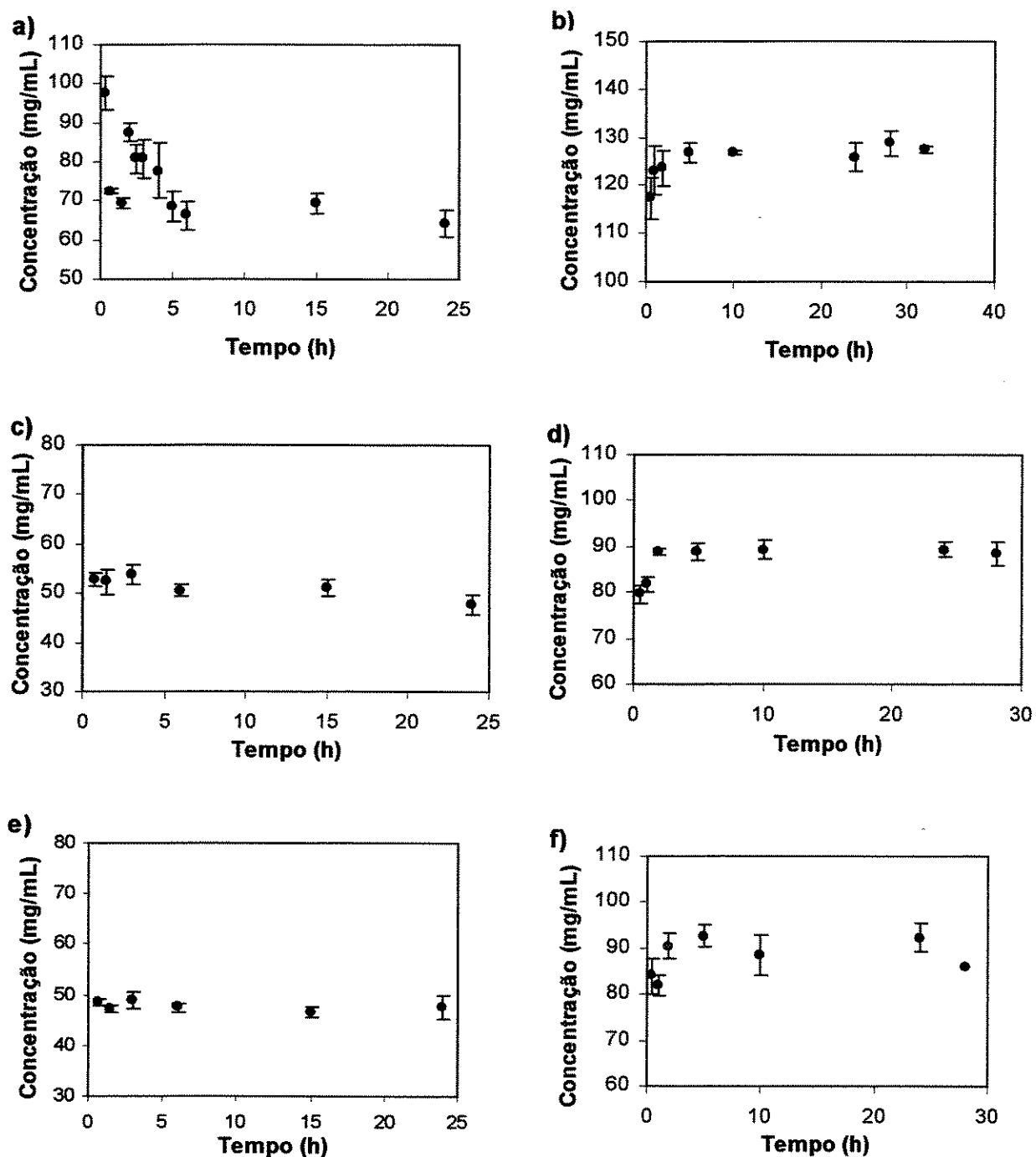
Na cinética de solubilidade da mistura racêmica a 5°C foi encontrado, a um tempo de contato curto (3 h), um ponto de solubilidade alta em relação à solubilidade para tempos maiores. Este comportamento também foi observado no trabalho de Bernardo *et al.* (2003), que atribuíram este fato à existência de polimorfismo. Porém, uma vez que o objetivo destes ensaios era a obtenção da solubilidade no equilíbrio, não foi dada maior atenção a este fato, que aconteceu antes do tempo padronizado como o tempo necessário para as soluções atingirem o equilíbrio.

A partir destas cinéticas, foi estabelecido o intervalo de 20 h como o tempo necessário para as soluções atingirem o equilíbrio e, com este tempo de equilíbrio, se fez as determinações de solubilidade das temperaturas restantes.

Determinaram-se então as solubilidades dos três compostos nas temperaturas de 10, 15, 20, 30, 35 e 40°C e uma curva de solubilidade em função da temperatura foi construída (Figura 4.4). As solubilidades da mistura racêmica foram maiores que as solubilidades dos enantiômeros e estas, por sua vez, foram coincidentes entre si. No entanto, as solubilidades do racemato não foram o dobro das solubilidades dos enantiômeros, o que seria a indicação da formação de conglomerado pela cetamina.

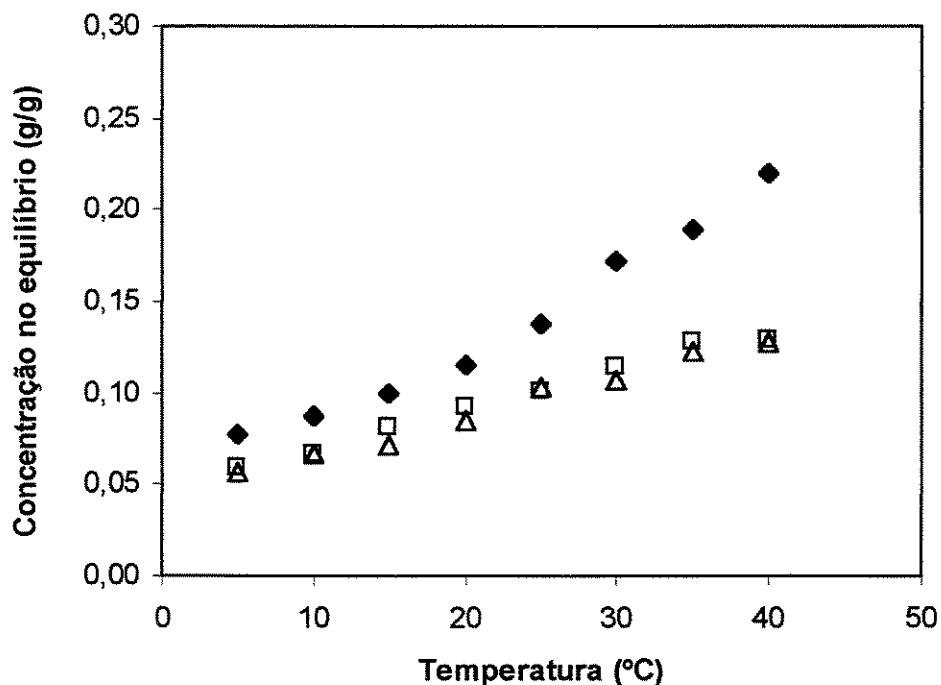
Uma utilidade da curva de solubilidade é também indicar, através da sua inclinação, qual a melhor forma de se atingir a supersaturação para determinado sistema, ao se projetar o processo de cristalização. Nylvt *et al.* (2001) afirmam que, para substâncias que possuem curvas de solubilidade com dependência moderada em relação à temperatura, a supersaturação pode ser gerada por





**Figura 4.3** - Cinéticas de solubilidade da cefixima: mistura racêmica a 5°C (a), a 25°C (b); enantiômero S a 5°C (c) e a 25°C (d) e enantiômero R a 5°C (e) e a 25°C (f). Concentração de cefixima na suspensão inicial, de 50 a 150 mg/mL. Dados em triplicata; barras indicam desvio padrão.

resfriamento da solução. Assim, no caso da cetamina, a inclinação das curvas de solubilidade em função da temperatura permite inferir que há a possibilidade do uso de resfriamento como estratégia de cristalização, tanto dos enantiômeros R e S quanto do racemato.



**Figura 4.4** – Solubilidade em etanol anidro da mistura racêmica de cetamina (◆), S-cetamina (□), e R-cetamina (△). Dados são médias de 4 a 7 repetições; desvio padrão < 0,007 g/g.

Como conclusão destes estudos de determinação do tipo de cristal formado, pode-se afirmar que a diferença encontrada entre as solubilidades do racemato e dos enantiômeros puros, assim como a diferença entre os espectros de infravermelho e os difratogramas de raios-X são indicações da cetamina formar um composto racêmico.

## 4.2. Determinação do diagrama de solubilidade

Devido à escassez de cetamina e uma vez que o diagrama de solubilidade pode ser determinado parcialmente para um dos isômeros em excesso (compreendendo a faixa entre a mistura equimolar até o enantiômero puro), e esta porção do diagrama é simétrica à faixa que compreende o excesso do outro isômero, os ensaios de determinação do diagrama de solubilidade foram realizados com o enantiômero R em excesso. Já os ensaios de cristalização em batelada foram realizados com excesso do isômero S.

### 4.2.1. Experimentos preliminares

Curva de calibração da CLAE e cinética de cristalização foram realizados como estudos preliminares aos ensaios para determinação do diagrama de fases. A cinética de cristalização forneceu o tempo necessário para que os cristais formados alcançassem o equilíbrio com a solução. Já a construção das curvas de calibração e o teste estatístico comparativo realizado confirmaram 245 nm como o comprimento de maior absorção para a cetamina nas análises de espectroscopia na faixa de luz ultravioleta.

#### 4.2.1.1. Curva de calibração

Os trabalhos contendo as análises por espectroscopia de absorção nas faixas dos espectros ultravioleta e visível de cetamina encontradas na literatura, divergem quanto ao comprimento de onda utilizado. Rofael e Abdel-Rahman (2002) utilizaram como comprimento de onda 225 nm, Yanagihara et al. (2000) optaram por 215 nm, enquanto Svensson e Gustafsson (1996) utilizaram 220 nm como comprimento de onda. No método implementado pelo Laboratório de Biosseparações do DPB-FEQ-UNICAMP baseado no trabalho de Blaschke (1986), é utilizado o comprimento de onda 254 nm. Nas determinações de solubilidade realizadas na primeira etapa deste trabalho, 245 nm se mostrou o comprimento de

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

onda de maior absorção para a cetamina e, por este motivo, foi utilizado até o momento.

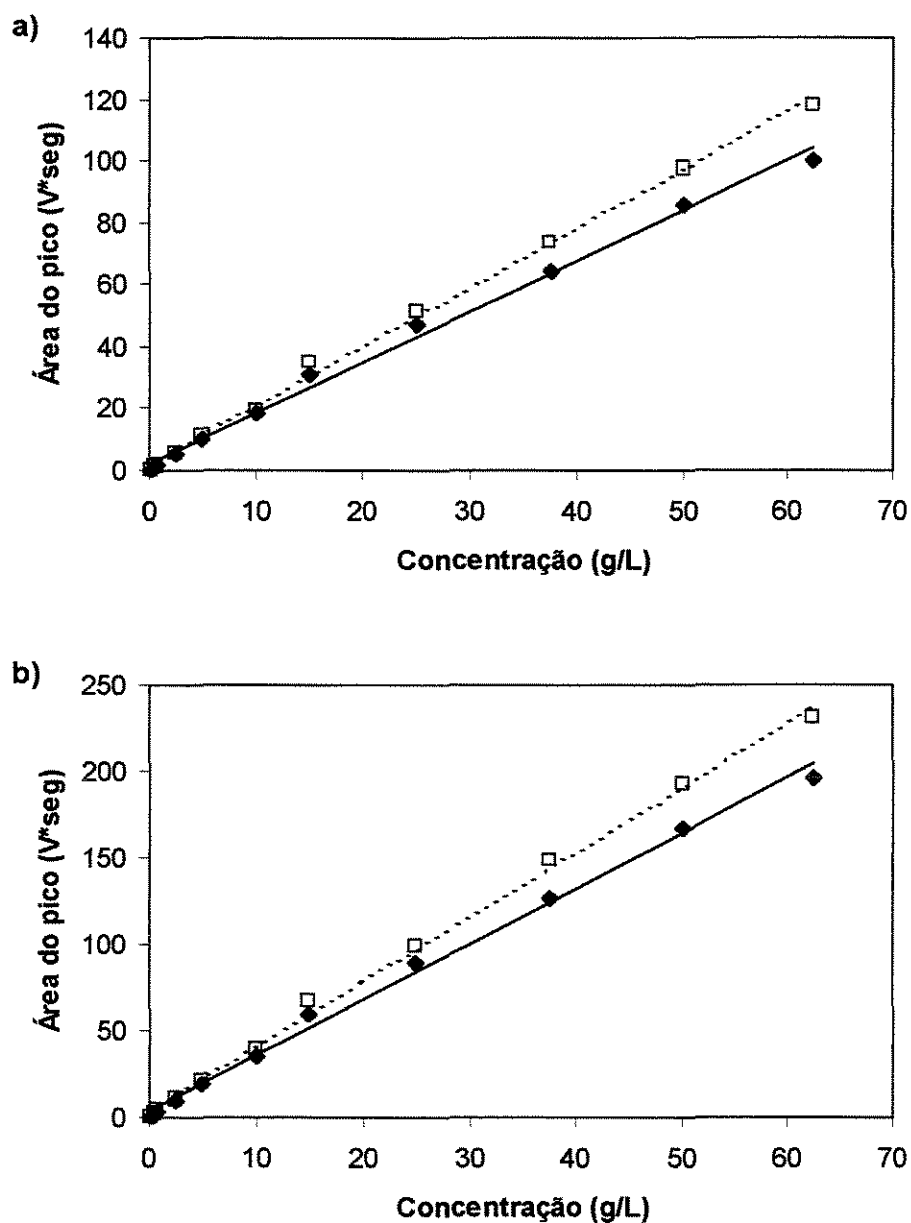
Para checar se existe diferença significativa entre as medidas feitas nos comprimentos de onda 245 e 254 nm, foram construídas curvas de calibração para ambos comprimentos de onda (Figura 4.5). As curvas de calibração construídas contêm o resultado da variação da área do pico obtido por integração no “software” Breeze (Waters, USA) em função da concentração de cetamina.

A 245 nm (Figura 4.5b), a sensibilidade se mostrou maior que a 254 nm (Figura 4.5a) e os dois comprimentos de onda apresentaram linearidade na relação concentração versus área do pico. Além disso, os valores de  $R^2$  encontrados foram semelhantes.

Um ponto que deve ser destacado é a diferença entre a inclinação das curvas dos dois enantiômeros, que não era esperada. Para os dois comprimentos de onda verificados, a *R*-cetamina apresenta uma sensibilidade maior que a *S*-cetamina, podendo esta diferença de sensibilidade levar a incertezas no método analítico utilizado.

A seguir, realizou-se um Teste t Pareado para avaliar se a diferença de absorção da cetamina nos comprimentos de onda estudados resulta em valores de concentração considerados estatisticamente diferentes. Este teste compara os valores das áreas obtidas nos dois comprimentos de onda para cada concentração utilizada. O resultado do Teste t Pareado, a um nível de 95% de significância (Quadro 4.1), indicou que os valores de concentração obtidos para os comprimentos de onda utilizados não diferem significativamente entre si.

Assim, optou-se que o comprimento de onda a ser utilizado no método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) fosse 245 nm, mantendo as condições utilizadas nos ensaios anteriores.



**Figura 4.5** – Curvas de calibração da mistura racêmica de cetamina. (a) Comprimento de onda de 254 nm. Dados para S-cetamina (◆): coeficiente angular, 1942210,273; coeficiente de correlação, 0,997. Dados para R-cetamina (□): coeficiente angular, 1687024,373; coeficiente de correlação 0,993. (b) Comprimento de onda de 245 nm. Dados para S-cetamina (◆): coeficiente angular, 3824588,748; coeficiente de correlação, 0,997. Dados para R-cetamina (□): coeficiente angular, 3294956,246; coeficiente de correlação 0,994.

Quadro 4.1 – Teste t pareado

```
Paired t-Test on Data1 col(nm254) and col(nm245):
```

Data	Mean	Variance	N
nm 254	47,26909	0,88611	11
nm 245	47,06455	0,62077	11

t = 1,3096  
p = 0,21962

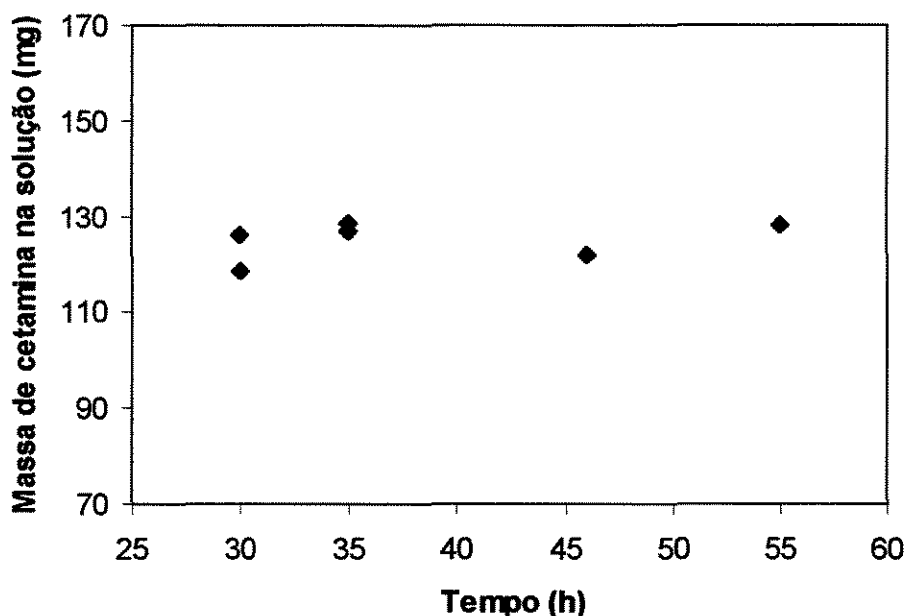
At the 0,05 level,  
the two means are NOT significantly different.

#### 4.2.1.2. Cinética de cristalização

De forma semelhante à aplicada nos experimentos de solubilidade, anteriormente à coleta de dados de equilíbrio para a construção do diagrama de fases, foi determinado, através da cinética de cristalização, o tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido (Figura 4.6). Pode-se considerar que a massa de cetamina presente na solução permanece constante após 30 h a 25°C. A partir da constatação deste comportamento, foi padronizado 30 h como o tempo necessário para que os cristais estivessem em equilíbrio com a solução-mãe. Este tempo de equilíbrio foi utilizado nos experimentos de localização do ponto eutético e na coleta de dados para a construção parcial do diagrama de fases.

#### 4.2.2. Determinação do ponto eutético

Primeiramente, foram estudados os comportamentos de cristalização a partir de soluções com proporções R:S iniciais de 90:10, 80:20 e 70:30 cujas composições dos cristais formados por resfriamento foram analisadas. Verificou-se que as duas primeiras composições resultaram em cristais somente do enantiômero R, enquanto a terceira composição resultou na formação de cristais contendo os dois enantiômeros. Assim pode-se perceber que o ponto eutético estava localizado entre as proporções 80:20 e 70:30.



**Figura 4.6** – Determinação do tempo de equilíbrio da cristalização de soluções com proporções dos enantiômeros R:S de 80:20 a 25°C. Concentração de cetamina na suspensão inicial, 300 mg/mL.

A seguir, fez-se um refinamento da localização do ponto eutético, realizando cristalizações para as proporções 72:28, 74:26, 76:24 e 78:22 e, como feito anteriormente, analisando-se as fases sólidas formadas. A composição dos cristais mostrou que o ponto eutético estava entre 74:26 e 76:24. A seguir, obtendo-se cristais também para a proporção inicial de 75:25 foram encontrados resultados distintos entre cinco replicatas (Tabela 4.2): três delas apresentaram concentrações por volta de 99% do enantiômero R e as outras duas repetições resultaram em cristais com aproximadamente 85% de concentração de R. Esta diferença pode ser atribuída à instabilidade do sistema próximo ao ponto eutético, devido à inclinação da curva de solubilidade nesta região, onde pequenas diferenças de composição da solução inicial podem acarretar diferenças na composição dos cristais. O mesmo não aconteceu para as proporções 74:26 e 76:24 que formaram, respectivamente, cristais somente da mistura racêmica e somente do enantiômero R. Pode-se afirmar então, que o ponto eutético do

diagrama de solubilidade para o sistema S-cetamina/R-cetamina/etanol está localizado na proporção R:S de 75:25.

**Tabela 4.2** – Composição dos cristais formados por soluções de proporção inicial 75:25 de R:S a 25°C.

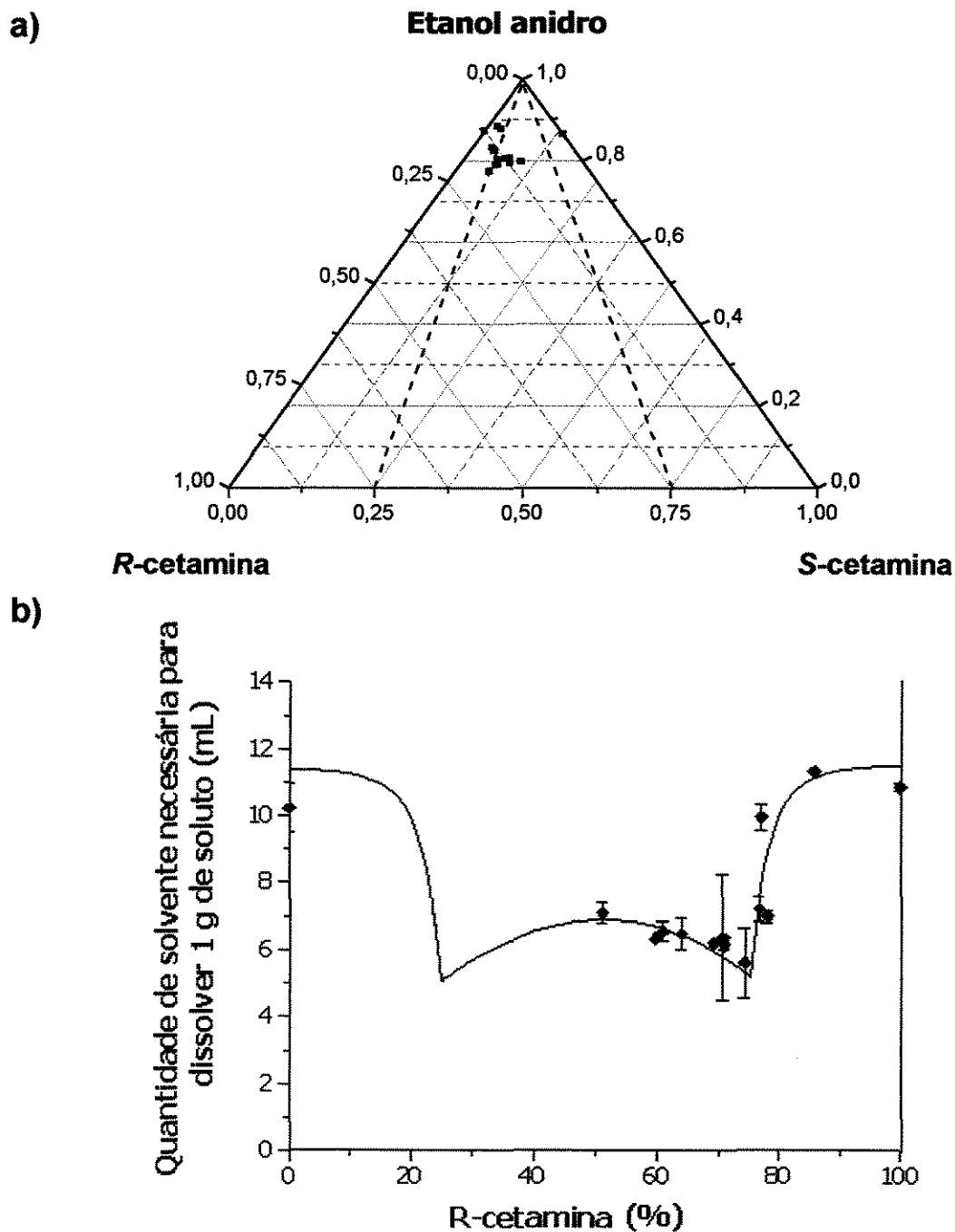
<i>Batelada #</i>	<i>Cristais formados</i>	
	<i>S (%)</i>	<i>R (%)</i>
1	1,13	98,87
2	0,91	99,09
3	1,30	98,70
4	12,35	87,65
5	18,37	81,63

#### **4.2.3. Determinação do diagrama de solubilidade**

A fase líquida que estava em equilíbrio com os sólidos resultantes dos ensaios de cristalização realizados para a localização do ponto eutético teve sua composição analisada por CLAE. A seguir, foram realizados outros experimentos de cristalização com diferentes proporções de R:S na solução-mãe (100:0, 95:5, 85:15, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50 e 0:100) cujas fases líquidas também tiveram suas composições determinadas por análise de CLAE. A partir das concentrações de equilíbrio de R-cetamina, S-cetamina e etanol foram obtidos pontos do diagrama que foi plotado de duas formas para melhor visualização: diagrama ternário e diagrama retangular (Figura 4.7).

Por apresentarem valores de solubilidade relativamente altos, a cetamina em etanol anidro gera pontos acumulados na extremidade superior quando o diagrama é plotado na forma triangular (Figura 4.7a), dificultando sua visualização e análise. Por este motivo, foi plotado também o diagrama retangular (Figura 4.7b). Pode-se observar pontos experimentais dentro da tendência de um diagrama de fases ideal para um sistema que forma compostos racêmicos.





**Figura 4.7** – Diagramas de equilíbrio do sistema *R*-cetamina/etanol/*S*-cetamina a 25°C representados nas formas triangular (a) e retangular (b). Dados experimentais: concentrações de equilíbrio (♦) e composição do ponto eutético em a (- - -). Guia visual de tendência em b (—).

Os pontos próximos ao ponto eutético apresentam os maiores valores de desvio padrão. Como discutido anteriormente, este fato pode ser atribuído à instabilidade da região próxima ao ponto eutético, onde pequenas diferenças de composição da solução podem acarretar mudanças na composição dos cristais formados, devido à grande inclinação da curva de solubilidade nessa região.

Segundo Lorenz e Seidel-Morgenstern (2002), erros maiores que 2,5% na determinação de dados de equilíbrio, são, na maioria das vezes, causados pela utilização de quantidades muito pequenas de solutos e solventes, o que torna a separação de fases difícil. Em estudos do processo de cristalização, normalmente trabalha-se acima da saturação da solução. No caso da cetamina, foram observados valores relativamente altos de solubilidade, o que implicou em grande quantidade de amostra utilizada para atingir esta supersaturação. Dessa forma, neste trabalho os ensaios foram realizados com pequenos volumes de solução, devido à limitada quantidade de amostra disponível, e não foi possível a execução de experimentos utilizando maiores volumes de amostra visando a obtenção de maiores precisões. As dificuldades encontradas corroboram o trabalho de Lorenz e Seidel-Morgenstern (2002) que concluiu que a estimativa dos equilíbrios de fase do diagrama ternário de solubilidade provou ser um processo que necessita de alto consumo de amostras e tempo.

Outro fator que pode ser causador de erros foi o método utilizado para a análise das concentrações dos enantiômeros. Os enantiômeros puros apresentaram comportamentos diferentes na absorção de luz ultravioleta, sendo a *R*-cetamina mais sensível ao comprimento de onda utilizado, o que acarretou um erro sistemático que resultou em solubilidades maiores e pode ter causado um pequeno deslocamento do diagrama de solubilidade para cima. No entanto, este método analítico teve sua reprodutibilidade avaliada e apresentou um coeficiente de variação de somente 0,3%.

### 4.3. Ensaio de cristalização em batelada

A fim de estimar rendimento e produtividade da etapa de cristalização foram realizados os ensaios em batelada. As concentrações iniciais (Conc. Inicial) das soluções dos ensaios de cristalização em reatores com temperatura controlada, assim como os tipos de agitação utilizados, as massas recuperadas (massa recup.) em cada um desses ensaios e os respectivos rendimentos e produtividades então representados na Tabela 4.3. Os rendimentos foram calculados através da massa do enantiômero S recuperado em relação a massa de S que estava acima da solubilidade da solução de proporção 80:20 de S:R (110 mg/mL). A produtividade está representada em termos de massa recuperada por volume de reator por tempo de operação.

**Tabela 4.3** – Parâmetros operacionais dos ensaios de cristalização de soluções de proporção inicial 80:20 de S:R a 25°C.

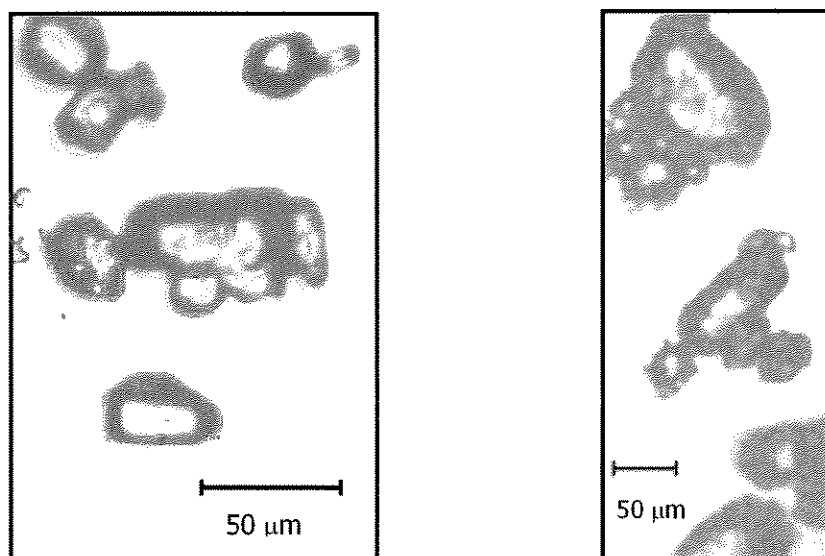
<i>Ensaio</i>	<i>Conc. inicial (g/L)</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>Agitação</i>	<i>t (h)</i>	<i>Massa recup. (g)</i>	<i>Rendimento* (%)</i>	<i>Produtividade (g/L h)</i>
1	250	20	magnética	20	1,9302	68,90	4,82
2	150	20	magnética	20	0,5753	71,91	1,44
3	150	30	mecânica	4	0,7820	65,17	6,51

\* Rendimento (%) = massa de S recuperada / massa de S acima da solubilidade.

Uma vez que o diagrama de solubilidade foi determinado utilizando cristalização por resfriamento, mas com a solução-mãe em repouso, o tempo necessário para o equilíbrio ser atingido utilizando-se agitação não é conhecido. Então, os ensaios 1 e 2 foram realizados durante o tempo de 20 h para garantir que o equilíbrio havia sido alcançado. No entanto, o monitoramento visual do processo verificou a formação de cristais em tempos menores que 1 h para ambos os ensaios (1 e 2), independentemente da concentração inicial. A opção por um tempo de operação longo acarretou em uma diminuição da produtividade. Para

minimizar esta queda da produtividade, no ensaio 3 o tempo de operação utilizado foi de 4 h, e a comparação desta batelada com o ensaio 2, de mesma concentração inicial e rendimentos semelhantes, revela que a diminuição do tempo de operação levou a um aumento de produtividade.

Apesar do pequeno tempo de indução do ensaio 1, que utilizou a solução inicial de maior concentração, os cristais obtidos se mostraram um pó fino, como mostrado nas fotos de microscopia ótica apresentadas na Figura 4.8.

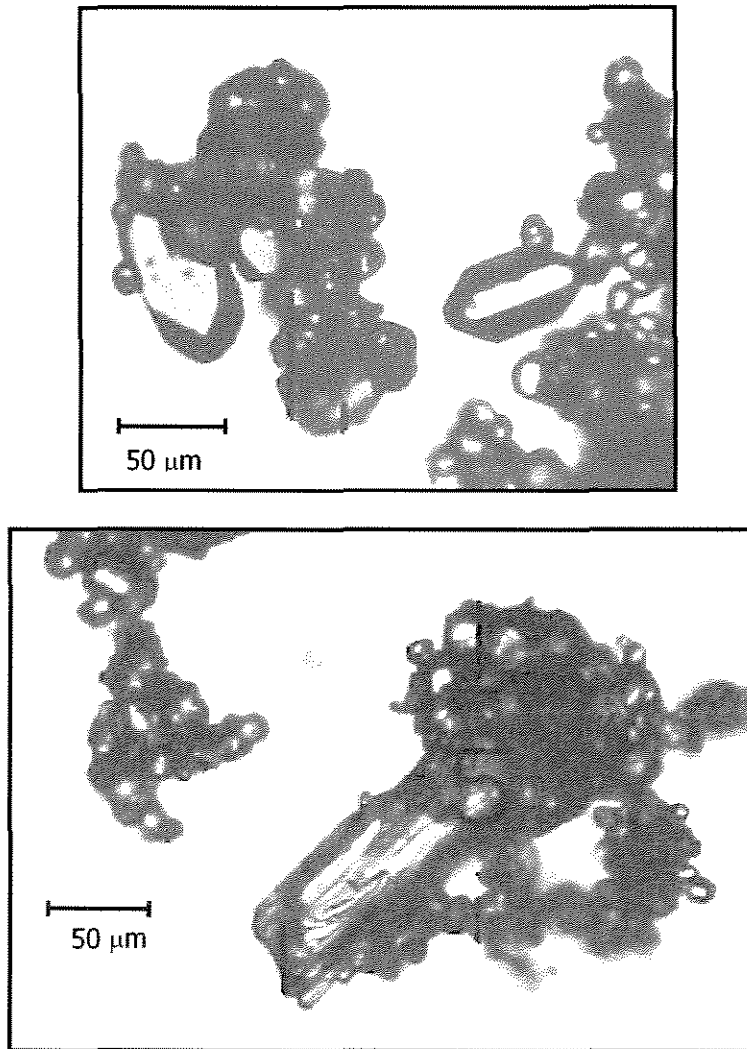


**Figura 4.8** – Cristais formados por cristalização em batelada de 20 mL a 25°C sob agitação magnética. Concentração inicial de 250 g/L e tempo de operação de 20 h (ensaio 1).

O reduzido tamanho dos cristais foi atribuído à alta supersaturação da solução inicial, uma vez que grandes valores de supersaturação levam à alta taxa de nucleação (Mullin, 2001). Com a formação de vários núcleos, a massa a ser cristalizada é distribuída, sendo a obtenção de cristais pequenos uma característica de sistemas com alta supersaturação.

Entretanto, os resultados do ensaio 2, que utilizou as mesmas condições de agitação, tempo de operação e volume de reator, mas com concentração inicial menor, não confirmaram a suposição de que o pequeno tamanho dos cristais era

conseqüência da alta supersaturação. Partindo-se de uma solução inicial de concentração 150 g/L, alguns dos cristais obtidos se mostraram maiores que os anteriores, mas a dimensão dos cristais obtidos continuou pequena (Figura 4.9).



**Figura 4.9** – Cristais formados por cristalização em batelada de 20 mL a 25°C sob agitação magnética. Concentração inicial de 150 g/L e tempo de operação de 20 h (ensaio 2).

Os cristais menores apresentaram forma esférica, enquanto os cristais maiores apresentaram uma forma alongada, assemelhando-se a paralelepípedos ou cilindros. No entanto, alguns dos cristais maiores apresentaram sinais de

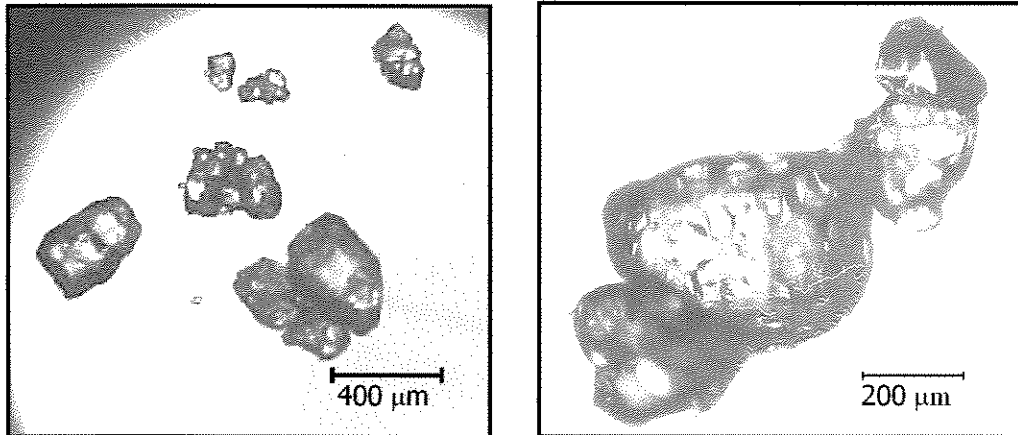
ruptura, sugerindo que a agitação magnética, devido à alta rotação, estava quebrando os cristais. Essa quebra dos cristais leva à nucleação secundária, a qual, da mesma forma que a nucleação primária ocorrida no primeiro ensaio, é responsável por um impedimento no crescimento dos cristais.

As concentrações iniciais dos três ensaios realizados estavam acima da solubilidade da mistura racêmica a 25°C (126,8 g/L), sendo esta supersaturação um pré-requisito necessário para a ocorrência da nucleação, a etapa inicial da cristalização. Como a supersaturação da solução preparada para o ensaio 1 foi maior que as dos outros dois ensaios, é justificável que a massa recuperada seja significativamente maior. A mesma abordagem pode ser utilizada para explicar a maior produtividade quando os ensaios 1 e 2 são comparados. Uma vez que os dois foram realizados durante o mesmo tempo, a maior supersaturação do primeiro (123,2 g/L) resultou em uma maior produtividade que o segundo ensaio (supersaturação de 23,2 g/L).

Quanto ao tamanho dos cristais, a utilização da agitação mecânica possibilitou a obtenção de cristais maiores que os obtidos quando a agitação magnética foi empregada (Figura 4.10). O tempo de indução deste ensaio (por volta de 3 h), maior que o do ensaio 2, apesar deste último ensaio possuir a mesma concentração inicial, reforça a hipótese de que a agitação magnética foi a responsável por rupturas nos cristais, resultando numa nucleação secundária e, conseqüentemente, em cristais de tamanho reduzido. Dessa forma, a agitação mecânica se mostrou vantajosa em relação à agitação magnética, uma vez que foram obtidos rendimentos semelhantes para os dois ensaios de mesma concentração inicial.

Os ensaios de cristalização em batelada possibilitaram um conhecimento inicial do processo com a obtenção de cristais de tamanho satisfatório, e os rendimentos ainda podem ser otimizados. Uma vez que este trabalho trata de estudos preliminares da etapa de cristalização, não foi determinada uma condição ótima para realização destes ensaios, obtendo-se apenas uma estimativa dos valores de rendimento e produtividade do processo, não estando os estudos

concluídos ou esgotados. Com a aplicação de conhecimentos de tecnologia de cristalização, maiores valores de rendimentos e produtividades podem ser alcançados.



**Figura 4.10** – Cristais formados por cristalização em batelada de 30 mL a 25°C sob agitação mecânica de 260 rpm. Concentração inicial de 150 g/L e tempo de operação de 4 h (ensaio 3).

Nestas estimativas de rendimento e produtividade, não foi considerada a etapa de concentração da solução proveniente do leito móvel simulado. Esta concentração é necessária para que a cristalização por resfriamento seja possível, já que no trabalho de Santos (2003), a concentração final do refinado contendo a S-cetamina é de 5 g/L, 30 vezes menor que a concentração inicial da etapa de cristalização realizada. No entanto, por trabalharem com soluções diluídas, os processos de cromatografia freqüentemente estão associados a etapas de recuperação dos solventes utilizados. Dessa forma, considerou-se que a etapa de concentração anterior à cristalização está envolvida na operação do leito móvel simulado, não sendo avaliado se esta etapa exerce alguma influência no rendimento e produtividade da cristalização.

## CAPÍTULO 05

### CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

#### 5.1. Conclusões

- a) As diferenças entre os espectros de infravermelho e entre os difratogramas de raios-X obtidos para os enantiômeros e para a mistura racêmica da cetamina indicaram que o cristal formado é um composto racêmico.
- b) A curva de solubilidade *versus* temperatura também indicou a formação de composto racêmico, devido à diferença obtida de solubilidades entre os enantiômeros e a mistura racêmica da cetamina, já que segundo Jacques (1981), para conglomerados a solubilidade do racemato é o dobro da solubilidade dos enantiômeros puros, o que não foi o caso dos dados determinados.
- c) A curva de solubilidade permite inferir que a cristalização por resfriamento pode ser utilizada para construção do diagrama de fases.
- d) A determinação do ponto eutético (75:25) também indicou que o racemato de cetamina era um composto racêmico, já que conglomerados sempre possuem na composição do ponto eutético a mesma proporção dos dois enantiômeros, o que não ocorreu para a cetamina em etanol anidro.



- e) A localização do ponto eutético no diagrama de solubilidade indicou que, obtendo-se uma pureza de extrato ou refinado proveniente do LMS acima deste valor (75%), será possível o acoplamento de uma etapa de cristalização que fornecerá somente um dos enantiômeros na forma sólida. O diagrama parcial de solubilidade para o sistema S-cetamina/etanol/R-cetamina foi construído para proporções de predominantemente R-cetamina. No entanto, esse diagrama é simétrico, e pode ser aplicado para formação de cristais de S, quando este está em excesso.
- f) Os ensaios em batelada resultaram em cristais de S-cetamina com pureza enantiomérica de 100,00%, enquanto que para os ensaios em menor escala e sem agitação feitos anteriormente esta pureza foi no máximo 99,52%, indicando que a cristalização de somente um dos enantiômeros a partir de misturas parcialmente resolvidas é factível. Rendimentos de 71,91% e produtividade de 6,51 g/L h foram obtidos, no entanto, deve-se ressaltar que não se fez otimização do processo.

Assim, o trabalho alcançou seu objetivo de fornecer informações suficientes para o acoplamento dos processos de cromatografia em leito móvel simulado e cristalização.

## 5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Para a continuação do estudo da etapa de cristalização a ser acoplada à jusante do leito móvel simulado sugere-se:

- a) A determinação do diagrama de solubilidade a temperaturas menores que 25°C, para que a diferença de temperatura aplicada no resfriamento seja maior, aumentando a supersaturação. Dessa forma, a concentração por evaporação da solução proveniente do leito móvel simulado pode ser minimizada, uma vez que a concentração inicial da cristalização poderá ser menor.

- b) Ensaio em reatores de maiores volumes e aplicação de conhecimentos de tecnologia de cristalização, como determinação da cinética de cristalização e otimização das condições de agitação, para se alcançar tamanho de cristais, distribuição de tamanhos de cristais, rendimento e produtividade adequados.
- c) Avaliação de produtividade da etapa de cromatografia, para posterior determinação da produtividade do processo global e comparação entre a produção utilizando somente LMS e a produção através do acoplamento das duas operações unitárias.
- d) Emprego de evaporação do solvente como método de obtenção da supersaturação, eliminando-se o gasto de energia no resfriamento, uma vez que a evaporação é utilizada na recuperação do solvente no LMS.
- e) Determinação de diagramas de solubilidade para a cetamina utilizando DSC para a comparação dos métodos, como sugerido pelo trabalho de Lorenz e Seidel-Morgenstern (2002). Posteriormente, o uso do DSC para a determinação do diagrama de solubilidade poderá ser estendido para outras substâncias quirais.
- f) Tentativa de mudança de solvente, uma vez que o tipo de cristal formado depende do solvente empregado na solução.

## CAPÍTULO 06

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

1. ATKINS, P. W. *Physical Chemistry*. Oxford: Oxford University Press, 1986.
2. BEILLES, S., CARDINAEL, P., NDZIÉ, E., PETIT, S., COQUEREL, G. Preferential crystallisation and comparative crystal growth study between pure enantiomer and racemic mixture of a chiral molecule: 5-ethyl-5-methylhydantoin. *Chemical Engineering Science*, v.56, p.2281-2294, 2001.
3. BERNARDO, A., CALMANOVICI, C. E., MIRANDA, E. A. Observance of polymorphic behavior during dissolution of insulin and lysozyme. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. "in press"
4. BLASCHKE, G. Chromatographic resolution of chiral drugs on polyamides and cellulose triacetate. *Journal of Liquid Chromatography*, v.9, n.2, p.341-368, 1986.
5. BLUMENSTEIN, J. J. Chiral Drugs: Regulatory Aspects. In: *Chirality in Industry*, Collins, N., Sheldrake, G. N., and Crosby, J., editors. West Sussex: John Willey&Sons, 1997.
6. BROCK, C. P., SCHWEIZER, W. B., DUNITZ, J. D. On the validity of Wallach's Rule: On the density and stability of racemic crystals compared with their chiral counterparts. *Journal of American Chemical Society*, v.113,

- p.9811-9820, 1991.
7. BUHSE, T., DURAND, D., KONDEPUDI, D., LAUDADIO, J., SPILKER, S. Chiral symmetry breaking in crystallization: The role of convection. *Physical Review Letters*, v.84, p. 4405-4408, 2000.
  8. BURGER, A., ROLLINGER, J. M., BRUGGELLER, P. Binary system of (R)- and (S)-nitrendipine – Polymorphism and structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.86, n.6, p.674-679, 1997.
  9. CARTWRIGHT, J. H. E., GARCÍA-RUIZ, J. M., PIRO, O., SAINZ-DÍAZ, I., TUVAL, I. Chiral symmetry breaking during crystallization: an advection-mediated nonlinear autocatalytic process. *Physical Review Letters*, v.93, n.3, p.35502-1-35502-4, 2004.
  10. CROSBY, J. Introduction. In *Chirality in Industry*, Collins, N., Sheldrake, G. N., and Crosby, J., editors. West Sussex: John Willey&Sons, 1997.
  11. GALLIS, H. E., BOUGRIOUA, F., OONK, H. A. J., EKEREN, P. J., MILTENBURG, J. C. Mixtures of d- and l-carvone: I. Differential scanning calorimetry and solid-liquid phase diagram. *Thermochimica Acta*, v.274, p.231-242, 1996.
  12. KASPEREIT, M., LORENZ, H., SEIDEL-MORGENSTERN, A. Coupling of simulated moving bed technology and crystallization to separate enantiomers. In: *Fundamentals of Adsorption 7*. Chiba-City: IK International, 2002.
  13. KOMMURU, T. R., KHAN, M. A., REDDY, I. K. Racemate and enantiomers of ketoprofen: Phase diagram, thermodynamic studies, skin permeability, and use of chiral permeation enhancers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.87, n.7, p.833-840, 1998.
  14. KONDEPUDI, D. K., SABANAYAGAM, C. Secondary nucleation that leads to chiral symmetry breaking in stirred crystallization. *Chemical Physics Letters*, v.217, p.364-368, 1994.

15. JABRANE, S., LÉTOFFÉ, J. M., CLAUDY, P. Vitrification and crystallization in the R(-)1,2-propanediol – S(+)-1,2-propanediol system. *Thermochimica Acta*, v.258, p.33-47, 1995.
16. JACQUES, J., COLLET, A., WILEN, S. H. *Enantiomers, racemates and resolutions*. New York: Wiley-Interscience, 1981.
17. JUZA, M., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M. Simulated moving bed and its application to chiral technology. *Trends in Biotechnology*, v.18, p.108-118, 2000.
18. LEITÃO, M. L. P., EUSÉBIO, M. E., MARIA, T. M. R., REDINHA, J. S. (Solid + liquid) phase diagram for trans-1,2-cyclohexanediol enantiomer mixtures. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v.34, p.557-568, 2002.
19. LI, Z. J., GRANT, D. J. W. Effects of excess enantiomer on the crystal properties of a racemic compound: ephedrinium 2-naphthalenesulfonate. *International Journal of Pharmaceutics*, v.137, p.21-31, 1996.
20. LI, Z. J., ZELL, M. T., MUNSON, E. J., GRANT, D. J. W. Characterization of racemic species of chiral drugs using thermal analysis, thermodynamic calculation, and structural studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.88, p.337-346, 1999.
21. LIM, B-G., CHING, C-B., TAN, R. B. H., NG, S.-C. Recovery of (-)-praziquantel from racemic mixtures by continuous chromatography and crystallization. *Chemical Engineering Science*, v.50, n.14, p.2289-2298, 1995.
22. LORENZ, H., SEIDEL-MORGENSTERN, A. Binary and ternary phase diagrams of two enantiomers in solvent systems. *Thermochimica Acta*, v.382, p. 129-142, 2002.
23. LORENZ, H., SEIDEL-MORGENSTERN, A. A contribution to the mandelic acid phase diagram. *Thermochimica Acta*, v.415, p.55-61, 2004.
24. LORENZ, H., SHEEHAN, P., SEIDEL-MORGENSTERN, A. Coupling of

- simulated moving bed chromatography and fractional crystallization for efficient enantioseparation. *Journal of Chromatography A*, n.908, p.201-214, 2001.
25. LORENZ, H., SPOUNDJIEV, D., SEIDEL-MORGENSTERN, A. Enantiomeric mandelic acid system – melting point phase diagram and solubility in water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, n.47, p.1280-1284, 2002.
26. MATSUOKA, M. Purity drop in optical resolution of racemic mixtures. In: *Separation and purification by crystallization*. Botsaris, G. D. and Toyokura, K., editors. Washington: American Chemical Society, 1997.
27. MERSMANN, A. *Crystallization Technology Handbook*. New York: Marcel Dekker Inc., 2001.
28. MOHAN, R., LORENZ, H., MYERSON, A. S. Solubility measurement using differential scanning calorimetry. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.41, p.4854-4862, 2002.
29. MULLIN, J. W. *Crystallization*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001.
30. NEMÁK, K., ÁCS, M., KOZMA, D., FOGASSY, E. Racemic compound formation - conglomerate formation. *Journal of Thermal Analysis*, v.48, p.691-696, 1997.
31. NISHIZAWA, N., NAKAO, S-I., NAGATA, A., HIROSE, T., MASUZAWA, M., SHINGU, K. The effect of ketamine isomers on both mice behavioral responses and c-Fos expression in the posterior cingulate and retrosplenial cortices. *Brain Research*, n.857, p.188-192, 2000.
32. NÝVLT, J., HOSTOMSKÝ, J., GIULIETTI, M. *Cristalização*. São Carlos: Editora da UFSCar, 2001.
33. PELLA, E., RESTELLI, R. Binary phase diagram of the enantiomer of indoprofen. *Mikrochimica Acta*, v.1, p.65-74, 1983.
34. PROFIR, V. M., FURUSJÖ, E., DANIELSSON, L-G., RASMUSON, A. Study

- of the crystallization of mandelic acid in water using in situ ATR-FTIR spectroscopy. *Crystal Growth and Design*, v.2, n.4, p.273-279, 2002.
35. REKOSKE, J. E. Chiral separations. *AIChE Journal*, v.47, n.1, p.2-5, 2001.
36. REYNOLDS, J. E. F, editor. *Martindale, The Extra Pharmacopeia*, 29<sup>a</sup> ed. Londres: The Pharmaceutical Press, 1989.
37. ROFAEL, H. Z., ABDEL-RAHMAN, M. S. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cocaine, its metabolites and ketamine. *Journal of Applied Toxicology*, v.22, p.123-128, 2002.
38. RUSTICHELLI, C., GAMBERINI, M. C, FERIOLI, V., GAMBERINI, G. Properties of the racemic species of verapamil hydrochloride and gallopamil hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, n.178, p.111-120, 1999.
39. SAMANT, R. N., CHANDALLA, S. B. Separation of racemic mixtures: optical resolution of DL-2-amino-1-butanol. *Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development*, v.24, p.426-429, 1985.
40. SANTOS, M. A. G., VEREDAS, V., SILVA JR, I. J., CORREIA, C. R. D., FURLAN, L. T., SANTANA, C.C. Simulated moving-bed adsorption for separation of racemic mixtures. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.21, n.01, p.127-136, 2004.
41. SCHROER, J. W., WIBOWO, C., NG, K.M. Synthesis of chiral crystallization processes. *AIChE Journal*, v.47, n.2, p.369-387, 2001.
42. SECOR, R. M. Resolution of optical isomers by crystallization procedures. *Chemical Reviews*, n.63, p.297-309, 1963.
43. SHELDON, R. A. *Chirotechnology*. New York: Marcell Dekker, 1993.
44. SKOOG, D. A. *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College Publishing, 1985.

45. STINSON, S. C. Chiral pharmaceuticals. *Chemical and Engineering News*, n.79, p.79-97, 2001.
46. STROHLEIN, G., SCHULTE, M., STRUBE, J. Hybrid processes: Design method for optimal coupling of chromatography and crystallization units. *Separation Science and Technology*, v.38, p.3353-3383, 2003.
47. SVENSSON, J-O., GUSTAFSSON, L. L. Determination of ketamine and norketamine enantiomers in plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, n.678, p.373-376, 1996.
48. TAVARES, E. C., MARCELINO, S. I. S., CHIAVONE-FILHO, O., SOUZA, C. P. Determination of salt solubility data for ternary aqueous systems with a quasiisothermic thermometric technique. *Thermochimica Acta*, v.328, p.253-258, 1999.
49. TOYOKURA, K., KUROTANI, M., FUJINAWA, J. Concentration change of L-SCMC [S-(carboxymethyl)-L-cysteine] in a supersaturated solution of DL-SCMC with suspended L-SCMC seeds in batch operation. In: *Separation and purification by crystallization*. Botsaris, G. D. and Toyokura, K., editors. Washington: American Chemical Society, 1997.
50. USP, 21<sup>a</sup> revisão. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 1985.
51. WANG, X., WANG, X. J., CHING, C. B. Solubility, metastable zone width, and racemic characterization of propranolol hydrochloride. *Chirality*, v.14, p.318-324, 2002.
52. WANG, X. J., WEHLER, H., CHING, C. B. Physicochemical properties and the crystallization thermodynamics of the pure enantiomer and the racemate for N-methylephedrine. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v.48, p. 1092-1098, 2003.
53. WANNMACHERL, F. D. *Farmacologia clínica – Fundamentos da terapêutica racional*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1998.



54. WOOD, W. M. L. Crystal science techniques in the manufacture of chiral compounds, p. . In: *Chirality in Industry*, Collins, N., Sheldrake, G. N. and Crosby, J., editors. West Sussex: John Willey&Sons, 1997.
55. YANAGIHARA, Y., OHTANI, M., KARIYA, S., UCHINO, K., AOYAMA, T., YAMAMURA, Y., IGA, T. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketamine and its active metabolite, norketamina, in human plasma. *Journal of Chromatography B*, n.746, p.227-231, 2000.
56. YOKOTA, M., DOKI, N., HATAKEYAMA, T., SASAKI, S., KUBOTA, N. Chiral separation by crystal size difference. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v.37, n.10, p.1284-1285, 2004.
57. ZHANG, G. G. Z., PASPAL, S. Y. L., SURYANARAYANAN, R., GRANT, D. J. W. Racemic species of sodium ibuprofen: Characterization and polymorphic relationships. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.92, n.7, p.1356-1366, 2003.