



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

2005 11495
**ESTUDO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS
ENANTIÔMEROS DO OMEPRAZOL EM FASE
ESTACIONÁRIA QUIRAL KROMASIL CHI-TBB (0,0'-BIS[4-
TERC-BUTILBENZOIL]-N,N'-DIALIL-L-TARTADIAMIDA)**

Autor: Paulo César Pires Rosa

Orientador: Prof. Dr. César Costapinto Santana

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Março de 2005

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TIV/Unicamp
	R71e
V	EX
TOMBO BC/	64298
PROC.	16-P-00086-05
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	13/06/05
Nº CPD	

Bibid: 353049

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

R71e Rosa, Paulo César Pires
Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (0,0'-BIS[4-*TERC*-BUTILBENZOIL] -N,N'DIALIL-L-TARTADIAMIDA) / Paulo César Pires Rosa.--Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: César Costapinto Santana
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Omeprazol - Separação. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Enantiômeros. 4. Quiralidade. 5. Dispepsia. I. Santana, César Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Study of the chromatographic separation of the enantiomers of the omeprazole in stationary phase quiral Kromasil CHI-TBB (0,0'-BIS[4-*TERC*-BUTYLBENZOYL] -N,N'DIALIL-L-TARTADIAMIDE)

Palavras-chave em Inglês: Separation of omeprazole, High performance liquid chromatography, Enantiomers, Chirality e Dyspepsia

Área de concentração: Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim e Beatriz Vahan Kilikian

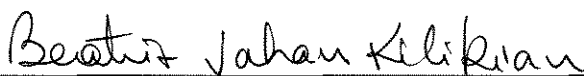
Data da defesa: 01/03/2005

Folha de Aprovação

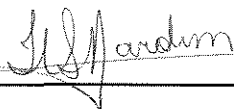
Dissertação de Mestrado defendida por Paulo César Pires Rosa e aprovada em 01 de março de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Cesar Costa Pinto Santana (Orientador)

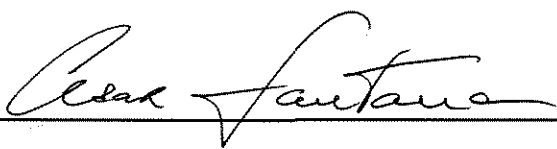


Profa. Dra. Beatriz Vahan Kilikian (USP)



Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-Unicamp)

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Paulo César Pires Rosa e aprovada pela comissão julgadora em 01 de março de 2005.

A handwritten signature in black ink, reading "Cesar Santana", is positioned above a horizontal line. The signature is fluid and cursive, with the first name "Cesar" and the last name "Santana" clearly distinguishable.

Prof. Dr. Cesar Costa Pinto Santana

Dedico

À Deus pela capacitação;

À minha esposa, Michèlle, e ao meu filho,

Dimitri, pelo amor, incentivo e compreensão;

Aos meus pais pela educação, carinho e apoio.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Cesar Costapinto Santana pelo orientação no meu trabalho, paciência, compreensão e auxílio.

À Professora Dr.^a Sônia Maria Alves Bueno por ter cedido o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado na realização deste trabalho.

À Medley Indústria Farmacêutica S.A. pela liberação do horário de trabalho e pelo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos professores do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pelos ótimos ensinamentos passados nas disciplinas e também nas orientações.

Aos amigos do laboratório Caroline, Ivanildo, João Paulo, Marco Torres e Vinicius pelo apoio, explicações e companheirismo.

À todos os colegas do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pela amizade e apoio ao longo destes anos.

À todos da Unicamp, Medley, amigos e parentes que contribuíram para a realização deste trabalho, mas que por porventura não foram mencionados, meus sinceros agradecimentos.

Sumário

RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
LISTA DE SÍMBOLOS	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxvii
LISTA DE FIGURAS	xxxiii
CAPÍTULO 1 – Introdução	1
1.1. A importância biológica da quiralidade	1
1.2. Objetivos	4
 CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica	 5
2.1. Fundamentos de Estereoquímica	5
2.1.1. Introdução	5
2.1.2. Estereoquímica	6
2.1.3. Os Enantiômeros	7
2.1.4. Quiralidade e o centro quiral	7
2.2. Fármacos para o controle da acidez gástrica	9
2.2.1. Introdução	9
2.2.2. Classificação dos fármacos para o controle da acidez gástrica	10
2.2.3. Fármacos inibidores da bomba de prótons	10
2.2.3.1. Omeprazol	11
2.2.3.2. Vias de obtenção de omeprazol	12
2.2.3.3. Esomeprazol	13
2.3. Vias de resolução de compostos racêmicos	14
2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	18

2.5. Cromatografia Quiral	23
2.5.1. Fases estacionárias quirais	24
2.6. Características da coluna cromatográfica quiral	28
2.6.1. Volume morto	29
2.6.2. Porosidades	29
2.6.3. Avaliação da queda de pressão	30
2.7. Parâmetros cromatográficos	31
2.7.1. Fator de Retenção	32
2.7.2. Fator de Separação	33
2.7.3. Resolução	33
2.7.4. Fator de Assimetria	34
2.7.5. Numero de Pratos	35
2.8. Métodos dos Momentos	35
2.9. Altura Equivalente a um Prato	37
2.10. Modelagem Matemática da coluna cromatográfica quiral	41
2.11. Isotermas de equilíbrio de adsorção	43
2.12. Análise termodinâmica de adsorção	44
2.13. Sobrecarga da coluna	46
 CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos	 48
3.1. Materiais	48
3.1.1. O omeprazol	48
3.1.2. O sorvente	49
3.1.3 Reagentes	51
3.1.4. Aparelhagem experimental	51

3.2. Métodos	52
3.2.1. Desenvolvimento do método de separação cromatográfica	52
3.2.2. Experimentos com soluções diluídas	53
3.2.2.1 Determinação das porosidades	53
3.2.2.2 Avaliação da queda de pressão	54
3.2.2.3 Obtenção da solução do Isômero R-omeprazol	54
3.2.2.4 Determinação dos parâmetros cromatográficos	55
3.2.2.5 Determinação das constantes de Henry - Isotermas Lineares	55
3.2.2.6 Determinação dos coeficientes de dispersão axial e parâmetros de transferência de massa.	55
3.2.2.7 Análise termodinâmica de adsorção	56
3.2.3. Experimentos com soluções concentradas	56
3.2.3.1 Determinação das isotermas de adsorção	56
3.2.3.2 Estudo de sobrecarga da coluna	57
 CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussão	 58
4.1. Experimentos para desenvolvimento do método de separação cromatográfica	58
4.2. Obtenção da solução do isômero R-omeprazol	65
4.3. Experimentos com soluções diluídas	65
4.3.1. Determinação do volume de retardamento da fase móvel, das porosidades total, do leito e das partículas	65
4.3.2. Avaliação da queda de pressão	68
4.3.3. Determinação dos parâmetros cromatográficos	70
4.3.3.1 Cromatogramas	77
4.3.3.2 Avaliação da alteração do tempo de retenção com a temperatura	84

4.4. Constantes de equilíbrio de adsorção linear – constantes de Henry	87
4.5. Determinação dos coeficientes de dispersão axial e dos parâmetros de transferência de massa	88
4.6. Análise termodinâmica de adsorção	95
4.7. Determinação das isotermas de adsorção competitivas	97
4.8. Estudo de sobrecarga da coluna	100
 CAPÍTULO 5 - Conclusões	 104
 CAPÍTULO 6 – Sugestões para Futuros Trabalhos	 106
 CAPÍTULO 7 – Referências Bibliográficas	 107

Resumo

O fármaco racêmico omeprazol tem sido utilizado no tratamento de doenças relacionadas à acidez gástrica e apresenta atividades diferentes entre os enantiômeros. O enantiômero S, conhecido como esomeprazol, tem maior atividade quanto à inibição da secreção gástrica e tem sido obtido a partir de uma síntese assimétrica. Entretanto, a síntese assimétrica é um processo de alto custo, que exige muitas etapas de desenvolvimento em que apenas um dos enantiômeros pode ser obtido. A separação cromatográfica com fase estacionária quiral (FEQ) tem sido utilizada como uma opção para obtenção de ambos os enantiômeros com elevada pureza ótica. Algumas FEQ têm sido utilizadas na separação do $\pm$ omeprazol, entretanto a FEQ Kromasil CHI-TBB ainda não foi utilizada para essa separação. Neste trabalho, foi realizado o desenvolvimento da separação do omeprazol racêmico utilizando a FEQ Kromasil CHI-TBB, e foram determinados parâmetros fundamentais para a separação em escala preparativa. A coluna foi caracterizada através da determinação das porosidades do sistema e avaliação da queda de pressão, apresentado porosidades indicativas de um processo uniforme de enchimento da coluna e baixa queda de pressão. Os parâmetros de separação cromatográfica, determinados a diferentes temperaturas e vazões apresentaram número de pratos, fator de separação e resolução superiores a 1200, 1,24 e 1,74 para a condição extrema de vazão 4,0 mL/min e temperatura 40°C. Em condições de concentrações elevadas foi obtido fator de separação superior a 1,27. O coeficiente de dispersão axial apresentou pouca variação entre os enantiômeros, entretanto a transferência de massa global foi considerada relativamente rápida com valores de 21,03 e 17,83 min⁻¹ para S e R-omeprazol, respectivamente. A isoterma de adsorção competitiva apresentou comportamento linear e elevada quantidade de enantiômero adsorvido na FEQ. A entalpia de adsorção determinada mostrou a fenômenos entálpicos regem a separação dos enantiômeros na FEQ avaliada. O estudo de sobrecarga da coluna realizado em concentrações elevadas mostrou a possibilidade da separação do omeprazol racêmico. Os resultados obtidos mostram que a FEQ Kromasil CHI-TBB é capaz de separar os enantiômeros do omeprazol em condições de escala preparativa sendo uma alternativa para a produção do S-omeprazol.

Palavras-chave: separação cromatográfica quiral, enantiômeros, omeprazol.

Abstract

The racemic mixture of the omeprazole has been used in the treatment of illnesses related to the gastric acidity and presents different activities between the enantiomers. Enantiomer S, known as esomeprazole, has greater activity how much to the inhibition of the gastric secretion and has been gotten from an asymmetric synthesis. However, the asymmetric synthesis is a process of high cost, that demands many stages of development where only one of the enantiomers can be gotten. The chromatographic separation with quiral stationary phase (CSP) has been used as an option for attainment of both the enantiomers with raised pureness optics. Some CSP have been used in the separation of omeprazole, however the FEQ Kromasil CHI-TBB was still not used for this separation. In this work, the development of the separation of omeprazole was carried through racemic mixture using the CSP Kromasil CHI-TBB, and had been determined basic parameters for the separation in preparative scale. The column was characterized through the determination of the porosities of the system and evaluation of the fall of pressure, presented indicative porosities of a process wadding uniform of the column and low pressure fall. The parameters of chromatographic separation, determined the different temperatures and outflows had presented plate number, factor of separation and resolution values larger than 1200, 1,24 and 1,74 for the extreme condition of 4,0 outflow mL/min and temperature 40°C. In conditions of high concentrations has obtained the separation factor value larger than of 1,27. The coefficient of axial dispersion presented little variation between the enantiômeros, however the transference of global mass was considered relatively fast with 17,83 values of 21,03 and min-1 for S and R-omeprazole, respectively. The isotherm of competitive adsorption presented linear behavior and high amount of enantiomer adsorbed in the CSP. The enthalpy of the adsorption determined showed the entalpics phenomena conducts the separation of the enantiômeros in the FEQ studied. The study of overload of the column carried through in high concentrations showed the possibility of the separation of omeprazole racemic. The gotten results show that the FEQ Kromasil CHI-TBB is capable to separate the enantiomers of omeprazol in conditions of preparative scale being an alternative for the production of the S-omprazole.

Word-key: chiral chromatographic separation, enantiomers, omeprazole.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Lista de Símbolos

A	Coefficiente da equação de van Deemter (cm) referente a difusão turbilhonar (Eq. 2.7)
A_{S10}	Fator de Assimetria a 10% da altura do pico
B	Coefficiente da equação de van Deemter ($\text{cm}^2 \text{ min}^{-1}$) referente a difusão longitudinal (Eq. 2.7)
C	Coefficiente da equação de van Deemter (min) referente à transferência de massa (Eq. 2.7)
C_i	Concentração do componente i na fase líquida (g L^{-1})
$C_{d,i}$	Concentração de cada componente no volume coletado (g L^{-1})
$C_{F,i}$	Concentração da alimentação para cada enantiômero (g L^{-1})
d_p	Diâmetro das partículas (cm)
D	Diâmetro da coluna (cm)
D_L	Coefficiente de dispersão axial ($\text{cm}^2 \text{ min}^{-1}$)
F	Vazão volumétrica (mL min^{-1})
FEQ	Fase estacionária quiral
H	Altura equivalente a um prato (cm)
H_i	Constante de equilíbrio de adsorção linear – constante de Henry
k	Fator de retenção
k_m	Coefficiente de transferência de massa global (min^{-1})
K_p	Constante de equilíbrio de adsorção linear
L	Comprimento da coluna (cm)
LMS	Leito móvel simulado
μ	Primeiro momento (min)
M	Massa molecular (g/mol)
N	Número de pratos
q_i	Concentração do soluto na fase estacionária (g L^{-1})
q_i^*	q_i em equilíbrio com C_i (g L^{-1})
$q_{i,j}^*$	Concentração de cada componente retido na partícula.
R_S	Resolução
SNC	Sistema Nervoso Central

T	Temperatura (°C, K)
T_{iso}	Temperatura de isoenantiosseletividade (°K)
t	Tempo (min)
t_M	Tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária (min)
t_{Ri}	Tempo de retenção do componente (min)
t_o'	Tempo de injeção (min)
u	Velocidade linear da fase móvel (cm min ⁻¹)
V_C	Volume da coluna (mL)
V_d	Volume do eluente coletado (mL)
V_M	Volume de retardamento da fase móvel. (mL)
V_S	Volume do sólido (mL)
z	Distancia longitudinal da coluna (cm)
w_b	Largura dos picos na base (cm)
w_h	Largura dos picos a meia-altura (cm)

Símbolos gregos

σ^2	Segundo momento
α	Fator de separação
ε	Porosidade do leito
ε_T	Porosidade total do leito
ε_p	Porosidade da partícula
ν	Viscosidade cinemática (cm ² s ⁻¹)
ϕ	Coefficiente de associação do solvente
η	Viscosidade (g cm ⁻¹ s ⁻¹)
K	permeabilidade do leito (cm ²)
ΔH	Entalpia molar de adsorção (kJ/mol)
ΔS	Entropia molar de adsorção(J/mol)
ΔG	Variação da energia de Gibbs (J/mol)

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Lista de fármacos quirais com diferentes atividade para os enantiômeros	16
Tabela 2.2 – Lista de fármacos mais vendidos como enantiômeros puros.	17
Tabela 2.3 – Fases estacionárias atualmente mais utilizadas para separação dos enantiômeros do omeprazol	26
Tabela 4.1 – Tempos de retenção dos enantiômeros do omeprazol com a variação do fluxo da fase móvel a 25 °C. Concentração da solução de 0,15 mg/mL.	61
Tabela 4.2 – Variação da composição da fase móvel com a adição de etanol.	63
Tabela 4.3 – Volume morto determinado com injeção do composto inerte TTBB nas conexões do sistema de CLAE sem a presença da coluna para cada vazão estudada.	66
Tabela 4.4 – Resultado da porosidade total a temperatura de 20°C, 25°C, 30°C e 40°C.	66
Tabela 4.5 – Resultado das porosidades do leito e das partículas	67
Tabela 4.6 – Dados de pressão para a coluna preparativa Kromasil CHI-TTBB e a coluna analítica Chiracel OD. O símbolo * indica pressão acima do limite aceito no sistema CLAE.	70
Tabela 4.7 – Fatores de retenção (k) e separação (α), resolução (R_s) e assimetria (A_{S10}) para cada temperatura estudada a vazão de 0,5 mL/min na separação da mistura racêmica.	71
Tabela 4.8 – Fatores de retenção (k) e separação (α), resolução (R_s) e assimetria (A_{S10}) para cada temperatura estudada a vazão de 0,75 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol.	71

Tabela 4.9 – Fatores de retenção (k) e separação (α), resolução (R_s) e assimetria (A_{S10}) para cada temperatura estudada a vazão de 1,0 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol.	71
Tabela 4.10 – Fatores de retenção (k) e separação (α), resolução (R_s) e assimetria (A_{S10}) para cada temperatura estudada a vazão de 2,0 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol.	72
Tabela 4.11 – Fatores de retenção (k) e separação (α), resolução (R_s) e assimetria (A_{S10}) para cada temperatura estudada a vazão de 3,0 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol.	72
Tabela 4.12 – Fatores de retenção (k) e separação (α), resolução (R_s) e assimetria (A_{S10}) para cada temperatura estudada a vazão de 4,0 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol.	72
Tabela 4.13 – Número de pratos para os enantiômeros do omeprazol. N_S e N_R representam o número de pratos para os enantiômeros R e S do omeprazol respectivamente obtidos a partir da injeção do omeprazol racêmico.	74
Tabela 4.14 – Número de pratos para o composto inerte TTBB. N_T , representa o número de pratos teóricos para o TTBB.	74
Tabela 4.15 – Valores de H para o enantiômero S do omeprazol.	87
Tabela 4.16 – Valores de H para o enantiômero R do omeprazol.	88
Tabela 4.17 – Número de pratos teóricos para o enantiômero S do omeprazol.	89
Tabela 4.18 – Número de pratos teóricos para o enantiômero R do omeprazol.	89
Tabela 4.19 – Parâmetros A e C da equação de van Deemter para a S-omeprazol.	92
Tabela 4.20 – Parâmetros A e C da equação de van Deemter para a R-omeprazol.	93
Tabela 4.21 – Parâmetros A e C da equação de van Deemter para o TTBB.	93

Tabela 4.22 – Valores de D_L/u e k_m obtidos a partir da análise dos momentos para os enantiômeros da omeprazol.	94
Tabela 4.23 – Valores de D_L/u obtidos a partir da análise dos momentos para o TTBB.	94
Tabela 4.24 – Valores de ΔH_{ads} e de ΔS_{ads} para os enantiômeros do omeprazol.	96
Tabela 4.25 – Dados de tempo de retenção, fatores de retenção e seletividade para injeções solução concentrada (5,0 g/L) de omeprazol racêmico a 25 °C e 2,0 mL/min: t_{RS} - S-omeprazol; t_{RR} - R-omeprazol. Volumes de injeção: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 μ L.	102

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Representação esquemática de moléculas quirais.	7
Figura 2.2 – Estrutura química dos benzimidazóis substituídos mais utilizados para inibição da secreção gástrica.	11
Figura 2.3 – Preparação de enantiômeros (Adaptado de Francotte, 1994).	15
Figura 2.4 – Comparativo entre a tecnologia utilizada e a produção científica na área quiral em 2003.	18
Figura 2.5 - Esquema de um sistema de CLAE.	20
Figura 2.6 – Alça de amostragem de uma válvula de microvolume.	21
Figura 2.7 – Representação da ligação do polímero quiral à sílica. R denota a repetição da unidade do seletor.	27
Figura 2.8 – Cromatograma teórico com as medidas para determinar os parâmetros de separação cromatográfica.	32
Figura 2.9 – Cromatograma do isômero S do omeprazol com as medidas para determinar o fator de assimetria e o fator de cauda	34
Figura 2.10. – Alargamento do pico cromatográfico a partir de diversos caminhos do fluxo.	38
Figura 2.11. – Difusão longitudinal devido à difusão do soluto para as extremidades de concentração mais baixa.	38
Figura 2.12. – Transferência de massa - efeito do tamanho da partícula e viscosidade da fase móvel.	39
Figura 2.13 – Curva de van Deemter hipotética, mostrando a variação entre a eficiência (H) com a velocidade superficial da fase móvel (u).	40
Figura 3.1 – Estrutura química do omeprazol. O símbolo (★) indica o centro quiral da molécula.	48

- Figura 3.2** – Coluna em aço inoxidável de 25 x 1 cm e diâmetro de partícula de 16 µm. 49
- Figura 3.3** – DATD baseado no seletor quiral TBB imobilizado quimicamente em sílica. R denota a repetição da unidade do seletor. 50
- Figura 3.4** – Sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência marca Waters. 52
- Figura 4.1** – Espectro de varredura da solução de omeprazol racêmico. Concentração de 0,5 g/L na fase móvel a 25°C. 59
- Figura 4.2** – Cromatograma de omeprazol racêmico com a coluna Chiracel OD de 150 x 4,6 mm. Concentração de 1,0 g/L em fase móvel hexano:etanol 70:30 v/v a 25 °C. Vazão 1,0 mL/min; volume de injeção: 10 µL; detecção UV: 302 nm. 60
- Figura 4.3** Cromatograma de omeprazol racêmico com a coluna analítica Kromasil CHI-TBB de 50 x 4,6 mm. Concentração de 1,0 g/L em fase móvel hexano :isopropanol:triethylamina:ácido acético 920:80:1,5:0,5 v/v/v/v a 25 °C; vazão 0,1 mL/min; volume de injeção: 10 µL; detecção UV: 302 nm. 61
- Figura 4.4** – Cromatograma de omeprazol racêmico com a coluna Kromasil CHI-TBB de 250 x 10 mm. Concentração de 0,15 g/L em fase móvel hexano:isopropanol:triethylamina:ácido acético 920:80:1,5:0,5 v/v/v/v a 25 °C; vazão de 6,0 mL/min. volume de injeção: 10 µL; detecção UV: 302 62
- Figura 4.5** – Cromatograma de omeprazol racêmico com a coluna Kromasil CHI-TBB de 250 x 10 mm. Concentração de 0,15 g/L em etanol a 25 °C. vazão de 2,0 mL/min de fase móvel com 5 v/v de etanol; volume de injeção 10 µL; detecção UV 302 nm 64
- Figura 4.6** – Primeiro momento vs inverso da velocidade superficial para o TTBB (■) a 25 °C 67

Figura 4.7 – Primeiro momento vs inverso da velocidade superficial para o TTBB (■) a 20 °C, 25 °C, 30 °C e 40 °C.	68
Figura 4.8 – Avaliação da queda de pressão na coluna cromatográfica quiral.	69
Figura 4.9 – Curva de variação da resolução com o fluxo da fase móvel para a temperatura de 40 °C.	75
Figura 4.10 – Curva de variação da resolução com a temperatura para vazão da fase móvel de 2 mL/min.	76
Figura 4.11 – Cromatograma do composto não retido – TTBB (0,15 g/L); volume de injeção 5 uL; 25 °C; vazão de 2,0 mL/min; detecção UV 254 nm	77
Figura 4.12 – Cromatograma do omeprazol racêmico (0,15 g/L) a 20 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm	78
Figura 4.13 – Cromatograma do omeprazol racêmico (0,15 g/L) a 25 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm	78
Figura 4.14 – Cromatograma do omeprazol racêmico (0,15 g/L) a 30 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm	79
Figura 4.15 – Cromatograma do omeprazol racêmico (0,15 g/L) a 40 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm	79
Figura 4.16 – Cromatograma do S-omeprazol (0,15 g/L) a 20 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm	80
Figura 4.17 – Cromatograma do S-omeprazol (0,15 g/L) a 25 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm	80
Figura 4.18 – Cromatograma do S-omeprazol (0,15 g/L) a 30 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm	81
Figura 4.19 - Cromatograma do S-omeprazol (0,15 g/L) a 40 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm	81

- Figura 4.20** – Cromatograma do R-omeprazol (0,15 g/L) a 20 °C;
volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm. 82
- Figura 4.21** – Cromatograma do R-omeprazol (0,15 g/L) a 25 °C;
volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm. 82
- Figura 4.22** – Cromatograma do R-omeprazol (0,15 g/L) a 30 °C;
volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm. 83
- Figura 4.23** – Cromatograma do R-omeprazol (0,15 g/L) a 40 °C;
volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm. 83
- Figura 4.24** – Tempo de retenção da omeprazol racêmico como função da
temperatura a uma vazão de 1,0 mL/min da fase móvel. 85
- Figura 4.25** – Tempo de retenção da omeprazol racêmico como função da
temperatura a uma vazão de 2,0 mL/min da fase móvel. 85
- Figura 4.26** – Tempo de retenção da omeprazol racêmico como função da
temperatura a uma vazão de 3,0 mL/min da fase móvel. 86
- Figura 4.27** – Tempo de retenção da omeprazol racêmico como função da
temperatura a uma vazão de 4,0 mL/min da fase móvel. 86
- Figura 4.28** – Curva de van Deemter para o TTBB a (■) 20 °C, (●) 25 °C,
(◆) 30 °C e (*) 40 °C. 90
- Figura 4.29** – Curva de van Deemter para a S-omeprazol a: (■) 20 °C,
(●) 25 °C, (◆) 30 °C e (*) 40 °C. 91
- Figura 4.30** – Curva de van Deemter para a R-omeprazol a (■) 20 °C,
(●) 25 °C, (◆) 30 °C e (*) 40 °C. 91
- Figura 4.31** – Curva de van Deemter para o S-omeprazol, R-omeprazol e
TTBB a (■) 20 °C, (●) 25 °C, (◆) 30 °C e (*) 40 °C. 92

- Figura 4.32** – Dependência do fator de retenção (k') com a temperatura para os enantiômeros do omeprazol. 95
- Figura 4.33** – Dependência do coeficiente de separação (α) com a temperatura para os enantiômeros do omeprazol 96
- Figura 4.34** – Curvas de ruptura-eluição para o omeprazol racêmico. Fluxo 2,0 mL/min e temperatura de 25 °C. 98
- Figura 4.35** – Curva de adsorção para determinação das isothermas de adsorção competitiva para os enantiômeros do omeprazol a 25 °C. 99
- Figura 4.36** – Cromatograma da omeprazol racêmica em condições de sobrecarga. A solução concentrada de alimentação de 5 g/L foi injetada com volumes de 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30 μ L a uma vazão de 2,0 mL/min e temperatura de 25 °C, S-omeprazol elui primeiro. 100
- Figura 4.37** – Cromatograma da omeprazol racêmica em condições de sobrecarga. A solução concentrada de alimentação de 5 g/L foi injetada com volumes de 35; 40; 45; 50; 55 e 60 μ L a uma vazão de 2,0 mL/min e temperatura de 25 °C, S-omeprazol elui primeiro. 101

Capítulo 1

1. Introdução

1.1 A importância biológica da quiralidade

Quiralidade é um fenômeno que permeia o universo, sendo uma característica da maioria dos processos biológicos naturais. Os avanços na tecnologia quiral e a habilidade de produzir compostos puros enantiomericamente têm um importante impacto no projeto de síntese, pesquisa e desenvolvimento de drogas e nas estratégias e políticas das indústrias farmacêuticas (Agranat e Caner, 1999).

A maioria das moléculas presentes na estrutura dos organismos vivos são quirais. Em nível molecular, quiralidade representa uma propriedade intrínseca dos “blocos estruturais da vida”, tais como aminoácidos e açúcares e, conseqüentemente, os peptídeos, proteínas e polissacarídeos (Maier et al., 2001). Dos vinte aminoácidos de nosso organismo, os blocos que compõe as proteínas, 19 estão na forma levógira. O único que não está na forma levógira é a glicina - só porque não é um composto quiral. Daí se observa a relevância da quiralidade em organismos vivos. De maior importância é o fato de que os enantiômeros interagem diferentemente com os sistemas biológicos que são eles próprios quirais. Os processos metabólicos e reguladores intermediários em sistemas biológicos são sensíveis à estereoquímica e freqüentemente podem ser observadas respostas diferentes quando comparadas às atividades dos pares de enantiômeros (Maier et al., 2001).

Drogas quirais, agroquímicos, aditivos em alimentos e fragrâncias representam classes de compostos com elevado potencial econômico e o interesse no estudo dessas

classes de compostos tem crescido bastante nas duas últimas décadas, sendo a indústria farmacêutica a principal responsável pelo grande número de pesquisas envolvendo essas classes de compostos.

As prováveis vantagens do uso de drogas enantiomericamente puras seriam: (1) a dose total administrada seria reduzida, (2) a relação dose-resposta seria mais eficaz, (3) a fonte de variabilidade interobjeto seria removida (4) a toxicidade, a partir do outro enantiômero, seria minimizada.

As desvantagens principais seriam o fenômeno da “inversão quiral” que ocorre com os analgésicos, antiinflamatórios não esteroidais arilpropionícos ou o fato de alguns fármacos apresentarem estreita janela terapêutica, reduzida diferença de concentração do fármaco para ser ativo e ser tóxico ao organismo. A inversão quiral significa a conversão de um enantiômero inativo ao enantiômero farmacologicamente ativo, esse fato justificaria o uso de fármacos como racematos como é o exemplo do fármaco ibuprofeno usado como antiinflamatório na forma racêmica (Lima, 1997).

Enantiômeros possuem propriedades físicas semelhantes tais como: pontos de fusão e ebulição, índice de refração, solubilidade e espectros de infravermelho e demais propriedades físicas. Muitas dessas propriedades são dependentes da magnitude das forças intermoleculares que agem entre as moléculas e para moléculas que são imagens especulares uma da outra essas forças serão idênticas (Solomons, 1996). Deste modo, não é possível separar enantiômeros por métodos tradicionais como: destilação fracionada, cristalização fracionada ou cromatografia clássica. Os enantiômeros apresentam diferentes comportamentos apenas quando interagem com outras moléculas quirais, por terem diferentes interações (Solomons, 1996).

Dentre os modos de desenvolvimento de drogas quirais, há dois cenários principais na obtenção dos enantiômeros puros: o primeiro é o desenvolvimento pelo processo de síntese enantiosseletiva; o segundo é a separação dos enantiômeros a partir de resolução da mistura racêmica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase estacionária quiral.

A síntese assimétrica consiste na elaboração de uma rota de síntese para o enantiômero desejado. Se ambos os enantiômeros são desejados, faz-se necessário o desenvolvimento de duas rotas de síntese independentes. O desenvolvimento de drogas quirais por síntese enantiosseletiva utiliza auxiliares quirais, enzimas ou processos

catalíticos estereosseletivos (Francotte, 2001). Embora a síntese assimétrica seja útil para a preparação de grandes quantidades de material, o tempo requerido no seu desenvolvimento pode torná-la impraticável e não atrativa, especialmente quando se necessita de apenas quantidades pequenas do enantiômero (Cass et al., 2003a).

A introdução e desenvolvimento de fases estacionárias quirais para cromatografia auxiliou na separação de isômeros, fornecendo um instrumento analítico para detecção, separação e quantificação dos enantiômeros. A cromatografia enantiosseletiva em fases estacionárias quirais, como ferramenta analítica para determinação de composições de mistura enantioméricas em estudos biológicos e farmacocinéticos, é agora uma técnica bem estabelecida, uma vez que algumas indústrias farmacêuticas multinacionais e centro de pesquisas têm realizado muitos estudos para a obtenção de novas fases estacionárias quirais (Guimarães e Collins, 1997). Um exemplo dessa extensa pesquisa é o exemplo da fase estacionária quiral utilizada neste trabalho produzida pela empresa Akzo Nobel. A aplicação do método em uma escala preparativa para produção de materiais opticamente ativos em quantidades favoráveis para testes biológicos, estudos toxicológicos e até mesmos testes clínicos está ganhando larga aceitação (Francotte, 1994).

O ($\pm$) Omeprazol é um potente inibidor da secreção ácida gástrica e foi primeiramente comercializado pela indústria farmacêutica Asta Médica em 1988. O ($\pm$) Omeprazol possui como centro estereogênico o átomo de enxofre e existe na forma de dois enantiômeros, enantiômero-(S) e enantiômero-(R). Omeprazol racêmico tem um método de produção validado e é produzido em larga escala, mas não há ainda um eficiente processo para a preparação de enantiômero puro (Deng et al., 2000).

Um dos enantiômeros do omeprazol o enantiômero-(S), conhecido comercialmente como Esomeprazol, tem sido alvo de alguns estudos comparando sua ação efetiva frente à cura de doenças gástricas; foi mais efetivo do que omeprazol racêmico na cura dos sintomas em pacientes com refluxo gastro-esofágico, e teve um perfil de tolerabilidade comparável ao ($\pm$) omeprazol (Kahrilas et al., 2000).

1.2 – Objetivos

O presente trabalho a ser apresentado tem como objetivo principal o estudo da separação cromatográfica do inibidor da secreção gástrica *omeprazol* em seus enantiômeros puros utilizando como fase estacionária quiral 0,0'-bis[4-terc-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartadiamida, conhecida comercialmente como Kromasil CHI-TTB. Como objetivos específicos têm-se: o desenvolvimento do método de separação cromatográfica em coluna preparativa; a realização de experimentos com soluções diluídas para a caracterização da coluna quiral quanto à determinação das porosidades total e do leito; avaliação da queda de pressão; obtenção de dados de equilíbrio de adsorção linear, de coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa; análise termodinâmica de adsorção; e experimentos com soluções concentradas para a obtenção das isotermas de adsorção competitiva, capazes de descrever, de forma satisfatória, sistemas em que as espécies de soluto presentes competem umas com as outras pelos sítios de adsorção da fase estacionária. Experimentos de sobrecarga da coluna com diferentes volumes de injeção de solução concentrada de omeprazol racêmico foram realizados com o intuito de estudar os efeitos de alargamento dos picos cromatográficos, variação do tempo de retenção e dos parâmetros de separação cromatográfica.

Capítulo 2

2. Revisão Bibliográfica

Esta parte do trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão da literatura sobre os fundamentos de estereoquímica, fármacos e sua farmacologia para o controle da acidez gástrica, parâmetros de separação cromatográfica de moléculas quirais e a determinação de parâmetros importantes para separação em escala preparativa.

2.1. Fundamentos de Estereoquímica

2.1.1 Introdução

A maioria das moléculas que constituem as plantas e animais são quirais, e geralmente apenas uma forma da molécula quiral ocorre em uma dada espécie. O corpo humano, por exemplo, é estruturalmente quiral, com o coração à esquerda do centro, e o fígado à direita (Solomons, 1996).

Moléculas quirais podem apresentar suas lateralidades diferentes de muitas maneiras, incluindo a maneira que afeta os seres humanos. Um enantiômero de um composto chamado carvona é a essência do cominho, e o outro a essência da hortelã.

A atividade de medicamentos contendo estereocentros pode, da mesma forma, variar entre enantiômeros (Solomons, 1996). Muito frequentemente um deles representa o isômero mais ativo para uma determinada ação, enquanto o outro poderia ser até mesmo

ativo, mas de um modo diferente contribuindo a efeitos colaterais, exibindo toxicidade, ou agindo como antagonico (Maier et al., 2001). Um exemplo a ser citado, é o caso da talidomida, que durante muitos anos, antes de 1963, era usado para aliviar a náusea matinal em mulheres grávidas, sendo descoberto, nesse mesmo ano, que a droga era responsável pelos terríveis defeitos congênitos em muitas crianças nascidas após o uso do medicamento. Algum tempo depois, começaram a aparecer evidências indicando que um dos enantiômeros (dextrógiro) tinha o efeito de curar náusea, enquanto o outro podia ser a causa dos defeitos congênitos (Solomons, 1996).

2.1.2 - Estereoquímica

A estereoquímica, descoberta inicialmente por Louis Pasteur, é uma ciência da química orgânica que estuda a relação entre a estrutura molecular tridimensional e sua propriedade. Os isômeros são compostos diferentes que têm a mesma fórmula molecular, são divididos em isômeros estruturais e estereoisômeros. Os isômeros estruturais são isômeros que possuem seus átomos ligados em ordens diferentes, sendo classificados em: isômeros de cadeia, que diferem quanto à estrutura da cadeia; isômeros de posição que diferem na posição de ligação de algum radical e; por último em isômeros de grupo funcional, que, como o próprio nome diz diferem pelo grupo funcional a que pertencem.

Os estereoisômeros são isômeros que possuem seus constituintes ligados na mesma ordem. Diferem somente no arranjo de seus átomos no espaço. São divididos em diastereoisômeros e enantiômeros. Diastereoisômeros são moléculas que não são imagens especulares uma da outra. Estereoisômeros que são imagens especulares um do outro e que não se superpõem são conhecidos como enantiômeros. A Figura 2.1 mostra a representação de um composto quiral. O composto apresenta como centro quiral um carbono secundário com quatro ligantes diferentes.

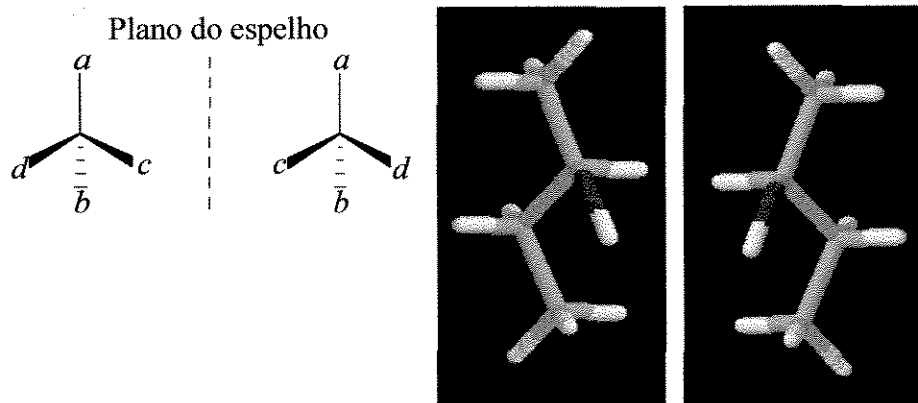


Figura 2.1 – Representação esquemática de moléculas quirais.

2.1.3 Os Enantiômeros

Enantiômeros, como relatado, são compostos de mesma fórmula molecular, que não se sobrepõem, sendo imagem especular um do outro. A diferença entre as moléculas está na maneira como os átomos estão dispostos no espaço e na ordenação nas respectivas moléculas. Portanto, apresentam as mesmas propriedades físicas e químicas, tais como: ponto de fusão e ebulição, densidade, dentre outras. Uma exceção é a maneira como os enantiômeros se interagem com o plano de luz polarizada, ocorrendo rotações em diferentes direções para cada um dos compostos (Allinger et al., 1978).

Uma outra propriedade na qual os enantiômeros são diferentes é na forma como interagem com reagentes opticamente ativos. Ocorrendo diferentes taxas de reação e, em alguns casos, pode até não ocorrer reação com um dos enantiômeros.

2.1.4 Quiralidade e o centro quiral

A quiralidade é a condição necessária para a existência de enantiômeros. Enantiômeros ocorrem apenas com compostos quirais – compostos diferentes de sua imagem especular. A relação entre a molécula quiral e sua imagem é definida como enantiomérica (Solomons, 1996). O termo quiral é usado para descrever moléculas de enantiômeros porque estão relacionadas uma com a outra da mesma maneira que uma mão

esquerda está relacionada com a mão direita. Moléculas que são superponíveis à sua imagem especular são conhecidas como aquirais (Morison e Boyd, 1983).

Os enantiômeros são freqüentemente designados como isômeros ópticos, uma vez que a não sobreposição de um objeto e a sua imagem em um espelho determina a existência da atividade óptica. Todas as moléculas quirais possuem enantiômeros e todas as moléculas opticamente ativas são quirais.

Uma substância opticamente ativa é aquela que produz rotação do plano da luz polarizada. Um feixe de luz polarizado ao emergir de uma substância opticamente ativa apresenta um diferente plano de vibração em relação ao incidido, possuindo diferentes vibrações para cada enantiômero e tendo o feixe que emerge em direções opostas. Se o feixe for para a direita, ou seja, no sentido do movimento dos ponteiros do relógio, a substância diz-se *dextrógira* (*d*), (+) ou (*R*); se a rotação for para a esquerda, ou seja, no sentido contrário dos ponteiros do relógio, a substância designa-se *levógira* (*l*), (-) ou (*S*) (Morrison e Boyd, 1983).

Um centro quiral é definido como um átomo que possui um conjunto de ligantes cujo arranjo espacial não é superponível com sua imagem no espelho.

O reconhecimento da quiralidade de uma molécula ocorre pela ausência de planos de simetria. Um plano de simetria é definido como um plano imaginário que corta uma molécula de maneira que duas metades da molécula sejam uma imagem especular da outra (Solomons, 1996).

Os centro quirais são geralmente representados pelos elementos de carbono, silício, germânio, nitrogênio e enxofre, dentre alguns outros elementos químicos que raramente ocorrem como elemento do centro quiral.

A mistura equimolar de dois enantiômeros é chamada de forma racêmica podendo ser chamada também de racemato, mistura racêmica (Solomons, 1996), ou ainda par *dl* (Allinger et al., 1978). Uma forma racêmica não apresenta rotação de luz plano-polarizada; como tal, é freqüentemente designada como (+-). A rotação causada por uma molécula de um dos isômeros é cancelada pela rotação igual e oposta provocada pelo seu enantiômero.

2.2 - Fármacos para o controle da acidez gástrica

2.2.1 – Introdução

A dispepsia, em suas muitas formas, tem sido companheira da espécie humana desde o advento das más comidas, dos excessos alimentares e da ansiedade. Durante séculos, a neutralização do ácido gástrico com antiácidos foi o único alívio para a dor das úlceras (Kromer, 2001).

As úlceras pépticas surgem devido a um desequilíbrio entre os mecanismos de secreção de ácido (chamados fatores agressores) e os fatores de proteção da mucosa e seu tratamento é direcionado para restaurar o equilíbrio. A perda de equilíbrio entre a secreção ácida e os fatores protetores da mucosa alterna entre os tipos de úlcera péptica. As úlceras do tipo I, que ocorrem na parte alta do estômago, estão associadas a uma hipersecreção menor ou ausente de ácido, sugerindo a importância dos fatores deficientes de proteção da mucosa nesta situação clínica. As úlceras do tipo II, por outro lado, incluem a úlceras gástricas e distais antrais (pré-pilóricas) e úlceras duodenais, estando associadas à hipersecreção ácida e aos efeitos de “feedback” negativo defeituosos de acidificação na liberação de gastrina e na contínua secreção de ácido (Kahrilas et al., 2000).

As metas das terapias para úlceras são o alívio da dor, a promoção da cicatrização e a prevenção da recorrência. As estratégias terapêuticas destinam-se ao equilíbrio entre os fatores agressivos e os fatores citoprotetores. Os fármacos que reduzem a secreção gástrica de ácido promovem a cicatrização. Os agentes citoprotetores e os antiácidos também são eficazes. A recorrência de úlceras é comum, sendo necessário, portanto o uso profilático à longo prazo de antagonistas de receptor H_2 e inibidores da bomba de prótons (Kromer, 2001).

2.2.2 – Classificação de fármacos para o controle da acidez gástrica

As drogas usadas para controle da secreção ácida classificam-se em:

- Drogas que neutralizam o ácido → Antiácidos
- Drogas que estimulam a inibição → Somatostatina
- Drogas citoprotetoras → Bismuto, Sulcrafato e Prostaglandinas
- Drogas que inibem a secreção
 - Anticolinérgicos
 - Bloqueadores de H_2
 - Inibidores da bomba de prótons.

2.2.3 – Fármacos inibidores da bomba de prótons

Dentre as classes específicas de inibidores da secreção gástrica os inibidores benzimidazólicos substituídos da H^+ , K^+ _ATPase oferecem um meio muito eficaz de bloquear seletivamente a bomba de prótons, responsável pela secreção de ácido pela célula parietal. Há evidências que sugerem a existência da bomba de prótons também, no cólon e jejuno. (Rohss et al., 2004)

A ativação da bomba de prótons ocorre pela ativação da via Ca^{2+} -dependente estimulando a ativação de H^+ , K^+ _ATPase nas células parietais, com sua inserção na membrana apical, levando à formação dos canículos secretores, com a conseqüente secreção de H^+ em taxas entre 20 e 40 mEq por hora. O resultado é um acúmulo de H^+ na luz gástrica, região central do estômago, em contato com células parietais, a uma concentração de cerca de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Um aumento na permeabilidade da membrana apical ao K^+ e Cl^- acompanha a ativação da bomba de prótons. Ocorre, portanto uma inibição irreversível da enzima H^+ , K^+ _ATPase. A inibição da secreção ácida é realizada tanto em nível basal quanto estimulada.

Pequenas modificações na estrutura química do omeprazol levaram à síntese de substâncias equivalentes e que constituem o grupo dos bloqueadores da bomba protônicas: omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rebeprazol e esomeprazol. Essas substâncias também são conhecidas como grupamento benzimidazol substituído e contêm um grupamento sulfidril em uma ponte entre o benzimidazol substituído e os anéis de piridina. A Figura 2.2 apresenta a estrutura química dos compostos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol.

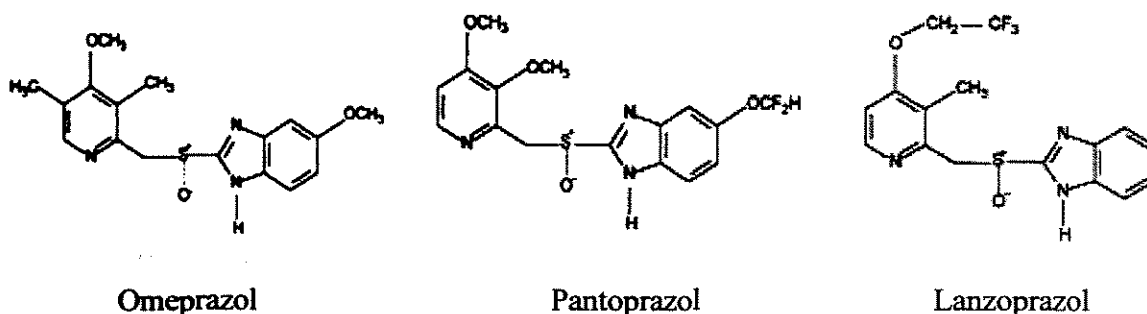


Figura 2.2 – Estrutura química dos benzimidazóis substituídos mais utilizados para inibição da secreção gástrica.

Em pH neutro, os benzimidazóis substituídos são estáveis, lipossolúveis, sendo bases fracas, sem atividade inibidora. Essas bases fracas atingem as células parietais do estômago e se difundem para os canículos secretores, nas quais tornam-se protonadas e, portanto são retidas. O agente protonado se rearranja para formar um ácido sulfênico e uma sulfenamida. A sulfenamida interage de forma covalente com os grupamentos sulfidril em pontos críticos no domínio extracelular da H^+ , K^+ -ATPase da superfície da membrana. A inibição total ocorre com duas moléculas do inibidor ligadas por molécula da enzima (Brunton, 1996).

2.2.3.1 – Omeprazol

O Omeprazol corresponde à formulação química: 5-metóxi-2-[[4-metóxi-3,5-dimetil-2-piridinil]-metil]sulfinil}-1H-benzimidazol, com fórmula molecular $C_{17}H_{19}N_3O_3S$ e massa molecular de 345,42 g/mol (Andersson e Regardh, 1990). Ele foi sintetizado em

1979, iniciando a era dos bloqueadores da bomba protônica, a qual foi precedida pela síntese do timoprazol que, embora iniba a secreção gástrica, não se mostrou adequado para o uso clínico (Özaltın e Koçer, 1997).

O composto quiral omeprazol tem sido usado, dentre os benzimidazóis substituídos, como o mais importante inibidor da secreção gástrica. É indicado no tratamento da esofagite, ulcera gástrica e duodenal, refluxo gastroesofágico e algumas outras doenças relacionadas à acidez gástrica (Bruni, 2000). O omeprazol é comercializado na forma racêmica.

A administração do omeprazol resulta na inibição permanente da atividade “in vivo” da enzima; a secreção de ácido retorna apenas após a inserção de novas moléculas de H^+ , K^+ -ATPase na membrana luminal. O omeprazol é degradado quando exposto à secreção ácida, diminuindo a sua absorção. Este achado levou ao desenvolvimento da formulação de grânulos de liberação entérica, os quais liberam omeprazol somente quando o pH está acima de seis. Nessa formulação, a biodisponibilidade é de cerca de 50%, (Andersson e Regardh, 1990)

O omeprazol apresenta dois diferentes valores de pKa: 7,1 e 14,7. Em estudos farmacológicos da substância é necessário saber o valor do pKa para determinar em qual pH ele estará na forma molecular ou ionizada (Yang et al., 2003).

2.2.3.2 – Vias de obtenção de omeprazol

A resolução, via derivados disatereoméricos N-substituídos, de omeprazol tem sido realizada; entretanto, este processo envolve uma separação trabalhosa e a cisão de N-substituintes. Uma oxidação assimétrica do sulfeto pró-quiral do omeprazol tem sido descrita na literatura para produção de esomeprazol (Cotton et al., 2000; Deng et al., 2000). Recentemente, Deng relatou a primeira resolução de omeprazol pela complexação de inclusão com um hospedeiro quiral 2,2'-diidroxil-1,1'-binaftil, conhecido como BINOL.

A separação enantioselectiva de ($\pm$) omeprazol em diferentes fases estacionárias quirais tem sido desenvolvida. As fases estacionárias Chiral-AGP, Ultron ES-OVM e BSA-DSC foram avaliadas obtendo baixa resolução entre os enantiômeros do omeprazol (Balmér et al. 1994). Os dois enantiômeros de omeprazol e alguns benzimidazóis substituídos

foram separados usando uma fase estacionária de albumina de soro bovino imobilizada em sílica (Cairns et al., 1995; Unge et al., 1997; Kanazawa et al., 2002). A fase trisfenilcarbamato de celulose ligada a 3-amino-propilsílica foi usada para separar omeprazol racêmico utilizando fase normal (Erlandsson et al., 1990). Celulose imobilizada em sílica diol foi usada não obtendo a separação completa e outras fases baseadas em proteínas também já foram alvos de estudo na separação de ($\pm$) omeprazol (Balmér et al., 1994). Recentemente, Cass et al., (2003a) estudaram a separação enantiosseletiva de omeprazol usando fases estacionárias quirais baseada em polissacarídeos dentre eles a tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e amilose e a fase tris(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (Cass et al., 2003a; Cass et al., 2003b). Um outro estudo realizado por Cass et al., (2000) foi a separação do omeprazol racêmico com eluição em fase reversa e fase normal. Há ainda a separação de omeprazol por espectrometria de massas usando coluna C18 (Woolf e Matuszewski, 1998). Em descoberta recente, a fase estacionária quiral Dialiltartadiamida di-(4-tert-butilbenzoi)-L, conhecida como Kromasil® CHI-TTB, foi usada na separação enantiomérica do omeprazol (AKZO Nobel, 2004)

2.2.3.3 – Esomeprazol

Esomeprazol é o enantiômero S do omeprazol – sendo também uma base fraca, convertido na forma ativa no meio altamente ácido dos canículos secretores da célula parietal, onde ocorre a inibição das secreções ácidas. Esomeprazol foi o primeiro inibidor da bomba de prótons a ser desenvolvido como enantiômero puro, mostrando maior eficácia que o omeprazol, oferecendo novas oportunidades no tratamento das enfermidades ácido-pépticas (Junghard et al., 2002; Hassan-Alin, et al., 2000).

Em estudos preliminares o esomeprazol tem mostrado ser uma droga de controle mais rápido do pH gástrico do que lanzoprazol e pantoprazol. No tratamento do refúgio gastroesofágico, a resolução dos sintomas e o controle da enfermidade têm ocorrido em cinco dias comparado ao período de nove dias com a administração do omeprazol. Nas esofagites, o tempo de tratamento diminui para quatro semanas comparadas às oito semanas quando o omeprazol é administrado (Lind et al., 2000). O Esomeprazol, na forma de microgrânulos em cápsulas, tem mostrado ter maior controle sobre a acidez em um número

maior de pacientes e sobre o controle do pH intragástrico quando comparado às formulações de lansoprazol 30 mg, omeprazol 20 mg, pantoprazol 40 mg e rabeprazol 20 mg em pacientes com sintomas de desordem do refluxo gastro-esofágico (Rohss et al., 2004)

O metabolismo de primeiro passo é mediado por duas isoformas das enzimas hepáticas citocromo P450, CYP2C19 e CYP3A4. A eliminação intrínseca do esomeprazol é menor que do omeprazol e do isômero R. O esomeprazol possui maiores vantagens metabólicas comparadas as do omeprazol, sendo que um isômero único tem maior biodisponibilidade, o que permite um melhor controle do ácido e como resultado uma maior eficácia clínica, com um excelente perfil de tolerabilidade. Após a ingestão, o esomeprazol é absorvido desde o trato gastrointestinal à corrente sanguínea de onde é transportado ao seu sítio de ação, a célula parietal gástrica. Ali, se difunde para o espaço canicular, onde se concentra e converte em sua forma ativa, a sulfonamida. Essa última se une aos grupos tios nos resíduos de cisteína na bomba de prótons, inibindo a atividade da enzima e, portanto, reduzindo a secreção de ácido no estômago (Kromer, 2001).

2.3 –Vias de resolução de compostos racêmicos

Devido a grande semelhança observada nas propriedades físicas dos enantiômeros não é possível separá-los um do outro, por métodos tradicionais de separação, nem por destilação fracionada, pois os respectivos pontos de ebulição são idênticos; nem por cristalização, devido às solubilidades dos enantiômeros em dado solvente serem idênticas (a menos que o solvente seja opticamente ativo); nem por cromatografia clássica, porque eles são adsorvidos com igual força por um dado sorvente (a menos que este seja opticamente ativo). A separação dos dois enantiômeros de uma mistura racêmica – ou *resolução* dessa mistura racêmica – constitui, por consequência uma tarefa cuja realização exige um método especial (Morrison e Boyd, 1983).

Os métodos de separação quiral usando técnicas de cromatografia líquida podem ser divididas em duas categorias: uma é o *método indireto*, na qual é baseado na formação de um diastereoisômero pela reação com um reagente quiral. O outro é o *método direto*, no

qual é baseado na formação de um diastereoisômero em uma fase estacionária ou em uma fase móvel (Haginaka, 2002).

O método indireto de separação quiral envolve a síntese de diastereoisômeros por uma agente quiral seguido por cromatografia em uma coluna aquiral. O método direto envolve separação de drogas racêmicas em seus correspondentes enantiômeros usando uma fase estacionária quiral. Métodos diretos baseados em FEQ são preferidos já que é um método rápido e satisfatório para resolução de racematos, tanto em escala analítica quanto em escala preparativa (Aboul-Encin, 2001). A Figura 2.3 apresenta as duas possíveis rotas para obtenção de compostos enantiomericamente puros.

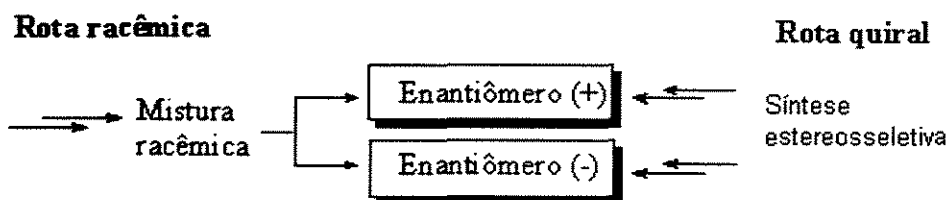


Figura 2.3 – Preparação de enantiômeros (Adaptado de Francotte, 1994).

As principais vantagens das técnicas cromatográficas são: aplicação a uma larga variedade de estruturas racêmicas; obtenção dos dois enantiômeros com elevado grau de pureza óptica; rápida e fácil realização e separação de enantiômeros de misturas racêmicas com características especiais como compostos que não podem ser derivatizados (hidrocarboneto), o qual é facilmente racemizado ou tem um tipo incomum de quiralidade (isto é, quiralidade do tipo helicoidal). Entretanto, como ocorre em alguns métodos, a rota cromatográfica possui algumas desvantagens, tais como: alto custo da fase estacionária; indisponibilidade de uma FEQ que separa uma ampla classe de compostos racêmicos; analito coletado em grandes volumes sendo necessária a concentração; consumo de uma larga quantidade da fase móvel e dificuldades associadas ao reciclo da fase móvel. Estes são obstáculos para o escalonamento, mas a uma grande extensão tem sido superado graças às recentes melhorias em técnicas cromatográficas e o desenvolvimento de novas, e relativamente baratas, fases estacionárias quirais para propósitos preparativos (Francotte, 1994).

A Tabela 2.1 apresenta uma lista com alguns fármacos com diferentes atividades biológicas para seus enantiômeros.

Tabela 2.1 – Lista de fármacos quirais com diferentes atividades para os enantiômeros

Nome	Atividade
Anfetamina	O isômero R tem maior efeito como estimulante no SNC.
Bupivacaína	S-bupivacaína é menos tóxica ao SNC
Cetamina	O isômero S é anestésico, enquanto que o isômero R é alucinógeno
Epinefrina	S-epinefrina é 10 vezes mais ativa como agente vasoconstritor
Propranolol	S-propranolol apresenta atividade contra hipertensão, o outro isômero não possui atividade.
Omeprazol	S-omeprazol possui maior atividade contra a acidez gástrica
Sulfato de Salbutamol	S-salbutamol é 4 vezes mais potente que o outro isômero como broncodilatador
Talidomida	S-talidomida é teratogênica e a R-talidomida é Sedativo.

A venda em 2002 de produtos farmacêuticos ultrapassou o valor de US\$ 410 bilhões , sendo, que desse montante, US\$ 160 bilhões foram de vendas de drogas quirais. É esperado que a venda mundial de produtos farmacêuticos produzidos a partir de enantiômeros puros alcance o valor de US\$ 8,57 bilhões até o fim de 2004 e chegue a US\$ 14,94 bilhões até o ano de 2009 (Rouhi, 2004).

A Tabela 2.2 apresenta uma lista dos fármacos quirais mais vendidos mundialmente em 2003. Entre os fármacos apresentados na Tabela 2.2, o composto cloridrato de sertralina é obtido através da técnica de leito móvel simulado (LMS). Um estudo de composição de custos foi realizado e o processo de separação em leito móvel simulado foi menos dispendioso quando comparado à síntese assimétrica. Um outro fármaco na forma de um único enantiômero obtido a partir da técnica de LMS é o composto escitalopram (Rouhi, 2004).

Tabela 2.2 – Lista de fármacos quirais mais vendidos mundialmente em 2003

Ativo	Efeito terapêutico	Forma Ativa do composto	Venda mundial 2003 U\$ bilhões
Atorvastina	Controle de Colesterol	Enantiômero puro	10,3
Sinvastatina	Controle de Colesterol	Enantiômero puro	6,1
Anlodipino	Bloqueados do canal de cálcio	Racemato	4,5
Lansoprazol	Inibidor da secreção gástrica ácida	Racemato	4,0
Esomeprazol	Inibidor da secreção gástrica ácida	Enantiômero puro	3,8
Clopidogrel	Inibidor de agregação de placas	Enantiômero puro	3,7
Salmeterol	Broncodilatador	Racemato	3,7
Fluticasone	Agente anti-inflamatório	Enantiômero puro	3,7
Cloridrato de Sertralina	Inibidor da serotonina	Enantiômero puro	3,4

O número de artigos científicos produzidos por ano, que abrangem a área de tecnologia quiral, aumentou de 1300 artigos em 1994 para mais 4400 em 2003, somando um total de mais de 24000 produções científicas publicadas nos últimos 10 anos. A maioria esmagadora dessas publicações, cerca de 72%, são sobre síntese assimétrica ou estereosseletividade (Rouhi, 2004).

A Figura 2.4 apresenta um comparativo entre a distribuição da tecnologia quiral utilizada na produção de fármacos e a produção científica nessa área em 2003. A publicação científica da área relacionada à tecnologia quiral não reflete, com veracidade, o uso da resolução quiral.

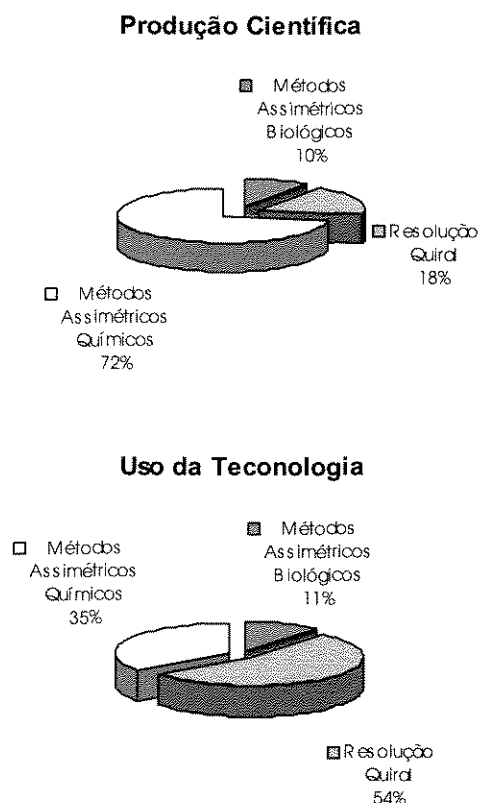


Figura 2.4 – Comparativo entre a tecnologia utilizada e a produção científica na área quiral em 2003. (Chemical Abstracts Service)

2.4 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A técnica cromatográfica de separação tem cerca de 100 anos e tem se mostrado uma técnica importante na análise de materiais com as mais variadas estruturas e propriedades físicas (Ciola, 2000). A cromatografia, nas suas diferentes modalidades, é uma técnica amplamente empregada na análise química, quer seja com finalidades preparativas ou analíticas. Ocupa, entre os métodos modernos de análise, um lugar de destaque.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais importantes entre os métodos cromatográficos de separação devido à sua rapidez, alta capacidade e facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise. A

CLAE apresenta um vasto campo de aplicações, tais como, análise de sólidos, líquidos, compostos iônicos ou covalentes, com massa molecular que variam de 32 a 4.000.000, incluindo principalmente compostos termolabéis, dentre eles os fármacos.

A separação cromatográfica é baseada na distribuição dos componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Essa separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, devido às diferentes interações com a fase estacionária.

Os equipamentos utilizados em CLAE são divididos em módulos, que em certos casos, podem ser controlados individualmente ou por computador. Um sistema moderno de cromatografia líquida de alta eficiência pode ser composto dos seguintes itens:

- Sistema de bomba de alta pressão (bomba com vários canais ou junção de duas bombas)
- Injetor (manual ou automático com possibilidade do controle de temperatura de injeção)
- Coluna (forno com controle de temperatura)
- Detector (individual, duplo canal ou em série)
- Computador para aquisição de dados e controle dos módulos (bomba, injetor, forno e detector)

A figura 2.5 apresenta um esquema de um sistema de CLAE. Os sistemas modernos de CLAE possuem vários reservatórios para fase móvel, geralmente até 4 canais, havendo ainda um quinto canal para a solução de limpeza da seringa de injeção. Os canais ligados à bomba passam um por um sistema de degaseificação contínuo eliminando a formação de gases na fase móvel. As bombas podem ser do tipo pistão, nas quais o funcionamento baseia-se em um pistão movido por motor elétrico, que empurra a fase móvel através do sistema cromatográfico (Cass e Degani, 2001).

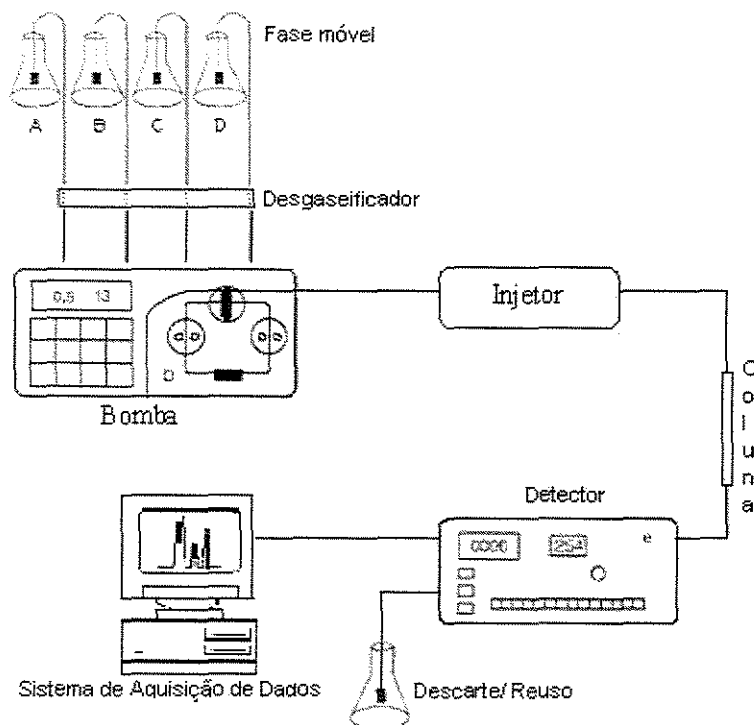


Figura 2.5 - Esquema de um sistema de CLAE (adaptado de Cass e Degani, 2001)

A introdução da amostra pode ser feita pelo uso de válvulas de amostragem do tipo Rheodyne. Este dispositivo utilizado para injeção de amostra, permite determinar o volume através da alça de amostragem, proporcionando a introdução de amostras de forma reprodutiva, em colunas pressurizadas, sem a interrupção significativa da vazão da fase móvel. A amostra é colocada, na pressão atmosférica, no lado externo da válvula e introduzida pela rotação apropriada da válvula. A Figura 2.6 apresenta a alça de amostragem de uma válvula de microvolume com o modo de amostragem e o modo de injeção.

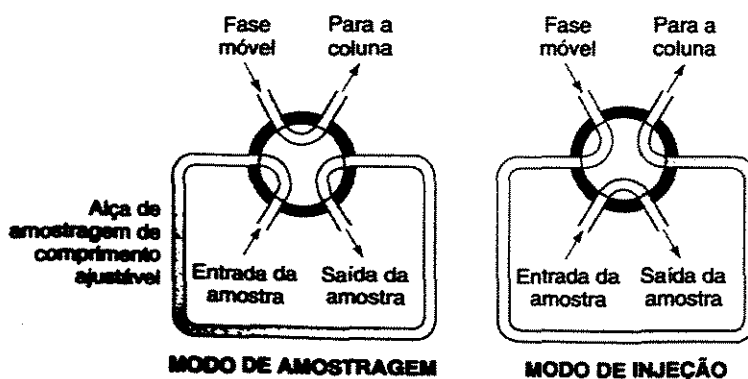


Figura 2.6 – Alça de amostragem de uma válvula de microvolume (adaptado de Voguel 2002).

Nos injetores automáticos as soluções das amostras são colocadas em pequenos recipientes de vidro conhecidos como vials. Nesses sistemas o volume de injeção pode ser alterado sem a troca constante das alças de amostragem. O volume de injeção pode variar de 1 uL a 200 uL com boa reprodutibilidade. Há equipamentos em que o controle de temperatura do injetor é automatizado, havendo também o controle da condensação de gases no recipiente de amostragem (Shimadzu, 2003; Marchery-Nagel, 2000).

Os detectores para CLAE são classificados em universal, que detectam as propriedades da fase móvel e soluto e os detectores seletivos, que detectam apenas as propriedades inerentes ao soluto. Dentre os seletivos o detector UV-Vísivel é o detector mais utilizado em cromatografia líquida. O princípio básico é a absorção de luz ultravioleta ou visível, por parte da amostra, quando nela passa radiação eletromagnética (Cass e Degani, 2001). Outros detectores utilizados em CLAE são o de fluorescência muito utilizado para análise de aminoácidos e hormônios, índice de refração que é considerado um detector universal, arranjo por foto diodo, polarímetro, dicroísmo circular, eletroquímico, espectrômetro de massas, infravermelho, espalhamento de luz e ainda o de ressonância magnética nuclear. Há a possibilidade do uso de detectores em série, como é o caso do ultravioleta e fluorescência, para determinação de mistura de compostos.

Na cromatografia líquida as espécies que estão sendo analisadas sofrem enorme influência da fase estacionária e, ao mesmo tempo, as propriedades destas são continuamente influenciadas pela fase móvel (Ciola, 2000).

As principais características que as fases móveis utilizadas em CLAE devem apresentar são (Guimarães e Collins, 1997):

- ser de alto grau de pureza e de fácil purificação
- solubilizar a amostra sem decompor os seus componentes
- não decompor ou dissolver a fase estacionária;
- ter baixa viscosidade
- ser compatível com o tipo de detector utilizado
- ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra

Há ainda alguns fatores desejáveis na fase móvel que nem sempre podem ser obedecidos devido à complexidade de algumas separações cromatográficas:

- não ser tóxica
- ser passível de reciclo e/ou reuso
- baixo custo

A escolha da fase móvel é um ponto crítico para separações de enantiômeros de cunho preparativo, na qual exerce influência direta no rendimento. De modo geral, em qualquer tipo de CLAE a fase móvel é de extrema importância, pois participa do processo de separação. Parâmetros importantes, tais como seletividade da separação, tempo de retenção e solubilidade do racemato, apresentam alta sensibilidade com relação às mudanças de composição da fase móvel. Outros parâmetros, como por exemplo, a resolução também pode ser afetada pela fase móvel. Este é o caso particular para fases baseadas em polissacarídeos. Em alguns casos, o impacto da fase móvel é tão forte que mudanças na composição da fase móvel causam uma inversão na ordem de eluição. Por esta razão, antes de executar uma separação preparativa é recomendado estabelecer a ordem de eluição de ambos enantiômeros sob as mesmas condições como as solicitadas para a separação analítica. Isto pode ser feito por detecção polarimétrica ou por injeção de enantiômeros individuais. Porém, este estudo deve ser interpretado cuidadosamente porque, para alguns compostos quirais, o sinal da rotação óptica pode inverter com a mudança do solvente (Francotte, 2001).

2.5 - Cromatografia Quiral

A descoberta do isomerismo óptico do ácido tartárico por Louis Pasteur em 1948 representou um grande avanço no significado do estereoisomerismo em relação à atividade biológica. A atividade óptica das moléculas atraiu, nas últimas décadas, muita atenção, uma vez que vários dos mecanismos de associação entre as moléculas nos organismos são quirais. Receptores e enzimas interagem seletivamente às diferenças configuracionais.

A obtenção dos enantiômeros puros tem sido foco de vários estudos, sendo os mais utilizados a síntese assimétrica e a resolução de misturas racêmicas por cromatografia quiral. A cromatografia preparativa com fase estacionária quiral é considerada hoje ser a mais eficiente e a rota geral de obtenção de enantiômeros com elevada pureza ótica e tem sido uma eficiente ferramenta na pesquisa farmacêutica e no desenvolvimento de novas drogas (Andersson e Allenmark, 2002).

A separação cromatográfica de enantiômeros pode ser realizada por diferentes métodos, entretanto é necessário o uso de algum tipo de discriminador ou seletor. Dois diferentes tipos de seletores podem ser usados: aditivo quiral na fase móvel ou fase estacionária quiral – métodos diretos. Outra possibilidade é a derivatização pré-coluna da amostra com um reagente quiral para produzir moléculas diastereoméricas, que podem ser separadas por cromatografia com fases estacionárias aquirais – método indireto (Ahuja, 2000).

O mecanismo de separação de enantiômeros por cromatografia quiral baseia-se na diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre o seletor quiral e os enantiômeros do soluto. As diferenças em estabilidade desses complexos transitórios levam a diferentes tempos de retenção dos enantiômeros na coluna e quanto maior a diferença de energia maior a separação (Ahuja, 2000). O enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro. A diferença de energia livre de formação dos adsorbatos diastereoisoméricos formados deve ter um valor satisfatório para que ocorra a separação. (Cass e Degani, 2001).

Adsorbatos diastereoisoméricos são formados como resultado de uma ou mais interações atrativas entre a FEQ e analito, o enantiômero, através da exclusão do analito

pela fase móvel ou por difusão passiva do analito em uma matriz quiral (Pirkle e Pochapsky, 1989).

O reconhecimento quiral, em termos cromatográficos, significa a interação preferencial de um enantiômero em relação ao outro. O termo reconhecimento quiral tem sido empregado para processos na qual algum receptor quiral (ou mesmo reagente quiral) interage seletivamente com um dos enantiômeros da molécula quiral e depende do grau de interação exibido entre cada enantiômero e o sítio de ligação quiral (Lima, 1997). Requer um mínimo de três interações simultâneas entre a FEQ e pelo menos um dos enantiômeros (regra dos três pontos), com pelo menos uma destas interações sendo estereoquimicamente dependente (Pryde, 1989).

O entendimento de como e onde ocorre o reconhecimento quiral por uma molécula seletora quiral pode prover importante informação com respeito à estimativa da magnitude qualitativa da enantiosseparação, tipos de analitos separáveis em um determinado seletor, previsibilidade de ordem de eluição e condições cromatográficas apropriadas (Maier et al., 2001).

2.5.1 – Fases estacionárias Quirais

Nas duas últimas décadas o número de fases estacionárias quirais disponíveis para separação de enantiômeros tem crescido consideravelmente (Andersson e Allenmark, 2002).

As FEQ normalmente consistem de pequenas moléculas quirais ou polímeros quirais imobilizados em um suporte (Okamoto et al., 2002). Os polímeros também podem ser usados como gel poroso (Yashima, 2001). O suporte de maior utilização atualmente é partícula microporosa de sílica. As partículas de sílica devem ser altamente puras e esféricas, entretanto, em alguns métodos de síntese, impurezas metálicas podem surgir como contaminantes da sílica. As partículas são permeáveis ao solvente e possuem uma área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama. Uma superfície de sílica possui uma concentração em torno de 8 μmol de grupos de silanol (Si-OH) por metro quadrado (Herris, 1999). Os grupos silanóis têm importante papel na preparação das fases

estacionárias, uma vez que a superfície da sílica pode ser modificada originando diversos tipos de fases estacionárias, dentre elas as FEQ.

A sílica, como suporte, possui limitações quanto à faixa de pH utilizada que deve ser de 2,0 a 8,0 (Herris, 1999). Em pH acima de 8,0 pode ocorrer a solubilização da sílica com profundas mudanças na uniformidade do enchimento da coluna, o que leva a alteração no tempo de retenção e diminuição da eficiência da separação. Em virtude dessas limitações ao uso da sílica, outros suportes têm sido empregados, tais como: polímeros macroporosos, semi rígidos como polimetacrilatos ou resinas de poliestireno, copolímeros de estireno-divinilbenzeno ou vinil álcool. Esses materiais, quando comparados à sílica, apresentam estabilidade numa faixa de pH mais ampla, entretanto com menores valores de eficiência. Uma grande desvantagem desses materiais em relação à sílica é a baixa resistência às altas pressões empregadas em CLAE (Morais, 2003).

Em sistemas cromatográficos com FEQ de pequenas moléculas, o mecanismo de reconhecimento quiral pode ser estimado através de estudos de espectroscopia na interação entre o composto quiral usado na FEQ e o composto a ser resolvido. Por outro lado, no sistema em que as FEQ forem polímeros, o entendimento do mecanismo de reconhecimento quiral em um nível molecular é usualmente dificultado, porque em muitos casos as estruturas estéricas exatas dos polímeros não são disponíveis. Entretanto, FEQ poliméricas são interessantes porque seu reconhecimento quiral depende da alta ordem estrutural do polímero e então é difícil de prever o reconhecimento quiral deles somente a partir de uma unidade monomérica (Okamoto e Kaida, 1994).

Alguns parâmetros são importantes para escolha da FEQ. Os principais são:

- estabilidade química, a qual limita um número de fases móveis e, indiretamente, a solubilidade máxima do soluto. Nesse contexto é importante destacar as faixas de pH da fase móvel utilizada;
- estabilidade mecânica, que é particularmente importante em aplicações em CLAE, na qual partículas pequenas são empregadas originando elevadas quedas de pressão;
- tempo de vida;
- capacidade de carga;
- custo.

Uma desvantagem, particularmente em separações preparativas, é o uso restrito de fases móveis devido à solubilidade das FEQ em muitos solventes orgânicos comuns.

A escolha da fase estacionária e das condições cromatográficas é governada por fatores tais como a seletividade e capacidade de carga de uma FEQ, a concentração desejada e a velocidade de operação, a solubilidade do racemato bem como a propriedades físicas da FEQ, como, por exemplo, a resistência física. (Andersson e Allenmark, 2002).

A maioria das separações dos enantiômeros do omeprazol tem sido realizadas em FEQ baseadas em polissacarídeos, tais como a celulose e a amilose conhecidas respectivamente como celulose tris(3,5-dimetilfenil carbamato) (Chiralcel OD) e amilose tris(3,5-dimetilfenil carbamato) (Chiralpak AD). A Tabela 2.3 apresenta algumas FEQ atualmente mais estudadas em cromatografia líquida para separação dos enantiômeros do omeprazol.

Tabela 2.3 – Fases estacionárias mais utilizadas para separação dos enantiômeros do omeprazol

<i>Nome</i>	<i>Nome comercial</i>
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose	Chiralcel OD
Tris(4-metilbenzoato) de celulose	Chiralcel OJ
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	Chiralpak AD

Celulose e amilose são os polímeros naturais opticamente mais acessíveis. Estes polissacarídeos mostram reconhecimento quiral, mas não fornecem FEQ de grande utilidade prática. Entretanto, suas derivatizações com a introdução de grupos apolares fornecem FEQ com alto reconhecimento quiral que podem separar uma larga faixa de compostos racêmicos em enantiômeros (Okamoto e Kaida, 1994; Francotte, et al., 1985). Estas FEQ foram estudadas extensivamente como seletores quirais cromatográficos nas duas últimas décadas e, como resultado, extensa variedade FEQ têm sido desenvolvidas e utilizadas em resoluções enantioméricas por CLAE (Haginaka, 2002). Os derivados de polissacarídeos, particularmente os carbamatos de celulose e amilose são os mais empregados como FEQ em CLAE.

A FEQ CHI-TBB é uma possibilidade que surge como opção para a separação dos enantiômeros do omeprazol, pois nas ultimas publicações de separação deste composto as FEQ com polissacarídeos foram as mais utilizadas.

A FEQ Kromasil CHI-TBB pode ser operada tanto em fase normal quanto em fase reversa. Efeitos na resolução, eficiência da coluna, fator de separação e ordem de eluição têm sido observados pela variação de álcool para outros solventes usados como fase móvel. Misturas de hexano e isopropanol ou etanol, vêm a ser uma mistura mais adequada para separações eficientes em fases estacionárias quirais (Andersson e Allenmark, 2002).

A FEQ CHI-TBB apresenta capacidade de carga intermediária, sendo as fases com maior capacidade de carga as fases baseadas em polissacarídeos e a de menor capacidade as fases quirobióticas.

A Figura 2.7 apresenta um esquema de formação da rede de polímero imobilizada à sílica na preparação fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB.

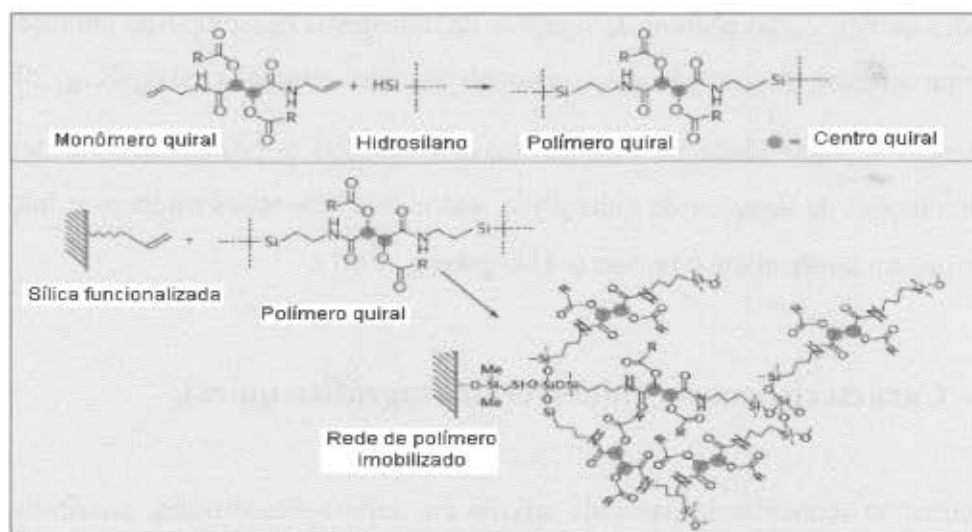


Figura 2.7 – Representação da ligação do polímero quiral à sílica. R denota a repetição da unidade do seletor.

A literatura descreve alguns trabalhos de seletores quirais baseados em amidas que têm sido imobilizadas em sílica e usadas como fase estacionária quiral. Amidas, derivadas do ácido tartárico, têm sido também utilizadas para separar enantiômeros como aditivo na fase estacionária e também imobilizados em sílica para serem usados como FEQ. O

composto opticamente ativo N,N'-dialil-tartadiamida (DATD) é um excelente precursor para um seletor quiral e pode ser facilmente sintetizado a partir do ácido tartárico. O DATD é o material de partida da FEQ Kromasil CHI-TBB, ele é de fácil disponibilidade e um útil precursor para seletores quirais, devido às inúmeras possibilidades de derivatizá-lo. Os dois grupos hidroxila no DATD podem ser facilmente derivatizados para introduzir diferentes grupos funcionais, entre eles os ésteres e carbamatos, que podem interagir com o analito a ser separado. Os dois grupos alílicos no DATD podem ser usados para imobilizar o seletor na sílica via reação de hidroxilação (Skogsberg, 2001).

Modificações no DATD são realizadas via funcionalização dos grupos hidroxila livres para derivados de ésteres formando o monômero quiral DATD-TBB ou o derivado carbamato (Andersson et al., 1996). O DATD derivado é então reagido para formar uma estrutura de rede de polímeros com hidrossilano. Esse polímero quiral é ligado covalentemente à sílica funcionalizada formando a rede de polímero imobilizada na sílica que, para a FEQ aqui utilizada, é a sílica Kromasil. O derivado éster do DATD tem possibilidades de agir como aceptor de ligações de hidrogênio. Esse tipo de interação pode vir a aumentar o tempo de retenção dos compostos a serem separados (Skogsberg, 2001).

A retenção e seletividade na FEQ Kromasil CHI-TBB é, principalmente, devida as múltiplas interações de ligações de hidrogênio, entretanto interações estéricas e interações do tipo π - π podem também estar presentes (Skogsberg, 2001).

2.6 – Características da coluna cromatográfica quiral

O tamanho reduzido da partícula auxilia em separações difíceis, possibilitando a obtenção de picos cromatográficos melhores resolvidos e simétricos. Uma coluna cromatográfica quiral ideal deve apresentar boa estabilidade química frente à maioria dos solventes e tampões usados como fase móvel. Em cromatografia quiral é de grande importância a utilização de partículas de sílica de menores diâmetros para obter um processo de separação de alta eficiência e com reduzida pressão. A coluna cromatográfica quiral deve apresentar estabilidade mecânica e química e baixa queda de pressão propiciando o uso em cromatografia preparativa, no qual o processo de separação torna-se dispendioso devido ao elevado valor e quantidade de fase estacionária e de solventes

usados como fase móvel. A coluna deve conter alta capacidade de carga da fase, geralmente atribuída à extensa área de superfície disponível e à alta densidade do ligante quiral.

2.6.1 - Volume de retardamento

O volume de retardamento V_M corresponde ao volume externo à coluna devido aos espaços provenientes das conexões, desde o injetor da amostra até entrada do detector, na ausência da coluna. Pode ser determinado pela Equação 2.1, onde F representa a vazão de fase móvel em, mL/min, e t_M o tempo de retenção, em minutos, dos pulsos cromatográficos do composto não retido TTBB introduzidos no sistema sem a presença da coluna.

$$V_M = t_M \cdot F \quad (2.1)$$

2.6.2 - Porosidade

A porosidade total (ϵ_T) da coluna cromatográfica corresponde a todos os volumes disponíveis internos e externos das partículas constituintes do material recheado.

Em princípio a porosidade total da coluna (ϵ_T) pode ser obtida a partir da análise do comportamento do primeiro momento pela variação da velocidade linear da fase móvel para o composto inerte conforme a Equação 2.2, onde μ representa o primeiro momento, L o comprimento da coluna, u a velocidade linear da fase móvel, t'_0 o tempo gasto para realizar a injeção, ϵ a porosidade do leito e ϵ_p a porosidades das partículas.

$$\mu = \frac{L}{u} \left[1 + \left(\frac{1-\epsilon}{\epsilon} \right) \epsilon_p \right] + \frac{t'_0}{2} = \frac{L}{u} \epsilon_T + \frac{t'_0}{2} \quad (2.2)$$

Uma outra opção para a obtenção da porosidade total considera uma distribuição simétrica na eluição conforme a Equação 2.3, onde ϵ_T é a porosidade total do leito, t_0 é o tempo de residência do composto não retido no leito, F é a vazão da fase móvel, V representa o volume da coluna.

$$\varepsilon_T = \frac{t_M F}{V} \quad (2.3)$$

A porosidade do leito (ε) e das partículas (ε_p) pode ser estimada pelas equações 2.4 e 2.5, respectivamente, de acordo com Ruthven (1984)

$$\varepsilon_T = 0,45 + 0,55\varepsilon \quad (2.4)$$

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (2.5)$$

Na prática, há o problema de identificar se uma espécie química pode ser usada como traçador para determinação da porosidade total da coluna cromatográfica. O composto traçador deve apresentar interações reduzidas com a fase estacionária presente na coluna. Normalmente, é comum utilizar um composto com polaridade oposta à da fase estacionária a ser utilizada. Por exemplo, em cromatografia de fase normal são utilizadas espécies químicas apolares como hexano e heptano devido a forte repulsão dos grupos SiOH presentes na superfície do adsorvente. Em fase reversa, como por exemplo a fase estacionária C18, podem ser utilizadas substâncias como a tiouréia e acetona que possuem pouca interação com a fase estacionária apolar. Entretanto, há a questão do sorvente apresentar sítios livres de $\equiv\text{SiOH}$ proporcionando a fase estacionária apolar alguma característica polar (Morbidelli et al., 1998).

O composto TTBB tem sido largamente utilizado como traçador para determinação da porosidade total em fases estacionária quirais, devido ao seu tamanho molecular reduzido e ao fato de não apresentar qualquer tipo de interação com as FEQ descritas na Tabela 2.1

2.6.3 - Avaliação da queda de pressão

É bem conhecido que a separação cromatográfica ótima, com propósitos preparativos, geralmente é atingida quando são utilizadas vazões mais altas possíveis. Assim, normalmente, limitações relacionadas à queda de pressão e limites do desempenho das bombas são essenciais (Kaspereit *et al.*, 2002). Como a unidade do LMS é projetada para

trabalhar a uma dada pressão, é necessário estabelecer uma relação entre a queda de pressão na coluna (por unidade de comprimento), $\Delta p/L$, e a velocidade linear da fase móvel (Lei de Darcy). A equação de Kozeny-Carman (Eq. 2.6) é satisfatória para fluxos laminares utilizados em cromatografia (Nicoud, 2000, Nicoud, 1999). Ela descreve o comportamento da queda pressão na coluna com a variação da vazão de alimentação, onde K representa permeabilidade do leito, β o coeficiente de Kozeny (valor aproximando de 4,5), d_p o diâmetro da partícula e η a viscosidade da fase móvel. A permeabilidade é uma propriedade do meio que indica um maior ou menor facilidade ao escoamento. Quanto maior o valor de K, maior a facilidade de escoamento do fluido e menor a pressão medida no sistema cromatográfico.

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{\eta}{K} u = \frac{\eta}{\left(\frac{d_p^2 \varepsilon^3}{36 \beta (1 - \varepsilon)^2} \right)} u \quad (2.6)$$

onde,
$$u = \frac{4F}{\varepsilon \pi D^2} \quad (2.7)$$

A velocidade linear da fase móvel, u , pode ser determinada a partir da Equação, onde D representa o diâmetro da coluna e F a vazão da fase móvel.

2.7 - Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros de separação cromatográfica são úteis para a avaliação e verificação da eficiência de separação de compostos na coluna cromatográfica (Sewell e Clarke, 1987). Eles fornecem informações a respeito do comportamento do composto entre a fase estacionária e a fase móvel. A Figura 2.8 apresenta um cromatograma com as definições das medidas para determinação dos parâmetros de separação cromatográfica.

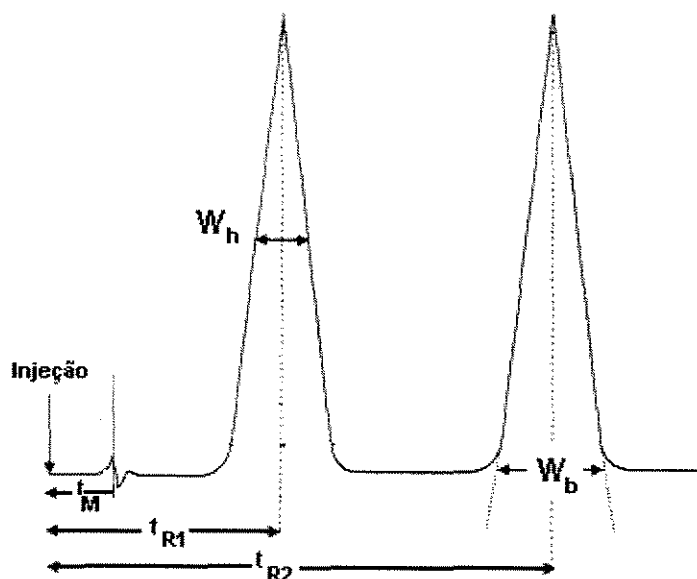


Figura 2.8. – Cromatograma teórico com as medidas para determinar os parâmetros cromatográficos.

2.7.1 – Fator de Retenção

O fator de retenção (k) é uma medida adimensional e de fundamental importância em separações cromatográficas (Cass e Degani, 2001), pois associa a retenção do composto em estudo com a retenção de um composto não retido pela fase estacionária. Pode ser determinado através da Equação 2.8, onde t_R é o tempo de retenção do composto e t_M é o tempo de retenção do composto não retido pela fase estacionária. Segundo a farmacopéia americana USP 27 (2004), o valor aceitável de k deve estar entre 1 a 8. Dentro dessa faixa é especificado o valor de 2 a 4 indicando uma razoável interação do soluto com a fase estacionária.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.8)$$

2.7.2 – Fator de Separação

O fator de separação (α) avalia a seletividade da separação para dois picos adjacentes. O valor α é dependente da fase estacionária e/ou fase móvel, podendo assumir valores maiores ou iguais a unidade à temperaturas diferentes. Pode ser definido como uma razão entre os fatores de retenção do composto mais retido e do menos retido e calculado pela Equação 2.9. O valor aceitável para o fator de separação, em uma separação razoável entre os compostos, segundo a USP 2004, é de 1,2.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2.9)$$

2.7.3 – Resolução

A resolução (R_S) avalia a qualidade da separação. Está associada ao tempo de retenção e a largura dos picos cromatográficos dos dois compostos adjacentes (Cass e Degani, 2001). Valores altos de resolução significam que as substâncias estão mais separadas. Valores de resolução acima de 1,5 significam que a separação entre os dois compostos ocorre pelo menos até a linha de base (Waters, 2002; USP 27, 2004; EP, 2002). O critério de aceitação da farmacopéia americana para resolução entre dois picos adjacentes é de resolução acima de 2,0 (Dantus e Wells, 2004; USP 27, 2004), esse valor considera a completa integração entre os picos para que não haja sobreposição de áreas. O valor de R_S pode ser determinado através da Equação 2.10, onde t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção para os dois compostos e w_{b1} e w_{b2} são as larguras dos picos medidos na linha de base (entre as tangentes) (Sewell e Clarke, 1987).

$$R_S = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (2.10)$$

2.7.4 – Fator de assimetria

O valor do fator de assimetria pode ser determinado a partir da medida da proporção entre as duas partes do pico cromatográfico medidos horizontalmente a 10% de sua altura. Nesse caso ele é conhecido como As_{10} e pode ser calculado conforme a Equação 2.11a.

A USP 27 (2004) propõe um critério aceitável de As_{10} entre 0,8 a 2,0.

O fator de cauda, um outro parâmetro para avaliar a forma de um pico cromatográfico, é obtido pela media a 5% da altura do pico, conforme a Equação 2.11b

A Figura 2.9 apresenta o posicionamento das medidas no pico cromatográfico para o cálculo do fator de assimetria e fator de cauda.

$$As_{10} = \frac{B}{A} \quad (2.11a)$$

$$\text{Fator - cauda} = \frac{A+B}{2A} \quad (2.11b)$$

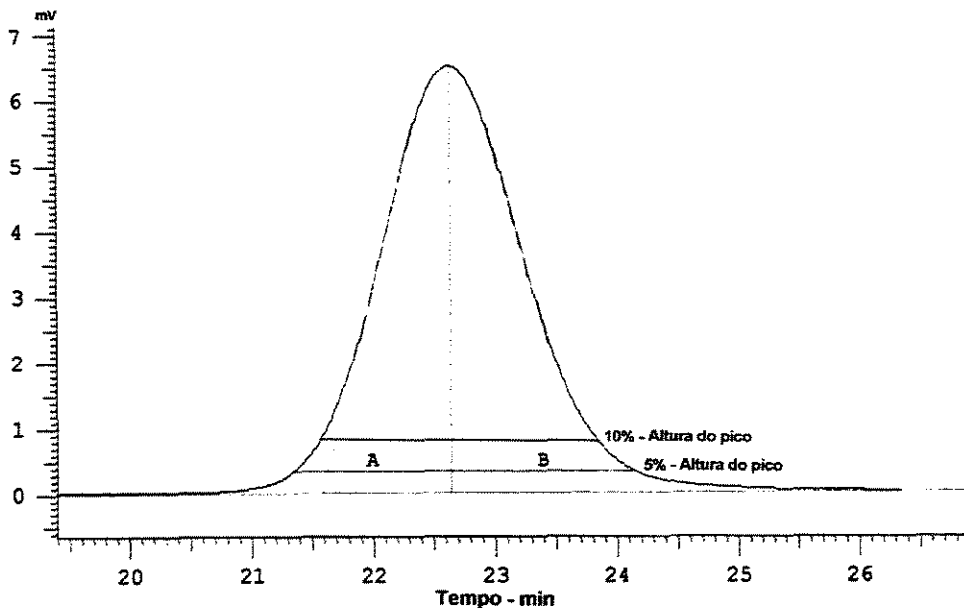


Figura 2.9. – Cromatograma do isômero S do omeprazol com as medidas para determinar o fator de assimetria e fator de cauda.

2.7.5 – Número de Pratos

O número de pratos mede a eficiência da separação de um composto em uma fase estacionária. Um prato equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios ocorrerão aumentando a eficiência e por consequência a separação. Uma vantagem em CLAE é que muitos pratos podem estar contidos em uma coluna tanto analítica quanto preparativa. Para avaliação da eficiência da coluna cromatográfica são aceitos valores de número de pratos acima de 2000 na separação de fármacos (Dantus, 2004)

O valor de N pode ser determinado através da Equação 2.12, onde t_R é o tempo de retenção, e w_h a largura do pico a meia altura (Snyder e Kirland, 1979; Sewell e Clarke, 1987). Na equação 2.12, o valor de N é dependente do tempo de retenção e da forma do pico. O valor de N mede o alargamento do pico quando o composto em estudo passa pela coluna. Quanto mais estreito for o pico, menor será o valor de w_h e maior será a eficiência da coluna na separação do soluto. Esta equação é válida para picos simétricos, quando se trata de picos assimétricos há a necessidade de calcular o fator de assimetria A_{S10} .

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (2.12)$$

2.8 Método dos momentos

A análise dos momentos é uma ferramenta usual para determinação dos coeficientes de difusão axial e difusão no poro a partir de experimentos de pulsos cromatográficos. Esta técnica consiste na análise da concentração do soluto como uma função do tempo na saída do leito fixo em resposta a concentração do soluto no pulso na entrada do leito fixo. Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta conforme a Lei de Henry. (Cremasco et al., 2001)

Por definição dos momentos de uma distribuição, o n -ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento $z = L$ é (Guiochon et al., 1994; Guiochon et al., 2004)

$$M_n = \int_0^{\infty} c(t, z = L) t^n dt \quad (2.13)$$

O n -ésimo momento absoluto ou momento normalizado é

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z = L) t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z = L) dt} \quad (2.14)$$

e o n -ésimo momento central é

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z = L) (t - \mu)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z = L) dt} \quad (2.15)$$

O primeiro momento μ está relacionado ao tempo de retenção do pico cromatográfico, e então com a força de ligação (isto é, com a constante de equilíbrio).

O segundo momento fornece informações sobre a difusão e está relacionado ao espalhamento do pico. Parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos a partir do segundo momento. O parâmetro c nas Equações 2.14 e 2.15 corresponde à resposta dos pulsos cromatográficos. Quando o pico apresenta uma forma gaussiana, o segundo momento é igual à variância σ^2 (Arnold *et al.*, 1985a; Arnold *et al.*, 1985b) e podem ser escritos da seguinte forma (Ruthven, 1984):

$$\mu = \frac{L}{u} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) (1-\varepsilon_p) K_p \right] + \frac{t_0}{2} = \frac{L}{u} \left\{ 1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right\} + \frac{t_0}{2} \quad (2.16)$$

$$\sigma^2 = \frac{2L}{u} \left\{ \frac{D_L}{u^2} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^2 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \right\} + \frac{t_0^2}{12} \quad (2.17)$$

onde

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)K_p \quad (2.18)$$

e K_p é a constante de equilíbrio de adsorção linear e t_M correspondem ao tempo de retenção do componente não retido.

2.9 – Altura Equivalente a um Prato

A eficiência da separação de um processo cromatográfico aumenta à medida que o soluto flui através do leito recheado, devido ao maior número de interações do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária. Uma etapa na qual a molécula alcança o equilíbrio é equivalente a um estágio de equilíbrio também designado por prato.

A altura equivalente a um prato (H) avalia a eficiência de uma coluna cromatográfica sob determinadas condições de operação por unidade de comprimento de coluna (Snyder e Kirkland, 1979). O desempenho da coluna é medido através dos tempos de retenção e do alargamento dos picos obtidos a partir dos cromatogramas (Cass e Degani, 2001).

Segundo Snyder e Kirkland, 1979, o principal objetivo na separação cromatográfica é a obtenção de pequenos valores de H com elevada eficiência de separação, valor de N . O valor de H é menor em colunas recheadas com partículas pequenas, para reduzidas taxas de vazão de fase móvel; para fase móvel menos viscosa, para separações realizadas em maiores temperaturas; e para moléculas pequenas de soluto.

O valor de H para uma coluna cromatográfica pode ser calculado aproximadamente através da equação de van Deemter, (Equação 2.19). Nessa equação, u representa a velocidade linear da fase móvel, e A , B e C são constantes cinéticas determinadas experimentalmente e que incluem os efeitos de difusão turbilhonar, difusão longitudinal e transferência de massa fluido-sólido, respectivamente.

$$H = A + \frac{B}{u} + uC \quad (2.19)$$

O termo A da Equação 2.19, chamado de difusão turbilhonar ou turbulenta refere-se aos diversos caminhos do fluxo que estão muito longe um dos outros. As moléculas que entram ao mesmo tempo na coluna podem ser eluídas em diferentes tempos, ocasionando alargamento do pico cromatográfico, conforme é mostrado na Figura 2.10.

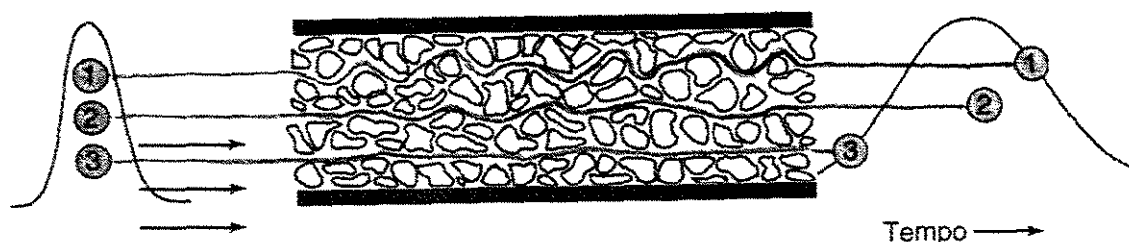


Figura 2.10. – Alargamento do pico cromatográfico a partir de diversos caminhos do fluxo.

O segundo termo da equação de van Deemter é referente à difusão longitudinal, na qual o soluto difunde do centro de maior concentração do pico para regiões mais diluídas na direção do fluxo. O efeito se torna mais pronunciado quando aumenta o tempo de residência do soluto na coluna. Quanto mais rápido a vazão da fase móvel, menor o tempo que o soluto fica na coluna e ocorre menor alargamento difusivo (Figura 2.11).

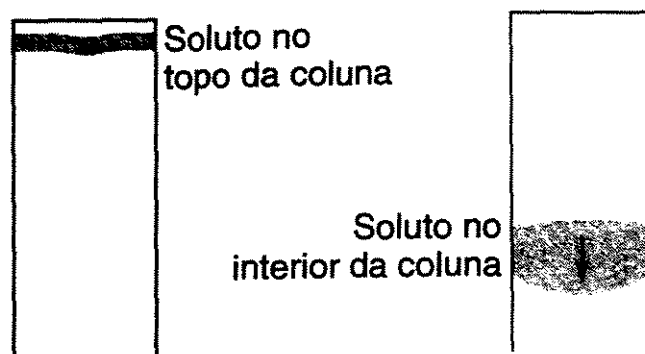


Figura 2.11. – Difusão longitudinal devido à difusão do soluto para as extremidades de concentração mais baixa.

A transferência de massa fluido-sólido, referente ao terceiro termo da Equação 2.19, é proveniente do limite de tempo necessário para o soluto estar em equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. A transferência de massa é reduzida quando a espessura da fase estacionária que recobre o suporte é menor, pois diminui o tempo para o soluto se difundir mais rápido a partir de profundidades mais distantes da fase estacionária para dentro da fase móvel. Quanto maior for o tamanho da partícula da fase estacionária e mais viscosa for a fase móvel, mais importante será este efeito (Figura 2.12).

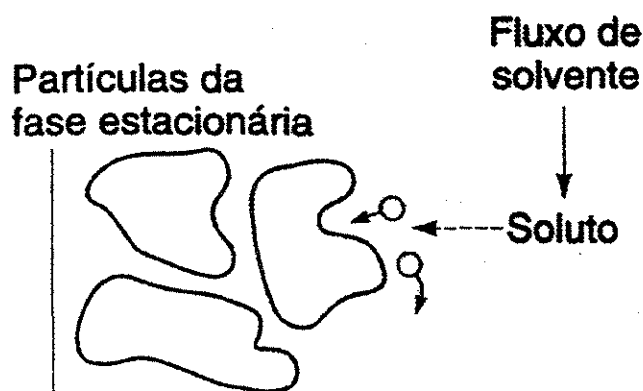


Figura 2.12. – Transferência de massa - efeito do tamanho da partícula e viscosidade da fase móvel.

O H fornece uma interpretação física simples dos efeitos de dispersão axial e de resistência à transferência de massa sobre desempenho da coluna. O conceito de H é estritamente válido somente quando a taxa de transferência de massa é relativamente rápida e os perfis dos picos de eluição são Gaussianos (Guiochon e Lin, 2003).

A Figura 2.13 apresenta uma curva hipotética da variação de H com a velocidade linear da fase móvel (u). A curva representa, na prática, um modo de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica. Na Equação 2.19 o primeiro termo representado pela curva A, é independente da velocidade superficial. A dispersão devido à transferência de massa incompleta é uma função linear de u e é representada pela curva C. A dispersão longitudinal é inversamente proporcional a velocidade linear e é representado pela curva B. A curva superior representa o perfil resultante de H versus u e apresenta um valor mínimo para altura dos pratos ($H_{\text{mínimo}}$) a uma dada velocidade linear ótima ($u_{\text{ótimo}}$). Abaixo desta

velocidade, H é fortemente dependente dos efeitos de difusão (termo B) e a altas velocidades é fortemente dependente do termo de transferência de massa (termo C) (Sewell e Clark, 1987).

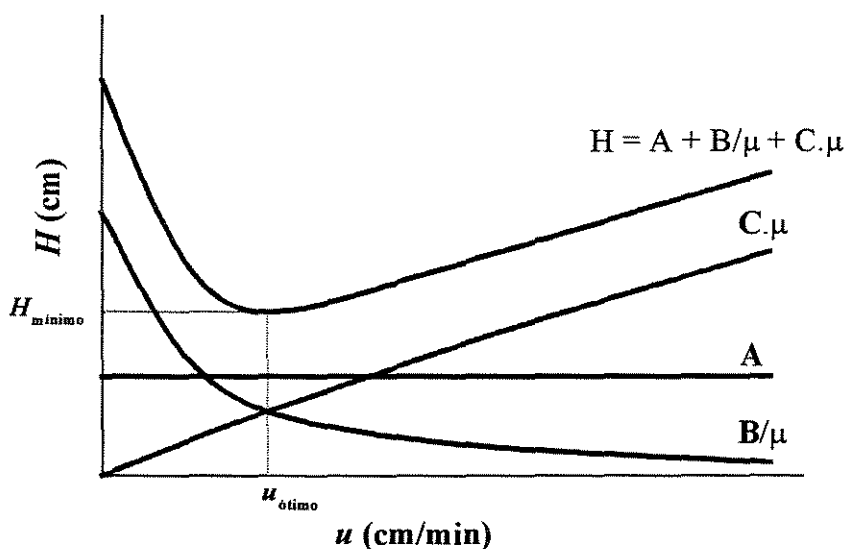


Figura 2.13 – Curva de van Deemter hipotética, mostrando a variação entre a eficiência (H) com a velocidade linear da fase móvel (u).

Em um sistema com isoterma de adsorção linear, a eficiência da coluna cromatográfica é avaliada pela análise da H (Guiochon et al., 1994; Ruthven, 1984), podendo ser calculada através da Equação 2.20, onde N corresponde ao número de pratos e L é o comprimento da coluna.

$$H = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \quad (2.20)$$

Em um processo de separação eficiente, um elevado número de pratos é necessário, para isso um enchimento uniforme é essencial. Isto requer uma coluna recheada com procedimento bem definido a fim de eliminar variações na porosidade do leito. Quando uma coluna cromatográfica não está uniformemente recheada pode ocorrer aumento no valor de H .

A contribuição da difusão molecular em cromatografia geralmente é desprezível quando comparados com outros processos envolvidos na separação. Os efeitos da

difusividade molecular são apenas perceptíveis a baixas vazões da fase móvel. Desta forma, a equação de van Deemter (Eq. 2.19) pode ser representada pela equação modificada que possui a forma apresentada pela Equação 2.21, onde k_m é o coeficiente de transferência de massa global e K corresponde ao termo relativo ao equilíbrio de adsorção, D_L é o coeficiente de dispersão axial e ε é a porosidade do leito (Duan et al., 1998)

$$H = \frac{2D_L}{u} + 2u \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.21)$$

onde os parâmetros A e C são representados por:

$$A = 2 \frac{D_L}{u}$$

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

2.10. Modelagem matemática da coluna cromatográfica quiral

O comportamento de um sistema cromatográfico é governado por três fenômenos básicos (Schulte et al., 1997):

- A termodinâmica de adsorção
- A hidrodinâmica da coluna
- A cinética de transferência de massa.

O balanço de massa diferencial do componente i ($i = 1, 2$) na coluna j ($j = \text{I, II, III, IV}$) é escrito da seguinte forma, segundo o modelo do equilíbrio dispersivo:

$$\varepsilon_T \frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_T) \frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} + u_j \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} = \varepsilon_T D_L \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial z^2} \quad (2.22)$$

onde C_i e q_i são as concentrações do componente i nas fases líquida e sólida na coluna j , respectivamente, ε_T é a porosidade total do leito; D_L corresponde ao coeficiente de dispersão axial (Haag et al., 2001)

Para escrever as equações deste modelo, assume-se que (Duan, 1998)

- o processo no leito fixo para multicomponentes é isotérmico;
- a fase móvel é uma solução diluída;
- a vazão da fase móvel é constante;
- o leito é recheado com partículas de adsorvente porosas, esféricas e de tamanho uniforme;
- o gradiente de concentração na direção radial do leito é desprezível;
- o coeficiente de dispersão axial é constante;

O modelo da força motriz linear do sólido (FML) é utilizado para representar o coeficiente de transferência de massa global através da coluna

$$\frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} = k_{m,i} (q_{i,j}^* - q_{i,j}) \quad (2.23)$$

onde $k_{m,i}$ é o coeficiente de transferência de massa global para o componente i e q_i^* é a concentração do componente i em equilíbrio com C_i (Guiochon e Lin, 2003; Guiochon, 2002; Haag et al., 2001).

As condições iniciais e de contorno, na entrada de cada coluna, correspondem à condição de Danckwerts:

$$C_i(z, t=0) = q_i(z, t=0) = 0 \quad (2.24a)$$

$$\left[u_j C_{i,j} - D_L \frac{dC_{i,j}}{dz} \right]_{z=0} = u_j C_{i,j}^0 \quad (2.24b)$$

$$\left. \frac{dC_{i,j}}{dz} \right|_{z=L} = 0 \quad (2.24c)$$

A condição de Danckwerts relata que o fluxo de massa no ponto de injeção, $u_j C_{i,j}(0,t) - D_L \left(\partial C_{i,j} / \partial z \right|_{z=0} \right)$,

é igual ao fluxo de injeção no tubo equivalente,

$$u_j C_{i,j}^0(t).$$

Esta condição de contorno é recomendada quando a eficiência da coluna é baixa, situação típica encontrada em cálculos numéricos realizados para separação em leito móvel simulado (Guiochon e Lin, 2003).

Experimentos com Soluções Concentradas

2.11 - Isotermas de equilíbrio de adsorção

A isoterma de equilíbrio descreve quantitativamente a distribuição de equilíbrio de um soluto entre as duas fases envolvidas no processo cromatográfico sob uma larga faixa de concentração (Jacobson et al., 1984).

Foi demonstrado que a termodinâmica controla perfis de bandas, particularmente a altas concentrações e quando a cinética de transferência de massa não é muito lenta. Para misturas de multicomponentes, a complexidade na determinação de isotermas competitivas resulta da competição que há entre os diferentes componentes por interações com a fase estacionária. A quantidade de um componente adsorvido em equilíbrio com a solução quase sempre diminui com o aumento da concentração do outro componente adsorvido. Isto ilustra o caráter competitivo da isoterma com dois componentes (Guiochon et al., 1994).

A concentração de cada componente retido na partícula foi determinada e o balanço de massa foi descrito pela equação 2.25:

$$q_i^* = \frac{V_d C_{d,i} - \varepsilon V_c C_{F,i}}{(1 - \varepsilon) V_c} \quad (2.25); \text{ onde}$$

q_i^* : concentração de cada componente retido na partícula.

$C_{d,i}$: concentração de cada componente no volume coletado

ε : porosidade

V_d : volume do eluente coletado

V_c : volume da coluna

$C_{F,i}$: concentração da alimentação para cada enantiômero

Muitos modelos matemáticos podem ser empregados para explicar o comportamento do processo de adsorção em sistema de multi-componentes. Esses modelos podem ser lineares seguindo uma isoterma linear como a de Henry, entretanto os modelos não lineares são mais aplicados a altas concentrações, dentre eles o modelo de Langmuir competitivo que considera o processo de adsorção acontecendo em uma superfície com números fixos de sítios de adsorção de mesma energia.

Um outro modelo matemático é o bi-Langmuir competitivo, que considera que a superfície da FEQ é heterogênea, com uma distribuição bimodal de energia, assumindo também que a FEQ contém dois tipos diferentes de sítios: sítios não-seletivos para enantiômeros de energia semelhante de adsorção e sítios seletivos que interagem de maneira diferentes com os dois enantiômeros.

2.12. Análise termodinâmica de adsorção

Em geral, a determinação dos parâmetros termodinâmicos torna-se uma aproximação útil para analisar os aspectos do mecanismo de retenção e discriminação quiral em fases estacionárias quirais (Lindner et al., 2004).

A separação direta dos enantiômeros é baseada na formação de complexos diastereoisoméricos reversíveis, que são criados por interações intermoleculares dos enantiômeros com o seletor quiral. O processo de formação, para os enantiômeros R e S,

podem ser caracterizados por parâmetros termodinâmicos (ΔG_i , ΔH_i e ΔS_i) (Lehotay et al., 2004). Esses parâmetros podem ser calculados pela Equação 2.26:

$$\Delta G = \Delta H_i - T\Delta S_i = RT \ln K' \quad (2.26)$$

Para esses parâmetros termodinâmicos é geralmente aceito que a temperatura possui maior impacto na retenção, enantiosseletividade, resolução e eficiência da coluna.

A dependência da retenção cromatográfica do soluto em relação a temperatura é usualmente expressa em termos do fator de retenção k através da Equação 2.27, onde ΔG° é a energia molar de Gibbs do soluto, e ΔH° e ΔS° são a entalpia e entropia de transferência do soluto a partir da fase móvel para fase estacionária, respectivamente, T é a temperatura absoluta, R a constante dos gases e Φ a proporção de fase (Cheong et al., 2004).

$$\ln k = -\frac{\Delta G}{RT} + \ln \Phi = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \Phi \quad (2.27)$$

De acordo com o método de van't Hoff, se a fase estacionária não altera em conformação, a variação de $\ln k$ vs $1/T$ deveria ser uma correlação linear com inclinação igual a $\Delta H_{ads}/R$ e intersecção igual a $\Delta S_{ads}/R + \ln \Phi$. Entretanto, diferentes interações entre os dois enantiômeros e a fase estacionária podem ser expressas como a diferença em energia molar para os dois enantiômeros, calculadas a partir do fator de separação (α) através da Equação 2.28 (Küsters e Spöndlin, 1996).

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta \Delta G}{RT} = -\frac{\Delta \Delta H}{RT} + \frac{\Delta \Delta S}{R} \quad (2.28)$$

O gráfico de $\ln \alpha$ vs $1/T$ é uma linha reta se as interações enantiosseletivas não variam sobre a faixa de temperatura estudada (Goossens et al., 2004).

Em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a enantioseparação é mais influenciada, na maioria dos casos, pelo termo relativo a entalpia (ΔH). Isto é devido ao fato dos experimentos serem, usualmente, realizados a relativas baixas temperaturas. A interação dos enantiômeros com o sistema cromatográfico conduz a valores negativos de

$\Delta\Delta H$ e $\Delta\Delta S$. Como esses parâmetros termodinâmicos são acessíveis, eles são frequentemente usados para prover informações do sistema de separação (Lehotay et al., 2004). Se a dependência de $\ln \alpha$ vs $1/T$ é linear com inclinação igual a $\Delta\Delta H/R$ e para $\ln k$ o intercepto é $\Delta\Delta S/R$, então pode-se assumir que:

- ΔH e ΔS são independentes da temperatura.
- Os enantiômeros interagem com o seletor quiral através de um mecanismo associativo simples.
- Equilíbrio de solvatação-dessolvatação não encobre o processo de associação dos enantiômeros com a fase estacionária quiral.

Como citado acima, a enantioseletividade, expressa por $\Delta\Delta G$, é principalmente influenciada por $\Delta\Delta H$ a baixas temperaturas. Com o aumento da temperatura, o termo da entalpia será mais compensado pelo termo $T\Delta\Delta S$. Para uma certa temperatura, (temperatura de isoenantiosseletividade, T_{iso}) $\Delta\Delta G = 0$ e os enantiômeros não são separados. Acima da temperatura de enantiosseletividade, a ordem de eluição dos enantiômeros pode ser alterada e a enantiosseletividade é predominantemente influenciada pelo termo entrópico (Lehotay et al., 2004; Sun C. et al., 2004). A temperatura de enantiosseletividade pode ser determinada através da Equação 2.29.

$$T_{iso} = \frac{\Delta\Delta H}{\Delta\Delta S} \quad (2.29)$$

2.13. Sobrecarga da coluna

Os perfis de eluição em condições de sobrecarga são muito sensíveis às isotermas de adsorção (Guiochon et al., 1994). Em altas concentrações, os picos cromatográficos são fortemente influenciados pela termodinâmica de equilíbrio de fase, isto é, a influência do comportamento não linear da isoterma de adsorção possui uma forte predominância com relação à influência da cinética de transferência de massa (Seidel-Morgenstern, 2004).

Para a otimização da taxa de separação de uma determinada substância em uma coluna preparativa é necessário o conhecimento das condições de sobrecarga da coluna. Em

colunas analíticas o volume de injeção não deve ultrapassar o valor de 1% do volume da coluna. Entretanto em escala preparativa essa limitação não ocorre devido à elevada taxa de separação requerida para essas colunas. Volumes de injeção podem ultrapassar esse valor de 1% do volume da coluna.

Uma coluna cromatográfica pode atingir a condição de sobrecarga quando a amostra é pouco solúvel na fase móvel ou o volume de injeção é elevado para as dimensões da coluna; alta concentração da amostra e amostra que são dissolvidas em solventes com elevada característica de solvatação quando comparada à fase móvel.

Quando a sobrecarga da coluna é considerada, dois procedimentos podem ser realizados. O primeiro, sobrecarga de concentração, considera o soluto muito solúvel na fase móvel e é realizado com volume de injeção constante de soluções em concentrações crescentes. Com o aumento da concentração da solução injetada é esperado que os picos cromatográficos sejam muito distorcidos chegando a ter a forma de um triângulo. Pode ocorrer o aumento de cauda no pico cromatográfico. O segundo tipo de sobrecarga, sobrecarga de volume, considera o soluto com solubilidade baixa ou até intermediária na fase móvel. A partir de uma solução concentrada, preparada para faixa de solubilidade do analito na fase móvel, volumes crescentes da mesma solução são injetados no sistema cromatográfico. O aumento do volume de injeção, dentre outros fatores como a força do sorvente usado para diluição, pode resultar na deformação do pico. Os picos cromatográficos são mais simétricos e a partir de um certo volume de injeção a altura do pico pode manter-se constante (Marchery-Nagel, 2000).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

O capítulo apresentado a seguir descreve os materiais e a metodologia empregada neste estudo. A metodologia foi dividida no desenvolvimento da separação cromatográfica; nos experimentos com soluções diluídas para as determinações de parâmetros hidrodinâmicos, de transferência de massa e de equilíbrio de adsorção linear; e nos experimentos com soluções concentradas para obtenção das isotermas de adsorção e estudo da sobrecarga na coluna.

3.1 - Materiais

3.1.1 - O omeprazol

O omeprazol racêmico, bem como o esomeprazol, utilizados neste trabalho foram, gentilmente, cedidos pela empresa Indústria Indiana Euresia.

A Figura 3.1 apresenta a estrutura química do omeprazol. O centro de quiralidade da molécula de omeprazol está situado sobre o átomo de enxofre.

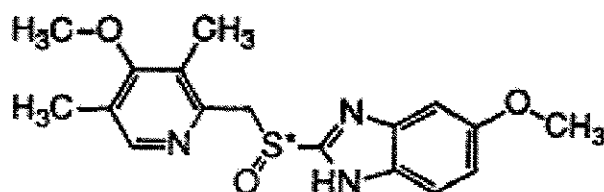


Figura 3.1 – Estrutura química do omeprazol. O símbolo (★) indica o centro quiral da molécula.

Uma varredura no espectro de absorção no ultravioleta foi realizada, com a solução de omeprazol diluída na fase móvel, para determinar o máximo e mínimo de absorção nessa região do espectro.

3.1.2 - O sorvente

O sorvente utilizado como fase estacionária quirál do tipo 0,0'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartadiamida (comercialmente conhecido como Kromasil CHI TBB) foi gentilmente cedida pela empresa EKA Chemicals em colunas preparativas de aço inoxidável (25 x 1 cm). O diâmetro médio de partícula do sorvente foi de 16 μm . A Figura 3.2 apresenta a coluna, em aço inoxidável, utilizada nos experimentos.



Figura 3.2 – Coluna em aço inoxidável de 25 x 1 cm e diâmetro de partícula de 16 μm

A fase estacionária Kromasil CHI-TBB é capaz de separar uma extensa faixa de fármacos na forma de racematos tanto ácidos, como básicos e neutros. O tamanho reduzido da partícula auxilia em separações difíceis, possibilitando a obtenção de picos cromatográficos melhores resolvidos e simétricos. Ela apresenta boa estabilidade química frente à maioria dos solventes e tampões usados como fase móvel. Entretanto, as melhores condições de seletividade são obtidas com fase normal. A estabilidade é devida a natureza da rede de polímero ligada covalentemente à sílica.

Essa fase estacionária é obtida a partir do precursor N,N'-dialil-L-tartadiamida (DATD) pela derivatização de grupos hidroxilas e posterior imobilização em sílica (Figura 3.3). A imobilização em um polímero multifuncional fornece a FEQ uma maior eficiência para coluna e uma maior capacidade de saturação, permitindo o uso de elevadas concentrações dos compostos.

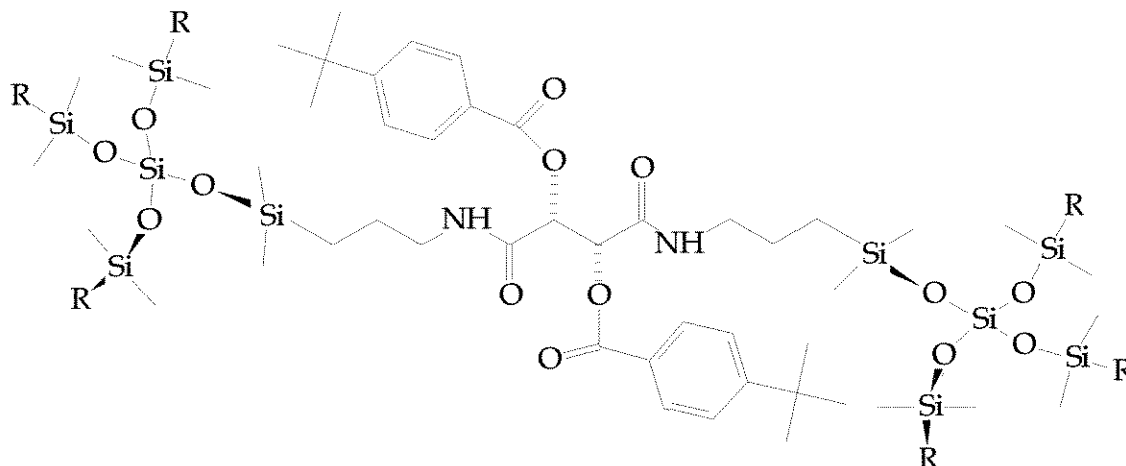


Figura 3.3 – DATD baseado no seletor quiral TBB imobilizado quimicamente em sílica. R denota a repetição da unidade do seletor.

A FEQ Kromasil CHI-TBB tem sido aplicada na separação dos enantiômeros de uma grande variedade de fármacos. A retenção e a seletividade são, principalmente, causadas por múltiplas ligações de hidrogênio, mas interações estéricas e π - π também são consideradas presentes. Devido às propriedades das ligações de hidrogênio, as separações utilizando esse tipo de FEQ são usualmente realizadas em solventes não-polares, dado que um solvente polar irá diminuir as interações entre o analito e o seletor quiral devido a uma solvatação não-favorável do analito na fase móvel.

A fase estacionária quiral CHI-TBB apresenta maior estabilidade mecânica e relativa baixa queda de pressão quando comparada a outras fases estacionárias. A alta capacidade de carga da fase CHI-TBB pode ser atribuída à extensa área de superfície disponível e à alta densidade do ligante quiral.

Nos experimentos de desenvolvimento do método de separação foram utilizadas colunas cromatográficas sendo uma coluna analítica Chiracel OD de 250 x 4,6 mm, contendo fase estacionária de polissacarídeo baseado em celulose, e uma coluna analítica, Kromasil CHI-TBB de 50 x 4,6 mm. Para o estudo comparativo da queda de pressão foi utilizada uma coluna Chiracel OD de 250 x 7,5 mm com diâmetro médio de partícula de 15 μ m.

3.1.3 - Reagentes

Os solventes usados na preparação da fase móvel e solubilização do omeprazol e do composto não retido, TTBB foram: hexano, isopropanol, etanol grau cromatográfico marca J.T.Baker (México) e trietilamina e ácido acético grau P.A. marca J.T.Baker (México).

A determinação do tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária foi realizada com o composto 1,3,5-tri-tert butil benzeno, conhecido como TTBB, marca Aldrich Chem. Co. (Suécia).

O TTBB é uma molécula com baixa massa molecular (M.: 264,44 g/mol) e não interage com fase estacionária CHI-TBB. As moléculas de TTBB não penetram nos poros das partículas da FEQ sendo que o tempo gasto para percorrer o leito é proporcional a porosidade total (Pedferri et al., 1999).

3.1.4 - Aparelhagem experimental

Os experimentos cromatográficos foram realizados utilizando dois sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência, conhecidos como cromatógrafos a líquido. Um dos sistemas, WATERS 1525 (EUA), equipado com forno para controle de temperatura, detector UV WATERS 2487 e sistema de aquisição de dados computadorizado (software BREEZE) foi utilizado na parte inicial dos experimentos para o desenvolvimento do método de separação cromatográfica. O outro sistema de CLAE, cedido gentilmente pela empresa Medley S.A Indústria Farmacêutica, marca Merck-Hitachi Lachrom (Japão-Alemanhã), detector UV L-7400, forno L-7300, injetor automático L-7200 e bomba quaternária L-7100, foi utilizado nos demais experimentos. A Figura 3.4 apresenta os sistemas CLAE Waters e Merck, respectivamente, utilizados na realização dos experimentos. O detector do sistema WATERS possui um monitoramento simultâneo em dois canais, possibilitando melhores condições no desenvolvimento da metodologia. As bombas dos sistemas de CLAE são de pistão duplo.

Os dois sistemas de CLAE foram utilizados devido ao elevado tempo de realização dos experimentos e da disponibilidade de horário para realização das análises. Na parte de desenvolvimento de métodos foi utilizado o sistema Waters e nos demais experimentos foi utilizado o sistema Merck-Hitachi Lachrom.

A varredura do espectro foi realizada em espectrofotômetro Lambda 35 UV-VIS marca Perkin Elmer Instruments (Alemanha).



Figura 3.4 – Sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência marca Waters (esquerda) e marca Merck Hitachi (direita)

3.2 - Métodos

3.2.1 – Desenvolvimento da separação cromatográfica.

O desenvolvimento da separação dos enantiômeros do omeprazol foi iniciado com experimentos em uma coluna analítica Chiracel OD de 150 x 4,6 mm contendo fase

estacionária de polissacarídeo baseada em celulose. Seguindo com experimentos em uma coluna analítica de 50 x 4,6 mm contendo a mesma fase estacionária quiral da coluna preparativa CHI-TBB e por último utilizando a coluna preparativa de 250 x 10 mm. Injeções de uma solução da mistura racêmica de omeprazol foram realizadas no sistema cromatográfico para avaliar a melhor condição cromatográfica de separação entre os enantiômeros do omeprazol. No desenvolvimento da metodologia, foram avaliadas as proporções entre os constituintes da fase móvel, constituída inicialmente de uma mistura de hexano/isopropanol/trietilamina/ácido acético na proporção de 920:80:1,5:0,5 v/v/v/v, adição de etanol na fase móvel, volume de injeção, vazão da fase móvel e temperatura de análise da coluna.

3.2.2 - Experimentos com soluções diluídas

3.2.2.1 - Determinação das porosidades

Experimentos de injeções no sistema cromatográfico - CLAE do composto tri-*terc*-butil benzeno (TTBB) foram realizados com o intuito de verificar a homogeneidade do enchimento e determinar a porosidade total da coluna (ϵ_T) e do leito (ϵ), respectivamente e estimar a porosidade das partículas (ϵ_P). O TTBB foi previamente dissolvido na própria fase móvel, constituída de uma mistura contendo hexano/isopropanol/trietilamina ácido acético (920:80:1,5:0,5 v/v). Uma solução foi preparada com concentração de 0,1 g/L e injeções de 5 μ L desta solução foram realizadas no sistema cromatográfico, sob condições isocráticas, após um período de tempo necessário para a estabilização do sistema, a diferentes vazões da fase móvel (0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mL/min). A temperatura do sistema foi variada para cada série de vazão, sendo 20 °C, 25 °C, 30 °C e 40 °C as temperaturas utilizadas. As respostas das injeções foram monitoradas pelo detector UV no comprimento de onda de 254 nm.

O valor da porosidade total foi determinado fazendo uma comparação entre dois procedimentos. O primeiro considera uma distribuição simétrica na eluição usando a Equação 2.3. O tempo de retenção de um composto não retido (t_M) é devido apenas ao trajeto percorrido na coluna. Faz-se necessário, portanto, para o cálculo da porosidade,

descontar o tempo de residência no volume morto devido às tubulações do sistema cromatográfico; sendo determinado a partir de injeções de uma solução do composto não-retido ao sistema cromatográfico sem a presença da coluna.

O segundo procedimento considera uma distribuição não simétrica na eluição. Sendo o valor da porosidade total determinado a partir da análise do primeiro momento do composto não retido. Os primeiros momentos foram obtidos pela integração das respostas dos pulsos cromatográficos experimentais, de acordo com a Equação 2.13. Entretanto, o composto TTBB é inerte, logo o termo relativo à adsorção na Equação 2.15 foi desprezado e as porosidades total e do leito foram obtidas pela inclinação das retas entre os primeiros momentos e o inverso das velocidades superficiais do fluido, como apresentado pela Equação 2.2.

O valor da porosidade do leito foi estimado utilizando-se a correlação proposta por Ruthven (1984), representada pela Equação 2.4. A porosidade da partícula foi estimada utilizando a Equação 2.5.

3.2.2.2 – Avaliação da queda de pressão.

A avaliação da queda de pressão foi realizada com experimentos no sistema de CLAE a diferentes vazões da fase móvel, para obtenção da pressão e a partir desses dados obter uma relação linear entre a queda de pressão ($\Delta p/L$) e a velocidade linear da fase móvel. O resultado experimental foi comparado ao resultado teórico calculado através da equação de Kozeny-Carman (Eq. 2.6) (Nicoud, 2000). O valor do coeficiente de permeabilidade κ foi determinado, indiretamente, através da inclinação da reta obtida experimentalmente.

3.2.2.3 – Obtenção da solução do isômero R-omeprazol

O enantiômero R do omeprazol foi obtido a partir de injeções de 200 μL de uma solução concentrada da mistura racêmica de omeprazol a 5,0 g/L no sistema CLAE. As frações correspondentes ao enantiômero-R foram coletadas e homogeneizadas em uma única solução. Uma curva analítica foi construída com soluções do isômero S-omeprazol. A solução de R-omeprazol foi injetada e a área avaliada contra a curva analítica do S-

omeprazol, a concentração foi determinada por comparação das áreas. O procedimento anterior foi repetido para confirmação da área.

3.2.2.4 – Determinação dos parâmetros cromatográficos

O estudo de separação cromatográfica do omeprazol racêmico foi realizado com injeções da solução de omeprazol racêmico a 0,15 g/L na fase móvel. Volumes de 5 μ L foram injetados no sistema CLAE com a coluna preparativa Kromasil CHI-TBB de 25 x 1 cm, sob condições isocráticas, à vazão de fase móvel de 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mL/min. As temperaturas avaliadas foram de 20 °C, 25 °C, 30 °C e 40 °C. As respostas das injeções foram monitoradas no detector de UV, a 302 nm. Parâmetros cromatográficos de fator de retenção, fator de separação, resolução, fator de assimetria e número de pratos foram determinados a partir das Equações 2.8 a 2.12, respectivamente.

3.2.2.5 - Determinação das constantes de Henry – Isotermas Lineares

As constantes de Henry foram determinadas a partir dos tempos de retenção (t_R) obtidos com as de injeções de 5 μ L, no sistema cromatográfico, das soluções dos enantiômeros da omeprazol a 0,15 g/L e dos tempos de retenção do composto não retido TTBB (t_M), obtidos nos experimento de determinação das porosidades conforme a Equação 4.2. Os experimentos foram realizados a diferentes vazões de 0,5 a 4,0 mL/min e temperaturas de 20 °C a 40 °C. As respostas foram monitoradas pelo detector UV, no comprimento de onda 302 nm.

3.2.2.6 - Determinação dos coeficientes de dispersão axial e parâmetros de transferência de massa

Os procedimentos realizados para a determinação das constantes de Henry foram utilizados para calcular os coeficientes de dispersão axial (D_L) e os parâmetros de transferência de massa global (K_m).

Os valores de pratos (N) e de altura equivalente a um prato (H) foram obtidos através das Equações 2.12 e 2.20 respectivamente e foram utilizados para determinar os coeficientes de dispersão axial (D_L) e de transferência de massa a partir da interseção e da inclinação das retas obtidas entre H e u , respectivamente.

3.2.2.7 – Análise termodinâmica de adsorção

Os dados obtidos nos experimentos realizados para determinação dos parâmetros cromatográficos, foram utilizados para a análise termodinâmica de adsorção. Os parâmetros termodinâmicos foram determinados a partir das Equações 2.27 a 2.29.

3.2.3. Experimentos com soluções concentradas

3.2.3.1 - Determinação das isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção competitivas foram determinadas seguindo uma metodologia descrita por Pais et al. (1998). O procedimento foi realizado passando a fase móvel através da coluna cromatográfica até a estabilização. Após a estabilização da coluna, uma solução de omeprazol racêmico, de concentração conhecida, diluída na fase móvel, foi adicionada na coluna, através de outro canal da bomba do sistema de CLAE. O sistema foi monitorado até a saturação da coluna com solução de omeprazol e estabilização. Em seguida, a amostra foi completamente eluída com a fase móvel. O volume da solução eluída do sistema na etapa de eluição foi coletado, medido e a concentração analisada contra uma curva analítica de omeprazol racêmico, envolvendo a faixa de concentração das soluções analisadas. Esse procedimento fornece um ponto de cada componente da mistura na isoterma de adsorção e foi realizado para outras proporções, entre os dois canais contendo a fase móvel e a solução de omeprazol racêmico, para determinação dos demais pontos da isoterma de adsorção. A concentração de cada componente retido na partícula foi determinada a partir da Equação 2.25. As condições cromatográficas utilizadas foram de vazão de móvel de 2,0 mL/min, temperatura de 25 °C (± 1) e volume de injeção para a curva analítica de 5 μ L.

3.2.2.2 - Estudo de sobrecarga da coluna

O estudo da sobrecarga da coluna foi realizado para verificar o comportamento de alargamento dos picos cromatográficos e dos tempos de eluição de cada enantiômero do omeprazol através de injeção de volumes crescentes (1 a 60 μL) de solução concentrada do omeprazol racêmico (5 g/L). Os experimentos foram realizados a uma vazão de 2,0 mL/min e temperatura controlada de 25 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$). As respostas foram monitoradas pelo detector UV no comprimento de onda em 302 nm. A avaliação das condições de sobrecarga foi estudada através dos parâmetros cromatográficos do fator de retenção, fator de separação, determinados a partir das Equações 2.8, e 2.9 respectivamente.

Capítulo 4

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos quanto ao desenvolvimento do método de separação, a determinação dos parâmetros cromatográficos, dentre eles o fator de separação, fator de retenção, resolução, fator de assimetria e número de pratos a diferentes temperaturas e vazões da fase móvel; caracterização da coluna cromatográfica quiral quanto à porosidade total, do leito e das partículas e avaliação da queda de pressão; coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa em fase diluída a diferentes temperaturas; parâmetros termodinâmicos de entalpia e entropia para o processo de separação dos enantiômeros; isotermas de adsorção competitivas e de sobrecarga da coluna cromatográfica quiral.

4.1 Experimentos para desenvolvimento do método de separação cromatográfico

O desenvolvimento do método de separação foi iniciado com a realização de uma varredura, no espectro ultra-violeta, de uma solução da mistura racêmica de omeprazol, para verificação do comprimento de onda de máxima absorção. O valor de 302 nm foi encontrado como máximo de absorção para o omeprazol (Figura 4.1), conforme relatam Yang et al., 2003. Esse comprimento de onda foi usado para monitoramento das injeções cromatográficas.

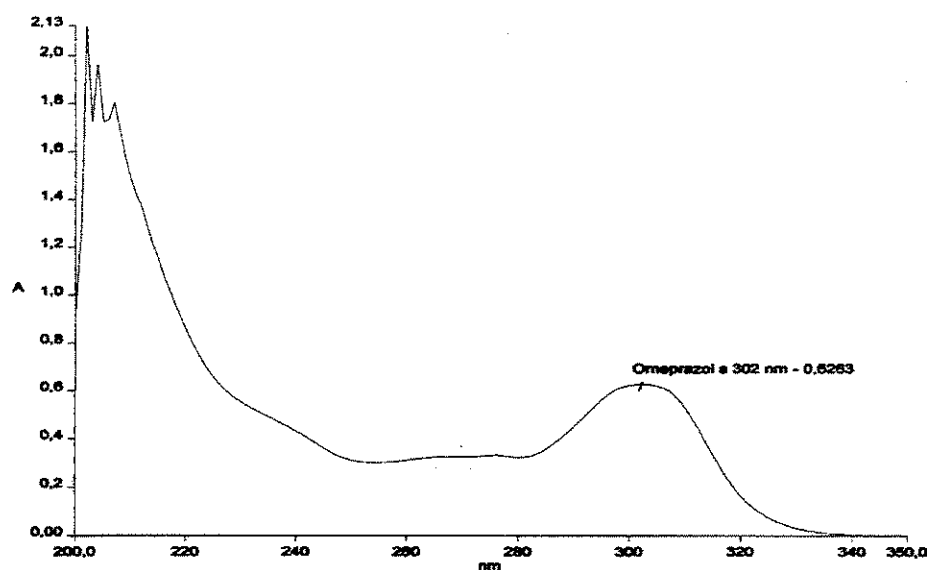


Figura 4.1 – Espectro de varredura da solução de omeprazol racêmico. Concentração de 0,05 g/L na fase móvel a 25 °C.

A coluna utilizada inicialmente foi uma coluna cromatográfica analítica conhecida comercialmente como Chiracel OD de 150 x 4,6 mm. Nessa coluna o polissacarídeo usado na preparação da fase estacionária quiral foi a celulose. A fase móvel utilizada foi uma mistura de 70:30 v/v, hexano:etanol. As vazões usadas foram de 0,6 mL/min e 1,0 mL/min, sendo a temperatura de 25 °C. Entretanto, não houve a separação dos enantiômeros do omeprazol, nas condições testadas, como pode ser verificada na Figura 4.2. Os enantiômeros do omeprazol foram eluídos em um único pico cromatográfico.

Essa coluna foi estudada inicialmente para efeito de comparação de separação com a coluna Kromasil CHI-TBB, uma vez que tem sido usada no estudo de separação dos enantiômeros do omeprazol dentre outras. A coluna de polissacarídeo mais indicada para essa comparação seria a coluna conhecida comercialmente como Chiralpack AD, na qual o polissacarídeo usado na preparação da fase estacionária quiral é a amilose. Entretanto, o laboratório onde foram realizados os experimentos não dispunha da coluna Chiralpack AD. Essa fase estacionária tem sido alvo muitos estudos na separação de omeprazol em fluídos biológicos e em produtos farmacêuticos (Erlandsson et al., 1990; Balmer et al., 1994; Cass et al., 2003a)

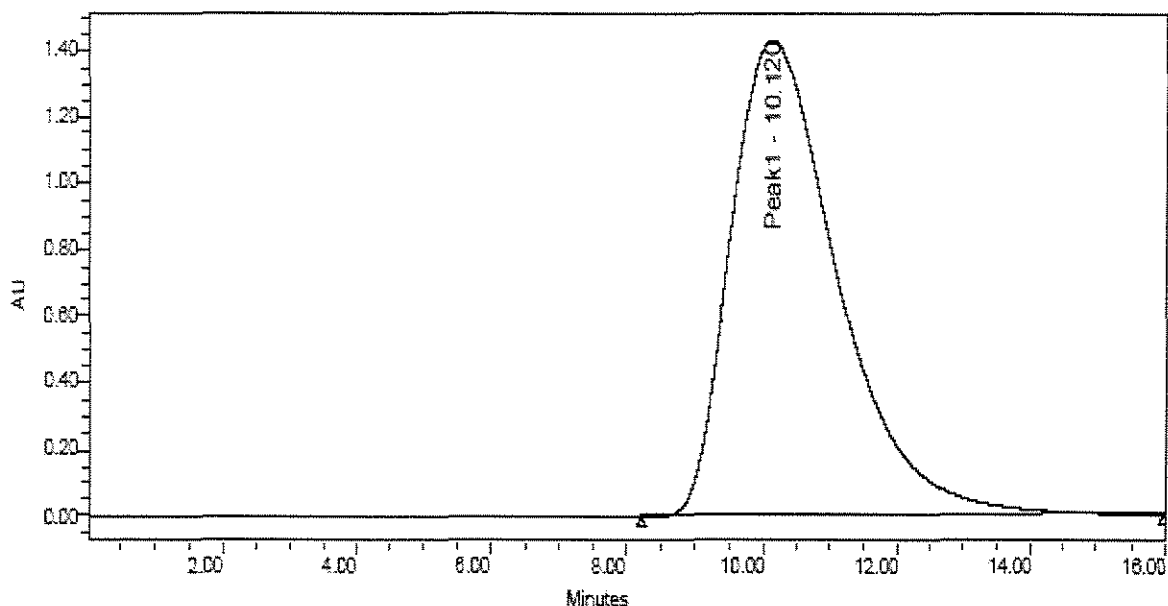


Figura 4.2 – Cromatograma de omeprazol racêmico com a coluna Chiracel OD de 150 x 4,6 mm. Concentração de 1,0 g/L em fase móvel hexano:etanol 70:30 v/v a 25 °C. Vazão 1,0 mL/min; volume de injeção: 10 uL; detecção UV: 302 nm.

A etapa seguinte do desenvolvimento seguiu-se com a utilização da coluna analítica Kromasil CHI-TBB de 50 x 4,6 mm, partícula 5 µm. A fase móvel usada foi uma mistura de hexano:isopropanol:triethylamina:ácido acético na proporção de 920:80:1,5:0,5 v/v/v/v. As vazões utilizadas para a fase móvel foram de 1,0; 0,5; 0,2 e 0,1 mL/min. A Figura 4.3 apresenta o cromatograma da injeção de omeprazol racêmico na coluna Kromasil CHI-TBB analítica utilizando vazão de fase móvel de 0,1 mL/min. Com a injeção no sistema CLAE, usando uma vazão de 0,1 mL/min, não houve separação completa, mas há um indício que a fase estacionária Kromasil CHI-TBB separe os enantiômeros do omeprazol usando a fase móvel proposta. Nas outras três condições de vazão de fase móvel avaliadas não foram obtidas melhores condições de separação. Na preparação da fase móvel, foram utilizados os solventes hexano e isopropanol por serem os solventes comuns, dentre outros, usados em separação cromatográfica quiral. A proporção mencionada foi baseada na separação de outros compostos com esta mesma fase estacionária. (Silva Junior et al., 2004b).

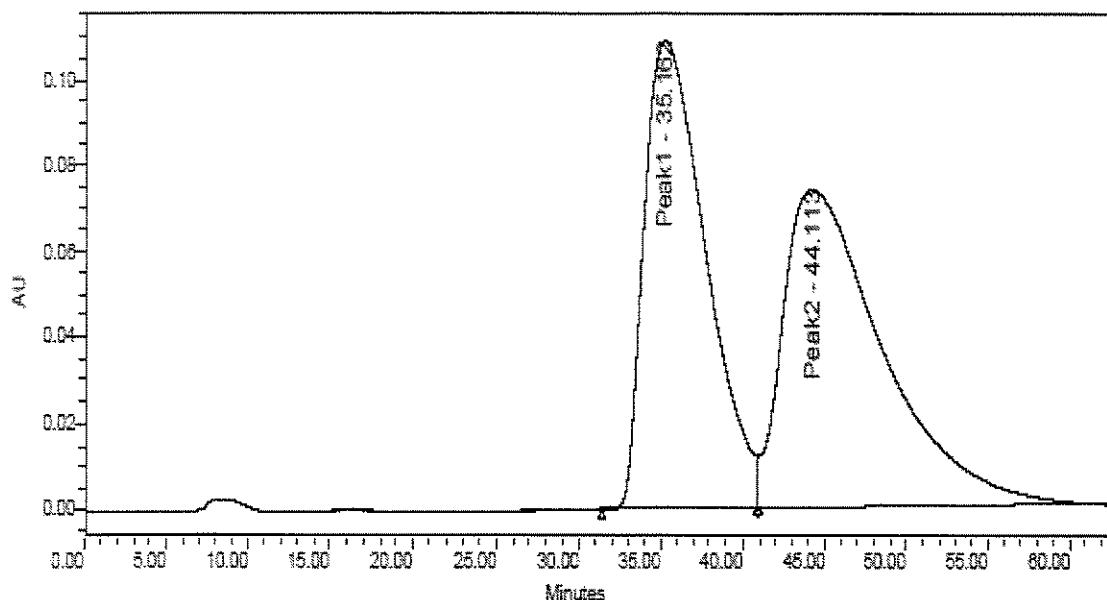


Figura 4.3 – Cromatograma de omeprazol racêmico com a coluna analítica Kromasil CHI-TBB de 50 x 4,6 mm. Concentração de 1,0 g/L em fase móvel hexano:isopropanol:triethylamina:ácido acético 920:80:1,5:0,5 v/v/v a 25 °C; vazão 0,1 mL/min; volume de injeção: 10 uL; detecção UV: 302 nm.

A partir da separação dos enantiômeros do omeprazol na coluna analítica foi iniciado o desenvolvimento da separação na coluna preparativa Kromasil CHI-TBB de 250 x 10 mm. A composição da fase móvel utilizada foi de hexano:isopropanol:triethylamina:ácido acético, na proporção de 920:80:1,5:0,5 v/v/v. As vazões utilizadas foram de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 10 uL. A Tabela 4.1 apresenta os tempos de retenção para cada enantiômero do omeprazol e o fator de separação obtido para as vazões utilizadas nos experimentos.

Tabela 4.1 – Tempos de retenção dos enantiômeros do omeprazol com a variação da vazão da fase móvel a 25 °C. Concentração da solução de 0,15 mg/mL. Volume de injeção 10 uL

Vazão – mL/min	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	t_M (min)	α
1,0	60,6	78,4	11,8	1,37
2,0	29,6	38,4	5,9	1,37
3,0	19,6	25,3	3,9	1,36
4,0	15,6	20,5	2,9	1,39
5,0	12,1	15,8	2,4	1,37
6,0	10,1	13,1	2,0	1,37

O fator de separação foi obtido a partir da Equação 2.9. O valor de t_M utilizado para calcular o fator de separação foi determinado a partir da Equação 4.1. Esse valor de t_M aproxima-se muito do real apresentado nas Tabelas de 4.9 a 4.12 para as vazões de fase móvel de 1,0 a 4,0 mL/min. Os valores obtidos para o fator de separação acima de 1,36 mostram que a separação pode ser realizada em condições de vazões elevadas de fase móvel.

$$t_M = \frac{(di) L\pi 0,6}{4F} \quad (4.1)$$

A Figura 4.4 apresenta o cromatograma da injeção no sistema de CLAE do omeprazol racêmico utilizando uma vazão de 6,0 mL/min. Nota-se que, apesar da elevada vazão utilizada na corrida cromatográfica, há a separação até a linha de base dos enantiômeros do omeprazol. O monitoramento da injeção cromatográfica foi realizado a 302 nm e 254 nm (linha superior) para verificar diferenças na absorção.

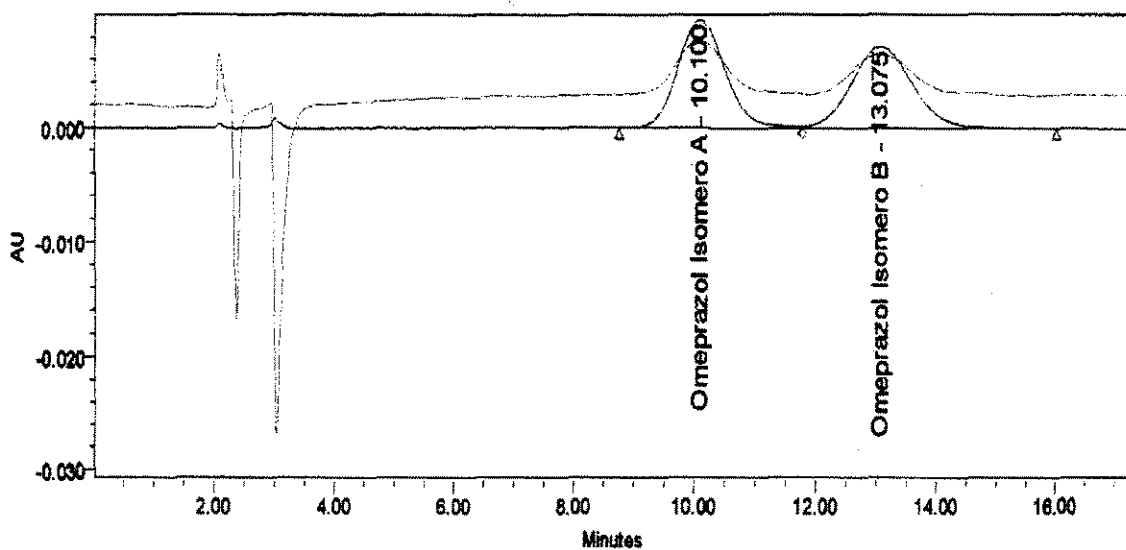


Figura 4.4 – Cromatograma de omeprazol racêmico com a coluna Kromasil CHI-TBB de 250 x 10 mm. Concentração de 0,15 g/L em fase móvel hexano:isopropanol:triethylamina:ácido acético 920:80:1,5:0,5 v/v/v a 25 °C; vazão de 6,0 mL/min. volume de injeção: 10 uL; detecção UV: 302 nm.

O uso da trietilamina e ácido acético como constituintes da fase móvel deve-se a melhoria da simetria dos picos cromatográficos. Bonato, et al., 2002 usaram também base e ácido fracos para melhoramento do perfil de eluição.

A separação dos enantiômeros do omeprazol foi realizada utilizando como FEQ a fase CHI-TBB e como fase móvel uma mistura constituída de hexano:isopropanol:trietilamina:ácido acético glacial na proporção de 920:80:1,5:0,5 v/v/v/v. Entretanto, com esta fase móvel e FEQ a separação não é tão rápida quando comparada a outros trabalhos que utilizaram a coluna Chiralpak AD e a fase móvel constituída de hexano:etanol 70:30 v:v, conforme relatam Cass et al., 2003a. Para que houvesse melhor separação entre os enantiômeros, foi realizada a variação na proporção dos constituintes da fase móvel. Os constituintes inicialmente alterados foram o hexano e isopropanol. A proporção, em volume por volume de hexano, foi alterada de 920 para 460 em seguida, para 600 e finalmente para 740. Proporcionalmente, a composição volume por volume de isopropanol foi alterada de 80 para 54, em seguida para 40 e para 26. Os testes realizados mostraram que, quanto menor a proporção de isopropanol melhor a separação, sendo a proporção de 8% a melhor testada para a separação dos enantiômeros do omeprazol. A outra alteração realizada foi a adição de etanol à fase móvel utilizando vazão de 2,0 e 3,0 mL/min e temperatura de 25 °C. As proporções entre os constituintes da fase móvel estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Variação da composição da fase móvel com a adição de etanol.

Proporção dos constituintes em v/v/v		
Hexano	Isopropanol	Etanol
87,4	7,6	5,0
82,8	7,2	10,0
73,6	6,4	20,0

A figura 4.5 apresenta o cromatograma obtido a partir da injeção do omeprazol racêmico com a fase móvel contendo a proporção em volume de etanol de 5. A melhor proporção de etanol na fase móvel foi de 5 v/v, obtendo um cromatograma com uma separação razoável. Entretanto, a separação não é completa, não há separação por linha de

base. Essa proporção de fase móvel poderá ser útil para uma comparação com a fase móvel constituída de hexano:isopropanol:triethylamina:ácido acético glacial 920:80:1,5:0,5 v/v/v/v escolhida para a realização dos demais experimentos, conforme é apresentado na Figura 4.5.

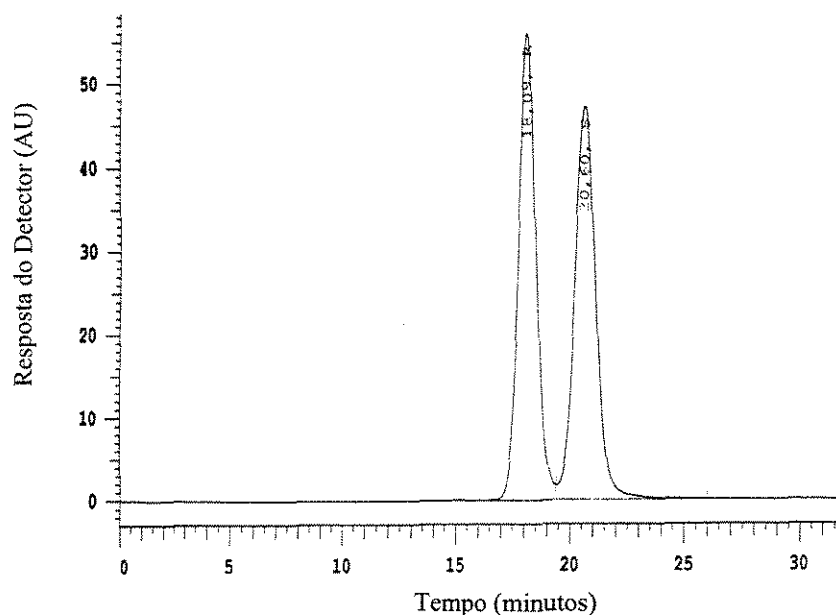


Figura 4.5 – Cromatograma de omeprazol racêmico com a coluna Kromasil CHI-TBB de 250 x 10 mm. Concentração de 0,15 g/L em etanol a 25 °C. vazão de 2,0 mL/min de fase móvel com 5 v/v de etanol; volume de injeção 10 uL; detecção UV 302 nm.

O etanol é um modificador orgânico mais forte que o isopropanol, quando presente na fase móvel proporciona redução nos tempos de retenção dos compostos. Quando os compostos em estudo apresentam semelhantes interações com a fase estacionária, pode ocorrer eluição muito próxima dos dois compostos ou até sobreposição de área com perda de seletividade e resolução.

4.2 Obtenção da solução de R-omeprazol

Em virtude da não disponibilidade do enantiômero-R do omeprazol para a determinação dos parâmetros de dispersão axial e de transferência de massa, foi realizado um procedimento para a obtenção de uma solução pura do isômero R. O procedimento consistiu de injeções de uma solução concentrada da mistura racêmica de omeprazol a 5,0 mg/mL no sistema de CLAE. Após o monitoramento da separação dos enantiômeros, as frações correspondentes ao enantiômero-R foram coletadas e homogeneizadas em uma única solução.

Nos experimentos realizados na etapa de desenvolvimento do método foi observado que as áreas dos picos cromatográficos referentes ao enantiômeros apresentavam o mesmo valor. A variação em porcentagem de área observada foi de 49,6 a 50,4%. A partir desse fato observado foi realizada uma curva analítica com soluções de concentrações conhecidas do isômero-S para a determinação da área da concentração da solução de R-omeprazol. O valor encontrado foi de 0,15 mg/mL para a concentração da solução do enantiômero-R. Houve uma contaminação de 0,5% de enantiômero-S na solução do enantiômero R. A partir desse valor foi preparada uma solução de S-omeprazol na mesma concentração para a realização dos experimentos com soluções diluídas.

Um procedimento similar a esse foi realizado por Erlandsson et al., (1990) para a obtenção dos enantiômeros do omeprazol a partir de uma solução concentrada de omeprazol racêmico utilizando fase estacionária quiral trisfenilcarbamoilcelulose.

4.3 Experimentos com soluções diluídas

4.3.1. Determinação do volume de retardamento da fase móvel, das porosidades total, do leito e das partículas

O volume externo a coluna, V_M , foi determinado através injeções de 5 μ L de uma solução do composto inerte TTBB no sistema cromatográfico de CLAE a diferentes vazões da fase móvel. O valor de V_M foi obtido através da Equação 2.1 e os resultados são

apresentados na Tabela 4.3, sendo o valor médio obtido de 0,12 mL. As injeções no sistema CLAE para o composto TTBB foram monitoradas a 254 nm. O valor de t_M foi usado para ajuste dos tempos de retenção dos enantiômeros do omeprazol.

Tabela 4.3 – Volume morto determinado com injeção do composto não retido.

F (mL/min)	t_M (min)	V_M (mL)
0,5	0,197	0,099
0,75	0,153	0,115
1,0	0,116	0,116
2,0	0,065	0,130
3,0	0,045	0,135
4,0	0,029	0,116

A porosidade total foi obtida a partir das Equações 2.2 e 2.3. A Equação 2.2 considera os valores dos primeiros momentos dos pulsos cromatográficos com composto TTBB e a Equação 2.3 considera o tempo de retenção. Os valores para o primeiro momento e o tempo de retenção do TTBB foram subtraídos do valor de t_M . O fato dos picos cromatográficos para o composto TTBB apresentar-se simétrico causa pouca variação ao calcular o tempo de retenção pelo método dos momentos e através da identificação diretamente no cromatograma. Os valores obtidos para ε_T , usando as duas equações a diferentes temperaturas, estão apresentados na Tabela 4.4. Os resultados encontrados são próximos, entretanto, para os cálculos da porosidade do leito e das partículas, foi utilizado o valor obtido pela equação 2.2 sendo o valor médio de 0,585.

Tabela 4.4 – Resultado da porosidade total a temperatura de 20 °C, 25 °C, 30 °C e 40 °C

Temperatura (°C)	Porosidade Total ε_T		
	Equação 2.2	r^2 Eq. 2.2	Equação 2.3
20	0,583	0,9995	0,577
25	0,585	0,9998	0,579
30	0,586	0,9996	0,583
40	0,587	0,9997	0,584

Os valores encontrados para porosidade total variaram pouco com o aumento da temperatura, sendo independentes da temperatura e indicando que o efeito de adsorção do composto TTBB foi reduzido, conforme relatado por Böcker et al., 2002 no estudo realizado para determinação da porosidade total em fase reversa.

A Figura 4.6 apresenta a reta obtida pela análise do primeiro momento para a determinação da porosidade total conforme a Equação 2.2, a temperatura de 25 °C. Para efeito comparativo da determinação da porosidade total em diferentes temperaturas, são apresentadas, na Figura 4.7, as retas obtidas a 20 °C, 25 °C, 30 °C e 40 °C a partir da análise do primeiro momento com a variação da velocidade linear da fase móvel.

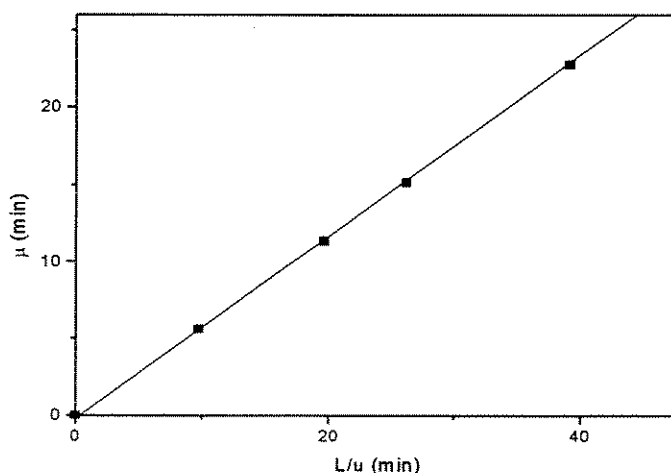


Figura 4.6 – Primeiro momento vs inverso da velocidade linear para o TTBB (■) a 25 °C

A porosidade do leito (ϵ) e das partículas (ϵ_p) foram obtidas a partir das Equações 2.4 e 2.5, respectivamente, de acordo com Rhutven (1984) e estão apresentados na tabela 4.5

Tabela 4.5 – Resultado das porosidades do leito e das partículas

	ϵ	ϵ_p
Porosidades	0,245	0,45

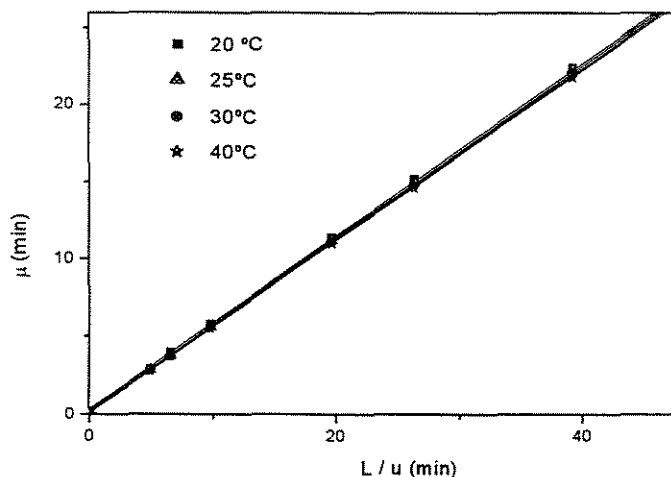


Figura 4.7 – Primeiro momento vs inverso da velocidade linear para o TTBB a (■) 20 °C, (▲) 25 °C, (●) 30 °C e (*) 40 °C

Na literatura revisada neste trabalho, foram encontrados poucos artigos que relatassem os valores de porosidade total para colunas recheadas com a fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB. Em um deles, foi relatado valores de porosidade total e do leito de 0,579 e 0,24, respectivamente, na separação dos enantiômeros do fármaco quiral bupivacaína, utilizando a mesma FEQ e com fase móvel de constituição semelhante (Silva Junior, 2004b). Os valores das porosidades indicam um bom enchimento da coluna cromatográfica quiral.

4.3.2 Avaliação da queda de pressão

Os experimentos no sistema de CLAE a diferentes vazões forneceram resultados de pressão e a partir desses dados de pressão foi possível obter uma relação linear entre a queda de pressão ($\Delta p/L$) e a velocidade linear da fase móvel. A Figura 4.8 apresenta o resultado experimental comparado ao resultado calculado através da equação de Kozeny-Carman (Eq. 2.6). Foi observado que há um ajuste aceitável da equação com o resultado experimental obtido, na qual a permeabilidade, K , foi indiretamente determinada através inclinação da reta obtida experimentalmente e apresentou valor igual a $4,077 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2$. O resultado experimental apresenta um coeficiente de correlação de r^2 0,9998.

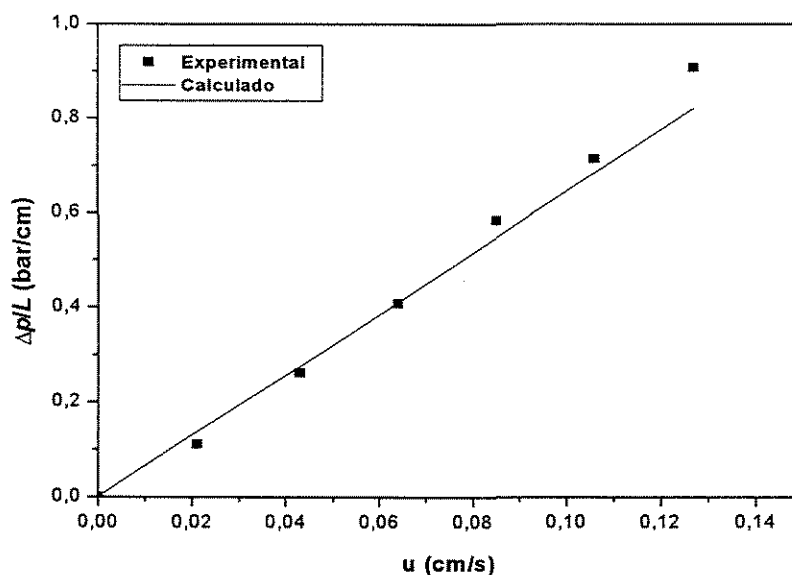


Figura 4.8 – Avaliação da queda de pressão na coluna cromatográfica quiral.

A Tabela 4.6 apresenta os dados de pressão para a coluna preparativa Kromasil CHI-TBB de 250 x 10 mm com tamanho de partícula de 16 µm e a coluna Chiralcel OD de 250 x 7,5 mm com diâmetro de partícula de 15 µm, para vazão de fase móvel de 1,0 mL/min a 6,0 mL/min. Nota-se a reduzida pressão obtida com a coluna preparativa Kromasil quando comparada com a coluna Chiralcel OD utilizando a mesma fase móvel. Como as duas colunas apresentam fase estacionária com tamanho de partícula próximo e dimensões semelhantes, pode-se dizer que a coluna Kromasil tem menor pressão frente a outras colunas cromatográficas quirais. A pressão reduzida obtida com a coluna Kromasil para a vazão de 6,0 mL/min mostra a possibilidade da separação em escala preparativa empregando elevadas vazões de fase móvel.

Tabela 4.6 – Dados de pressão para a coluna preparativa Kromasil CHI-TTBB e a coluna analítica Chiracel OD. O símbolo * indica pressão acima do limite aceito no sistema de CLAE.

Vazão (mL/min)	Pressão coluna Kromasil (psi)	Pressão coluna Chiracel OD (psi)
1,0	40	980
2,0	95	1750
3,0	148	2820
4,0	212	3580
5,0	259	*
6,0	329	*

4.3.3 Determinação dos parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos foram determinados a partir das injeções de solução do omeprazol racêmico e dos enantiômeros puros para a faixa de temperatura e vazão da fase móvel estudados. Os fatores de separação e as resoluções foram determinados para a mistura racêmica e os fatores de retenção, assimetria e número de pratos foram determinados para as injeções da mistura racêmica e para os enantiômeros puros. O número de pratos também foi determinado para o composto não retido TTBB apenas para avaliação do coeficiente de dispersão axial.

As tabelas 4.7 a 4.13 apresentam os valores dos parâmetros cromatográficos para a mistura racêmica do omeprazol a diferentes vazões de fase móvel e temperatura. A Equação 2.12 foi utilizada para calcular o número de pratos e a Equação 2.10 para calcular o valor da resolução. Os fatores de retenção, separação e a assimetria foram calculados a partir das Equações 2.8, 2.9 e 2.11a, respectivamente. A partir dos resultados apresentados nas Tabelas de 4.7 a 4.13 foi possível avaliar a influência da vazão da fase móvel e temperatura na determinação dos parâmetros cromatográficos. A simbologia 1 é aplicada ao composto S-omeprazol e 2 para o composto R-omeprazol. Os termos apresentados nas tabelas t_{R1} e t_{R2} representam o tempo de retenção para o composto S-omeprazol e R-omeprazol, respectivamente.

Tabela 4.7 – Fatores de retenção (k) e separação (α) assimetria (A_{S10}) e resolução (R_S) para cada temperatura estudada a vazão de 0,5 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol

Temperatura (°C)	t_M (min)	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	k_1	k_2	α	R_S	A_{S10} S-omep	A_{S10} R-omep
20	22,43	132,75	166,77	4,92	6,44	1,31	4,49	1,14	1,22
25	22,25	121,76	148,40	4,47	5,67	1,27	4,08	1,24	1,21
30	22,06	109,47	132,21	3,96	4,99	1,26	3,90	1,25	1,29
40	21,77	94,32	111,41	3,33	4,12	1,24	3,47	1,46	1,39

Tabela 4.8 – Fatores de retenção (k) e separação (α) assimetria (A_{S10}) e resolução (R_S) para cada temperatura estudada a vazão de 0,75 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol

Temperatura (°C)	t_M (min)	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	k_1	k_2	α	R_S	A_{S10} S-omep	A_{S10} R-omep
20	15,18	88,69	111,63	4,84	6,35	1,31	4,04	1,15	1,17
25	14,97	79,92	98,75	4,34	5,60	1,29	3,66	1,24	1,20
30	14,71	74,11	88,88	4,04	5,04	1,25	3,37	1,13	1,14
40	14,57	62,93	74,64	3,32	4,12	1,24	3,37	1,32	1,26

Tabela 4.9 – Fatores de retenção (k) e separação (α) assimetria (A_{S10}) e resolução (R_S) para cada temperatura estudada a vazão de 1,0 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol

Temperatura (°C)	t_M (min)	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	k_1	k_2	α	R_S	A_{S10} S-omep	A_{S10} R-omep
20	11,38	67,20	84,53	4,91	6,43	1,31	3,67	1,13	1,17
25	11,18	60,87	73,97	4,45	5,62	1,26	3,17	1,14	1,17
30	11,05	55,37	67,43	4,01	5,10	1,27	3,34	1,22	1,18
40	10,95	47,64	56,57	3,35	4,17	1,24	3,11	1,27	1,24

Tabela 4.10 – Fatores de retenção (k) e separação (α) assimetria (A_{S10}) e resolução (R_S) para cada temperatura estudada a vazão de 2,0 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol.

Temperatura (°C)	t_M	t_{R1}	t_{R2}	k_1	k_2	α	R_S	A_{S10}	A_{S10}
	(min)	(min)	(min)					S-omep	R-omep
20	5,81	35,49	46,03	5,11	6,92	1,36	2,94	1,11	1,15
25	5,60	30,49	37,57	4,45	5,71	1,28	2,64	1,11	1,15
30	5,56	28,21	34,37	4,07	5,18	1,27	2,54	1,10	1,13
40	5,50	24,45	29,13	3,45	4,30	1,25	2,46	1,12	1,10

Tabela 4.11 – Fatores de retenção (k) e separação (α) assimetria (A_{S10}) e resolução (R_S) para cada temperatura estudada a vazão de 3,0 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol.

Temperatura (°C)	t_M	t_{R1}	t_{R2}	k_1	k_2	α	R_S	A_{S10}	A_{S10}
	(min)	(min)	(min)					S-omep	R-omep
20	3,96	22,25	27,97	4,62	6,06	1,31	2,37	1,10	1,12
25	3,75	20,44	25,17	4,45	5,71	1,28	2,13	1,09	1,08
30	3,74	19,14	23,39	4,12	5,25	1,28	2,16	1,07	1,07
40	3,69	16,93	20,07	3,59	4,44	1,24	1,97	1,06	1,05

Tabela 4.12 – Fatores de retenção (k) e separação (α) assimetria (A_{S10}) e resolução (R_S) para cada temperatura estudada a vazão de 4,0 mL/min na separação da mistura racêmica de omeprazol.

Temperatura (°C)	t_M	t_{R1}	t_{R2}	k_1	k_2	α	R_S	A_{S10}	A_{S10}
	(min)	(min)	(min)					S-omep	R-omep
20	2,92	16,73	21,08	4,73	6,22	1,32	2,10	1,10	1,10
25	2,84	15,19	18,67	4,35	5,57	1,28	1,88	1,13	1,07
30	2,82	14,31	17,51	4,07	5,21	1,28	1,88	1,08	1,07
40	2,79	12,47	14,97	3,47	4,37	1,26	1,74	1,07	1,04

Os valores de assimetria apresentaram pouca variação as vazões de fase móvel de 2,0 a 4,0 mL/min. Para as vazões menores, houve maior variação na assimetria aumentando com elevação da temperatura. Isto pode ser devido ao maior alargamento dos picos cromatográficos causado por processos de difusão longitudinal para vazões menores (Ciola, 2000). Para vazões de fase móvel de 3,0 e 4,0 mL/min houve pouca variação nos valores de assimetria nas temperaturas avaliadas.

Os resultados indicam o melhor uso de vazões mais altas para obtenção de análise com tempos menores de retenção, entretanto com menores valores de α e R para a separação cromatográfica.

Nota-se a redução da separação com a elevação da temperatura. Os valores de coeficiente de separação variaram pouco com a alteração da vazão para uma mesma temperatura. Uma maior alteração ocorreu para a vazão de 2,0 mL/min, na qual o valor de α para a temperatura de 20 °C foi maior que o valor obtido para as demais vazões.

A resolução entre os enantiômeros do omeprazol diminui com o aumento da vazão da fase móvel e da temperatura, devido à interações mais rápida entre os enantiômeros e a fase estacionária. Isto pode ser notado para a análise dos pontos extremos de temperatura e vazão de fase móvel utilizados. O valor de resolução muda de 4,49 a vazão de 0,5 mL/min e temperatura de 20 °C para 1,74 a vazão de 4,0 mL/min e temperatura de 40 °C.

O fator de retenção pode ser avaliado da mesma forma que o tempo de retenção, pois é proporcional a ele, conforme mostra a Equação 2.8. Com o aumento da temperatura de análise ocorre redução do tempo de retenção. A temperatura aumenta a velocidade de interação do composto com a fase estacionária, reduz a viscosidade da fase móvel e, portanto reduz o tempo de retenção e, proporcionalmente, o fator de retenção.

A Tabela 4.13 apresenta os valores do número de pratos, N_S e N_R para os enantiômeros do omeprazol obtidos a partir de injeções da mistura racêmica de omeprazol no sistema de CLAE com a variação da vazão da fase móvel e temperatura de análise. Os valores de N_S e N_R reduziram com a elevação da vazão da fase móvel e aumentaram com a elevação da temperatura.

Tabela 4.13 – Número de pratos para os enantiômeros do omeprazol, N_S e N_R , para R e S do omeprazol respectivamente obtidos a partir da omeprazol racêmico.

	Número de Pratos para os Enantiômeros do Omeprazol							
	20 °C		25 °C		30 °C		40 °C	
Vazão (mL/min)	N_S	N_R	N_S	N_R	N_S	N_R	N_S	N_R
0,5	6263	6218	6548	7055	6760	7084	6805	7106
0,75	5071	4925	5112	5062	5615	5486	6320	6211
1,0	4203	4084	4339	4168	4756	4545	5463	5080
2,0	2119	2026	2729	2460	2760	2594	3242	3115
3,0	1781	1702	1797	1647	1911	1835	2234	2081
4,0	1368	1308	1380	1343	1419	1367	1530	1384

Na avaliação para uma mesma temperatura, a redução dos valores de N_S e N_R , com o aumento da vazão, ocorre devido ao maior alargamento do pico e redução do tempo de retenção. Quanto mais largo for o pico cromatográfico e menor o tempo de retenção menor será o número de pratos com menor eficiência de separação. Para uma mesma vazão de análise com elevação da temperatura, ocorre aumento do valor N_S e N_R devido a maior contribuição da redução do alargamento do pico cromatográfico.

A Tabela 4.14 apresenta o número de pratos calculado para o composto não retido pela fase estacionária. O número de pratos foi calculado apenas como efeito comparativo para obtenção da altura equivalente a um prato H usado para o cálculo da dispersão axial.

Tabela 4.14 – Número de pratos para o composto inerte TTBB, N_T .

Vazão (mL/min)	Número de Pratos TTBB			
	N_T 20 °C	N_T 25 °C	N_T 30 °C	N_T 40 °C
0,5	9074	9552	10196	11343
0,75	7974	8394	8960	9968
1,0	7112	7487	7991	8890
2,0	4699	4947	5280	5874
3,0	3655	3847	4107	4569
4,0	2924	3078	3285	3655

A alteração no valor do número de pratos para o composto não retido, (N_T), com a variação da vazão da fase móvel e da temperatura, pode ser avaliada com o mesmo raciocínio para os a alteração de N_S e N_R . Entretanto, a contribuição do valor de w_h para o cálculo de N_T é maior e gera resultados de número de pratos maiores, apesar do menor tempo de retenção.

A Figura 4.9 apresenta o gráfico da variação da resolução com a vazão da fase móvel a temperatura de 40 °C. Um decréscimo na vazão da fase móvel ocasiona um aumento na resolução. As moléculas dos enantiômeros dispõem de tempo suficiente para interagir com o sorvente, melhorando a separação com maior resolução entre os dois picos cromatográficos dos enantiômeros. Quando a vazão da fase móvel utilizada foi de 0,5 mL/min a resolução atingiu o valor máximo, entretanto os tempos de retenção para os enantiômeros foram muito longos. Com a corrida cromatográfica longa, o custo e o tempo de análise aumentam consideravelmente. Vazões maiores, apesar da redução da resolução, permitem uma separação satisfatória com menor tempo de análise, e com maior consumo de solventes. Uma opção seria a utilização de temperatura um pouco maior na análise, como por exemplo, a temperatura de 40 °C, que apresentou melhor relação linear da resolução com a vazão da fase móvel.

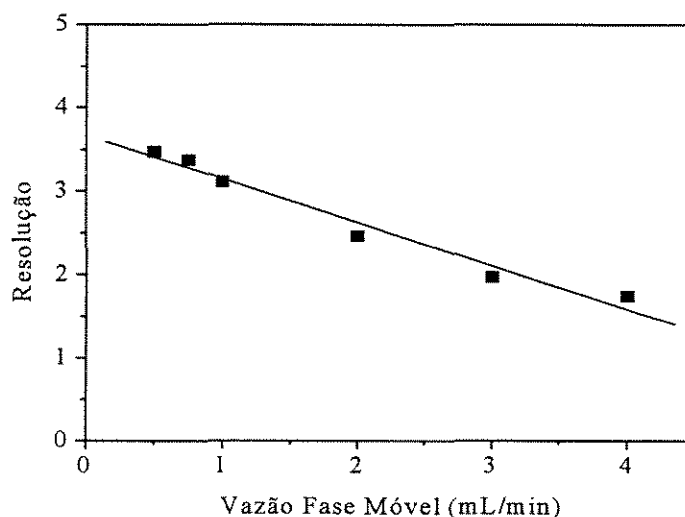


Figura 4.9 – Curva de variação da resolução com a vazão da fase móvel para a temperatura de 40 °C

A Figura 4.10 apresenta o gráfico da variação da resolução com a temperatura utilizando vazão da fase móvel de 2,0 mL/min. Com o aumento da temperatura os valores da resolução reduziram linearmente. Os tempos de retenção foram reduzidos permitindo às moléculas dos enantiômeros interagirem menos com o sorvente da fase estacionária ocasionando a redução da resolução com o aumento da temperatura (Yu et al., 2002).

Um outro aspecto a ser avaliado é questão da redução do alargamento dos picos cromatográficos. Apesar do cálculo da resolução utilizar a largura dos picos à linha de base dos cromatogramas, o efeito da variação do tempo de retenção é mais pronunciado que o efeito da redução das larguras dos picos com a elevação da temperatura. A largura dos picos é reduzida com o aumento da temperatura e poderia proporcionar aumento da resolução caso apenas esse parâmetro fosse avaliado.

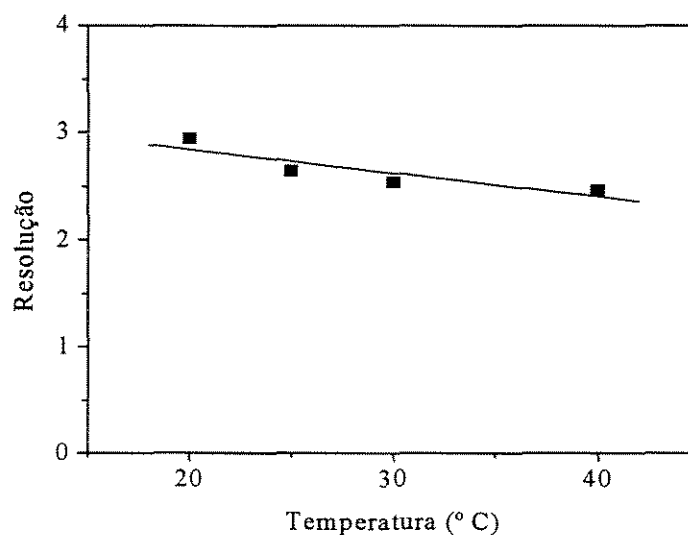


Figura 4.10 – Curva de variação da resolução com a temperatura para a vazão da fase móvel de 2 mL/min.

Os valores dos fatores de separação e resolução obtidos nos experimentos foram melhores, quando comparados à separação de omeprazol racêmico utilizando a coluna cromatográfica quiral Chiralpak AD (Orlando e Bonato, 2003). Isto mostra que a separação dos enantiômeros do omeprazol na coluna preparativa Kromasil CHI-TBB é compatível com outras fases estacionárias disponíveis no mercado.

4.3.3.1- Cromatogramas

Os cromatogramas para o composto não retido TTBB, mistura racêmica e enantiômeros do omeprazol foram determinados a diferentes temperaturas e vazões de fase móvel composta de uma mistura de hexano:isopropanol:triethylamina:ácido acético na proporção de 920:80:1,5:0,5 v/v/v/v.

A Figura 4.11 apresenta o perfil de eluição do composto não retido na coluna cromatográfica quiral Kromasil CHI TTBB, a temperatura de 25 °C e vazão de fase móvel de 2,0 mL/min. A redução do tempo de retenção e menor alargamento do pico leva a maiores valores do número de pratos.

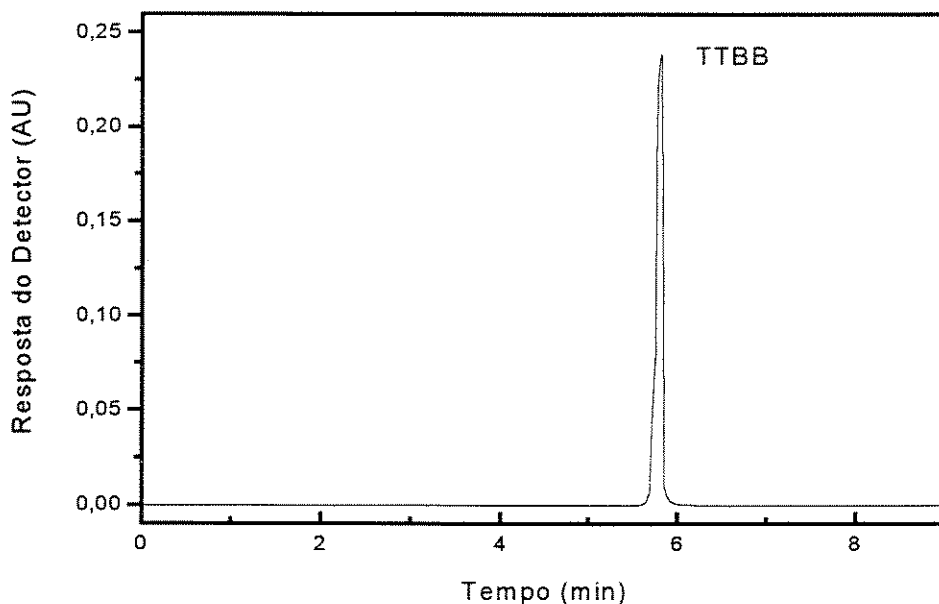


Figura 4.11 – Cromatograma do composto não retido – TTBB (0,15 g/L); volume de injeção 5 uL; 25 °C; vazão de 2,0 mL/min; detecção UV 254 nm.

As Figuras 4.12 a 4.23 apresentam os cromatogramas dos omeprazol racêmico e dos enantiômeros do omeprazol para a faixa de temperatura estudada e vazão da fase móvel igual a 2,0 mL/min utilizando a coluna Kromasil CHI-TBB de 250 x 10 mm. A detecção foi feita em UV 302 nm e o volume de injeção utilizado foi de 5 uL.

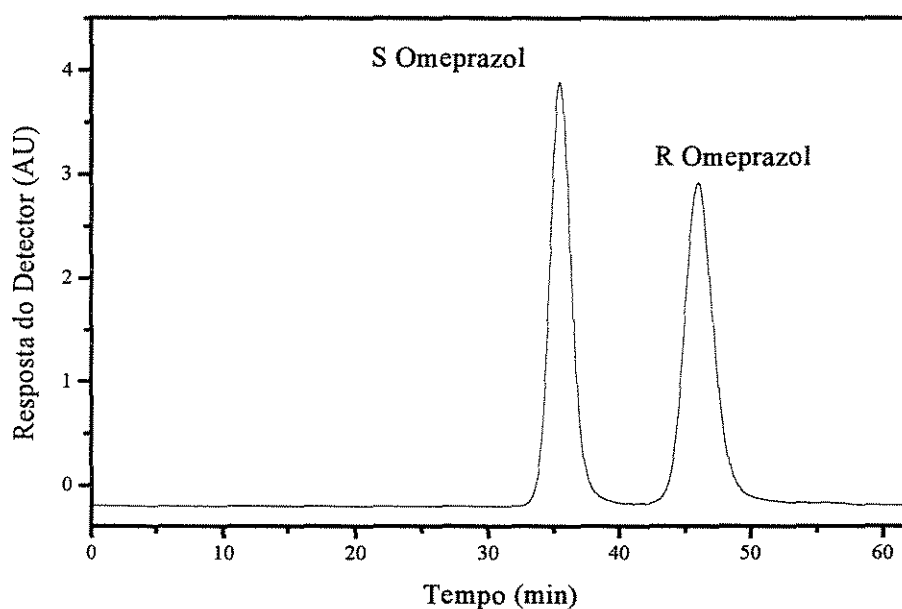


Figura 4.12 – Cromatograma do omeprazol racêmico (0,15 g/L) a 20 °C; volume de injeção 5 μ L; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

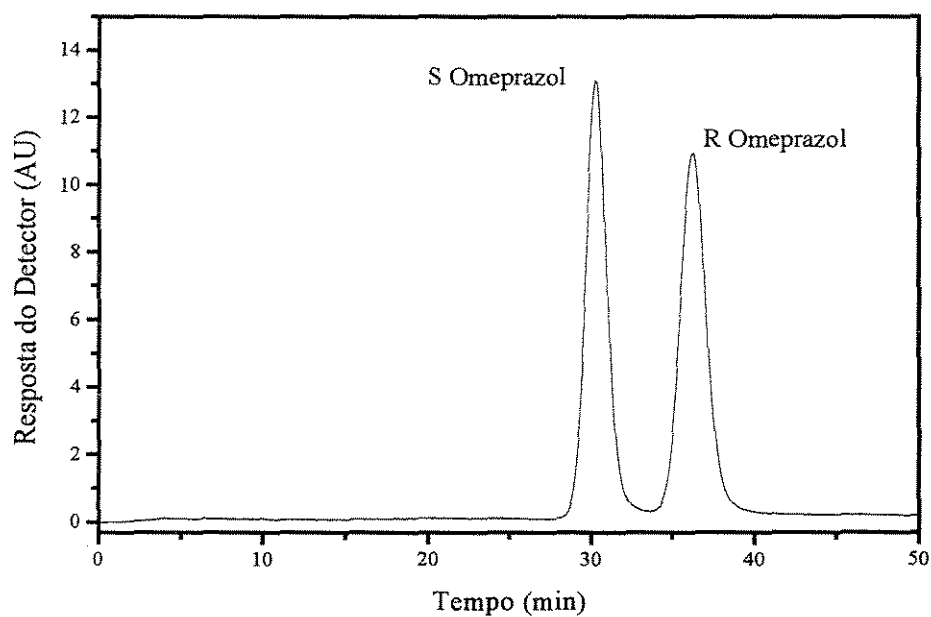


Figura 4.13 – Cromatograma do omeprazol racêmico (0,15 g/L) a 25 °C; volume de injeção 5 μ L; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

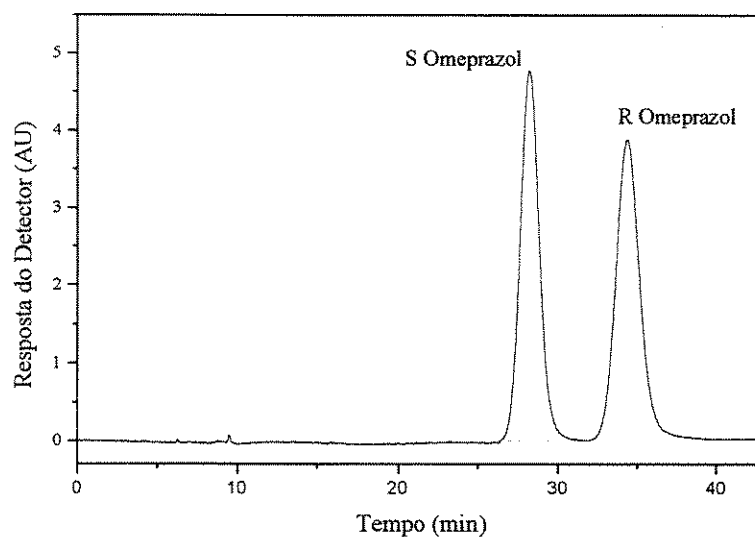


Figura 4.14 – Cromatograma do omeprazol racêmico (0,15 g/L) a 30 °C; volume de injeção 5 μ L; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

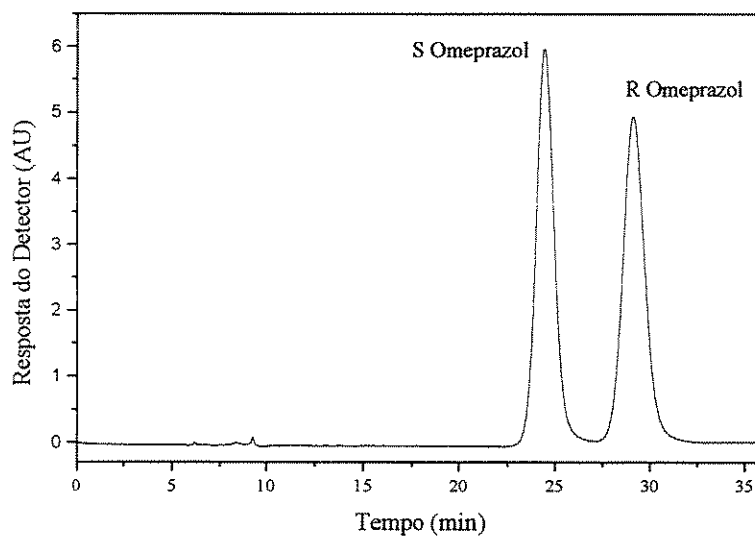


Figura 4.15 – Cromatograma do omeprazol racêmico (0,15 g/L) a 40 °C; volume de injeção 5 μ L; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm. .

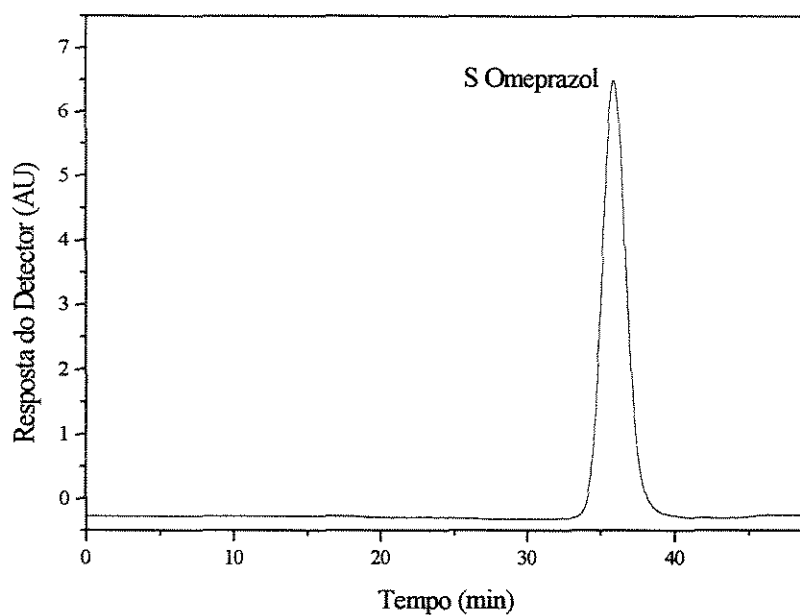


Figura 4.16 – Cromatograma do S-omeprazol (0,15 g/L) a 20 °C; volume de injeção 5 μ L; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

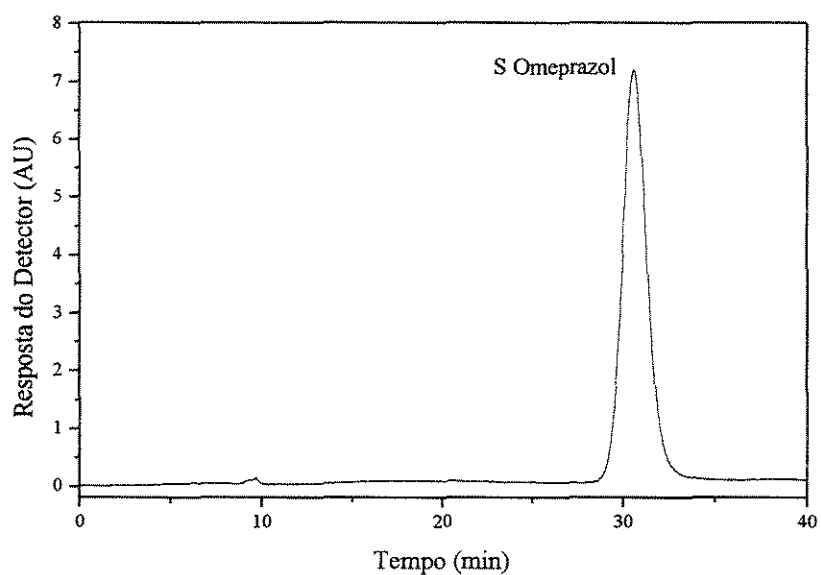


Figura 4.17 – Cromatograma do S-omeprazol (0,15 g/L) a 25 °C; volume de injeção 5 μ L; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm

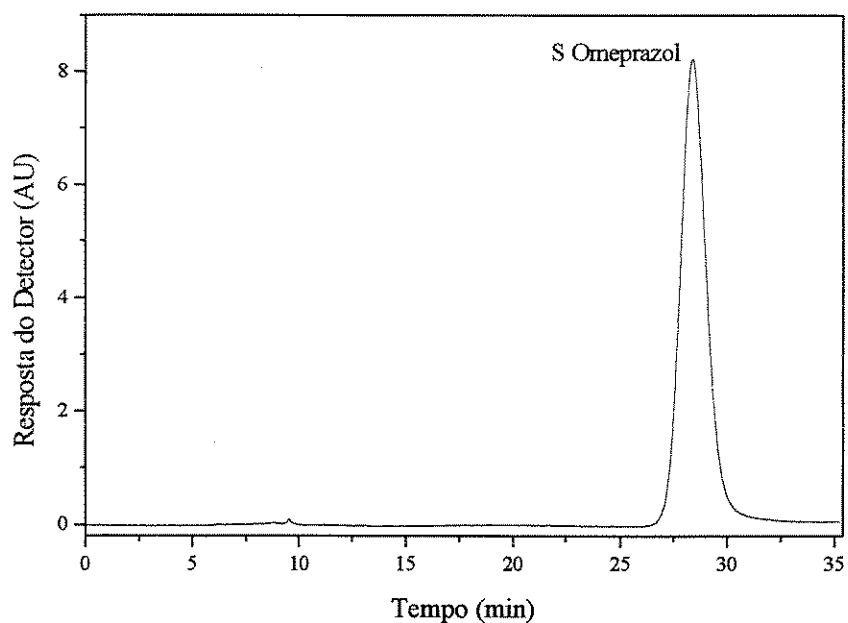


Figura 4.18 – Cromatograma do S-omeprazol (0,15 g/L) a 30 °C; volume de injeção 5 μ L; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

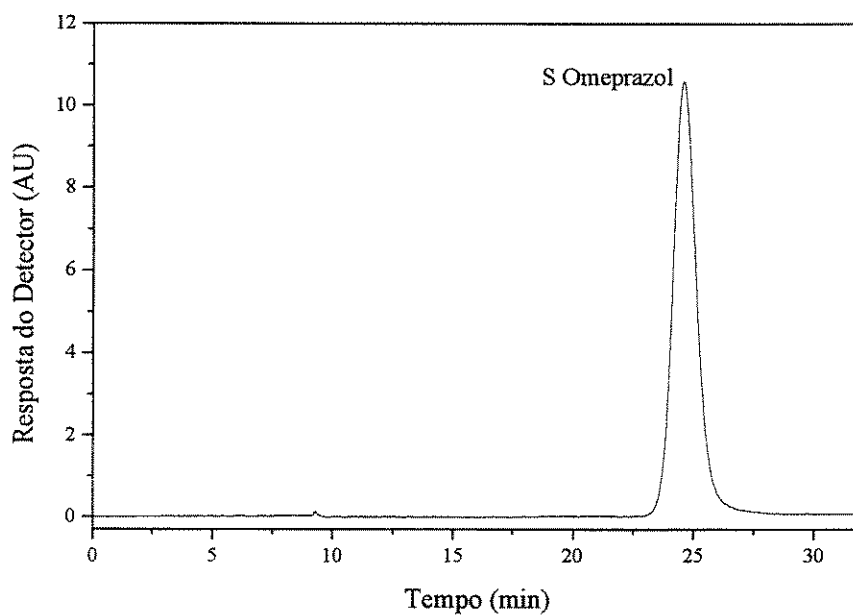


Figura 4.19 – Cromatograma do S-omeprazol (0,15 g/L) a 40 °C; volume de injeção 5 μ L; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

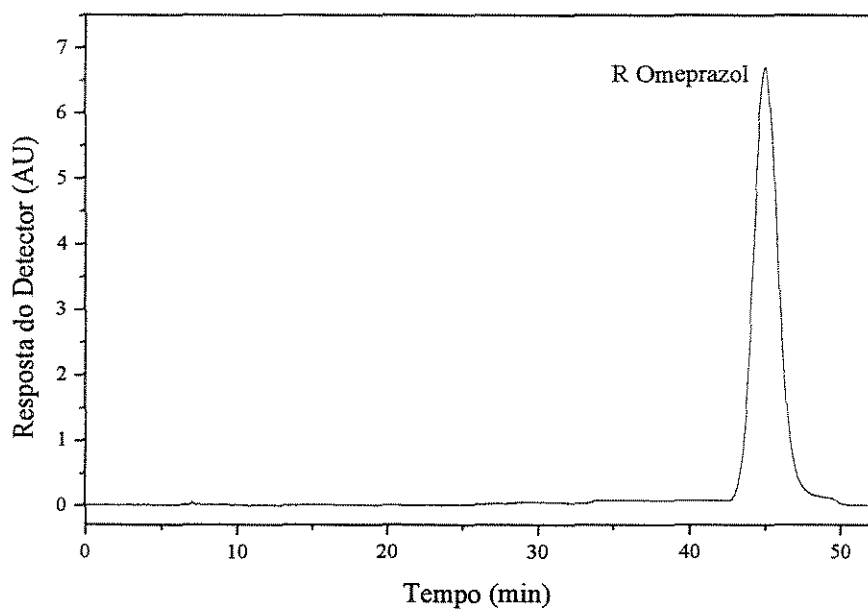


Figura 4.20 Cromatograma do R-omeprazol (0,15 g/L) a 20 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

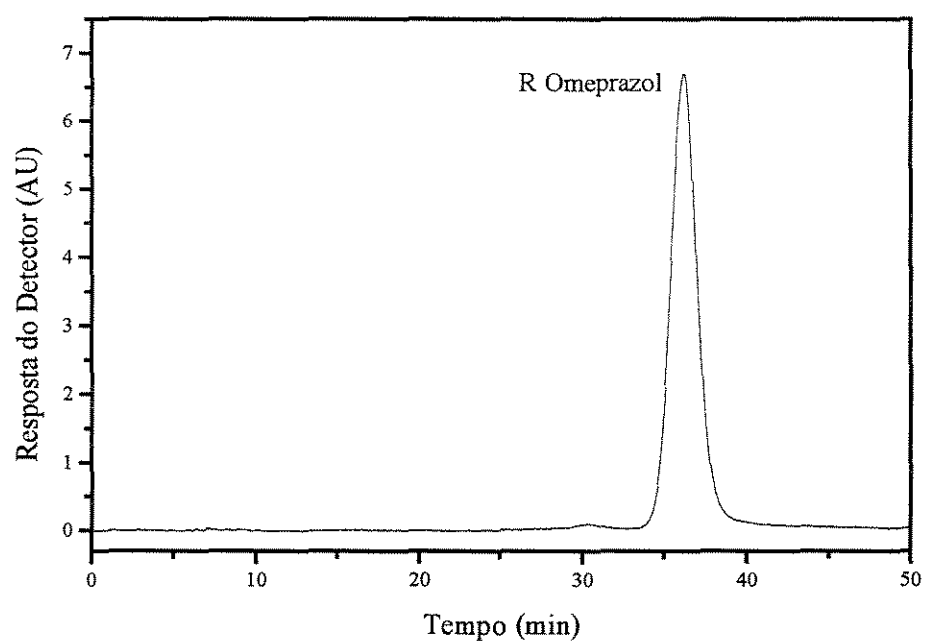


Figura 4.21 – Cromatograma do R-omeprazol (0,15 g/L) a 25 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

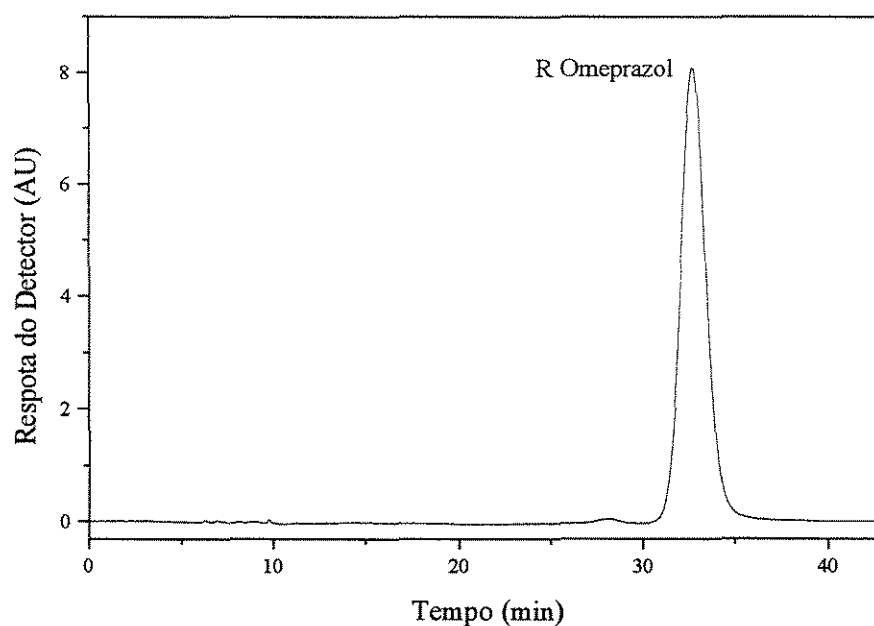


Figura 4.22 – Cromatograma do R-omeprazol (0,15 g/L) a 30 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm..

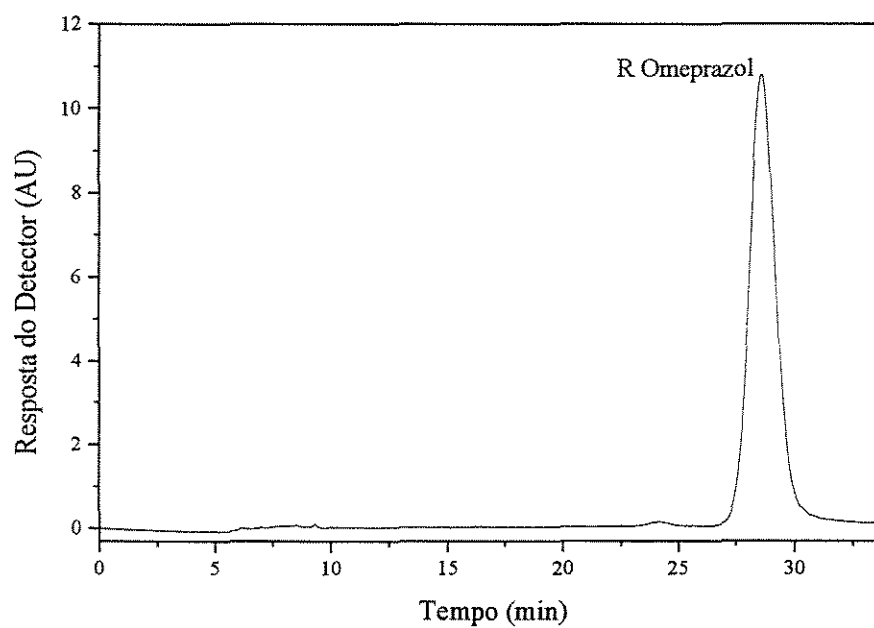


Figura 4.23 – Cromatograma do R-omeprazol (0,15 g/L) a 40 °C; volume de injeção 5uL; vazão 2,0 mL/min; detecção UV 302 nm.

Os tempos de retenção para os enantiômeros do omeprazol diminuíram com a elevação da temperatura. Através dos perfis de eluição mostrados foi possível observar que a separação entre os enantiômeros do omeprazol ocorre até a linha de base nas condições testadas. Para as demais vazões de fase móvel a separação também ocorre até a linha de base. Os resultados de resolução e seletividade, discutidos na seção anterior, comprovam esta separação pois estão acima do valor desejado para uma possível separação em escala preparativa. Nos experimentos realizados não foram testadas temperaturas maiores devido à possibilidade de oxidação do omeprazol, o que possibilitaria a formação de compostos de degradação, fugindo do objetivo desse trabalho.

4.3.3.2- Avaliação da alteração do Tempo de Retenção com a Temperatura

Os dados apresentados nas Tabelas de 4.7 a 4.12 foram utilizados para construir as Figuras 4.24 a 4.27 para avaliação da influência da temperatura nos tempos de retenção para os enantiômeros do omeprazol.

As Figuras 4.24 a 4.27 apresentam os gráficos da variação dos tempos de retenção com a variação da temperatura para as vazões de 1,0 a 4,0 mL/min estudados. Nota-se uma variação linear entre o tempo de retenção e a temperatura, sendo reprodutiva para as vazões avaliadas. Foram escolhidas apenas essas quatro vazões, por apresentarem menores tempos de retenção, uma vez que maiores tempos de retenção foram obtidos para as vazões de 0,5 e 0,75 mL/min.

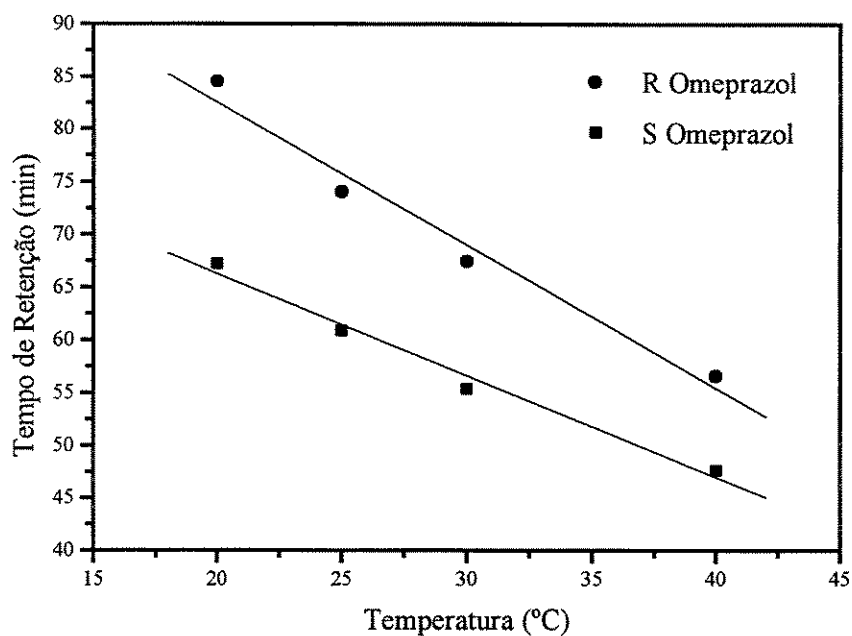


Figura 4.24 – Tempo de retenção da omeprazol racêmico como função da temperatura a uma vazão de 1,0 mL/min da fase móvel.

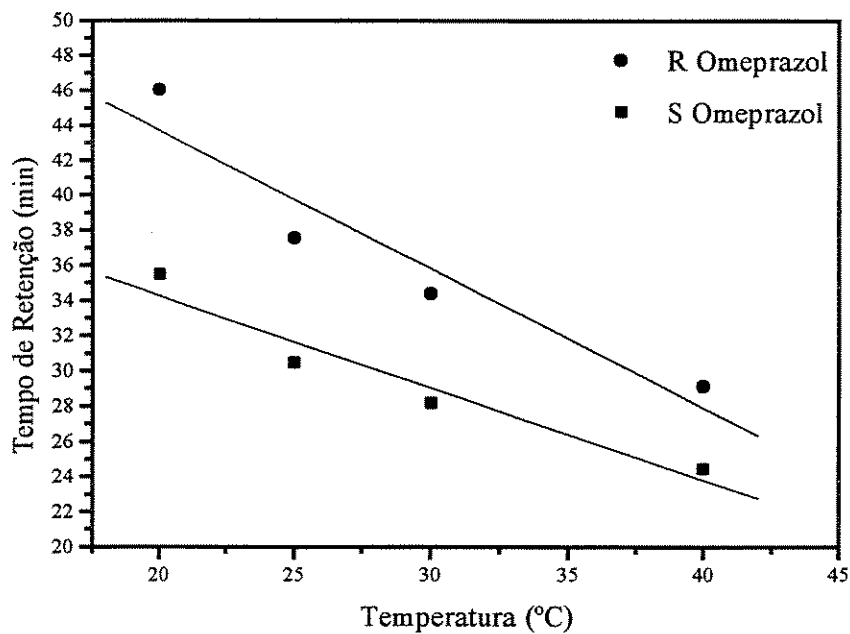


Figura 4.25 – Tempo de retenção da omeprazol racêmico como função da temperatura a uma vazão de 2,0 mL/min da fase móvel.

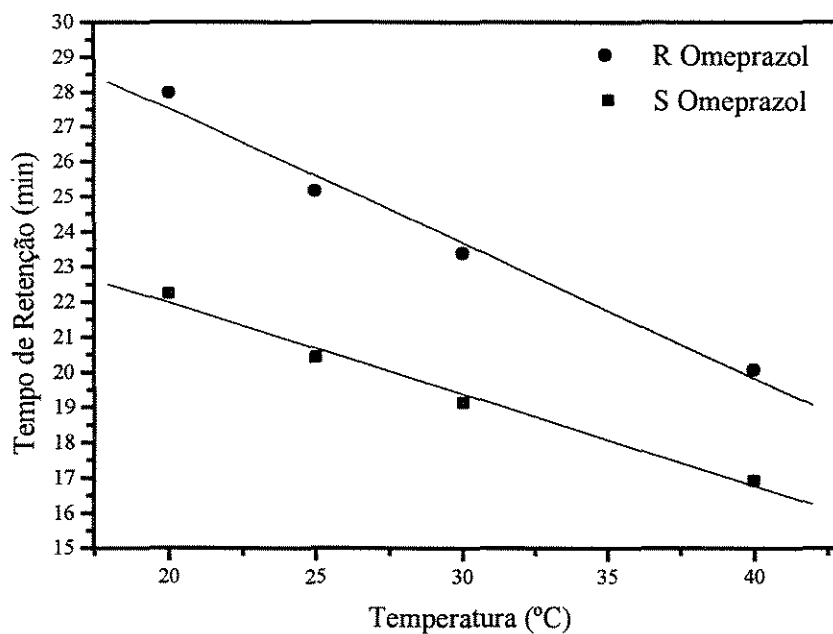


Figura 4.26 – Tempo de retenção da omeprazol racêmico como função da temperatura a uma vazão de 3,0 mL/min da fase móvel.

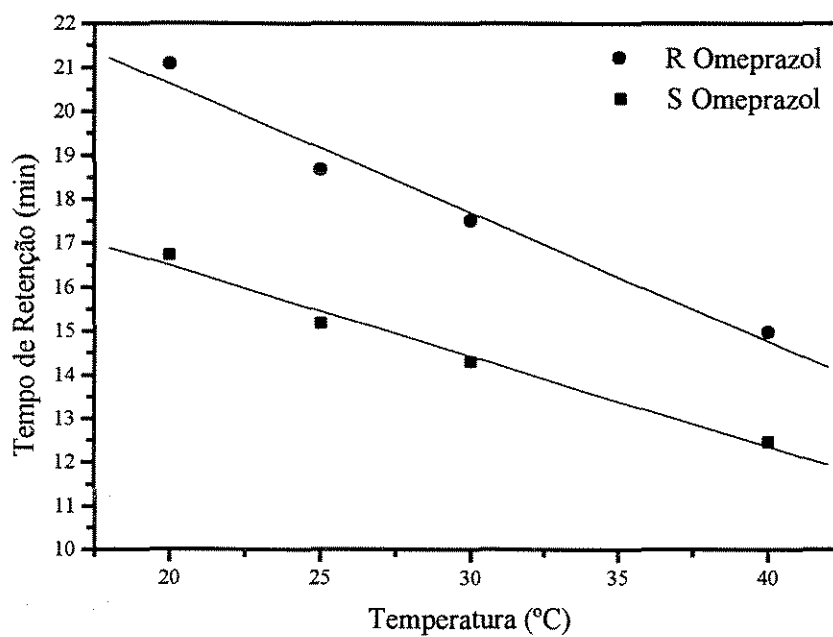


Figura 4.27 – Tempo de retenção da omeprazol racêmico como função da temperatura a uma vazão de 4,0 mL/min da fase móvel.

4.4. Constantes de equilíbrio de adsorção linear – constante de Henry

As Tabelas 4.15 e 4.16 apresentam os resultados da constante de Henry para os enantiômeros do omeprazol nas condições de vazão da fase móvel e temperatura avaliadas.

Os valores da constante de Henry (H_i), para os enantiômeros do omeprazol, foram calculados a partir dos tempos de retenção dos enantiômeros, do tempo de retenção do composto não retido e da porosidade do leito, conforme a Equação 4.2. ε_T representa a porosidade total da coluna, t_R e t_M são os tempos de retenção do enantiômero e do composto não retido, respectivamente.

$$H_i = \left(\frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \right) \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \quad (4.2)$$

Os resultados apresentados na Tabela 4.15 e 4.16 mostram que os valores de H são maiores que a unidade. Nota-se, para uma mesma vazão de fase móvel, uma redução no valor da constante de Henry com aumento da temperatura utilizada nos experimentos. Entretanto, para uma mesma temperatura o valor da constante de Henry não sofreu grandes alterações com a elevação da vazão da fase móvel.

Os valores encontrados indicam uma interação relativamente forte entre cada um dos enantiômeros do omeprazol e a fase estacionária quiral. O R-omeprazol apresentou uma maior afinidade pela fase estacionária quiral contida na coluna utilizada, com valores de H_i mais elevados quando comparados aos valores de H_i para S-omeprazol.

Tabela 4.15 – Valores de H_i para o enantiômero S do omeprazol.

Vazão (mL/min)	Temperatura (°C)			
	20	25	30	40
0,5	6,933	6,304	5,586	4,583
0,75	6,826	6,116	5,692	4,565
1,0	6,914	6,265	5,654	4,608
2,0	7,201	6,265	5,743	4,739
3,0	6,511	6,274	5,804	4,935
4,0	6,668	6,130	5,744	4,772

Tabela 4.16 – Valores de H_i para o enantiômero R do omeprazol.

Vazão (mL/min)	Temperatura (°C)			
	20	25	30	40
0,5	9,071	7,992	7,039	5,663
0,75	8,956	7,889	7,108	5,670
1,0	9,061	7,917	7,192	5,730
2,0	9,758	8,048	7,304	5,909
3,0	8,547	8,052	7,406	6,105
4,0	8,767	7,857	7,343	6,004

Os valores elevados de H_i para baixas temperaturas e vazões de fase móvel reduzidas podem explicar o alargamento dos picos obtidos para os cromatogramas nessas condições, uma vez que, a menores vazões os solutos possuem menores velocidades de escoamento no leito poroso ocasionando maior tempo de residência na coluna.

4.5. Determinação dos coeficientes de dispersão axial e dos parâmetros de transferência de massa

Os coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa foram obtidos a partir dos experimentos realizados para avaliar a constante de Henry.

O número de pratos para cada enantiômero injetado separadamente no sistema CLAE foi calculado através da Equação 2.12 sendo apresentados nas Tabelas 4.17 e 4.18.

Tabela 4.17 – Número de pratos para o enantiômero S do omeprazol.

Vazão (mL/min)	Número de Pratos S-omeprazol			
	N _S 20 °C	N _S 25 °C	N _S 30 °C	N _S 40 °C
0,5	6534	6583	6671	6730
0,75	4923	5177	5483	6213
1,0	4229	4412	4679	5249
2,0	2415	2619	2737	3085
3,0	1751	1794	1885	2062
4,0	1363	1396	1450	1487

Tabela 4.18 – Número de pratos para o enantiômero R do omeprazol.

Vazão (mL/min)	Número de Pratos R-omeprazol			
	N _R 20 °C	N _R 25 °C	N _R 30 °C	N _R 40 °C
0,5	5794	6502	6849	7071
0,75	4766	5224	5534	6221
1,0	3947	4272	4749	5357
2,0	2112	2548	2728	3086
3,0	1564	1783	1950	2089
4,0	1223	1392	1492	1541

O valor da altura equivalente a um prato (H) foi calculado a partir da Equação 2.20. Observando-se as Figuras 4.28 a 4.31, não foi possível verificar a existência de um mínimo na curva de van Deemter, ocorrendo uma dependência linear entre H e u para faixa de vazão de fase móvel utilizada. Isto indica que a eficiência da coluna é controlada pelos efeitos de dispersão axial e de resistência à transferência de massa. No presente trabalho não foram investigadas menores vazões de fase móvel devido ao elevado tempo de retenção que teriam as corridas cromatográficas para a separação dos enantiômeros do omeprazol.

A partir das figuras apresentadas, nota-se uma dependência da eficiência com a temperatura e vazão da fase móvel. Para os valores de temperatura investigados, o isômero

mais retido, R-omeprazol, apresentou a menor eficiência, seguido pelo S-omeprazol, e finalmente pelo TTBB, que apresentou a maior eficiência dentre os três.

A maior eficiência da coluna com o aumento da temperatura juntamente com menores tempos de retenção proporcionaram aos enantiômeros picos cromatográficos mais simétricos.

A eficiência de separação da coluna cromatográfica quiral, a baixos valores de vazões, é muito próxima para os enantiômeros. Maiores diferenças são observadas para vazões elevadas de fase móvel.

A curva de van Deemter para o composto não retido, a diferentes temperaturas (Fig.4.28) mostra menor variação de H com o aumento da vazão da fase móvel e consequentemente da velocidade linear. Apresenta comportamento linear e dentro da faixa estudada o termo B da Equação de van Deemter (Eq. 2.19), que está relacionado aos efeitos de difusão molecular pode ser desconsiderado, pois os experimentos foram realizados com elevadas vazões de fase móvel. Normalmente, essa influência é percebida em reduzidas velocidades de escoamento da fase móvel e para a menor vazão estudada nesse trabalho, vazão de 0,5 mL/min, não foi percebida a influência da difusão longitudinal.

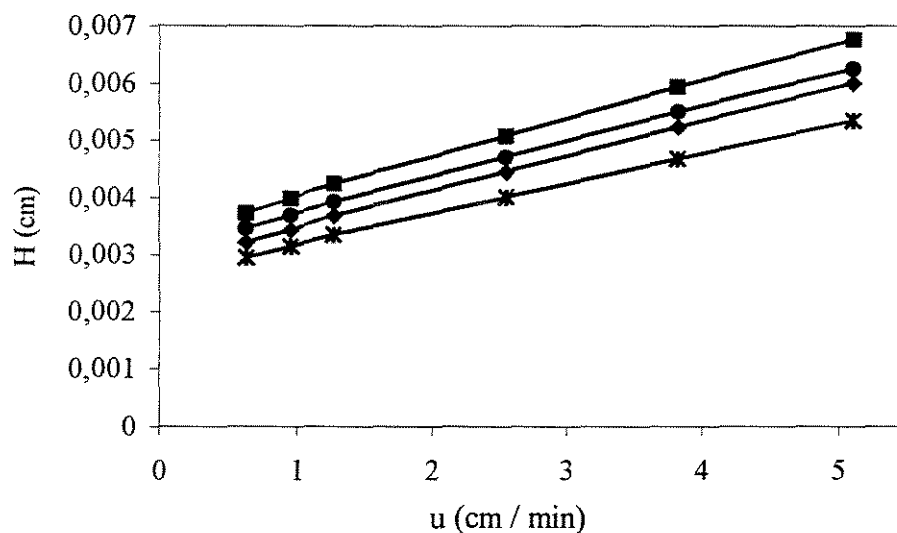


Figura 4.28 – Curva de van Deemter para o TTBB a (■) 20 °C, (●) 25 °C, (◆) 30 °C e (*) 40 °C.

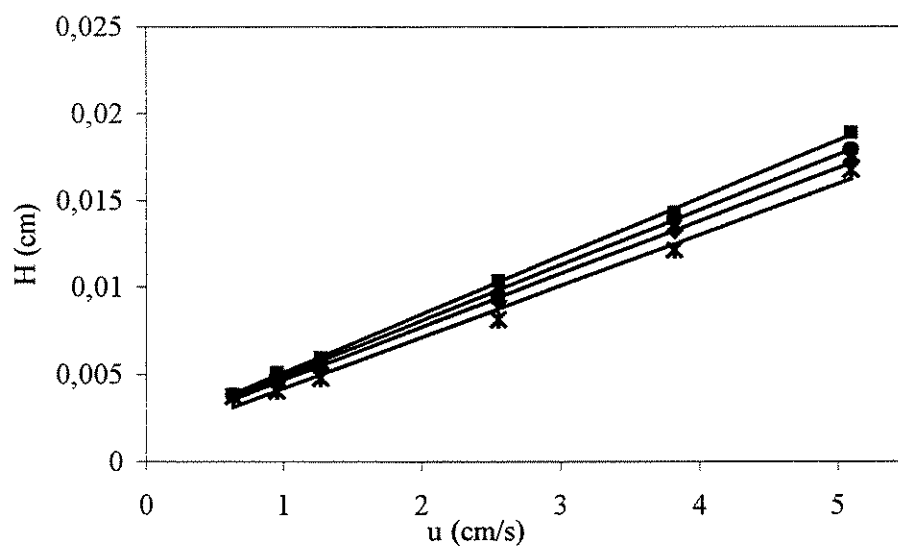


Figura 4.29 – Curva de van Deemter para a *S*-omeprazol a: (■) 20 °C, (●) 25 °C, (◆) 30 °C e (*) 40 °C.

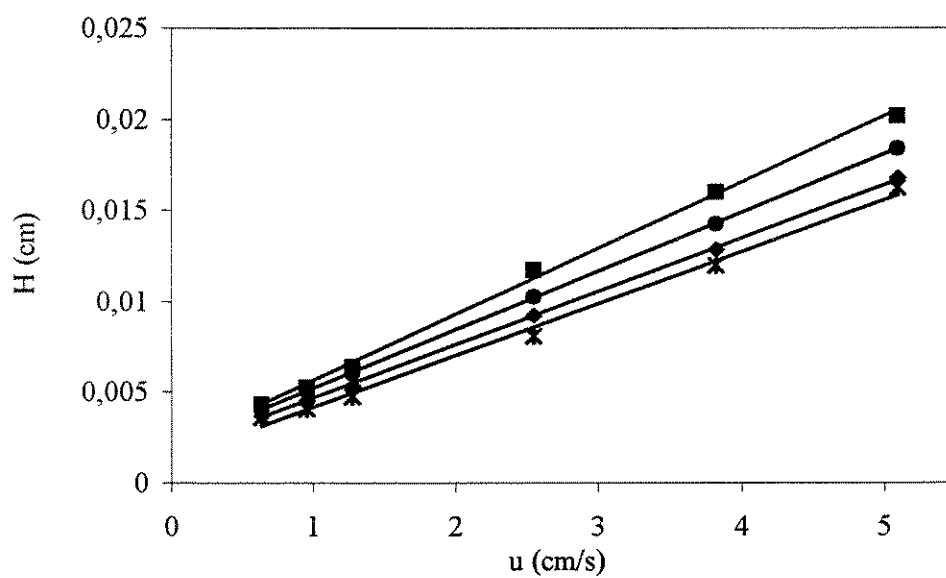


Figura 4.30 – Curva de van Deemter para a *R*-omeprazol a: (■) 20 °C, (●) 25 °C, (◆) 30 °C e (*) 40 °C.

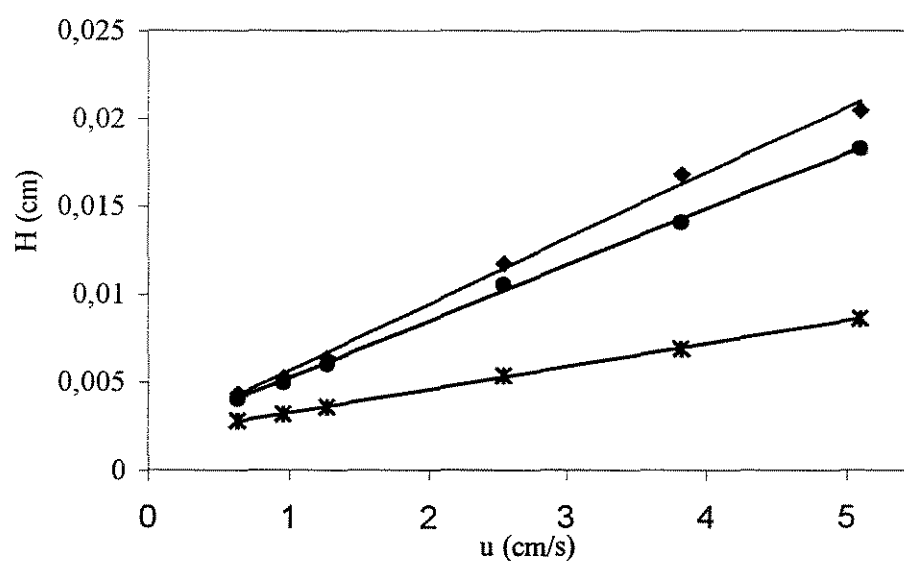


Figura 4.31 – Curva de van Deemter para o S-omeprazola (♦), R-omeprazol (●) e TTBB (*) a 20 °C

A partir da extrapolação das retas obtidas entre H e u foi possível determinar o valor da constante A na equação de van Deemter e o termo C a partir da inclinação das retas de acordo com a Equação 2.19.

As Tabelas 4.19, 4.20 e 4.21 apresentam os valores dos parâmetros A e C da equação de van Deemter para ambos os enantiômeros da omeprazol e para o TTBB.

Tabela 4.19 – Parâmetros A e C da equação de van Deemter para a S-omeprazol.

Temperatura (°C)	A (cm)	C (min)	r^2
20	$1,88 \times 10^{-3}$	$3,25 \times 10^{-3}$	0,9995
25	$1,70 \times 10^{-3}$	$3,18 \times 10^{-3}$	0,9994
30	$1,60 \times 10^{-3}$	$3,05 \times 10^{-3}$	0,9991
40	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,95 \times 10^{-3}$	0,9908

Tabela 4.20 – Parâmetros A e C da equação de van Deemter para a *R*-omeprazol.

Temperatura (°C)	A (cm)	C (min)	r^2
20	$1,91 \times 10^{-3}$	$3,38 \times 10^{-3}$	0,9979
25	$1,78 \times 10^{-3}$	$3,18 \times 10^{-3}$	0,9999
30	$1,66 \times 10^{-3}$	$2,95 \times 10^{-3}$	0,9996
40	$1,24 \times 10^{-3}$	$2,87 \times 10^{-3}$	0,9949

Tabela 4.21 – Parâmetros A e C da equação de van Deemter para o TTBB.

Temperatura (°C)	A (cm)	C (min)	r^2
20	$1,36 \times 10^{-3}$	$1,66 \times 10^{-3}$	0,9995
25	$1,28 \times 10^{-3}$	$1,45 \times 10^{-3}$	0,9994
30	$1,20 \times 10^{-3}$	$1,32 \times 10^{-3}$	0,9967
40	$1,02 \times 10^{-3}$	$1,27 \times 10^{-3}$	0,9997

A partir dos dados dos parâmetros de van Deemter, A e C , apresentado nas Tabelas de 4.19 a 4.21 foram calculados os valores dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global, mostrados nas Tabelas 4.22 e 4.23.

A mistura axial no sistema em estudo foi considerada ser determinada pelo escoamento entre os espaços vazios do leito desprezando os efeitos de difusão molecular, esta contribuição para H deve ser aproximadamente a mesma para todos os adsorbatos. Isto implica que todos o solutos deveriam ter o mesmo H , a zero de velocidade linear da fase móvel, pois para uma dada temperatura e para o menor valor de velocidade de escoamento do fluido, os dois enantiômeros apresentam o mesmo comportamento, com valores próximos de D_L/u . Os valores de D_L/u para o composto TTBB são menores quando comparado aos dos enantiômeros do omeprazol decaído com a temperatura.

Tabela 4.22 – Valores de D_L/u e k_m obtidos a partir da análise dos momentos para os enantiômeros da omeprazol.

Temperatura (°C)	D_L/u (cm)		k_m (min ⁻¹)	
	S-omeprazol	R-omeprazol	S-omeprazol	R-omeprazol
20	$9,4 \times 10^{-4}$	$9,6 \times 10^{-4}$	13,66	9,35
25	$8,5 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-4}$	15,21	12,16
30	$8,0 \times 10^{-4}$	$8,3 \times 10^{-4}$	17,15	14,31
40	$6,0 \times 10^{-4}$	$6,2 \times 10^{-4}$	21,03	17,83

Tabela 4.23 – Valores de D_L/u obtidos a partir da análise dos momentos para o TTBB.

Temperatura (°C)	D_L/u (cm)
20	$6,8 \times 10^{-4}$
25	$6,4 \times 10^{-4}$
30	$6,0 \times 10^{-4}$
40	$5,1 \times 10^{-4}$

Os valores de k_m apresentados na Tabela 4.22 mostram que, para ambos os enantiômeros, ocorre um aumento da taxa de transferência de massa com a elevação da temperatura. Observa-se que a transferência de massa na coluna cromatográfica quiral é considerada relativamente alta. Os valores encontrados da quantidade adsorvida dos enantiômeros no experimento da determinação das isothermas competitivas comprovam os valores de transferência de massa obtidos.

4.6. Análise termodinâmica de adsorção

A entalpia e entropia molar de adsorção, ΔH_{ads} e ΔS_{ads} , respectivamente foram determinados através da relação linear entre $\ln k$ vs $1/T$ (fator de retenção e temperatura absoluta, respectivamente). De acordo com a Equação 2.27, a partir da inclinação das retas obtidas entre $\ln k$ vs $1/T$ (Figura 4.32), foi possível obter a entalpia e a entropia molar de adsorção para ambos os enantiômeros do omeprazol.

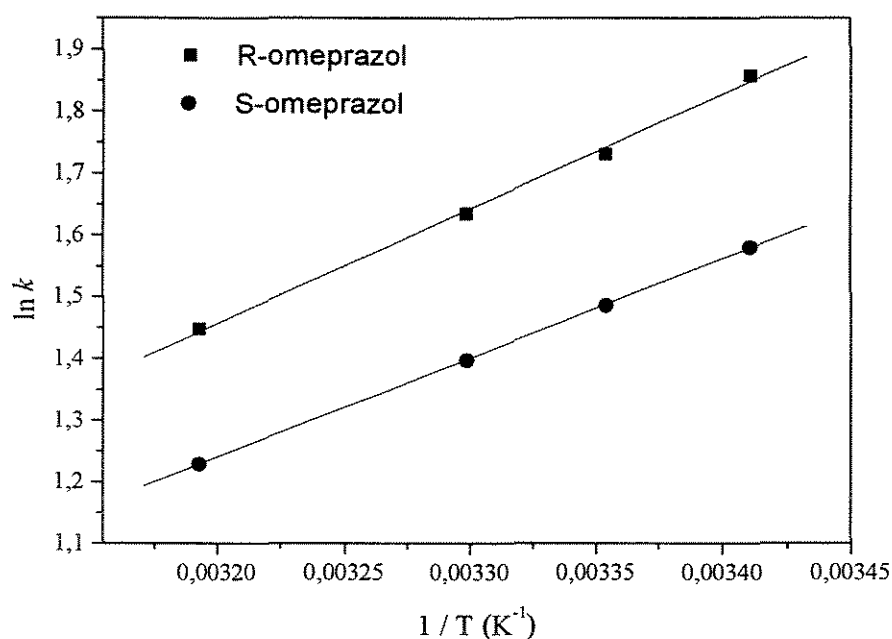


Figura 4.32 – Dependência do fator de retenção k com a temperatura para os enantiômeros do omeprazol.

Observou-se uma dependência linear entre $\ln k$ e $1/T$ para faixa de temperatura estudada, os dados obtidos de ΔH_{ads} e de ΔS_{ads} estão apresentados na Tabela 4.24. Valores negativos de ΔH_{ads} são indicativos que é mais favorável energeticamente ao soluto estar na fase estacionária. O valor mais negativo para o R-omeprazol favorece uma maior interação com a fase estacionária e conseqüentemente maior tempo de retenção. Valores negativos de ΔS_{ads} indicam um aumento na ordem do sistema cromatográfico para o soluto ser transferido da fase móvel para a fase estacionária (Gossens et al., 2004).

Tabela 4.24 – Valores de ΔH_{ads} e de ΔS_{ads} para os enantiômeros do omeprazol.

	ΔH_{ads} (kJ/mol)	ΔS_{ads} (J/mol)
S-omeprazol	-15,42	-37,24
R-omeprazol	-13,38	-32,44

Observou-se uma dependência linear entre $\ln \alpha$ e $1/T$, conforme a Equação 2.28, para faixa de temperatura estudada (Figura 4.33), os valores encontrados de $\Delta\Delta H_{ads}$ e de $\Delta\Delta S_{ads}$ foram de -2,05 KJ/mol e de -4,75 J/mol respectivamente.

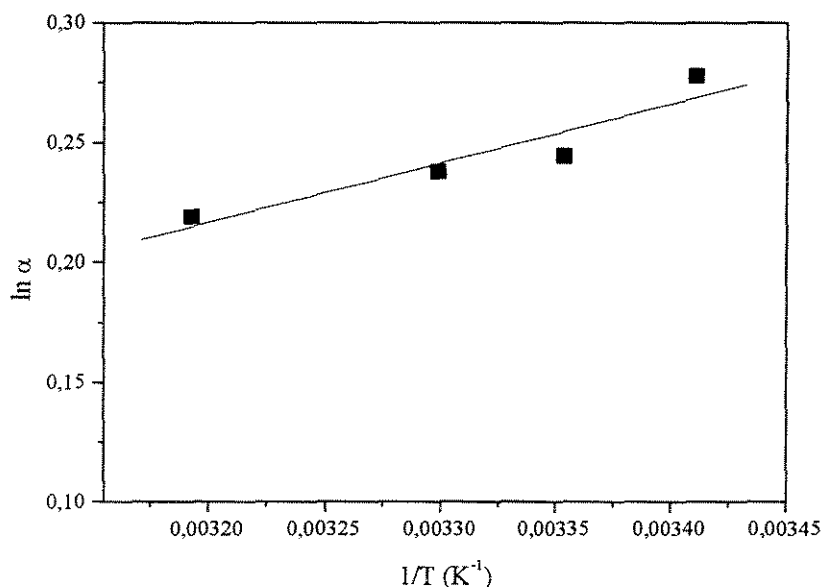


Figura 4.33 – Dependência do fator de separação (α) com a temperatura para os enantiômeros do omeprazol.

Os valores negativos de $\Delta\Delta H_{ads}$ e de $\Delta\Delta S_{ads}$ indicam que a transferência do soluto da fase móvel para a fase estacionária e a separação são respectivamente entalpicamente dirigidas (Gossens et al., 2004).

Para ambos os enantiômeros a linearidade de $\ln k$ e $\ln \alpha$ vs $1/T$ mostra que a fase estacionária não altera em conformação e que interações enantiosseletivas envolvidas

durante a separação permanecem inalteradas. Quando não ocorre a dependência linear entre $\ln k$ e $1/T$, pode-se dizer que a não linearidade desse gráfico é atribuída a presença de múltiplos mecanismos de retenção (Wainer e Booth, 1996) e que a superfície da fase estacionária é heterogênea ocorrendo variações conformacionais na fase estacionária com a temperatura (Lehotay et al., 2004).

A temperatura de enantiosseletividade determinada foi de 158 °C. Esse valor obtido é superior à faixa de temperatura empregada neste estudo e é indicativo que abaixo dessa temperatura o enantiômero S-omeprazol elui primeiro que o enantiômero R-omeprazol. Acima dessa temperatura, caso fosse possível realizar a separação ela seria controlada através da entropia.

No presente estudo foi mostrado que o R-omeprazol elui após o S-omeprazol em todas as condições avaliadas. A partir dos dados apresentados pode-se dizer que a separação dos enantiômeros do omeprazol na FEQ Kromasil CHI-TBB é controlada por fenômenos entálpicos.

Experimentos com soluções concentradas

4.7. Determinação das isotermas de adsorção competitivas

Devido as melhores condições de separação, optou-se por trabalhar na temperatura de 25 °C e vazão de 2,0 mL/min nos experimentos realizados com soluções concentradas.

Um exemplo de curva de ruptura é apresenta na Figura 4.34. As etapas de adsorção e eluição foram realizadas sequencialmente. Os experimentos de adsorção com a injeção da mistura racêmica de omeprazol foram seguidos da completa eluição com o eluente, até que o equilíbrio fosse alcançado. Os volumes de eluição resultantes dos passos de eluição de cada curva de ruptura foram coletados e analisados para a obtenção das isotermas competitivas.

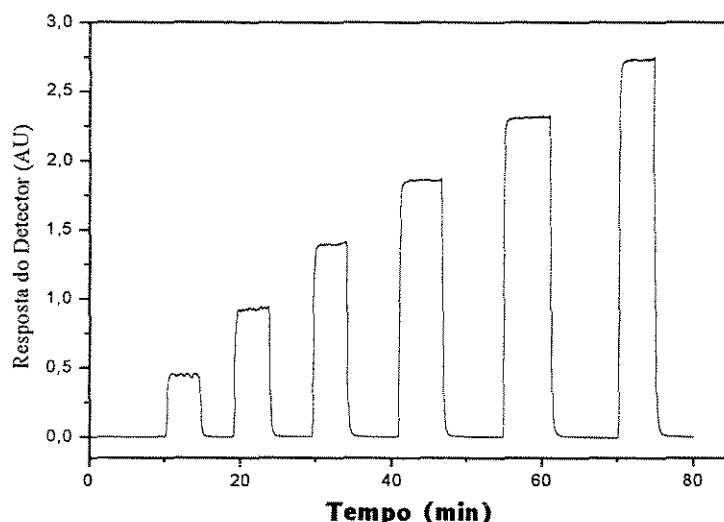


Figura 4.34 – Curvas de ruptura e eluição para o composto omeprazol racêmico. Vazão 2,0 mL/min e temperatura de 25 °C.

A Figura 4.35 apresenta a curva de equilíbrio de adsorção para ambos os enantiômeros do omeprazol na fase estacionária Kromasil CHI-TBB a 25 °C. A quantidade de soluto adsorvida na fase estacionária (q) em equilíbrio com a quantidade de soluto na fase móvel (c), para cada enantiômero do omeprazol, foi obtida através da Equação 2.25.

Apesar da concentração relativamente alta dos enantiômeros do omeprazol, as isotermas possuem um formato linear para a faixa de concentração de injeção estudada. A linearidade das curvas pode ser avaliada (lei de Henry) pelos valores de r^2 obtido para os enantiômeros do omeprazol, 0,9984. Nota-se um diferente comportamento de adsorção entre os enantiômeros, apesar da proximidade das equações obtidas, conforme a Figura 4.35.

O método estático da adsorção-dessorção foi utilizado por Pais et al. (1998) para a obtenção das isotermas de adsorção de um epóxido quiral em triacetato de celulose microcristalina (MCTA) na qual foi obtido um comportamento similar entre os enantiômeros, entretanto não linear. O formato linear da isoterma obtido no presente trabalho, provavelmente deva-se a faixa de concentração estudada. Para se conseguir uma faixa não linear a concentração da solução deveria ser bem maior do que a estudada, entretanto não foi possível devido a solubilidade do omeprazol na fase móvel não ser elevada.

A retenção e seletividade dos enantiômeros do omeprazol na FEQ avaliada podem ser devido a múltiplas ligações de hidrogênio, mas interações estéricas e π - π também são consideradas presentes. Skogsberg (2001) atribuiu as mesmas interações na separação de dos enantiômeros do 2-propranolol na FEQ CHI-TBB.

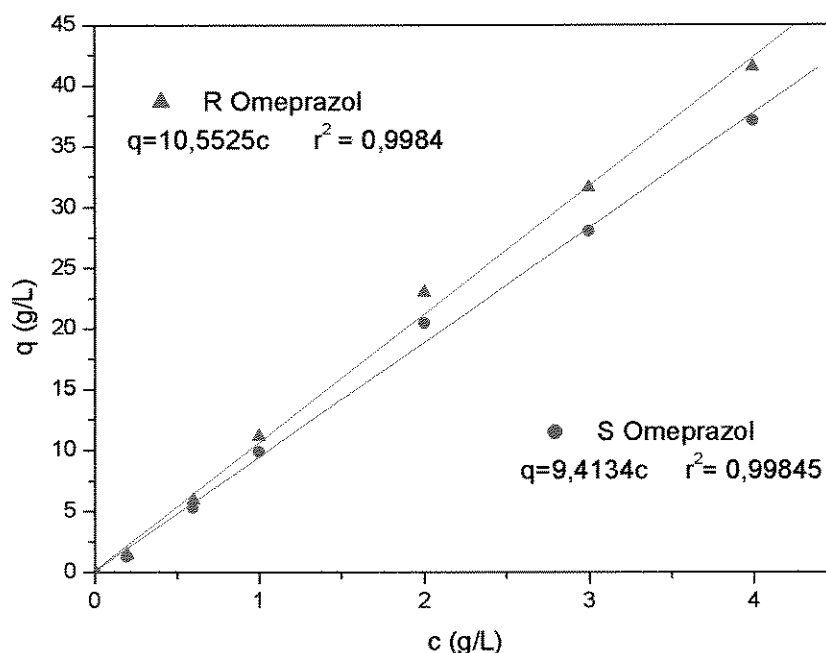


Figura 4.35 – Curva de adsorção para determinação das isotermas de adsorção competitiva para os enantiômeros do omeprazol a 25 °C.

Os resultados obtidos para o valor de q , para ambos os enantiômeros do omeprazol, foram altos quando comparados aos de outras fases estacionárias quirais, indicando uma alta capacidade de adsorção do omeprazol na FEQ estudada.

Em estudos realizados, segundo o método proposto por Pais et al., 1988 para determinação de isoterma competitiva, foram determinados por Silva Junior et al., 2004a valores de q da ordem de 5 g/L para uma concentração de alimentação do enantiômero de 3 g/L. Apesar de cada composto possuir uma interação diferente com a fase estacionária, o resultado obtido nesse trabalho é um indicativo da alta capacidade de adsorção da coluna cromatográfica quiral Kromasil CHI-TBB, pois para uma concentração de alimentação de 3,0 g/L a coluna apresentou valor de q na ordem de 30,0 g/L.

4.8. Estudo da sobrecarga da coluna

O método utilizado de avaliação de sobrecarga, com variação do volume de injeção a partir de uma única solução concentrada, foi indicado devido à solubilidade intermediária do omeprazol na fase móvel.

A Figura 4.36 apresenta os cromatogramas, com diferentes volumes de injeção (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL) de uma solução de omeprazol racêmico na concentração de 5 g/L, com vazão da fase móvel de 2,0 mL/min e temperatura de 25 °C.

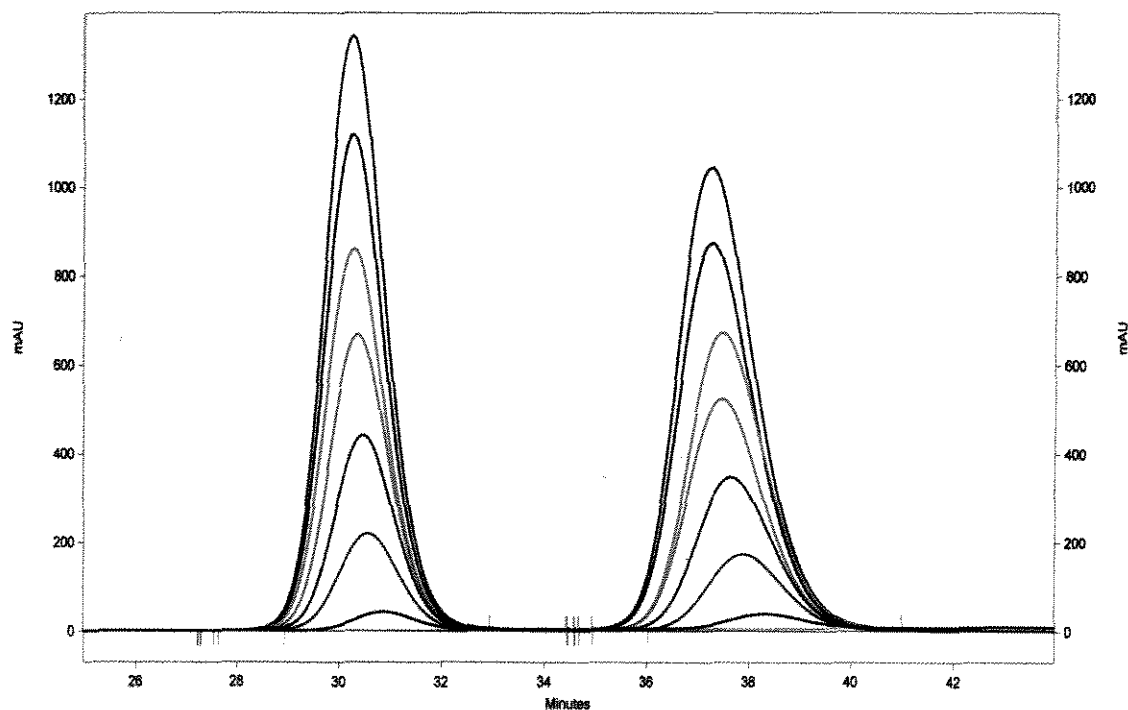


Figura 4.36 – Cromatograma do omeprazol racêmico em condições de sobrecarga. A solução concentrada de injeção de 5 g/L foi injetada com volumes de 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30 μL a uma vazão de 2,0 mL/min e temperatura de 25 °C, S-omeprazol elui primeiro.

A Figura 4.37 apresenta os cromatogramas nas mesmas condições para injeções de volumes de 35, 40, 45, 50, 55 e 60 μL . Nas figuras os picos estão em ordem crescente de volume de injeção.

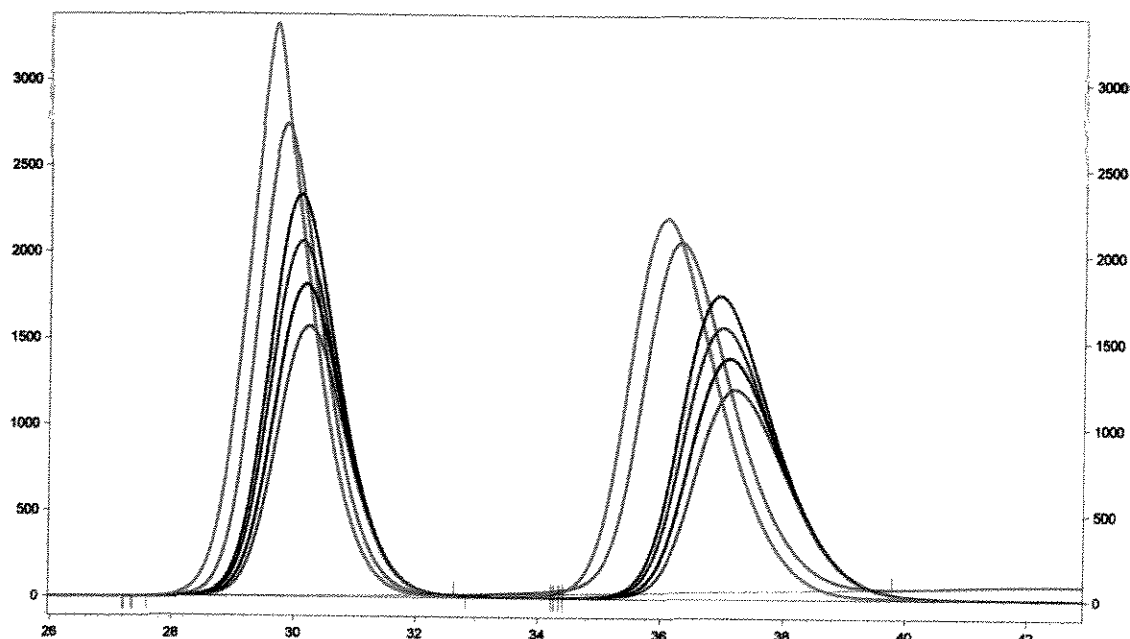


Figura 4.37 – Cromatograma da omeprazol racêmico em condições de sobrecarga. A solução concentrada de alimentação de 5 g/L foi injetada com volumes de 35; 40; 45; 50; 55 e 60 μL a uma vazão de 2,0 mL/min e temperatura de 25 °C, S-omeprazol elui primeiro.

Nota-se que para volumes crescentes de injeção ocorre uma redução dos tempos de retenção para ambos os enantiômeros. O valor do fator de separação reduziu com o aumento do volume de injeção. Entretanto, mesmo para o volume de injeção de 60 μL o valor do fator de separação ficou acima de 1,20.

Nos experimentos, foram realizadas injeções da solução de omeprazol no sistema de CLAE com volumes maiores, porém a absorção ultrapassou a escala de monitoramento do detector do sistema de CLAE. Os volumes maiores de injeção ocasionaram um maior alargamento da banda cromatográfica e melhor definição dos perfis de eluição.

O enantiômero mais retido R-omeprazol apresentou maior variação nos tempos de retenção e aumento do pico cromatográfico para volumes de injeção de 55 e 60 μL . Para os demais experimentos com variação do volume de injeção a variação no tempo de retenção foi proporcional.

Com relação à largura dos picos cromatográficos, nota-se que o isômero R do omeprazol perde em altura, entretanto aumenta a largura do pico. Já o isômero S não acontece o mesmo, o aumento de intensidade é constante com menor alargamento da base do pico.

No experimento de sobrecarga e nos experimentos realizados com soluções diluídas na seção anterior a porcentagem de área entre os enantiômeros manteve-se constante. Os valores mínimos foram de 49,3% para o isômero S e 50,7% para o isômero R.

A Tabela 4.25 apresenta os tempos de retenção, os fatores de retenção e de separação para cada condição do teste.

Tabela 4.25 – Valores de tempo de retenção, fatores de retenção (k) e separação (α) para injeções de uma solução concentrada (5,0g/L) de omeprazol racêmico a 25 °C ; vazão de 2,0 mL/min: t_{R1} - S-omeprazol; t_{R2} - R-omeprazol. Volumes de injeção: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 μ L.

Volume de Injeção (μ L)	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	k_1	k_2	α
1	30.88	38.34	4.52	5.85	1.30
5	30.55	37.88	4.46	5.76	1.29
10	30.46	37.64	4.44	5.72	1.29
15	30.34	37.45	4.42	5.69	1.29
25	30.24	37.26	4.40	5.65	1.28
30	30.23	37.24	4.40	5.65	1.28
35	30.22	37.20	4.40	5.64	1.28
40	30.16	37.10	4.39	5.62	1.28
45	30.09	36.99	4.37	5.61	1.28
50	30.06	36.93	4.37	5.60	1.28
55	29.84	36.30	4.33	5.48	1.27
60	29.67	36.07	4.30	5.44	1.27

O volume de 60 μ L foi o volume máximo possível de ser injetado para a escala de absorção do detector. Outros estudos de sobrecarga têm sido realizados na coluna Kromasil CHI-TBB utilizando um procedimento de sobrecarga de concentração e de volume, conforme Kim e Yoon, (2004), obtendo separações significativas mesmo em condições de injeção de altas concentrações.

Os resultados obtidos com o estudo da isoterma competitiva e sobrecarga da coluna mostram que é possível trabalhar em condições de concentração e volumes de injeção elevados, obtendo ainda uma separação satisfatória entre os enantiômeros. Esses dados possibilitam uma separação em escala preparativa com o intuito de obter os enantiômeros do omeprazol, isolados, com a utilização de uma FEQ alternativa como a Kromasil CHI-TBB.

Capítulo 5

Conclusões

O presente trabalho oferece uma alternativa para a separação dos enantiômeros do omeprazol em uma nova FEQ conhecida como Kromasil CHI-TBB e também uma rota alternativa à síntese assimétrica para a obtenção do S-omeprazol. Foi realizado um desenvolvimento do método de separação e foram determinados parâmetros cromatográficos e cinéticos que servirão para a simulação e separação em escala preparativa. A separação dos enantiômeros do omeprazol na FEQ Kromasil CHI-TBB apresenta algumas vantagens que são descritas abaixo.

A coluna apresentou boa uniformidade das partículas avaliada através das porosidades total, do leito e das partículas e baixa queda de pressão quando comparada a outras colunas com FEQ baseadas em polissacarídeos. O tamanho da partícula da FEQ Kromasil CHI-TBB possibilita separações com vazões elevadas minimizando o tempo de análise, com aumento de produtividade, considerando uma separação preparativa, sem comprometer a resolução entre os enantiômeros.

A separação realizada, mesmo em condições extremas de vazão de 4 mL/min e temperatura de 40 °C, permite a obtenção números de pratos, fator de separação e resolução superiores a 1200, 1,24 e 1,74, respectivamente. Os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos para uma coluna preparativa foram maiores daqueles exigidos nos compêndios oficiais para a separação do omeprazol e melhores do que os citados na literatura utilizando as FEQ Chiracel OD, Chiral_AGP e Ultrom ES-OVM.

A partir do estudo da isoterma competitiva e da sobrecarga da coluna, foi possível verificar que, quantidades elevadas dos enantiômeros podem ser separados em uma extensa faixa linear de concentração com pureza elevada. Isto mostra o potencial da separação do omeprazol em sistemas cromatográficos preparativos em que a obtenção de quantidades significativas das substâncias, a serem separadas, é de fundamental importância.

A separação ocorre com uma cinética alta de transferência de massa exibindo maior interação para o enantiômero R. Essa maior interação para o R-omeprazol pode ser vista também através da termodinâmica da separação que exhibe valores negativos de entalpia e entropia.

Capítulo 6

Sugestões para futuros trabalhos

Nesse trabalho foram obtidas informações dos parâmetros cromatográficos, de transferência de massa e de equilíbrio que envolvem a separação cromatográfica do fármaco omeprazol na fase estacionária Kromasil CHI-TBB. Como não foi possível realizar todos os experimentos que poderiam ser feitos devido ao espaço de tempo que envolve o mestrado, proponho algumas sugestões que poderão servir para uma futura separação em escala preparativa.

- Determinação das isotermas de adsorção competitivas por outros métodos citados na literatura para comparação dos valores da quantidade adsorvida do fármaco omeprazol.
- Realizar a separação do omeprazol racêmico em outras fases estacionárias quirais com a avaliação de outros solventes para a fase móvel.
- A implantação dos dados obtidos na análise da separação do omeprazol utilizando a fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB em um sistema preparativo do tipo leito móvel simulado.
- Análise do custo para a separação preparativa.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

- ABOUL-ENEIN, H. Y.; High-performance liquid chromatographic enantioseparation of drugs containing multiple chiral centers on polysaccharide-type chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, vol. 906, p. 185 – 193, 2001.
- AGRANAT, I.; CANER, H.; Intellectual property and chirality of drugs. *Drug Discovery Thecnologies*, Vol. 4, No 7, p. 313 – 321, 1999.
- AHUJA, S.; Chiral separations by chromatography. American Chemical Society Washington D.C. and Oxford University Press, 1rd edition, 2000.
- AKZO NOBEL, Catálogo de colunas, 2004.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; DE JONGH, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L.; Química Orgânica, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 2ª edição, 1978.
- ANDERSSON, S.; ALLENMARK, S.; MOLLER, P.; PERSSON, B.; SANCHEZ, D.; Chromatographic separation of enantiomers on N,N' – diallyl – L – tartadamide - based network - polymeric chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, vol. 741, p. 23 – 31, 1996.
- ANDERSSON, T.; REGARDH C. G.; Pharmacokinetics of omeprazole and metabolites following single intravenous and oral doses of 40mg and 80. *Drug Investigation*, vol. 2, p. 255 – 263, 1990.

- ANDERSSON, S.; ALLENMARK, G. S.; Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Vol. 54, p. 11 – 23, 2002.
- ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R.; Analysis of affinity separations II: The characterizations of affinity columns by pulse techniques. *Chemical Engineering Journal*, 30, B25 – B36, 1985a.
- ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R.; Liquid chromatography plate height equations. *Journal of Chromatography*, 330, 159 – 166, 1985b
- BALMER, K.; PERSSOM, B. - A.; LAGERSTROM, P. - O.; Stereoselective effects in the separation of enantiomers of omeprazole and other substituted benzimidazoles on different chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, Vol. 660, 269 – 273, 1994.
- BÖCKER, S.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M.; FLEURY, C.; SCHENKEL, B.; Design of chromatographic separations on reversed phase. *Separation Science and Technology*, vol. 37(7), p. 1725 – 1745, 2002.
- BONATO, S.P.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C. M.; PAIAS, F. O.; IHA, M. H.; LIMA R. P.; Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide -and protein - based chiral stationary phases. *Journal Brazilian Chemical Society*, Vol. 13, No. 2, p. 190 – 199, 2002.
- BRUNI, A. T.; Estudos teóricos aplicados à farmacologia: omeprazol e compostos análogos. Campinas - SP, 2000.
- BRUNTON, L.L.; Goodman e Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 9th edition, McGraw-Hill, p 901 – 915, 1996.
- CAIRNS, M. A.; RITA, H.; CHIOU, Y.; ROGERS, J.D.; DEMETRIADES, J.L.; Enantioselective high-performance liquid chromatographic determination of omeprazole in human plasma. *Journal of Chromatography B*, Vol. 666, p. 323 – 328, 1995.

- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. Série Apontamentos, Editora da UFSCar, 2001.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. M.; Effects on Enantioselectivity by the Use of Polysaccharide-Based Columns by Multimodal Elution. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 26, No. 13, p. 2069 – 2086, 2003a.
- CASS, Q. B.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; CASSIANO, N. M.; DEGANI, A. L. G.; PEDRAZZOLI J. JR.; Enantiomeric determination of the plasma levels of omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral-chiral column-switching. *Journal of Chromatography B*, Vol. 798, p. 275 – 281, 2003b.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. M.; The use of a Polysaccharide-Based Column on Multimodal Elution. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 23, No. 7, p. 1029 – 1038, 2000.
- CHEONG, W. J.; KANG, G. W.; KO, J. H.; Thermodynamic Study of Enantioseparation of Arylpropionic Acids with the Chirex 3001 Stationary Phase. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*[®], vol. 27, no. 4, p. 595 – 610, 2004.
- CIOLA, R.; Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC. Editora Edgard Blücher LTDA, 2000.
- COTTON, H. ; ELEBRING, T.; LARSSON, M.; LI, L.; SORENSEN, H.; UNGE, S.; Asymetric sythesis of esomeprazole. *Tetrahedrom: Asymmetry* 11, p. 3819-3825, 2000.
- CREMASCO, M. A.; HRITZKO, B.J.; XIE, Y.; WANG, N.H.L.; Parameters estimation for amino acids adsorption in a fixed bed by moment analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 18, no. 2, São Paulo – June, 2001.
- DANTUS, M. M.; WELLS, L. M.; Regulatory issues in chromatographic analysis in the pharmaceutical industry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 27, Nos. 7 - 9, p. 1413 – 1442, 2004.

- DENG, J.; CHI, Y.; FU, F.; CUI, X.; YU, K.; ZHU, J.; JIANG, Y.; Resolution of omeprazole by inclusion complexation with a chiral host BINOL. *Tetrahedron: Asymmetry* 11, p. 1729 – 1732, 2000.
- DUAN, G.; CHING C. B.; SWARUP, S.; Kinetic and equilibrium study of the separation of propranolol enantiomers by high performance liquid chromatography on a chiral adsorbent. *Chemical Engineering Journal*, vol. 69, p. 111 – 117, 1998.
- ERLANDSSON, P.; ISAKSSON, R.; LORENTZON, P.; LINDBERG, P.; Resolution of the enantiomers of omeprazole and some of its analogues by liquid chromatography on a trisphenylcarbamoylcellulose-based stationary phase. *Journal of Chromatography*, vol. 532, p. 305 – 319, 1990.
- EP, EUROPEAN PHAMACOPEIA. 4th Edition, p. 1675 - 1677, 2002.
- FRANCOTTE, E.; WOLF, R. M.; LOHMANN, D.; Chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases: influence of the supramolecular structure of cellulose triacetate. *Journal of Chromatography*, 347, 25 – 37, 1985.
- FRANCOTTE, E. R.; Contribution of preparative chromatographic resolution to the investigation of chiral phenomena. *Journal of Chromatography A*, 666, 565 – 601, 1994.
- FRANCOTTE, E. R.; Enantoselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drugs enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 906, 379 – 397, 2001.
- GOOSSENS, J. F.; FOULON, C.; BAILLY, C.; BIGG, D.C.H.; BONTE, J.P.; VACCHER, C.; Chiral resolution of enantiomers of homocamptothecin derivatives, antitumor topoisomerase I inhibitors, using high performance liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phases. *Chromatographia*, 59, 5/6, 305 - 313, 2004.
- GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H.; Em Introdução a métodos cromatográficos, COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S., Editora da UNICAMP, 7ª edição, p 185 – 195, 1997.

- GUIOCHON, G.; LIN, B., Modeling for preparative chromatography, Academic Press, San Diego, California. 2003
- GUIOCHON, G., Preparative liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 965, pp. 129-161. 2002
- GUIOCHON, G.; HONG, L.; FELINGER, A.; KACZMARSKI, K.; Measurement of intraparticle diffusion in reversed phase liquid chromatography. *Chemical Engineering Science*, Vol. 59, p. 3399 – 3412, 2004.
- GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M.; Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography. Academic Press, Boston, MA, 1994.
- HAAG, J.; VANDE WOUWER, A.; LEHOUCQ, S.; SAUCEZ, P.; Modeling and simulation of a SMB chromatographic process designed for enantioseparation, *Control Engineering Practice*, 9, 921-928. 2001
- HAGINAKA, J.; Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27, 357 – 372, 2002.
- HASSAN-ALIN M.; ANDERSSON, T.; BREDBERG, E.; RÖHSS, K.; Pharmacokinetics of esomeprazole after oral and intravenous administration of single and repeated doses to healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 56, p. 665 – 670, 2000.
- HERRIS, D. C.; Análise química quantitativa, 5ª Edição, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 1999.
- JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C.; Measurement of Adsorption Isotherms by Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, Vol. 316, p. 53 – 68, 1984.
- JUNGHARD, O.; HASSAN-ALIN M.; HASSELGREN, G.; The effect of the area under plasma concentration vs time curve and the maximum plasma concentration of esomeprazole on intragastric pH. *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 58, p. 453 – 458, 2002.

- KAHRILAS, P. J.; FALK, G.W.; JOHNSON, D.A.; SCHMITT, C.; COLLINS, D.W.; WHIPPLE, J.; D'AMICO, D.; HAMELIN, B.; JOELSSON, B.; Esomeprazole improves healing and symptom resolution as compared with omeprazole in reflux oesophagitis patients: a randomized controlled trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutic*, vol. 14, p. 1249 – 1258, 2000.
- KANAZAWA, H.; OKADA, A.; MATSUSHIMA, Y.; YOKOTA, H.; OKUBO, S.; MASHIGE, F.; NAKAHARA, K.; Determination of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 949, p. 1 – 9, 2002.
- KASPEREIT, M.; LORENZ, H.; SEIDEL-MORGENSTERN, Coupling of simulated moving bed technology and crystallization to separate enantiomers, *Fundamentals of Adsorption 7*, International Adsorption Society, Japan, pp. 101-108, 2002.
- KIM, I. H.; YOON, T. H.; Chiral separation of ketoprofen racemate by using Chirex[®] 3005 and Kromasil[®] CHI-II chiral column. *Korean Journal of Chemical Engineer*, vol. 21(2), p. 521 – 526, 2004.
- KROMER, W.; Relative Efficacies of Gastric Proton-Pump Inhibitors on a Milligram Basis: Desired and Undesired Side reactions. Impact of Chirality. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 36, Suppl. 234, p. 3 – 9, 2001.
- KÜSTERS, E.; SPÖNDLIN, C.; Influence of temperature on the enantioseparation of rolipram and structurally related racemates on Chiracel-OD. *Journal of Chromatography A*, vol. 737, p. 333 – 337, 1996.
- LEHOTAY, J.; ROJKOVICOVÁ, T.; KRUPCIK, J.; FEDURCOVÁ, A.; CIZMARIK, J.; ARMOSTRONG, D. W.; Study of the mechanism of enantioseparation. VII. Effect of temperature on retention of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivatives on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies[®]*, vol. 27, no. 11, p. 1653 – 1670, 2004.
- LIMA, V. L. E.; Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. *Química Nova*, vol. 20(6), p. 657 – 663, 1997.

- LIND, T.; KYLEBÄCK, A.; RYDBERG, I.; Esomeprazole provides improved acid control vs. Omeprazole in patients with symptoms of gastro-oesophageal reflux disease. *Alimentary Pharmacology*, vol. 14, p. 861 – 867, 2000.
- LINDNER, W.; GYIMESI-FORRÁS, K.; KÖKÖSI, J.; SZÁSZ, G.; GERGELY, A.; Liquid chromatographic enantiomer separations of novel quinazolone derivatives on quinine carbamate based chiral stationary phases using hydro-organic mobile phases. *Journal of Chromatography A*, vol. 1047, p. 59 – 67, 2004.
- MAIER, N.; FRANCO, P.; LINDER, W.; Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography A*, 906, 3 – 33, 2001.
- MARCHERY-NAGEL, Guia para colunas cromatográficas, p 62 – 66, 2000.
- MORAIS, L. S. R.; Preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a partir de sílica titanizada e polibutadieno. Dissertação de Mestrado, Unicamp, 2003.
- MORBIDELLI, M.; FRANCOTTE, E.; RICHERT, P.; MAZZOTTI, M.; Simulated moving bed chromatographic resolution of a chiral antitussive, *Journal of Chromatography A*, 796, 239-248, 1998
- MORRISON, R.; BOYD, R.; *Química orgânica*. Fundação Calouste Gulbenkian, 12ª edição, 1983.
- NICOUD, R. M., The separation of optical isomers by simulated moving bed chromatography, *Pharmaceutical Technology Europe*, 1999.
- NICOUD, R. M., Em “Handbook of bioseparations”, Ahuja, S., vol. 02, pp. 475-509, 2000.
- OKAMOTO, Y., KAIDA, Y., Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 666, 403 – 419, 1994.

- OKAMOTO, Y.; CHANKVETADZE, B.; KARTOZIA, I.; YAMAMOTO, C.; Comparative enantioseparation of selected chiral drugs on four different polysaccharide-type chiral stationary phases using polar organic mobile phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 27, p. 467 – 478, 2002.
- ORLANDO, R. M.; BONATO, P. S.; Simple and efficient method for enantioselective determination of omeprazole in human plasma. *Journal of Chromatography B*, Vol. 795, p. 227 – 235, 2003.
- ÖZALTIN, N.; KOÇER, A.; Determination of omeprazole in pharmaceuticals by derivate spectroscopy¹. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 16, p. 337 – 342, 1997.
- PAIS, S. L.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. E.; Separation of enantiomers of a chiral epoxide by simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, Vol. 827, p. 215 – 233, 1998.
- PEDEFERRI, M. P.; ZENONI, G.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M.; Experimental analyses of a chiral separation through simulated moving bed chromatography . *Chemical Engineering Science*, vol. 54, p. 3735 – 3748, 1999.
- PIRKLE, W. H.; PORCHAPSKY, T. C.; Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers. *Chemical Review*, 89, 347 – 362, 1989.
- PRYDE, A.; In *Chiral liquid chromatography*, LOUGH, W. J., Ed., Blackie, Glasgow, 1989.
- ROHSS, K.; LIND T.; WILDER-SMITH C.; Esomemeprazole 40 mg provides more effective intragastric acid control than lansoprazole 30 mg, omeprazole 20 mg, pantoprazole 40 mg and rabeprazole 20 mg in patients with gastro-oesophageal reflux symptoms. *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 60, p. 531 – 539, 2004.
- ROUHI, M.A.; *Chiral Chemistry* – Traditional methods thrive despite numerous hurdles, including tough luck, slow commercialization of catalytic processes. *Chemical & Engineering News*, vol. 82, nº 24, p. 47 – 62, 2004

- RUTHVEN, D. M.; Principles of adsorption an adsorption process. Univesity of New Brunswuick, John Wiley & Sons, 1984.
- SCHULTE, M.; DITZ, R.; DEVANT, R. M.; KINKEL, J. N.; CHARTON, F.; Comparison of the specific productivity of different chiral stationary phases used for simulated moving-bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, 769, 93 – 100, 1997.
- SEIDEL-MORGENSTERN, A.; “Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms”, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1037, p. 255 – 272, (2004).
- SEWELL, P. A.; CLARKE, B.; Chromatographic Separations, John Wiley & Sons, 1987.
- SHIMADZU, Manual do usuário de HPLC, 2003.
- SILVA JUNIOR, I.; Estudo cinético e de equilíbrio na separação cromatográfica dos enantiômeros da cetamina em triacetato de celulose microcristalina, Dissertação de Mestrado, Unicamp, 2003.
- SILVA JUNIOR, I.; VEREDAS, V.; SANTANA, C. C.; Separação cromatográfica dos enantiômeros da Bupivacaína sob condições lineares em fase estacionária quiral do tipo DATD-TBB. Trabalho apresentado no Congresso XV COBEQ , Curitiba – PR, 2004a.
- SILVA JUNIOR, I. ; VEREDAS, V.; ROSA, P.C. P.; SANTANA C. C.; Separação cromatográfica preparativa dos enantiômeros da Bupivacaína utilizando fase estacionária quiral baseada em dialil tartadiamida. Trabalho apresentado no Congresso ENEMP 2004, Uberlândia - MG, 2004b.
- SKOGSBERG, U.; Some new strategies in chiral stationary phase development. Dissertação de Mestrado, Goteborg University, 2001.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; Introduction to modern liquid chromatography. New York, Jonh Wiley & Sons, 2ª edition, 1979.
- SOLOMONS, T. W. G.; Química Orgânica Vol. I. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos, 6ª edição, 1996.

- SUN, C.; HE, H.; LIU, Y.; PHAM-HUY, C.; Effect of Temperature on enantiomer separation of oxazepam and lorazepam by high-performance liquid chromatography on a β -cyclodextrin derivatized bonded chiral stationary phase. *Journal of Chromatographic Science*, vol. 42, February, 2004.
- UNGE, S. V.; LANGER, V.; SJÖLIN, L.; Stereochemical assignment of the enantiomers of omeprazole from X-ray analysis of a fenchyloxymethyl derivate of (+)-(R)-omeprazole. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 8, no. 12, p. 1967 – 1970, 1997.
- USP 27, THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, NF 22, P 1358-1359, 2004.
- VOGUEL, A. I.; Química analítica quantitativa, São Paulo, LTC, 2002
- WAINER, W. I.; BOOTH, D. T.; Mechanistic investigation into the enantioselective separation of mexiletine and related compounds, chromatographed on an amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, vol. 741, p. 205 – 211, 1996.
- WATERS CORPORATION; *HPLC*; Troubleshooting Guide, 2002.
- WOOLF, E. J.; MATUSZEWSKI, B. K.; Simultaneous determination of omeprazole and 5'-hydroxyomeprazole in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 828, p. 229 – 238, 1998.
- YANG, R.; SCHUKMAN, S. G.; ZAVALA, P. J.; Acid-base chemistry of omeprazole in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*, 481, 155 – 164, 2003.
- YASHIMA, E.; Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *Journal of Chromatography A*, 906, 105 – 125, 2001.
- YU, H.; CHING, C. B.; FU, P.; CHONG, S.; Enantioseparation of fluoxetine on a new β -cyclodextrin bonded phase column by hplc. *Separation Science and Technology*, vol. 37(6), p. 1401 – 1415, 2002.

