

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Cromatografia Quiral em Escala Preparativa:  
Estudo de Casos e Aplicação.”**

**Tiago de Campos Lourenço\***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Química Orgânica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Quezia B. Cass

\*Bolsista FAPESP

São Carlos – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

L892cq

Lourenço, Tiago de Campos.

Cromatografia quiral em escala preparativa: estudo de casos e aplicação / Tiago de Campos Lourenço. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

141 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

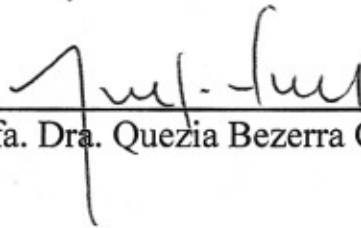
1. Análise cromatográfica. 2. Cromatografia quiral. 3. Cromatografia líquida. 4. Enantiômeros I. Título.

CDD: 543.089 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

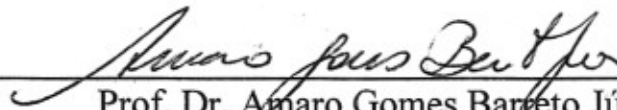
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado do candidato **Tiago de Campos Lourenço**, realizada em 25 de maio de 2012:*



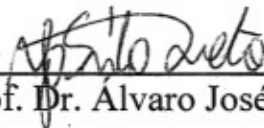
---

Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass



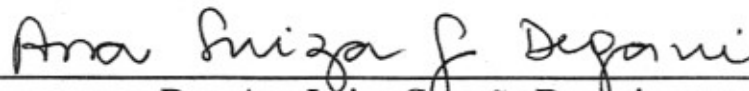
---

Prof. Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior




---

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto



---

Dra. Ana Luiza Gusmão Degani



---

Dr. Nelson Ferreira Claro Júnior

*“During the 20th century chromatography changed the way how complex natural substances are investigated and it has become an indispensable analytical tool in all areas of science and technology. Chromatography also highly aided biochemistry and life sciences: as expressed by Synge in his Nobel Lecture, it helped to merge chemistry with biology. (...) this evolution will be even more important in the years to come. One thing is certain: chromatography is continuously growing and its fields of applications are widening. Future chromatographers will encounter new excitements and their efforts will be highly rewarded by new discoveries.”*

L. S. Ettre, *Chromatographia* **51**(1/2): 7, 2000.

*Dedico esta tese ao meu melhor amigo José Maria Lourenço Jr., ao meu anjo da guarda Ilza Ap. de C. Lourenço e ao exemplo de vida Felipe de C. Lourenço.*

*Ao amor de minha vida Alice B. Lopes,*

*“A distância faz ao amor aquilo que o vento  
faz ao fogo: apaga o pequeno, inflama o  
grande.”*

*Roger Bussy-Rabutin*

## **Agradecimentos**

Agradeço, especialmente, a Prof<sup>a</sup>. Dra. Quezia B. Cass pela orientação, confiança, amizade e apoio recebido durante todo o período em que fiz pesquisa em seu laboratório. Com certeza irei utilizar todos os conhecimentos adquiridos na minha vida pessoal e profissional.

Ao grupo do Laboratório de Biosseparação, em especial, ao Prof. Dr. Cesar C. Santana e aos alunos Absolon Carvalho, Rafael Perna e Airton Salles, pelos auxílios referentes aos conceitos, operação e aplicação de cromatografia multicolumnas.

Ao corpo docente, técnico e administrativo do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade de realização da parte experimental desta tese.

A todos os meus amigos do grupo de Síntese Orgânica e CLAE, em especial, a Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina V Oliveira, a Neila M. Cassiano, Kenia Vanzolini, Marcela Moraes, Katia Roberta Belaz e Gabriel Scatena, pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos antigos membros do CLAE, em especial, Angela, Lúcia e Fernando.

Ao meu grande amigo Fernando Gonçalves de Almeida pelos conselhos e longos períodos de discussões, dos mais variados temas.

À família Lopes pela confiança e, sobretudo, pela amizade.

Aos amigos Diego (Feio), Rodrigo Smirmaul (Tigrão), Rodrigo Lourenço (Jóia), Felipe Pacheco (Burga), João Volpato, Alan Escodro, Claudinha Rodrigues, Jame's Almada e Douglas Ferreira.

Ao Alexandre Augusto Cruz, por sua amizade e disponibilidade para ajudar com os equipamentos cromatográficos.

Aos meus amigos dos laboratórios vizinhos, por serem prestativos sempre que necessário.

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro.

Ao CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro.

À todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1. 1</b> – Diferentes rotas para a obtenção de álcoois enantiopuros (Adaptada ref. 29).	5
<b>Figura 1. 2</b> – Esquema ilustrativo da separação por <b>a)</b> EBC e <b>b)</b> MCC.	8
<b>Figura 1. 3</b> – Esquema do leito móvel verdadeiro.	9
<b>Figura 1. 4</b> – Esquema do SMB.	10
<b>Figura 1. 5</b> – Estrutura dos polissacarídeos derivados mais utilizados em HPLC: <b>1a)</b> tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, <b>1c)</b> tris(4-metilbenzoato) de celulose, <b>2b)</b> tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose e <b>2a)</b> tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.	14
<b>Figura 1. 6</b> - Experimento de sobrecarga para um intermediário sintético, condições de separação: CHIRALPAK AD (10x1,0 cm), MeOH (100%), Vazão: 3,0 mL/min, $\lambda=270$ nm, Volume Injetado: 200 $\mu$ L.	16
<b>Figura 3. 1</b> – Esquema da diferença entre as trocas das válvulas do <b>a)</b> SMB e do <b>b)</b> VARICOL <sup>®</sup> .	21
<b>Figura 3. 2</b> – Ilustração da medição do ponto de inflexão para o experimento de sobrecarga.	23
<b>Figura 3. 3</b> - Planilha <i>Analytical Injections</i> do HELP 10.3.	24
<b>Figura 3. 4</b> - Planilha <i>Adsorption Isotherm</i> do HELP 10.3.	24
<b>Figura 3. 5</b> - Planilha <i>Hydrodynamics</i> do HELP 10.3.	25
<b>Figura 3. 6</b> - Planilha <i>Varicol Data</i> do HELP 10.3.	25
<b>Figura 3. 7</b> - Planilha <i>Varicol Parameters</i> do HELP 10.3.	26
<b>Figura 3. 8</b> - Planilha <i>Varicol Simulation e Varicol Performances</i> do HELP 10.3.	26
<b>Figura 3. 9</b> - Esquema ilustrativo do deslocamento da distribuição dos enantiômeros por um ciclo de MCC, após atingir o estado estacionário.	27
<b>Figura 3. 10</b> - Esquema ilustrativo do deslocamento da distribuição dos enantiômeros por um ciclo de MCC.	28
<b>Figura 3. 11</b> – Esquema da configuração do sistema multicolumnas.	29
<b>Figura 3. 12</b> – Ilustração do ajuste das vazões pelo programa ACS, monitoramento do sinal do polarímetro, <b>a)</b> extrato com baixa pureza, <b>b)</b> refinado com baixa pureza e <b>c)</b> boa pureza para ambos enantiômeros.	30
<b>Figura 3. 13</b> – Ilustração da contaminação nas zonas I/IV, <b>a)</b> contaminação do extrato pelo refinado, <b>b)</b> contaminação do refinado pelo extrato.	31
<b>Figura 3. 14</b> – Ilustração do controle do programa ACS nas zonas I/IV <b>a)</b> Controle <i>Hardness</i> , <b>b)</b> Controle <i>Soft</i> .	31
<b>Figura 3. 15</b> – Controle do ACS com o sinal do ultravioleta.	32
<b>Figura 3. 16</b> – <b>a)</b> Esquema da compressão radial, <b>b)</b> Esquema da compressão axial, <b>c)</b> Ponte do leito cromatográfico.	33
<b>Figura 3. 17</b> – Esquema de preenchimento de colunas cromatográficas.	34
<b>Figura 3. 18</b> – Cromatogramas obtidos para a separação da Base de Troger pela <b>a)</b> coluna analítica II, <b>b)</b> coluna preparativa VII; ambas de fase estacionária CHIRALCEL OD <sup>®</sup> e <b>c)</b> colunas analítica III, <b>d)</b> coluna preparativa III; ambas de fase estacionária CHIRALPAK AS <sup>®</sup> .	36
<b>Figura 3. 19</b> – Esquema utilizado para a avaliação das condições de separação.	38



<b>Figura 3. 20</b> – Cromatogramas das separações do <b>a)</b> albendazol sulfóxido (1,0 mg/mL) <b>b)</b> modafinil (1,0 mg/ml) <b>c)</b> atenolol (1,0 mg/ml). .....	41
<b>Figura 3. 21</b> – Estrutura química, <b>a)</b> (R)-(-)-modafinil e <b>b)</b> (S)-(+)-modafinil. ....	42
<b>Figura 3. 22</b> – Cromatogramas de sobrecarga para o modafinil, CHIRALPAK AD <sup>®</sup> (10 x 1 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 2,5 ml/min, λ=270 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml, 35°C. ....	43
<b>Figura 3. 23</b> – 1 <sup>o</sup> derivada do cromatograma da separação do modafinil (0,5 mg/ml), CHIRALPAK AD <sup>®</sup> (10 x 1 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 2,5 ml/min, λ=270 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml. ....	43
<b>Figura 3. 24</b> - Ajustes das vazões internas pelo ACS durante a separação do modafinil (15 g/L).....	46
<b>Figura 3. 25</b> - Purezas obtidas durante a separação do modafinil (15 g/L) nas linhas de <b>a)</b> refinado <b>b)</b> extrato. ....	47
<b>Figura 3. 26</b> – Cromatograma para a separação do modafinil (15 g/L) <b>a)</b> ciclo 15, <b>b)</b> ciclo 25.....	48
<b>Figura 3. 27</b> – Perfil interno de concentração do ACS para a separação do modafinil (15 g/L) <b>a)</b> ciclo 15, <b>b)</b> ciclo 25.....	48
<b>Figura 3. 28</b> – Curva de calibração para o modafinil <b>a)</b> refinado, <b>b)</b> extrato. ....	49
<b>Figura 3. 29</b> – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (15 g/L). ....	50
<b>Figura 3. 30</b> – Ajustes das vazões internas pelo ACS para a separação do modafinil (7,5 g/L).....	51
<b>Figura 3. 31</b> – Purezas enantioméricas obtidas durante a separação do modafinil (7,5 g/L) <b>a)</b> refinado <b>b)</b> extrato. ....	52
<b>Figura 3. 32</b> – Cromatograma para a separação do modafinil (7,5 g/L) <b>a)</b> ciclo 13, <b>b)</b> ciclo 36.....	53
<b>Figura 3. 33</b> – Perfil interno de concentração do ACS para a separação do modafinil (7,5 g/L) <b>a)</b> ciclo 13, <b>b)</b> ciclo 36. ....	53
<b>Figura 3. 34</b> – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (7,5 g/L). ....	54
<b>Figura 3. 35</b> – Ajustes das vazões internas pelo ACS para a separação do modafinil (3,5 g/L).....	56
<b>Figura 3. 36</b> – Purezas obtidas durante a separação do modafinil (3,75 g/L) <b>a)</b> refinado <b>b)</b> extrato.....	57
<b>Figura 3. 37</b> – Cromatograma para a separação do modafinil (3,75 g/L) <b>a)</b> ciclo 20, <b>b)</b> ciclo 50.....	57
<b>Figura 3. 38</b> – Perfil interno de concentração do ACS para a separação do modafinil (3,75 g/L) <b>a)</b> ciclo 20, <b>b)</b> ciclo 50. ....	58
<b>Figura 3. 39</b> – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (3,75 g/L). ....	59
<b>Figura 3. 40</b> – Cromatogramas obtidos para os enantiômeros do modafinil, CHIRALPAK AD <sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 2,5 ml/min, λ=240 nm, volume de Injeção: 0,5 ml, <b>a)</b> refinado <b>b)</b> extrato. ....	61
<b>Figura 3. 41</b> – Ajustes das vazões internas pelo ACS para a separação do modafinil (7,5 g/L).....	62
<b>Figura 3. 42</b> – Purezas obtidas durante a separação do modafinil (7,5 g/L) <b>a)</b> refinado <b>b)</b> extrato.....	62

<b>Figura 3. 43</b> – Purezas obtidas durante a separação do modafinil (7,5 g/L) <b>a)</b> refinado <b>b)</b> extrato.....	64
<b>Figura 3. 44</b> – Cromatogramas obtidos para os enantiômeros do modafinil, CHIRALPAK AD <sup>®</sup> (10 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 2,5 ml/min, λ=240 nm, volume de Injeção: 0,5 ml, <b>a)</b> refinado <b>b)</b> extrato. ....	64
<b>Figura 3. 45</b> – <b>a)</b> (S)-(-)-atenolol e <b>b)</b> (R)-(+)-atenolol. ....	66
<b>Figura 3. 46</b> – Cromatograma da separação do atenolol, <b>a)</b> CHIRALCELOD-H <sup>®</sup> (25 x 0,46 D.I., 5 µm), <i>n</i> -hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,01%), 1,0 ml/min, 275 nm <b>b)</b> CHIRALCEL OD <sup>®</sup> (10 x 1,0 D.I., 20 µm), <i>n</i> -hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,01%), 3,5 ml/min, 275 nm. .	67
<b>Figura 3. 47</b> – Cromatogramas de sobrecarga para o atenolol, CHIRALCEL OD <sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), <i>n</i> -hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,1%), 2,5 ml/min, λ=275 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml, 35°C. ....	68
<b>Figura 3. 48</b> - 1 <sup>o</sup> derivada do cromatograma da separação do atenolol (1,25 mg/ml), CHIRALCEL OD <sup>®</sup> (10 x 1 cm de D.I., 20 µm), <i>n</i> -hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,1%), 2,5 ml/min, λ=275 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml, 35°C. ....	68
<b>Figura 3. 49</b> – Ajustes das vazões internas pelo ACS para a separação do atenolol (0,5 g/L). ....	72
<b>Figura 3. 50</b> – <b>a)</b> Cromatograma e <b>b)</b> Perfil interno de concentração do ACS, da separação do atenolol (0,5 g/L) durante o ciclo 20.....	72
<b>Figura 3. 51</b> – <b>a)</b> Cromatograma e <b>b)</b> Perfil interno de concentração do ACS, da separação do atenolol (0,5 g/L) durante o ciclo 28.....	73
<b>Figura 3. 52</b> – Estrutura química, <b>a)</b> (S)-albendazol sulfóxido e <b>b)</b> (R)-albendazol sulfóxido.....	74
<b>Figura 3. 53</b> – Cromatogramas do estudo de sobrecarga para o albendazol sulfóxido, CHIRALPAK AD <sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20µm), metanol (100%), 3,0 mL/min, λ=305 nm, Volume de Injeção: 2,0 mL.....	76
<b>Figura 3. 54</b> – 1 <sup>o</sup> derivada do cromatograma da separação do albendazol sulfóxido (0,5 mg/mL), CHIRALPAK AD <sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 3,0 mL/min, λ=305 nm, Volume de Injeção: 2,0 mL. ....	76
<b>Figura 3. 55</b> – Perfil das vazões internas durante o processo de separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).....	79
<b>Figura 3. 56</b> – Pureza enantiomérica durante o processo de separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L) <b>a)</b> Refinado, <b>b)</b> Extrato. ....	80
<b>Figura 3. 57</b> - Esquema dos estágios de produção de fármacos quirais (Adaptado Ref 35). ....	82
<b>Figura 3. 58</b> – Cromatograma da separação do <b>a)</b> (±)-albendazol sulfóxido, <b>b)</b> (+)-albendazol sulfóxido e <b>c)</b> (-) – albendazol sulfóxido, pela CHIRALPAK AD <sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 3,0 mL/min, λ=290 nm, Vol. de Inj.: 0,1 mL.....	83
<b>Figura 3. 59</b> – Curva de calibração do albendazol sulfóxido a) Refinado e b) Extrato.....	84
<b>Figura 3. 60</b> – Perfil interno de concentração do processo de purificação do albendazol sulfóxido.....	85
<b>Figura 3. 61</b> - Cromatograma obtido durante o processo de purificação do albendazol sulfóxido <b>a)</b> ciclo 10 <b>b)</b> ciclo 55.....	86
<b>Figura 3. 62</b> – Perfil interno teórico obtido durante o processo de purificação do albendazol sulfóxido <b>a)</b> ciclo 10 <b>b)</b> ciclo 55.....	86
<b>Figura 3. 63</b> - Estrutura química, <b>a)</b> (S)-(+)-MDMA e <b>b)</b> (R)-(-)-MDMA. ....	87

<b>Figura 3. 64</b> - Cromatograma da separação obtida para o MDMA (0,1 mg/ml), Hibar ChiraDex® (25,0 x 1,0 cm, 5 µm), acetonitrila/tampão acetato de amônia (pH 6,5, 100 mM) (70:30), 500 µl, 270 nm. ....	88
<b>Figura 3. 65</b> - Esquema de EBC com <i>peak shaving recycling</i> . ....	89
<b>Figura 3. 66</b> - Cromatograma da separação preparativa para o MDMA (20,0 mg/ml), Hibar ChiraDex® (25,0 x 1,0 cm, 5 µm), acetonitrila/tampão acetato de amônia (pH 6,5, 100 mM) (70:30), 500 µl, 270 nm (os traços representam as posições de coleta). ....	89
<b>Figura 3. 67</b> - Cromatograma dos enantiômeros do MDMA (0,5 mg/ml), Hibar ChiraDex® (25,0 x 1,0 cm, 5 µm), acetonitrila/tampão acetato de amônia (pH 6,5, 100 mM) (70:30), 500 µl, 270 nm. ....	90
<b>Figura 3. 68</b> – Estrutura química do <b>a)</b> (R)-(+)-omeprazol <b>b)</b> (S)-(-)-omeprazol. ....	91
<b>Figura 3. 69</b> – Separação do omeprazol pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (15 x 0,46 cm D.I., 10 µm), metanol (100%), 1,0 ml/min, λ=325 nm. ....	92
<b>Figura 3. 70</b> – Separação do omeprazol (30 mg/ml) pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (20 x 0,70 cm D.I., 10 µm), metanol (100%), 3,0 ml/min, λ=325 nm, Vol. Inj. 500 µl. ....	93
<b>Figura 3. 71</b> – Esquema ilustrativo da injeção do tipo <i>stack</i> . ....	94
<b>Figura 3. 72</b> – Cromatograma para o cálculo do tempo da injeção <i>stack</i> ( $t_i^1$ ), para a separação do omeprazol (30,0 mg/ml) pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (20,0 x 0,70 cm D.I., 10 µm), metanol (100%), 3,0 ml/min, λ=325nm, Vol. Inj. 500 µl. ....	94
<b>Figura 3. 73</b> – Cromatograma da separação <i>stack</i> do omeprazol (30,0 mg/ml) pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (20,0 x 0,70 cm D.I., 10 µm), metanol (100%), 3,0 ml/min, Vol. Inj. 500 µl. ....	96
<b>Figura 3. 74</b> – Cromatograma para ambos enantiômeros do omeprazol (0,20 mg/ml), coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (15,0 x 0,46 cm D.I., 10 µm), metanol (100%), 1,0 ml/min, Vol. Inj. 0,50 µl. ....	97
<b>Figura 3. 75</b> – <b>a)</b> Espectro na região do IR experimental para o (-)-ABZO e (+)-ABZO e cálculo do espectro de IR para o (S)-enantiômero utilizando B3LYP/6-31G* e B3PW91/6-311G*. <b>b)</b> Espectro de VCD experimental para o (-)-ABZO e (+)-ABZO e cálculo do espectro de VCD para o (S)-enantiômero utilizando as duas bases teóricas. ....	99
<b>Figura 3. 76</b> – Estrutura dos confôrmeros mais estáveis do (S)-(-)-albendazol sulfóxido, energias relativas, fator Boltzman e espectros de VCD utilizando-se as bases de cálculo B3LYP/6-31G* e B3PW91/6-311G*. ....	100
<b>Figura 3. 77</b> – Ciclo da <i>Taenia Solium</i> . ....	101
<b>Figura 3. 78</b> – Fotografia mostrando a diferente influência dos fármacos (250 ng/ml), (+/-) ABZO, (+)-ABZO, (-)-ABZO e PZQ no tamanho dos cistos após 72 horas. ....	102
<b>Figura 3. 79</b> – Evaginação dos cistos após a administração dos fármacos 72 horas. ....	103
<b>Figura 3. 80</b> – Inibição da enzima alcalina fosfatase pelos fármacos; <b>a)</b> (+)-ABZO <b>b)</b> (-)-ABZO <b>c)</b> (+/-)-ABZO <b>d)</b> PZQ. ....	104
<b>Figura 3. 81</b> – Inibição do antígeno AG pelos fármacos (100 ng/ml). ....	105
<b>Figura 3. 82</b> - Efeito do (R,S)-(+/-)-MDMA e dos enantiômeros (R)-(-)-MDMA, (S)-(+)-MDMA sobre os níveis de glutathiona em fígados de ratos. *p < 0,05 comparado com outros grupos e não é diferente (Anova seguido por Tukey-Kramer's teste de comparação múltiplo). ....	106

**Figura 3. 83** – Efeito do (R,S)-(+/-)-MDMA e dos enantiômeros (R)-(-)-MDMA, (S)-(+)-MDMA sobre a produção de MDA em fígados de ratos. \*p < 0,05 comparado com outros grupos e não é diferente (Anova seguido por Tukey-Kramer's teste de comparação múltiplo). .....107

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1. 1</b> – Seletores quirais e principais interações com analitos quirais .....	13
<b>Tabela 1. 2</b> – Viscosidade dos principais solventes utilizados em HPLC. ....	18
<b>Tabela 3. 1</b> – Parâmetros teóricos obtidos pelo programa HELP 10.3 .....	27
<b>Tabela 3. 2</b> – Parâmetros cromatográficos obtidos para as separações da base de tröger nas colunas cromatográficas preenchidas.....	35
<b>Tabela 3. 3</b> – Parâmetros cromatográficos obtidos para as melhores separações dos fármacos selecionados.....	39
<b>Tabela 3. 4</b> – Solubilidade dos fármacos selecionados.....	40
<b>Tabela 3. 5</b> – Parâmetros cromatográficos obtidos através do estudo de sobrecarga do modafinil.....	44
<b>Tabela 3. 6</b> – Parâmetros iniciais de operação do VARICOL <sup>®</sup> para a separação do modafinil. ....	45
<b>Tabela 3. 7</b> – Parâmetros determinados para o ACS para a separação do modafinil.....	45
<b>Tabela 3. 8</b> – Vazões internas ajustadas pelo ACS para a separação do modafinil (15 g/L).....	46
<b>Tabela 3. 9</b> – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (15 g/L). ....	49
<b>Tabela 3. 10</b> – Vazões internas ajustadas pelo ACS para a separação do modafinil (7,5 g/L).....	51
<b>Tabela 3. 11</b> – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (7,5 g/L).....	54
<b>Tabela 3. 12</b> – Vazões internas ajustadas pelo ACS para a separação do modafinil (3,75 g/L).....	55
<b>Tabela 3. 13</b> – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (3,75 g/L).....	58
<b>Tabela 3. 14</b> – Purezas obtidas nos ciclos durante a separação do modafinil.....	59
<b>Tabela 3. 15</b> – Alterações manuais e purezas enantioméricas para a separação do modafinil (7,50 g/L).....	63
<b>Tabela 3. 16</b> – Parâmetros do processo de purificação enantiomérica do modafinil (7,50 g/L).....	65
<b>Tabela 3. 17</b> – Parâmetros cromatográficos obtidos do estudo de sobrecarga atenolol. ....	69
<b>Tabela 3. 18</b> – Parâmetros iniciais de operação do VARICOL <sup>®</sup> para a separação do atenolol (1,0 g/L).....	69
<b>Tabela 3. 19</b> – Parâmetros determinados para o ACS para a separação do atenolol (1,0 g/L).....	70
<b>Tabela 3. 20</b> – Parâmetros iniciais de operação do VARICOL <sup>®</sup> para a separação do atenolol (0,5 g/L).....	70
<b>Tabela 3. 21</b> – Parâmetros determinados para o ACS para a separação do atenolol (0,5 g/L).....	71
<b>Tabela 3. 22</b> – Alteração manual do QIV durante o processo de separação do atenolol (0,5 g/L).....	73
<b>Tabela 3. 23</b> – Parâmetros cromatográficos obtidos do estudo de sobrecarga do albendazol sulfóxido.....	77
<b>Tabela 3. 24</b> – Parâmetros iniciais de operação do VARICOL <sup>®</sup> para a separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).....	78
<b>Tabela 3. 25</b> – Parâmetros determinados para o ACS para a separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).....	78
<b>Tabela 3. 26</b> – Variação de vazões realizada pelo programa sistema de controle avançado para a separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L). ....	78
<b>Tabela 3. 27</b> – Pureza enantiomérica dos compostos durante a separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).....	80
<b>Tabela 3. 28</b> – Parâmetros do processo de purificação enantiomérica do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).....	81
<b>Tabela 3. 29</b> – Perfil interno de concentração do albendazol sulfóxido .....	84
<b>Tabela 3. 30</b> – Parâmetros do processo para o isolamento dos enantiômeros do MDMA. ...	90
<b>Tabela 3. 31</b> – Estudo de capacidade de carga para a separação do omeprazol* .....	93

<b>Tabela 3. 32</b> – Tempos de eluição e injeção para a separação do omeprazol .....	95
<b>Tabela 3. 33</b> – Parâmetros para a separação do omeprazol em escala preparativa. ....	96
<b>Tabela 3. 34</b> – Parâmetros para o escalonamento* .....	98

## **“Cromatografia Quiral em Escala Preparativa: Estudo de Casos e Aplicação.”**

Diferentes técnicas cromatográficas em escala preparativa foram aplicadas para a purificação de misturas enantioméricas. O estudo da eficiência do processo de cromatografia multicolumna com comprimento de zona variável (VARICOL<sup>®</sup>), assim como sua aplicação para a separação dos fármacos modafinil, atenolol e albendazol sulfóxido são descritos neste trabalho e os resultados obtidos são detalhadamente discutidos. As condições iniciais de operação foram ajustadas através da simulação teórica no programa HELP 10.3 (Novasep<sup>®</sup>). Para a separação do modafinil, diferentes concentrações de alimentação foram avaliadas, para uma mesma configuração de zonas e período. O método mais eficiente desenvolvido para este fármaco proporcionou purezas enantioméricas de 96,0% para ambos enantiômeros, com taxas de produção acima de 2,24 g/dia. O albendazol sulfóxido foi eficientemente separado pelo processo VARICOL<sup>®</sup>, obteve-se purezas enantioméricas de 99,5% e 99,0% para o refinado e extrato, respectivamente, com taxa de produção de, aproximadamente, 2,0 g/dia. Em ambos os procedimentos a fase móvel composta por 100% de metanol foi recuperada em 95,0%. O atenolol foi enantiorresolvido, de maneira eficiente, pela coluna CHIRALCEL OD<sup>®</sup>, a baixa solubilidade deste composto na fase móvel e o longo tempo de ciclo, impossibilitou a obtenção de seus enantiômeros com altas purezas pelo processo VARICOL<sup>®</sup>. Os enantiômeros puros do albendazol sulfóxido foram submetidos a teste sobre cistos de *Taenia Solium*, o comportamento macroscópico, microscópico e bioquímico dos céstodos foi avaliado e, de maneira geral, o (+)-albendazol sulfóxido teve maior efeito anti-helmíntico. A configuração absoluta do centro estereogênico dos enantiômeros do albendazol sulfóxido foi determinada pela primeira vez, para isso utilizou-se dicroísmo circular vibracional e cálculos teóricos. A cromatografia de eluição foi utilizada para a resolução dos enantiômeros do MDMA e do omeprazol. O *ecstasy* foi enantiorresolvido com reciclo em condições de sobrecarga de massa, obteve-se boas purezas enantioméricas - 99,0% para o (R)-(-)-MDMA e 96,0% para o (S)-(+)-MDMA – e taxa de produção de 40,0 mg/mL. Os enantiômeros do MDMA foram utilizados em testes de estresse oxidativo, apresentando diferente comportamento. Para o isolamento dos enantiômeros puros do omeprazol, utilizou-se injeções do tipo *stack* com sobrecarga de massa, taxa de produção de 1,10 g/dia, alta purezas enantioméricas para ambos enantiômeros (acima de 99,0 %) e o uso de fase móvel totalmente reciclada são atrativos deste procedimento.

## **“Preparative Chiral Chromatography: Study of Cases and Applications”**

Different types of preparative chromatography techniques were applied to the enantiomeric purification of a series of chiral drugs. The efficiency of multicolumn chromatography with variable zones (VARICOL<sup>®</sup>) process and also the application for the resolution of drugs modafinil, atenolol and albendazole sulfoxide were investigated and is fully discussed in this work. The initial conditions for the separations were determined by theoretical simulation, using the software HELP 10.3 by Novasep<sup>®</sup>. For the modafinil separation, different feed concentrations were evaluated for the same zone distribution and period. The most efficient process provided 96.0% of enantiomeric purities for both enantiomers with a production rate of 2.24 g/dia. The enantiomers of albendazole sulfoxide were separated by the VARICOL<sup>®</sup> process, and the enantiomeric purities obtained were of 99.5% and 99.0% for raffinate and extract, respectively, with a production rate of, approximately, 2.0 g/dia. For both developed method, the mobile phase used was exclusively methanol, which was recovered around 95 %. Atenolol was efficiently enantioresolved by CHIRALCEL OD<sup>®</sup>, however, the enantiomers were not obtained with high purities by the VARICOL<sup>®</sup> process due to their low solubility in the mobile phase and the high cycle time. This work describes also, for the first time, the absolute configuration of albendazole sulfoxide as (-)-(S) and (+)-(R)-enantiomers. To this end, vibrational circular dichroism and theoretical calculations were applied. The albendazole sulfoxide enantiomers were used for *In Vitro* tests against *Taenia Solium* cysts, the macroscopic, the microscopic and the biochemical behavior for the cysts were evaluated; (+)-(R)-albendazole sulfoxide was the enantiomer with the highest anthelmintic effect. Elution chromatography was used for the resolution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and omeprazole. MDMA was separated by the use of recycling in mass overload conditions, enantiomeric purities of 99.0% and 96.0% were obtained for (R)-(-)- and (S)-(+)-MDMA, respectively, with production rate of 40.0 mg/mL. Racemic MDMA and both enantiomers were used to evaluate oxidative stress status parameters. The enantiomers showed distinct effects in the liver redox state with the (R)-(-)-enantiomer being the responsible for the highest oxidative damage. For omeprazole separation, stack injections with mass overload was used, a production rate of 1.10 g/dia and high enantiomeric purities (99.0%) were attained and for this process, furthermore the mobile phase was totally recycled.



## Sumário

1.	Introdução.....	1
1.1	A importância das moléculas quirais e como obtê-las .....	1
1.2	Cromatografia Líquida: para o isolamento de moléculas enantiopuras.....	6
1.3	Fases estacionárias quirais e a busca por condições de separação .....	12
1.4	Cromatografia líquida em escala preparativa: fatores relevantes .....	16
2.	Objetivos.....	20
3.	Resultados e Discussões.....	21
3.1	Cromatografia de leito móvel simulado com comprimento de zona variável (VARICOL®).....	21
3.1.1	Preenchimento das colunas quirais de polissacarídeos.....	32
3.1.2	Avaliação da enantiorresolução dos fármacos selecionados para a separação no VARICOL® .....	36
3.1.3	Modafinil: purificação enantiomérica pelo processo VARICOL® .....	41
3.1.4	Atenolol: purificação enantiomérica .....	66
3.1.5	Albendazol sulfóxido: purificação enantiomérica.....	74
3.2	3,4-Metilenodioximetamfetamina: Purificação Enantiomérica.....	87
3.3	Omeprazol: Purificação enantiomérica .....	91
3.4	Aplicações.....	98
3.4.1	Albendazol sulfóxido: determinação da configuração absoluta .....	98
3.4.2	Albendazol sulfóxido: testes <i>In Vitro</i> sobre cistos de <i>Taenia solium</i> .....	101
3.4.3	MDMA enantiômeros: testes de <i>stress</i> oxidativo em fígado de ratos .....	106
4.	Conclusões e Perspectivas.....	108
5.	Parte Experimental .....	110
5.1	Generalidades.....	110
5.2	Parâmetros Cromatográficos.....	112
5.3	Procedimento Experimental .....	112
5.3.1	Separações utilizando o sistema VARICOL® .....	112
5.3.1.1	Preenchimento de fases estacionárias quirais .....	112
5.3.1.2	Avaliação das condições de separação do modafinil, do atenolol e do albendazol sulfóxido.....	113
5.3.1.3	Estudo de sobrecarga do modafinil.....	114
5.3.1.4	Processo de purificação enantiomérica do modafinil .....	114
5.3.1.5	Perfil interno de concentração do VARICOL® durante a purificação enantiomérica do modafinil.....	115
5.3.1.6	Estudo de sobrecarga do atenolol .....	116
5.3.1.7	Processo de purificação enantiomérica do atenolol .....	116
5.3.1.8	Estudo de sobrecarga do albendazol sulfóxido.....	117
5.3.1.9	Processo de purificação enantiomérica do albendazol sulfóxido .....	117
5.3.1.10	Perfil interno de concentração do VARICOL® durante a purificação enantiomérica do albendazol sulfóxido.....	118

5.3.2	Teste de atividade do (+/-)-albendazol sulfóxido, (+)-albendazol sulfóxido, (-)-albendazol sulfóxido em céstodos de <i>Taenia Solium</i> .....	119
5.3.2.1	Coleta e cultura dos Céstodos.....	119
5.3.2.2	Medida do tamanho dos céstodos .....	120
5.3.2.3	Evaginação.....	120
5.3.2.4	Medida de secreção da enzima alcalina fosfatase (AP).....	120
5.3.2.5	Medida de secreção do antígeno (AG) .....	121
5.3.3	Avaliação das condições de separação do MDMA .....	121
5.3.4	Purificação enantiomérica do MDMA.....	122
5.3.5	Purificação enantiomérica do omeprazol .....	122
Anexo 1 - Procedimento para o uso do VARICOL® .....		134

### 1. Introdução

#### 1.1 A importância das moléculas quirais e como obtê-las

Em ciência, a estereoquímica é uma área em constante crescimento, especialmente pelo fato da natureza ser composta por moléculas quirais. Os organismos vivos são constituídos por moléculas quirais, que possuem papéis fundamentais - aminoácidos, açúcares, proteínas, ácidos nucleicos - e; portanto, reconhecem e sintetizam diastereoisômeros e/ou enantiômeros<sup>1</sup>.

Muitas das moléculas utilizadas cotidianamente possuem quiralidade, os principais fixadores utilizados nos perfumes, como: tonalida, fantolida, traseolida e galaxolida<sup>2</sup>, muitos pesticidas e fungicidas, como: diniconazol, uniconazol, triadimenol, metalaxil<sup>3</sup> e, principalmente, diversos fármacos como: atorvastatina, esomeprazol e valsartana<sup>4</sup> são alguns exemplos da aplicabilidade de moléculas quirais.

Há décadas, moléculas quirais deixaram de ser um interesse acadêmico e passaram a ser alvo de grandes corporações, principalmente farmacêuticas. A produção de substâncias enantiomericamente pura se deu pela necessidade de se ter compostos com maior atividade, com menor efeito colateral e com procedimentos de preparo mais eficientes, já que em alguns casos o enantiômero sem atividade é considerado uma impureza<sup>5</sup>.

Além da busca por substância quirais mais efetivas e métodos mais produtivos, a regulamentação do *Food & Administration (FDA)* dos Estados Unidos, de 1992, que passou a preconizar a política de administrar misturas racêmicas como medicamentos, apenas se estudos farmacológicos e toxicológicos dos enantiômeros puros fossem realizados<sup>6</sup>, acarretou em um aumento no interesse por métodos de obtenção de compostos enantiomericamente puros. Desta forma, já em 2006, 75% das pequenas moléculas quirais administradas como fármacos eram enantiômeros puros<sup>6</sup>.

Para se preparar compostos enantiopuros é necessário ter ambientes estereosseletivos durante a síntese ou purificação. Sendo assim, moléculas quirais são utilizadas para induzir a formação de quiralidade ou para interagir de maneira distinta com a mistura racêmica.

Existem diferentes abordagens para se preparar compostos enantiomericamente puros, todas elas se dão através de síntese assimétrica ou de síntese aquiral seguido de purificação enantiomérica. No primeiro caso, destacam-se a utilização de

substratos quirais (isolados da natureza), a utilização de auxiliares quirais e/ou catalisadores quirais. Dentre os métodos de purificação destacam-se a resolução de enantiômeros clássica, por conglomerados, cinética, por membranas e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*).

A derivação de substâncias naturais quirais para a obtenção de produtos enantiopuros é uma prática antiga<sup>7</sup> e se da, preferencialmente, quando o substrato é de fácil obtenção (ex.: aminoácidos, terpenos, polissacarídeos) e quando as etapas sintéticas não são complicadas. Dentre as desvantagens encontram-se, principalmente, o longo período para a obtenção do produto, sem alterar a estereoquímica do substrato.

Exemplos clássicos da utilização de auxiliares quirais para a indução de novos centros estereogênicos, como: enolatos<sup>8</sup>, imidas<sup>9</sup>, oxalinas<sup>10</sup>, bicíclios<sup>11</sup> e Taddols<sup>12</sup> demonstram que esta técnica é bastante empregada para a obtenção de compostos quirais, sobretudo quando os substratos são substâncias naturais.

Apesar de possuir vantagens importantes como previsibilidade e confiabilidade, a necessidade do uso de grande quantidade de reagente e a adição de no mínimo duas etapas a mais no procedimento de preparo (a formação da ligação covalente e a quebra desta ligação) restringe a utilização de auxiliar quiral para a obtenção de grandes quantidades de compostos enantiopuros.

A catálise enantiosseletiva é uma alternativa para as desvantagens do uso de auxiliares quirais, já que faz uso de quantidade subestequiométrica e; portanto, as etapas de formação e quebra de ligação são eliminadas<sup>13</sup>. No processo catalítico a formação da molécula quiral é determinada pelo catalisador, que pode efetuar milhares de reações antes de ser descartado.

Dentre os catalisadores assimétricos têm-se enzimas<sup>14-16</sup>, os complexos metálicos<sup>17</sup> e os organocatalisadores<sup>18</sup>, que diferenciam-se, principalmente, pela especificidade. Atualmente, existem muitos catalisadores utilizados nos mais diferentes tipos de reações<sup>19</sup>, fazendo com que esta técnica seja preferencial para a obtenção de grandes quantidades de compostos enantiopuros por síntese assimétrica<sup>18-20</sup>.

A utilização de métodos de purificação ou técnicas de resolução é muito importante para a obtenção de compostos enantiopuros, sobretudo em larga escala. Todos os procedimentos deste tipo baseiam-se na separação física de misturas

enantioméricas e proporcionam, em teoria, baixos rendimentos, já que um dos compostos da mistura será descartado. Todavia, o reciclo do enantiômero não desejado, com sua prévia racemização, é uma prática comum que aumenta o rendimento total do processo<sup>21</sup>.

A resolução clássica através da formação de complexos diastereoisoméricos é um dos métodos mais empregados por indústrias, para a obtenção de grande quantidade de substância enantiopura<sup>22</sup>. Este procedimento baseia-se no uso de um enantiômero puro para formar os complexos diastereoisoméricos com a mistura racêmica, desta forma é possível separar por cristalização os dois diastereoisômeros, que possuem solubilidades diferentes. Dentre os agentes de resolução mais utilizados destaca-se o ácido tartárico<sup>23</sup>.

Os agentes de resolução podem também ser utilizados para formar diastereoisômeros por ligação covalente com a mistura racêmica, a qual posteriormente, é separada por cromatografia ou cristalização<sup>24</sup>. Contudo, esta técnica possui a desvantagem de adicionar duas etapas na produção do composto desejado, a de formação e da quebra da ligação covalente.

As misturas enantioméricas podem cristalizar de diversas formas, a maioria delas cristalizam como misturas racêmicas; portanto, com a proporção de 1:1. Todavia, algumas misturas racêmicas cristalizam como conglomerados, formando dois cristais enantiomorfos possíveis de serem separados<sup>25</sup>.

A separação dos conglomerados manualmente, como fez Pasteur na primeira resolução enantiomérica reportada<sup>26</sup>, possui baixo rendimento. Geralmente, proporciona-se a indução da cristalização de apenas uns dos cristais enantiomorfos, pela adição do cristal do enantiômero desejado à uma solução saturada da mistura enantiomérica. Apesar de ser pouco utilizado, devido ao número restrito de misturas que cristalizam como dois cristais distintos, a produção do fármaco Aldomet<sup>TM</sup>, que já perdura por mais de 50 anos, é um exemplo da aplicabilidade do processo de resolução por conglomerados<sup>27</sup>.

A resolução cinética de misturas enantioméricas é outra forma de se obter substâncias enantiopuras. Apesar de ser intrínseco a cada mistura enantiomérica e difícil de ser desenvolvida, já foi aplicada com sucesso em várias misturas e com alto rendimento, como por exemplo, para análogos de piretróides, inseticidas naturais. Neste caso em especial, as reações ocorreram de maneira simultânea no mesmo recipiente, não sendo necessário nenhum método de separação posterior<sup>28</sup>.

Este procedimento baseia-se nas reações com diferentes taxas de velocidade, entre a mistura enantiomérica e reagentes ou catalisadores assimétricos, geralmente enzimas ou complexos metálicos. Desta forma, é possível separar os enantiômeros coletando frações das reações, em diferentes períodos. De maneira distinta dos outros métodos de purificação, a resolução cinética proporciona a diferenciação química dos dois enantiômeros, por exemplo: na resolução de um éster quiral um dos produtos formado é um álcool, proveniente da reação de hidrólise, enquanto que o outro enantiômero não sofre hidrólise<sup>29</sup>.

O método de obtenção de substâncias enantiopuras por membranas quirais é pouco utilizado, devido a baixa estabilidade do suporte quiral. Pesquisas se intensificam cada vez mais, para produzirem membranas resistentes e capazes de produzir enantiômeros em altos rendimentos e pureza enantiomérica. Ela é atrativa, pelo baixo custo de produção e operação<sup>29,30</sup>.

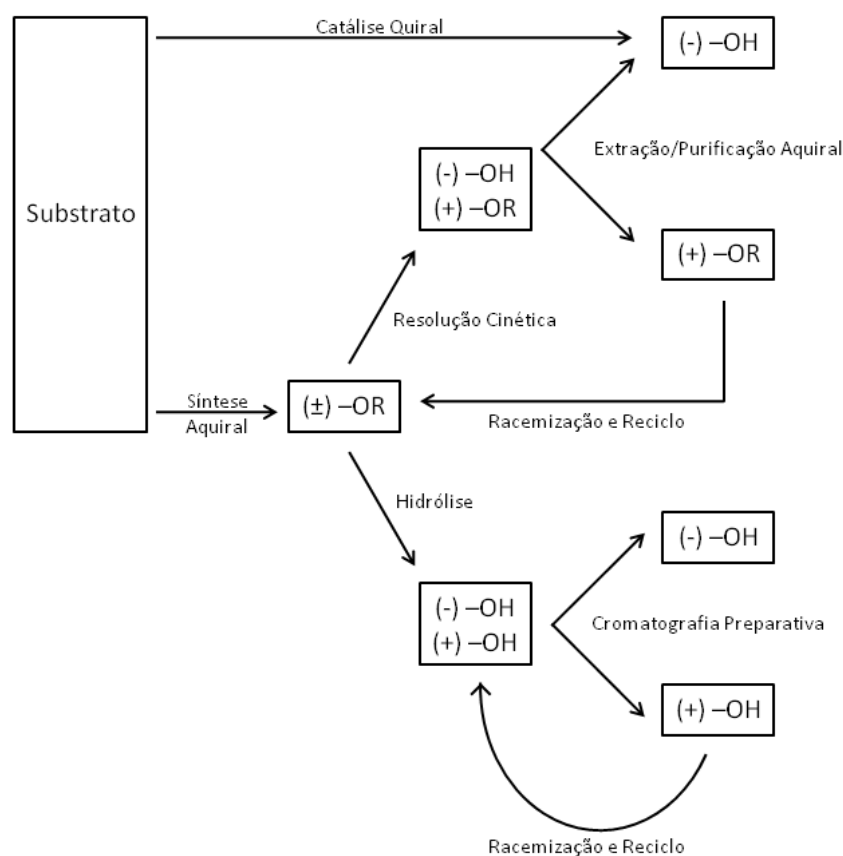
Por outro lado, o uso de cromatografia líquida é o método mais eficiente para a resolução de misturas enantioméricas, por proporcionar altos rendimentos e, principalmente, por ser mais universal quando comparado aos demais procedimentos de purificação. Os métodos cromatográficos podem ser distinguidos entre indiretos e diretos. O método indireto se baseia na separação aquiral de misturas diastereoisoméricas, previamente sintetizadas pela reação entre os enantiômeros e um substrato quiral.

O método direto se dá pela utilização de seletores quirais para formar complexos diastereoisoméricos transitórios, entre a fase estacionária e a fase móvel. Neste caso há duas possibilidades, na primeira o seletor quiral está presente na fase móvel, chamado de aditivo quiral (CMPAs, *Chiral Mobile Phases Additives*), por outro lado o seletor quiral pode estar ancorado fisicamente ou quimicamente na fase estacionária (CSPs, *Chiral Stationary Phases*). O uso de CMPAs é limitado devido ao alto custo dos experimentos, pois o aditivo quiral é descartado e na maioria dos casos não pode ser recuperado da fase móvel<sup>31</sup>. Apesar disto, existem relatos interessantes que tratam do assunto, como por exemplo a separação de fármacos não esteroidais da família do naproxeno, em equipamento nano-HPLC, utilizou-se uma coluna C18 no modo reverso e como aditivo um derivado de  $\beta$ -ciclodextrina<sup>32</sup>.

O método cromatográfico direto pelo uso de CSPs, apesar de ser conhecido como custoso, principalmente, pelo alto consumo de solventes e as fases estacionárias dispendiosas, é talvez o mais empregado, sobretudo em escala

analítica para estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos<sup>31</sup>. Já em escala preparativa, o uso de fases estacionárias quirais também é empregado para a obtenção de grande quantidade de substâncias enantiopuras, dois exemplos clássicos é a produção da Sertralina (Zoloft<sup>®</sup>) pela Pfizer e Citalopram (Lexapro<sup>®</sup>) pela Lundbeck.

Tanto os métodos de síntese assimétrica quanto os de resolução, principalmente, cromatográfica pelo uso de CSPs, podem providenciar grandes quantidades de moléculas enantiopuras. A utilização de síntese aquiral seguido da utilização de HPLC-QUIRAL providencia na maioria dos casos melhores rendimentos e menor custo/tempo do que os demais métodos, especialmente, se o enantiômero de não interesse for racemizado e reciclado ao início do processo. A Figura 1. 1 exemplifica rotas preferenciais para o desenvolvimento de métodos para a obtenção de alcoóis enantiopuros<sup>29</sup>.



**Figura 1. 1** – Diferentes rotas para a obtenção de alcoóis enantiopuros (Adaptada ref. 29).

### 1.2 Cromatografia Líquida: para o isolamento de moléculas enantiopuras

Nos últimos anos, o uso de cromatografia líquida enantiosseletiva, para o isolamento de substâncias com utilidade comercial, tornou-se muito empregada, sobretudo para a obtenção de compostos na escala de mg/dia à kg/dia. O desenvolvimento de fases estacionárias quirais estáveis aos principais eluentes utilizados e com alta capacidade de carga, permitiram que técnicas como cromatografia em batelada de eluição (EBC, *Elution Batch Chromatography*) e cromatografia de multicolumnas (MCC, *Multicolumn Chromatography*) fossem aperfeiçoadas e colocadas como práticas rotineiras para a purificação enantiosseletiva tanto por centros de pesquisas como por indústrias.

A EBC é a técnica cromatográfica mais simples de ser aplicada e é muito utilizada, principalmente, em laboratórios onde se deseja miligramas/gramas por dia de substâncias enantiopuras<sup>33</sup>. A principal vantagem desta técnica é a facilidade de se escalonar as condições de separação e de predizer a produtividade, em escala analítica para a escala preparativa. Isto proporciona a economia das misturas racêmicas durante o procedimento de desenvolvimento do método<sup>34</sup>.

O fator de escalonamento pode ser calculado através da razão entre o volume da coluna preparativa e o volume da coluna analítica - equação (1). Apesar de aparentes inconvenientes, como: entupimento da coluna analítica (colunas capilares), diferença de porosidade, de diâmetro, de conexões e de equipamentos, o escalonamento de colunas analíticas e preparativas pode ser realizado de maneira confiável e reprodutível<sup>34</sup>. A aplicação da equação (1) é abordada na seção 3.3 (pp. 91).

$$S = \frac{R_p^2 \cdot L_p}{R_a^2 \cdot L_a} \quad (1)$$

Onde S é o fator de escalonamento,  $R_p$  e  $R_a$  os diâmetros das colunas e  $L_p$  e  $L_a$  os comprimentos das colunas preparativas e analíticas, respectivamente.

A EBC é conhecida por operar em condições de diluição, ou seja, de baixa concentração do analito. Desta forma, uma pequena região do leito da fase estacionária (a cada instante) está envolvida no processo de separação. Nesta abordagem, os compostos enantiopuros são obtidos após sucessivas injeções da mistura racêmica em condições de sobrecarga de massa<sup>35</sup>.



No intuito de se aumentar a produtividade dos métodos de EBC, técnicas como injeções do tipo *stack*, de *peak shaving recycling* e injeção de solvente polares, durante a separação, podem ser aplicadas.

As injeções do tipo *stack* são utilizadas em casos que os enantiômeros são separados com grande eficiência pela coluna cromatográfica, com altos valores de seletividade e resolução. As injeções, em condições de sobrecarga de massa, são realizadas considerando o volume morto do sistema. Desta maneira, as separações são otimizadas e a perda de tempo para que o primeiro enantiômero seja eluído é solucionada, proporcionando a diminuição dos tempos de análise e do consumo de solvente<sup>36</sup>.

O EBC com *peak shaving recycling* para separações de compostos quirais é aplicado, principalmente, quando se tem separações com baixa enantiosseletividade<sup>37</sup>. Neste caso, a mistura racêmica é eluída pela coluna cromatográfica ao menos duas vezes, aumentando a enantiosseletividade e a resolução da separação. O fechamento da válvula de reciclo durante o processo de separação resulta na economia de solvente durante este procedimento<sup>38,39</sup>.

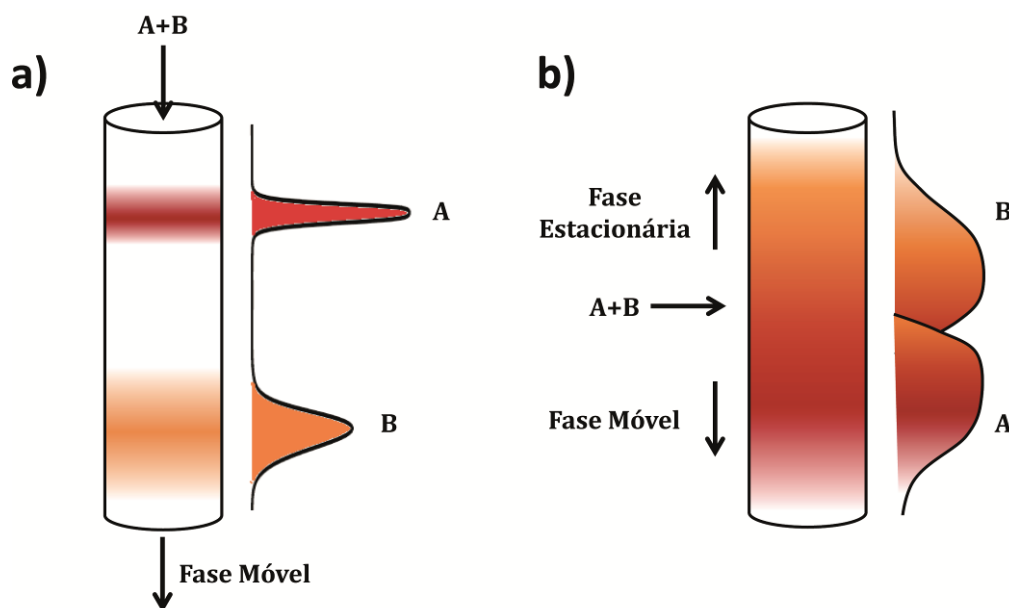
Casos de separações quirais em que um dos enantiômeros possua muito maior interação com a fase estacionária, do que o outro enantiômero, pode ser resolvido através da injeção de um solvente mais polar e miscível com a fase móvel, durante a eluição do composto mais retido. Sendo assim, diminui-se o tempo de análise e coleta-se o segundo enantiômero em maior concentração, amenizando o procedimento de evaporação da fase móvel. O solvente mais polar pode ser injetado direto no topo da coluna cromatográfica por *by pass*, de modo a não alterar a fase móvel da alça de injeção e permitir uma maior rapidez no acondicionamento da coluna, para a condição de separação inicial<sup>36</sup>.

Outras alternativas que podem ser empregadas na EBC, para aumentar a eficiência dos processos, é o uso de gradiente de solvente e/ou temperatura, nos casos de separações com enantiosseletividade muito elevada e ou fator de retenção muito alto. De maneira geral, maiores temperaturas diminuem o fator de retenção e afinam as bandas cromatográficas, porém a enantiosseletividade sempre precisa ser avaliada, pois a mudança de temperatura influencia nas interações e na transferência de massa dos enantiômeros com o seletor quiral<sup>40-42</sup>.

Ao manter as condições cromatográficas, as separações utilizando-se EBC são altamente reprodutíveis e robustas. Por este motivo, a automação é uma alternativa

para aumentar a eficiência dos processos de purificação, assim como torna-los menos trabalhoso. Para isso, utiliza-se auto injetores e coletores de frações<sup>37,43</sup>.

No intuito de otimizar as separações de misturas binárias, as técnicas de MCC surgiram para operar não mais em condições de diluição, como a EBC, mas sim para serem operadas em condições de saturação da fase estacionária. Neste caso, tem-se um comportamento de adsorção competitivo não-linear e a obtenção de produtos menos diluídos. De maneira geral, os métodos de MCC proporcionam o gasto de um menor volume de solvente<sup>44</sup>. A Figura 1. 2 ilustra a separação de uma mistura binária por EBC e por MCC.



**Figura 1. 2** – Esquema ilustrativo da separação por a) EBC e b) MCC.

Uma unidade de MCC pode ser compreendida levando em conta o chamado leito móvel verdadeiro (TMB, *True Moving Bed*), que consiste no deslocamento da fase estacionária no sentido oposto à fase móvel, aumentando assim a eficiência da separação. Neste caso, a mistura a ser separada é introduzida no centro da coluna, que é dividida em quatro zonas, os produtos são recolhidos entre as extremidades da coluna e o ponto de alimentação. No refinado é retirado o enantiômero com menor interação com a fase estacionária e no extrato o enantiômero com maior interação<sup>45</sup>. A Figura 1. 3 demonstra o esquema de funcionamento de um TMB.

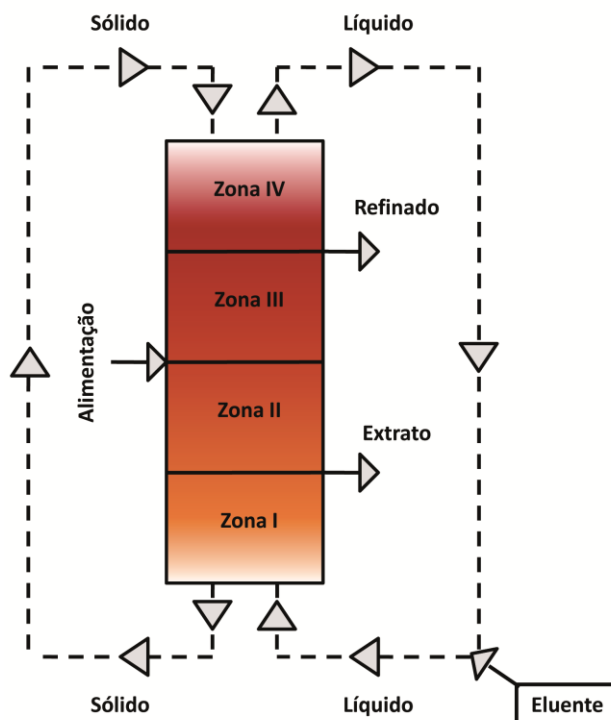


Figura 1. 3 – Esquema do leito móvel verdadeiro.

A implementação do deslocamento homogêneo da fase estacionária no TMB é inviável, já que pode causar ruptura das partículas sólidas e formação de fortes retro-misturas<sup>44,46</sup>. Na prática, a movimentação do adsorvente é simulada, através da utilização de leitos fixos (colunas cromatográficas) e do avanço periódico dos pontos de admissão e de retirada, sempre na mesma direção do escoamento da fase móvel, desta forma tem-se os processos de MCC.

Uma zona do MCC é constituída por dois pontos consecutivos de retirada e admissão, num total de quatro, cada uma das quais com uma função específica e fundamental para atingir a separação bem sucedida. A zona I é responsável por dessorver o componente com maior interação com a fase estacionária e está localizada entre o ponto de entrada do eluente e saída do extrato. Já a zona II tem como função dessorver o composto menos retido e localiza-se entre a linha de saída do extrato e entrada da alimentação. A zona III e IV são responsáveis pela adsorção dos analitos com maior interação e menor interação com a fase estacionária, respectivamente. A zona III localiza-se entre a linha de entrada da alimentação e saída do refinado, já a zona IV encontra-se entre a saída do refinado e entrada do eluente<sup>45</sup>.

A simulação dos leitos fixos é feita através de válvulas localizadas entre as colunas cromatográficas, que de maneira sincronizada - no caso de cromatografia de leito móvel simulado convencional (SMB, *Simulated Moving Bed*) - realizam mudanças nos pontos de entrada e saída dos compostos. A configuração original do sistema é restituída após a movimentação completa dos pontos de admissão e retirada, caracterizando um ciclo<sup>45</sup>. Considerando um sistema de SMB com 8 colunas cromatográficas e com a distribuição de 2 colunas por zona, têm-se um sistema 2-2-2-2 (Figura 1. 4)<sup>46</sup>.

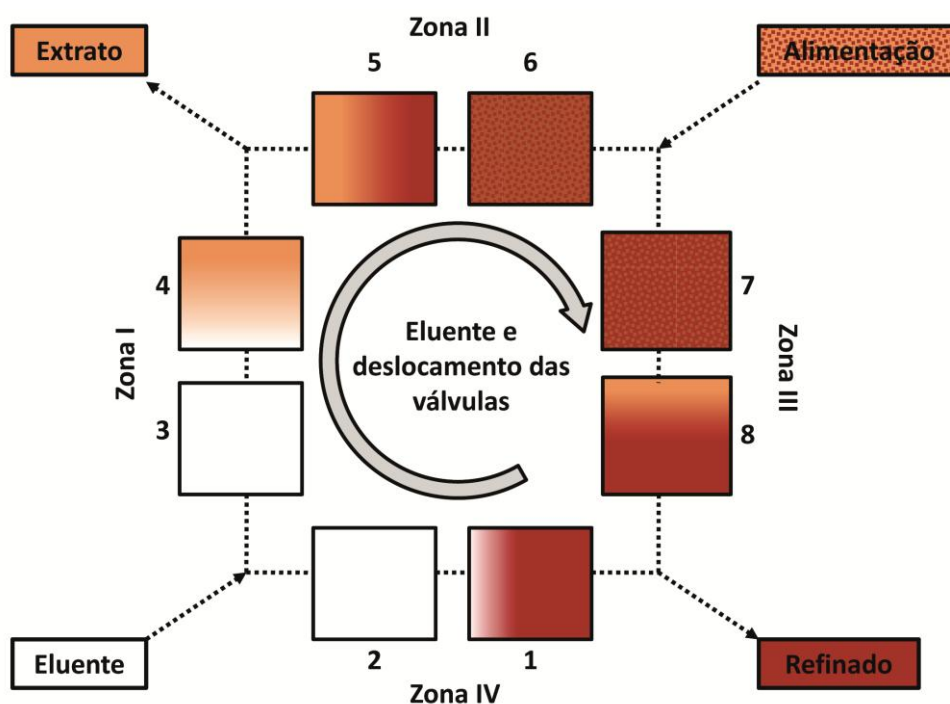


Figura 1. 4 – Esquema do SMB.

A busca por processos mais produtivos, que resultem em maior pureza para os enantiômeros coletados, pode ser obtido tanto pelo aprimoramento da discriminação quiral do analito, como pela implementação de condições de operações mais complexas. Para isso, novos sistemas de MCC são, constantemente, criados e comercializados.

O processo de leito móvel simulado com comprimento de zona variável (VARICOL<sup>®</sup>) é um eficiente método de MCC não convencional. Durante a separação pelo processo VARICOL<sup>®</sup>, os avanços dos pontos de alimentação e retirada ocorrem em intervalos não sincronizados<sup>47-49</sup>; sendo assim, a configuração das colunas e o comprimento das zonas não se mantêm constante ao longo do tempo,

proporcionando um número de configurações infinito, diferentemente do SMB convencional.

A infinidade de configurações do VARICOL<sup>®</sup> faz com que esta unidade seja extremamente flexível e poderosa, quando comparada ao SMB convencional, sobretudo ao se utilizar um número reduzido de colunas<sup>47,49,50</sup>.

Outras possibilidades de processos de MCC não convencionais já foram desenvolvidas, como a aplicação de gradiente de solvente nas linhas de entrada e saída (PowerFeed<sup>®</sup>)<sup>51-54</sup>, gradientes de pH, temperatura e sais<sup>55-57</sup>. A variação da concentração da alimentação e do período de troca de válvulas também já foi descrita (ModiCon)<sup>58,59</sup>, assim como a separação de misturas multicomponentes<sup>60,61</sup>.

A escolha do número de colunas a ser utilizada nos sistemas MCCs é uma etapa primordial do processo de separação. A equivalência entre TMB e MCC é maior em procedimentos com número de coluna elevado<sup>62,63</sup>. O uso de 8 colunas pode proporcionar mais facilmente produtos com alta pureza. Por outro lado, ao diminuir o número de colunas (4 – 6 colunas) aumenta-se a produtividade do método<sup>45</sup>.

De maneira geral, processos com um número reduzido de colunas são aplicados, quando se deseja uma grande quantidade de composto purificado, condição na qual os volumes mortos das colunas são mais relevantes e a necessidade de se substituir as colunas utilizadas é mais frequente<sup>62</sup>. Nestes casos, a aplicação de MCC não convencional, principalmente o VARICOL<sup>®</sup>, pode ser aplicado para aumentar a eficiência dos procedimentos<sup>62,63</sup>.

Os sistemas de MCC são unidades complexas, cuja operação requer a escolha criteriosa de parâmetros, tais como: tempo de troca das válvulas, vazões nas quatro zonas e concentrações de alimentação. Estes parâmetros devem ser determinados para cada processo de separação, a fim de se atingir alta pureza dos produtos, com alta eficiência e produtividade<sup>64</sup>.

O uso de solventes supercríticos (SFC, *Supercritical Fluids*) como fase móvel é uma alternativa que pode ser aplicada, tanto em sistemas de EBC quanto para sistemas de MCC<sup>44,65</sup>. A utilização de eluente no estado supercrítico, ao invés da grande quantidade de solventes orgânicos, pode resultar em processos mais eficientes, além de ser uma grande vantagem econômica e ambiental<sup>66</sup>.

Acima de certa temperatura e pressão (ponto crítico), as substâncias possuem propriedades intermediárias entre gás ou líquido, este estado é conhecido como

supercrítico. O dióxido de carbono é o eluente mais utilizado na técnica de SFC, por requerer menor temperatura e pressão para permanecer no estado supercrítico; além disso, este composto possui baixa toxicidade e não é explosivo<sup>67</sup>.

De maneira geral, as separações utilizando-se SFC possuem menor tempo de retenção e menor consumo de fase móvel, como a fase móvel possui baixa viscosidade, pode proporcionar separações em vazões maiores. Além disso, a baixa viscosidade do eluente possibilita o uso de partículas menores como suporte das CSPs, aumentando assim o poder de discriminação quiral das colunas cromatográficas<sup>68</sup>.

Apesar da obtenção de compostos enantiopuros ser mais rápida e menos custosa ao se utilizar solvente supercrítico como fase móvel, a solubilidade dos compostos orgânicos nestes eluentes, geralmente é baixa. Este fato restringe a utilização da técnica, pois baixa solubilidade resulta em baixa produtividade. Uma alternativa é a utilização de clorofórmio na fase móvel, porém é necessário verificar a estabilidade da CSP diante deste solvente<sup>68</sup>.

Dewulf *et al.* consideraram a quantidade integral de recursos necessários para a produção de substâncias enantiopuras, neste contexto a utilização de EBC é menos custosa para se obter toneladas de enantiômeros, principalmente, devido a dificuldade e custo energético para se produzir grande quantidade de dióxido de carbono líquido. Por outro lado, segundo os autores, a produção de gramas e miligramas é, preferencialmente, realizado por métodos com EBC-SFC<sup>69</sup>.

Independente da técnica cromatográfica escolhida para se realizar a purificação de misturas enantioméricas, a escolha da condição de separação fase estacionária/fase móvel é fundamental. Se por um lado o crescente número de fases estacionárias quirais desenvolvidas e, comercialmente, disponíveis, possibilita a separação de uma ampla variedade de classes de compostos, por outro dificulta a escolha da fase estacionária mais apropriada para cada tipo de separação<sup>70-72</sup>.

### 1.3 Fases estacionárias quirais e a busca por condições de separação

Existem diversos tipos de seletores quirais, que atuam pelas mais distintas interações com os enantiômeros. Ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$ , dipolo-dipolo, hidrofóbicas, iônicas, estéricas e a formação de complexo de inclusão são responsáveis pela formação do complexo diastereoisomérico e, em consequência,

pela discriminação quiral<sup>73</sup>. As CSPs podem ser classificados como naturais ou sintéticas<sup>71,73</sup> (Tabela 1. 1).

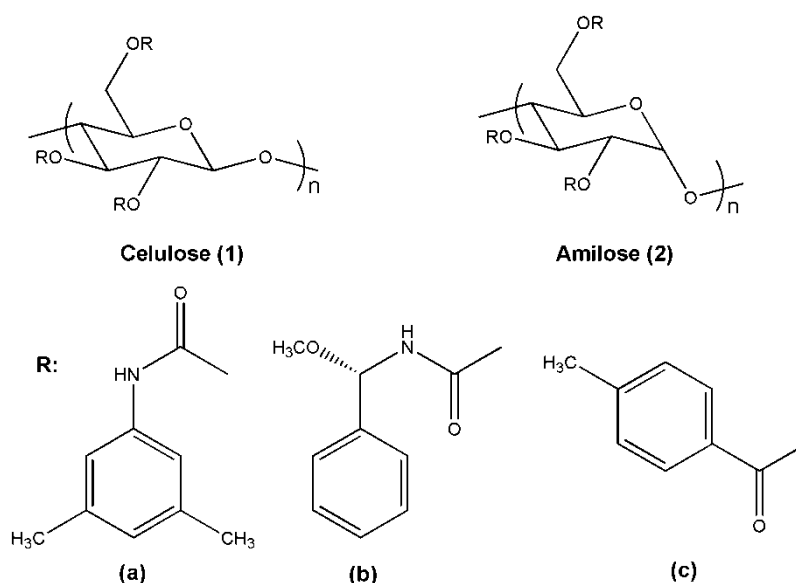
**Tabela 1. 1 – Seletores quirais e principais interações com analitos quirais**

<b>Seletor Quiral</b>	<b>CSPs</b>	<b>Principais Interações</b>
Natural	Proteínas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas
	Ciclodextrinas	Complexo de Inclusão e ligação de hidrogênio
	Polissacarídeos	Complexo de Inclusão e forças atrativas
	Glicopeptídeos	Complexo de inclusão e interações iônicas
	Macrocíclicos	
	Cinchona	Interações eletrostáticas
Sintético	Tipo Pirkle	Interação $\pi$ - $\pi$ e ligação de hidrogênio
	Troca de Ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo
	Éteres de Coroa	Complexo de inclusão e íon dipolo
	Polímeros Sintéticos	Interação $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo
		MIPs

Em 2007, Berthod *et al.*<sup>72</sup> relataram as principais CSPs comercialmente disponíveis, totalizando mais de 100 colunas cromatográficas quirais. Dentre elas, as colunas de polissacarídeos são as mais eficientes, principalmente pela alta capacidade de carga e pelo alto poder de discriminação quiral para as mais variadas classes de compostos<sup>71,72</sup>.

Os polissacarídeos na sua forma natural são capazes de discriminar e resolver misturas enantioméricas. Entretanto, as suas habilidades de reconhecimento quiral e sua estabilidade não são suficientes para serem aplicadas em cromatografia líquida<sup>71</sup>. Os ésteres e carbamatos de polissacarídeos, especialmente os de celulose e amilose, foram desenvolvidos nas últimas décadas do século passado e apresentam alto poder de discriminação quiral e grande estabilidade<sup>74,75</sup>.

As quatro CSPs de polissacarídeos mais utilizadas em cromatografia líquida são: a tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose, tris(4-metilbenzoato) de celulose e a tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose ou celulose (Figura 1. 5).



**Figura 1. 5** – Estrutura dos polissacarídeos derivados mais utilizados em HPLC: **1a)** tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, **1c)** tris(4-metilbenzoato) de celulose, **2b)** tris[(S)-feniletilcarbamato] de amilose e **2a)** tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

Os seletores quirais de polissacarídeos são adsorvidos fisicamente ao suporte, geralmente, em partículas esféricas de 3-aminopropilsilica com tamanho variando de 5 à 20  $\mu\text{m}$ . O processo de adsorção permite que uma grande quantidade de seletor quiral seja aderido ao suporte (aproximadamente 20% g/g), fazendo com que a coluna cromatográfica atinja um grande potencial de enantiosseletividade e capacidade de carga<sup>76</sup>.

As colunas de polissacarídeos adsorvidos podem ser utilizadas nos principais modos de eluição, aplicados a cromatografia quiral, como: modo normal (hidrocarboneto/álcool), modo polar orgânico (acetonitrila, metanol, etanol, 2-propanol, etc) e modo reverso (solventes polares/água). Contudo, as CSPs de polissacarídeos adsorvidos possuem restrições referentes a fase móvel, devido a solubilidade do seletor quiral em alguns solventes, como: acetona, acetato de etila, diclorometano, dimetilsulfóxido e metil *t*-buthyl éter<sup>77</sup>. O uso destes solventes em colunas de polissacarídeos só é possível, quanto o seletor quiral é covalentemente ligado<sup>77</sup> ou reticulado no suporte<sup>78-80</sup>. As colunas de polissacarídeos imobilizados, de maneira geral, possuem menor poder de discriminação quiral do que as similares adsorvidas. Contudo, este tipo de coluna tem sido extremamente útil, em casos que os enantiômeros possuem baixa solubilidade nos eluentes, utilizados nas colunas de polissacarídeos adsorvidos ou não são discriminados por elas<sup>81,82</sup>.



As principais interações envolvidas no processo de discriminação quiral pelas colunas de polissacarídeos são, além da formação do complexo de inclusão, interações de ligações de hidrogênio, interação  $\pi$ - $\pi$  e dipolo-dipolo<sup>75</sup>.

Outro tipos de colunas cromatográficas bastante eficientes na discriminação de compostos quirais são a coluna do tipo Pirkle, Whelk-O 1<sup>®</sup> e as colunas de glicopeptídeos macrocíclicos, especialmente, a de teicoplanina, ristoceína e vancomicina<sup>83,84</sup>.

Apesar da existência de um elevado número de revisões bibliográficas, que citam os principais tipos de seletores quirais e suas principais vantagens<sup>31,71,73,74,85</sup>, determinadas misturas racêmicas só são discriminadas em seletores quirais e em condições de fase móvel específicas. Sendo assim, a otimização da busca por condições de separação esta sempre em destaque, já que esta pode ser uma etapa limitante do processo de purificação.

As técnicas de *microflow* em HPLCs multiparalelo tem sido uma ótima alternativa para agilizar e baratear o processo de busca por condições de separação. Desta forma, o *screening* cromatográfico é realizado em um maior número de colunas em um menor tempo, pois avalia-se várias condições de separação simultaneamente. Existem dois equipamentos comerciais disponíveis, o Nanostream<sup>®</sup> que possui 24 canais e o Eksigent<sup>®</sup>, que possui 8 canais. Welch *et al.* descrevem as principais vantagens e desvantagens de cada equipamento<sup>86,87</sup>.

Outra prática muito utilizada antes de se fazer o *screening* cromatográfico é a busca de condições de separação em base de dados. Desta forma, pode-se encontrar colunas específicas e eficientes para a discriminação de certas classes de compostos. A ChirBase<sup>®</sup> é um exemplo de base de dados comercialmente disponível e constantemente atualizada<sup>88</sup>, algumas empresas de preparo de colunas quirais também disponibilizam base de dados referentes as suas colunas, como por exemplo a *Chiral Technologies*.

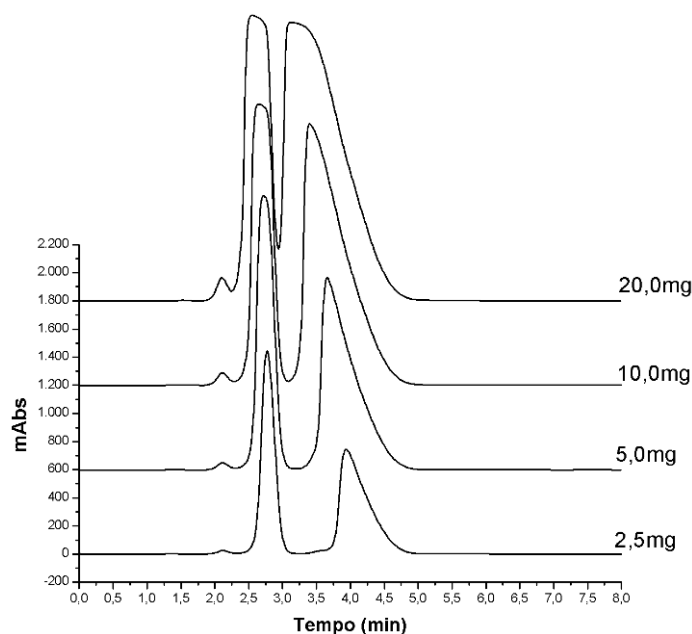
Ao se aplicar cromatografia quiral em escala preparativa, a escolha da condição de separação para as misturas enantioméricas de interesse, deve considerar diferentes parâmetros, como: a enantiosseletividade, a enantiorresolução, a capacidade de carga, a eficiência da coluna, a produtividade e a viscosidade da fase móvel escolhida, assim como características intrínsecas as misturas enantioméricas em estudo, por exemplo: solubilidade, a estabilidade química e enantiomérica dos compostos quirais e o pH da solução<sup>89</sup>.

#### 1.4 Cromatografia líquida em escala preparativa: fatores relevantes

De maneira distinta a cromatografia em escala analítica, que visa fornecer características das misturas enantioméricas (ex: pureza e excesso enantiomérico), assim como, o desenvolvimento de métodos para quantificação dos enantiômeros em matrizes biológicas<sup>90</sup> e ambientais<sup>91</sup>, os métodos em escala preparativa tem como objetivo principal, purificar e isolar compostos enantiopuros.

Em escala preparativa a capacidade de carga da coluna e a recuperação dos produtos tornam-se parâmetros indispensáveis para a eficiência do processo, estes parâmetros podem ser previstos em escala analítica<sup>34</sup>.

A pureza enantiomérica e a produtividade são parâmetros que devem ser sempre considerados conjuntamente e podem ser avaliados através de estudos de carga. Na condição de separação escolhida deve-se injetar concentrações crescentes de massa na coluna até atingir o encontro entre as bandas dos enantiômeros, o *touchband* (Figura 1. 6). Idealmente, o experimento é realizado em escala analítica em colunas sempre preenchidas com a mesma fase estacionária a ser utilizada em escala preparativa.



**Figura 1. 6** - Experimento de sobrecarga para um intermediário sintético, condições de separação: CHIRALPAK AD (10x1,0 cm), MeOH (100%), Vazão: 3,0 mL/min,  $\lambda=270$  nm, Volume Injetado: 200  $\mu$ L.

As quantidades injetadas em escala analítica seguem as isotermas lineares, onde o equilíbrio dos enantiômeros entre a fase estacionária e a fase móvel é proporcional. As condições de diluição podem ser avaliadas através da injeção 0,001-0,01% de analito pela massa total de fase estacionária.

No caso dos experimentos em escala preparativa, o processo deve ser realizado com o máximo de massa injetada, para o sistema CSP/Fase móvel escolhido - aproximadamente 1% de analito por fase estacionária. Sendo assim, os experimentos são operados em condições de isotermas não-lineares, onde a quantidade de analito na fase estacionária e na fase móvel não é proporcional, atingindo-se maior produtividade<sup>92</sup>.

Existem duas formas de se identificar a capacidade máxima de injeção (*overload*), através do aumento do volume de injeção ou através do aumento da concentração da amostra. Preferencialmente, realiza-se o aumento da concentração da amostra, para evitar o alargamento ou a deformação da banda, devido ao volume de solvente injetado<sup>92</sup>.

A capacidade de carga obtida em colunas analíticas podem ser usadas para se fazer a previsão da produtividade e purezas tanto para processos de EBCs como para MCCs. Sendo assim, o melhor sistema CSP/fase móvel pode ser escolhido antes de se começar o processo de separação em larga escala, economizando quantidades expressivas de mistura enantiomérica.

A melhor forma de se aumentar a capacidade de carga de um processo é através da seletividade, quanto maior a enantiosseletividade de uma separação maior é a capacidade de carga do processo<sup>89</sup>.

A enantiosseletividade ou fator de separação ( $\alpha$ ) é um parâmetro controlado pelos fatores termodinâmico, das interações entre a mistura enantiomérica e a CSP numa dada fase móvel. A seletividade é medida inicialmente em escala analítica e deve ser a mesma em escala preparativa, quando as condições de separação são mantidas<sup>34</sup>.

Em condições de *overload* outros dois fatores são relevantes, a capacidade de saturação ( $w_s$ ) e a isoterma de adsorção. Para a maioria dos compostos, que seguem a isoterma de Langmuir em processos adsortivos, a relação entre a enantiosseletividade e a capacidade de carga é proporcional, com a capacidade de saturação constante. Ou seja, quanto maior seletividade, maior capacidade de carga e, em decorrência, maior produtividade<sup>89</sup>.

Em processos de adsorção que não seguem a isoterma de Langmuir, a relação entre a enantiosseletividade e a capacidade de carga pode não ser proporcional. Desta forma, uma separação com baixa seletividade pode ter maior capacidade de carga do que uma separação com alto fator de separação<sup>89</sup>. Sendo assim, para se ter o máximo de produtividade em separações cromatográficas de larga escala é necessário sempre avaliar a seletividade e a capacidade de carga do sistema CSP/fase móvel.

A viscosidade dos eluentes utilizados nos processos cromatográficas pode influenciar de modo direto a produtividade dos métodos em escala preparativa. Alta viscosidade das fases móveis proporciona separações com altas pressões, o que pode prejudicar as fases estacionárias em longo prazo. Além disso, separações com solventes pouco viscosos possuem maior enantiorresolução e podem ser realizadas com maiores vazões. A Tabela 1. 2 sumariza a viscosidade dos principais solventes utilizados em HPLC<sup>89</sup>. A viscosidade da mistura de solventes pode ser maior do que a dos solventes que compõem a mistura.

**Tabela 1. 2 – Viscosidade dos principais solventes utilizados em HPLC.**

Solventes	Viscosidade (CPo)*	Ponto de Ebulição (°C)
<i>n</i> -hexano	0,30	68,7
<i>n</i> -heptano	0,39	98,5
acetonitrila	0,37	81,6
metanol	0,55	64,6
etanol	1,07	78,3
2-propanol	2,03	82,3
água	0,89	100,0

\*Temperatura ambiente

O conhecimento de características específicas das misturas enantioméricas, como: solubilidade, estabilidade química e enantiomérica e até o pH da solução do composto, são fundamentais para separações em escala preparativa.

Condições de separações com alta seletividade e com baixa solubilidade resultam em processos com baixa taxa de produção e, em consequência, baixa produtividade. De maneira geral, para se ter altas produtividades a solubilidade do analito na fase móvel deve ser de no mínimo 20 g/L<sup>89</sup>.

Compostos instáveis na fase móvel ou com baixa barreira de racemização podem dificultar os procedimentos de purificação enantiomérica, pois podem degradar ou racemizar durante o processo de evaporação do solvente ou até mesmo durante a coleta dos enantiômeros. Em alguns casos, pode-se realizar a coleta dos enantiômeros em banho de gelo ou até mesmo de nitrogênio líquido.

Algumas condições de separação podem ser influenciadas pelo pH da solução de injeção (EBCs) ou alimentação (MCCs). Estas soluções, geralmente, são muito concentradas e podem sofrer alterações do pH, dependendo da procedência da amostra. Logo, o ajuste do pH das soluções, sempre para o mesmo valor, irá manter a reprodutibilidade da separação e também evitar a degradação das colunas sensíveis a acidez e/ou basicidade do meio.

Diante de tantas variáveis existentes, para a escolha do processo cromatográfico mais adequado para a purificação de misturas enantioméricas, é preciso considerar os objetivos de cada separação, no intuito de se ter o procedimento mais eficiente.

Diversos relatos na literatura comparam os processos de EBCs e de MCCs tanto empiricamente como teoricamente<sup>93</sup>, na maioria dos casos os procedimentos de MCCs são mais vantajosos que os de eluição, em especial, devido a maior produtividade em virtude da obtenção de produtos menos diluídos<sup>93</sup>.

Por outro lado, a EBC possui uma vantagem importante e que em alguns casos pode ser fundamental, a possibilidade de se injetar misturas enantioméricas solubilizadas em outro solvente que não seja a fase móvel<sup>89</sup>. A solubilidade de compostos farmacêuticos, geralmente, é muito baixa em solventes do modo normal de eluição e estas fases móveis são muito utilizadas para separações quirais<sup>89</sup>.

A escolha do melhor método cromatográfico, para a obtenção de substâncias enantiopuras, deve considerar a disponibilidade da mistura racêmica e a quantidade requerida do enantiômero puro, além de todos os fatores relevantes aqui descritos. O presente trabalho insere-se neste contexto e descreve o uso de diferentes processos cromatográficos, de EBCs e de MCCs (processo VARICOL<sup>®</sup>), para a resolução de fármacos quirais em escala preparativa.

## **2. Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivo estudar diferentes abordagens de cromatografia quiral em escala preparativa, para a purificação enantiomérica dos fármacos: albendazol sulfóxido, modafinil, atenolol, omeprazol e MDMA. Três diferentes técnicas foram avaliadas, a cromatografia de eluição com reciclo e com injeções do tipo *stack*, além da cromatografia de leito móvel simulado, com comprimento de zona variável (VARICOL<sup>®</sup>).

Diferentes aplicações para os enantiômeros separados também foram objetivados, como o estudo da atividade dos enantiômeros do albendazol sulfóxido sobre cistos de *Taenia Solium*, estudo de *stress* oxidativo dos enantiômeros do MDMA em fígado de rato e determinação da configuração absoluta dos enantiômeros do albendazol sulfóxido.

### 3. Resultados e Discussões

#### 3.1 Cromatografia de leito móvel simulado com comprimento de zona variável (VARICOL®)

O VARICOL®-Micro é um sistema MCC desenvolvido pela NOVASEP utilizado, principalmente, para separações de misturas binárias, em escala gramas/dia. O processo pode ser desenvolvido com quatro a seis colunas dependendo das condições de separação da mistura racêmica. Para separações com alta seletividade e objetivando alta produtividade utiliza-se um menor número de colunas, contrariamente, para maior pureza, usa-se o número máximo de colunas.

A grande vantagem deste processo de MCC em comparação aos demais é a possibilidade das infinitas configurações de zonas, possível devido a mudança das posições das válvulas em intervalos não sincronizados<sup>47,48</sup> (Figura 3. 1).

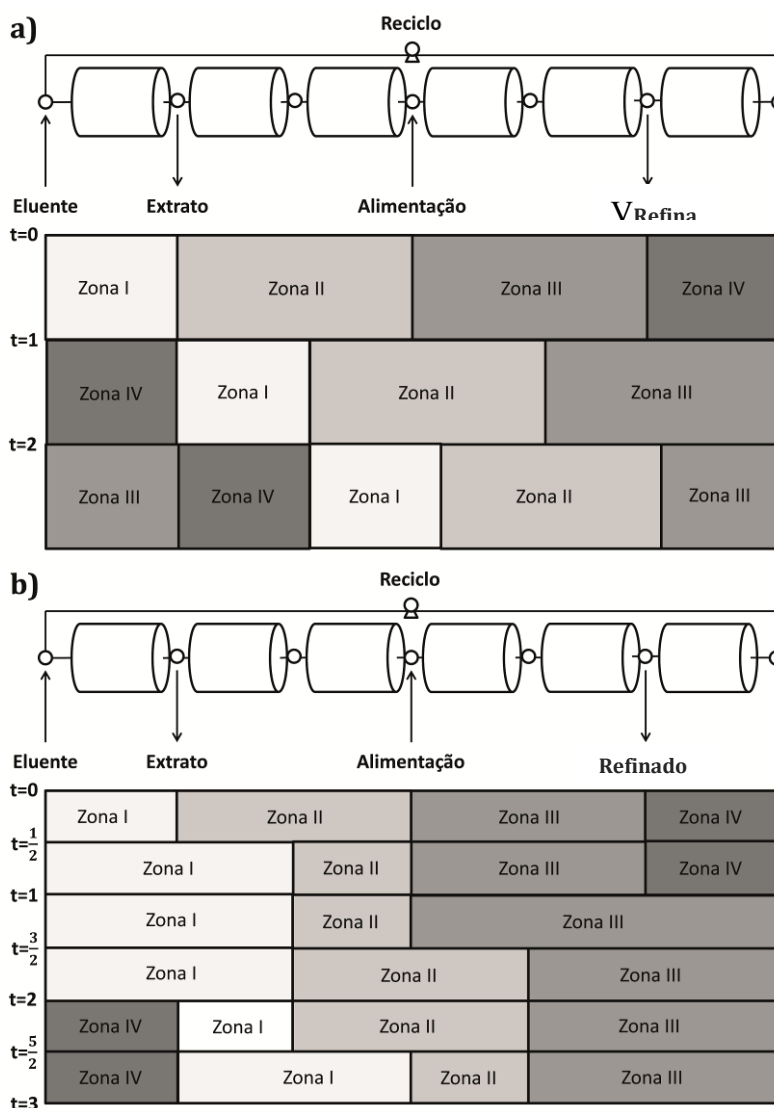


Figura 3. 1 – Esquema da diferença entre as trocas das válvulas do a) SMB e do b) VARICOL®.

A otimização do processo de purificação enantiomérica com MCCs pode ser realizado, baseado nos cromatogramas analíticos, com a aplicação de modelagem e simulação teórica.

No caso de sistemas adsortivos com apenas um componente, isotermas de adsorção determinam a concentração do analito na fase estacionária ( $C_{CSP}^1$ ) e na fase móvel ( $C_{FM}^1$ ) após o equilíbrio e em temperatura constante. Geralmente, esta relação não é linear, porém em baixas concentrações a relação entre as duas concentrações é proporcional (Lei de Henry)<sup>94</sup>.

Em sistemas multicomponentes, todos os analitos presentes na fase móvel competem entre si para acessar os sítios adsortivos da fase estacionária, este comportamento é descrito através de isotermas de adsorção competitivas. Portanto,  $C_{CSP}^1$  não mais depende apenas de  $C_{FM}^1$ , mas também de ( $C_{FM}^2$ ), ( $C_{FM}^3$ ), etc<sup>94</sup>. Diferentes isotermas de adsorção são usadas para explicar as separações cromatográficas em escala preparativa, dentre elas os modelos empíricos competitivos de Langmuir, a isoterma de Langmuir modificado e bi-Langmuir<sup>95</sup>. A correta estimativa da isoterma de adsorção requer informações sobre o equilíbrio de transferência de massa entre os enantiômeros e o seletor quiral, especialmente, em casos de condições não lineares.

No caso do uso dos equipamentos VARICOL<sup>®</sup>, os diferentes parâmetros iniciais do processo de purificação, como: distribuição de zonas, período das válvulas, Qalimentação, Qeluente, Qrefinado, Qextrato e Qreciclo são calculados através da simulação no programa HELP 10.3. Este programa está baseado no trabalho de Seidel-Morgenstern *et al.*<sup>95</sup>, que consideram isotermas de adsorção competitivas e não competitivas em tipos diferentes de sítios de adsorção, característica das separações de misturas enantioméricas por CSPs<sup>49,95,96</sup>.

O programa HELP 10.3 possibilita uma maneira rápida para se determinar as condições de operação inicial do VARICOL<sup>®</sup>. As condições de separação da mistura binária, como: fase estacionária, fase móvel, temperatura e dimensões das colunas cromatográficas precisam ser previamente determinados e ser exatamente iguais as utilizadas no sistema MCC.

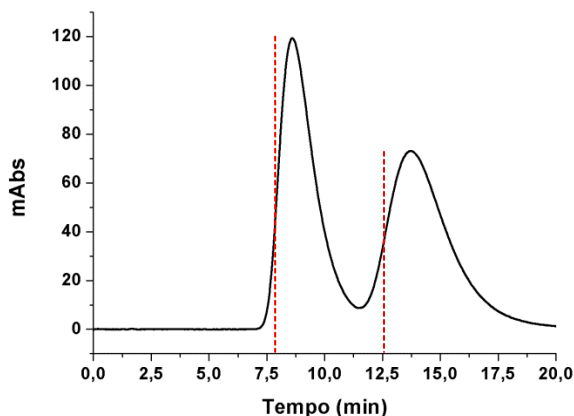
Para a simulação no programa HELP 10.3 é necessário calcular-se os parâmetros cromatográficos, enantiosseletividade, enantiorresolução, fator de retenção e pratos para cada separação obtida em escala analítica. Outros



experimentos também são necessários como: queda de pressão, sobrecarga e injeções em diferentes vazões<sup>49</sup>.

Os experimentos de queda de pressão foram realizados com uma tubulação vazia idêntica as das colunas preparativas e com uma coluna preparativa utilizada no VARICOL<sup>®</sup>. A diferença de pressão entre as duas colunas foi medida em um sistema cromatográfico analítico e a queda de pressão foi então calculada.

As injeções de sobrecarga foram realizadas através de condições diluídas à concentradas, até atingirem o encontro das bandas cromatográficas (*touchingband*). Para este experimento, os tempos de eluição foram medidos no primeiro ponto de inflexão de cada banda (Figura 3. 2).



**Figura 3. 2** – Ilustração da medição do ponto de inflexão para o experimento de sobrecarga.

Para a medição dos parâmetros hidrodinâmicos da separação é necessário realizar a resolução da mistura racêmica, em duas diferentes vazões<sup>49</sup>. Portanto, separou-se os compostos com as vazões de 2,5 ml/min e de 5 ml/min.

Ao abrir o programa HELP 10.3 tem-se a planilha *Analytical Injections* (Figura 3. 3) que deve ser preenchida, inicialmente, com as características (tamanho da partícula e densidade do leito) e dimensões das colunas que serão utilizadas no VARICOL<sup>®</sup> (diâmetro e tamanho) e, em seguida, com os parâmetros da separação em escala analítica (vazão e tempo de retenção).

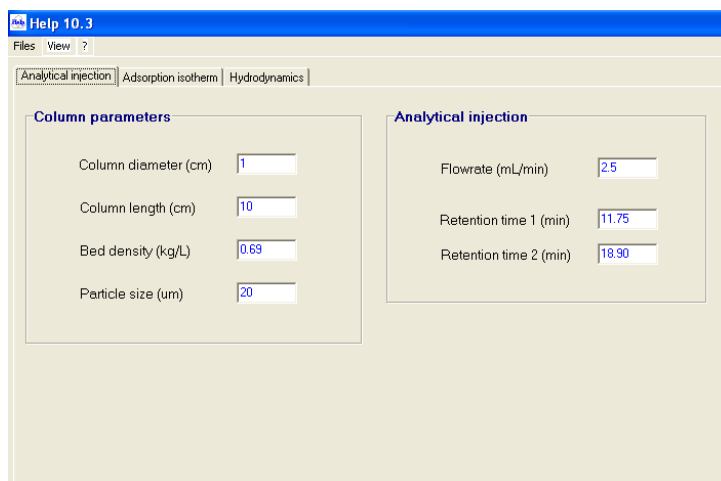


Figura 3. 3 - Planilha *Analytical Injections* do HELP 10.3.

Os parâmetros obtidos no estudo de sobrecarga são incluídos na planilha *Adsorption Isotherm* do programa HELP 10.3 (Figura 3. 4). Além dos tempos de inflexões das bandas cromatográficas, é necessário preencher a planilha com os valores das vazões, volumes de injeções e concentrações em que cada separação foi realizada. Realizou-se os experimentos de sobrecarga sempre com o aumento da concentração da amostra, mantendo-se os volumes de injeção constantes.

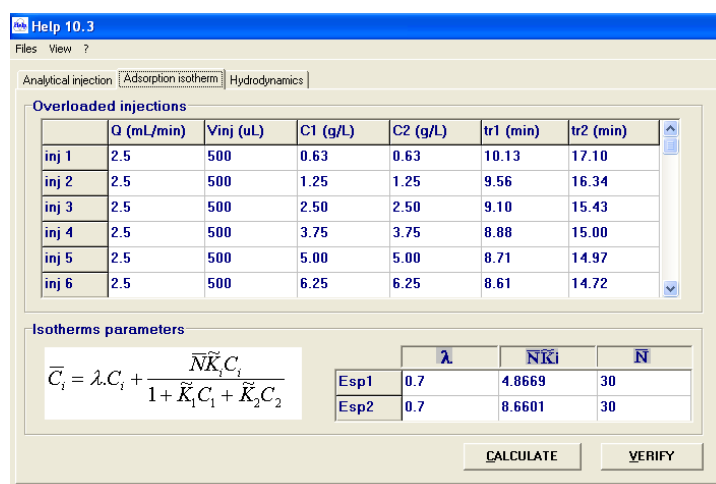


Figura 3. 4 - Planilha *Adsorption Isotherm* do HELP 10.3.

A simulação utilizando o programa HELP 10.3 é encerrada com a planilha *Hydrodynamics*, que é preenchida com os valores obtidos nos experimentos de diferentes vazões e queda de pressão (Figura 3. 5).

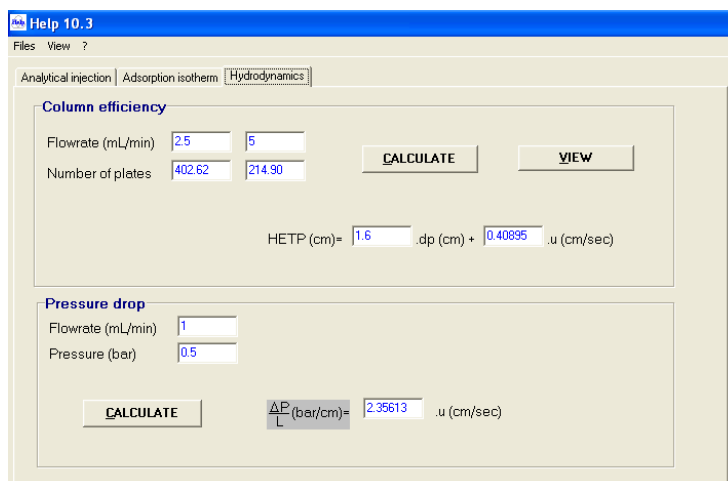


Figura 3. 5 - Planilha *Hydrodynamics* do HELP 10.3.

Antes de se realizar a previsão dos parâmetros iniciais de operação, na planilha *Varicol Data* (Figura 3. 6) são requeridas informações sobre o VARICOL<sup>®</sup> (pressão máxima, diâmetro da coluna e tamanho da coluna) e sobre a mistura enantiomérica a ser separada (solubilidade e razão enantiomérica).

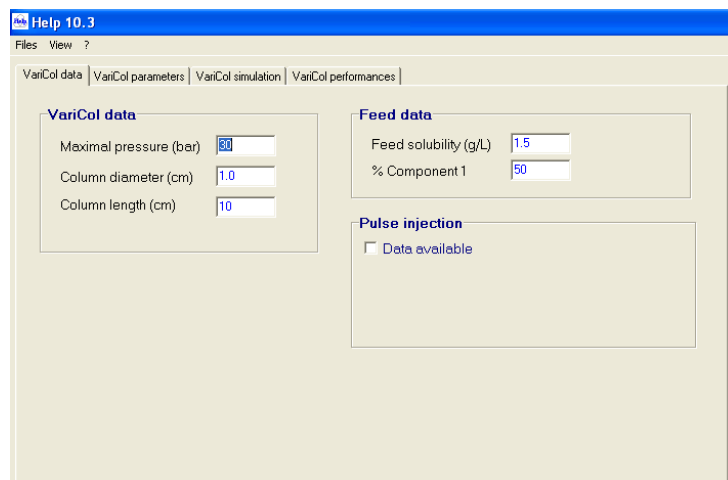


Figura 3. 6 - Planilha *Varicol Data* do HELP 10.3.

Finalmente, na planilha *Varicol Parameters* se realiza os cálculos dos parâmetros iniciais de operação. Além disso, é possível simular uma separação teórica (Figura 3. 7).

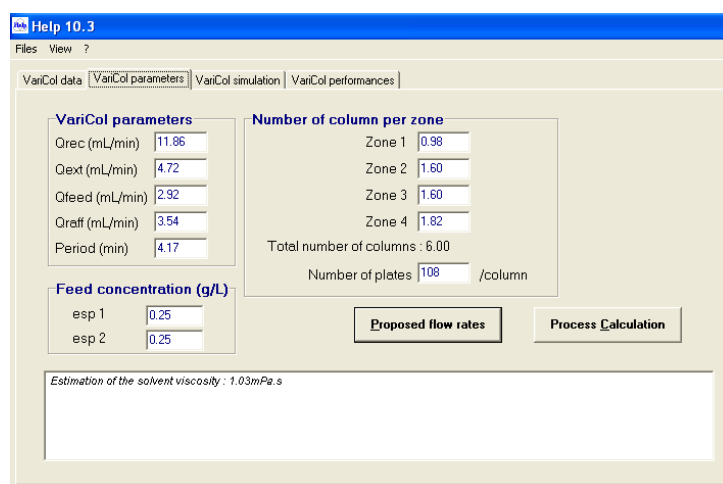


Figura 3. 7 - Planilha *Varicol Parameters* do HELP 10.3.

Na planilha *Varicol Simulation* e *Varicol Performances*, é possível verificar os parâmetros calculados pelo programa através da simulação teórica da separação (concentração do refinado e extrato em ambas linhas de coleta, a razão enantiomérica, taxa de produção, produtividade e consumo de solvente) (Figura 3. 8).

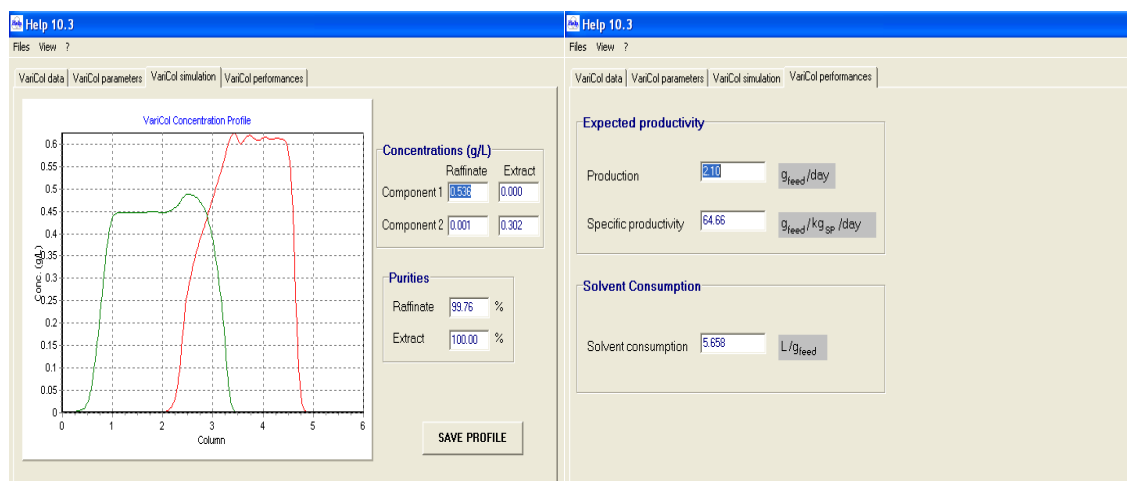


Figura 3. 8 - Planilha *Varicol Simulation* e *Varicol Performances* do HELP 10.3.

De maneira geral, o programa HELP 10.3 superestimou os valores (Tabela 3. 1 – Parâmetros teóricos obtidos pelo programa HELP 10.3), para a separação teórica em comparação as separações experimentais, parâmetros muito acima foram obtidos através da simulação. Os resultados experimentais - discutidos posteriormente - apresentam valores de pureza enantiomérica inferiores dos que os valores teóricos obtidos pelo HELP 10.3.

Tabela 3. 1 – Parâmetros teóricos obtidos pelo programa HELP 10.3

	Taxa de produção (g/dia)	Produtividade (g/kg/dia)	Pureza enantiomérica (%)	
			Refinado	Extrato
modafinil	16,1	494,3	99,9	100,0
atenolol	2,1	64,1	99,7	100,0
albendazol sulfóxido	18,4	566,4	99,9	100,0

Como o processo VARICOL<sup>®</sup> possui alterações das válvulas de maneira não sincronizada, e é um procedimento de separação contínua, para corrigir alterações indesejadas na distribuição dos enantiômeros é necessário o controle das vazões durante os ciclos. Para isso, o programa ACS (*Advanced Control System*) foi utilizado para automatizar o monitoramento e a otimização das vazões, das zonas de limpeza (Zona I e Zona IV) e separação (Zona II e Zona III).

O programa ACS foi ligado após a separação atingir o estado estacionário, ou seja, o máximo de concentração da mistura racêmica. Desta forma, não há variação da concentração dos compostos e apenas o deslocamento da distribuição da mistura enantiomérica pelas quatro zonas do sistema MCC (Figura 3. 9).

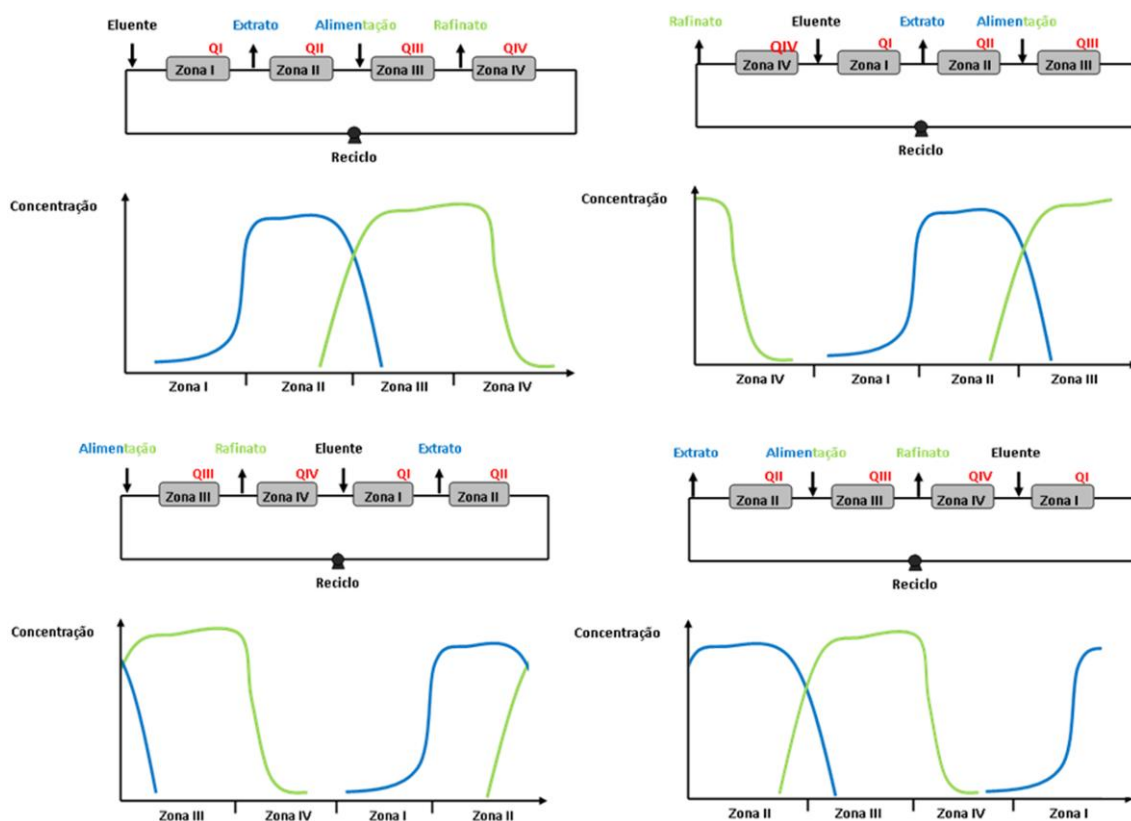
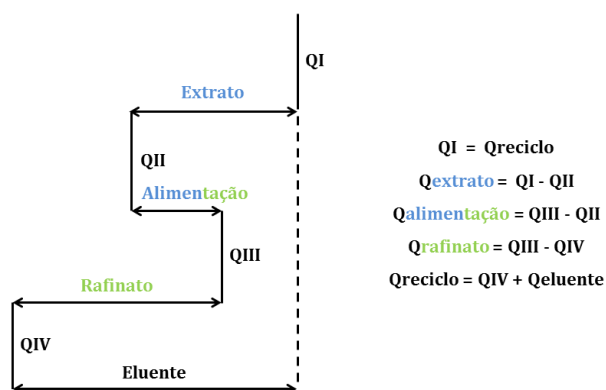


Figura 3. 9 - Esquema ilustrativo do deslocamento da distribuição dos enantiômeros por um ciclo de MCC, após atingir o estado estacionário.

No intuito de se avaliar a influência das vazões sobre o processo de separação, as vazões chamadas externas (alimentação, extrato, refinado, reciclo e eluente) são transformadas em vazões internas (QI, QII, QIII e QIV) por balanço de massa. A Figura 3. 10 apresenta as relações entre as vazões internas e externas, assim como o balanço de massa necessário para a dedução.



**Figura 3. 10** - Esquema ilustrativo do deslocamento da distribuição dos enantiômeros por um ciclo de MCC.

O programa ACS pode ajustar as vazões baseando-se nos sinais dos detectores usados, de ultravioleta ou polarímetro. De maneira geral, para misturas racêmicas o sinal de polarímetro é utilizado; na zona de separação e de limpeza, as vazões QII/QIII e QI/QIV são controladas, respectivamente. O controle é realizado em todos os ciclos e é programado para aperfeiçoar a pureza dos enantiômeros isolados e a produtividade da separação.

O controle das vazões durante os ciclos, utilizando os sinais dos detectores, é possível devido à configuração do sistema multicolunas. A bomba de reciclo e os detectores possuem posições fixas, enquanto que as vazões de alimentação, de eluente, de refinado e de extrato se movem através das colunas, no sentido da vazão da fase móvel. Desta forma, estas quatro posições variam entre as seis colunas pela troca das válvulas, completando 1 ciclo ao retornar a configuração inicial. Todas as posições das zonas passam pela válvula do detector<sup>49</sup> (Figura 3. 11).

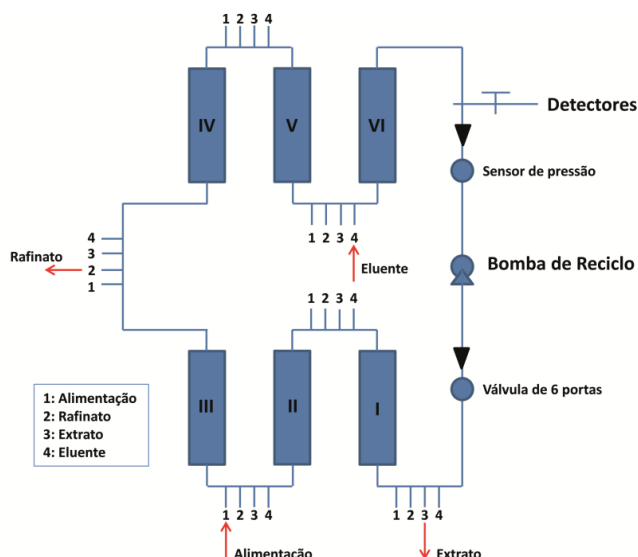


Figura 3. 11 – Esquema da configuração do sistema multicolumnas.

O padrão da configuração inicial do sistema é com a alimentação na posição 3, entre a segunda e a terceira coluna. Já o extrato, o refinado e o eluente estão nas posições 1, 4 e 6, respectivamente. Vale salientar, que dependendo das posições de injeção e coleta, a bomba de reciclo pode estar nas zonas I, II, III e IV, sendo a vazão de reciclo ajustada constantemente.

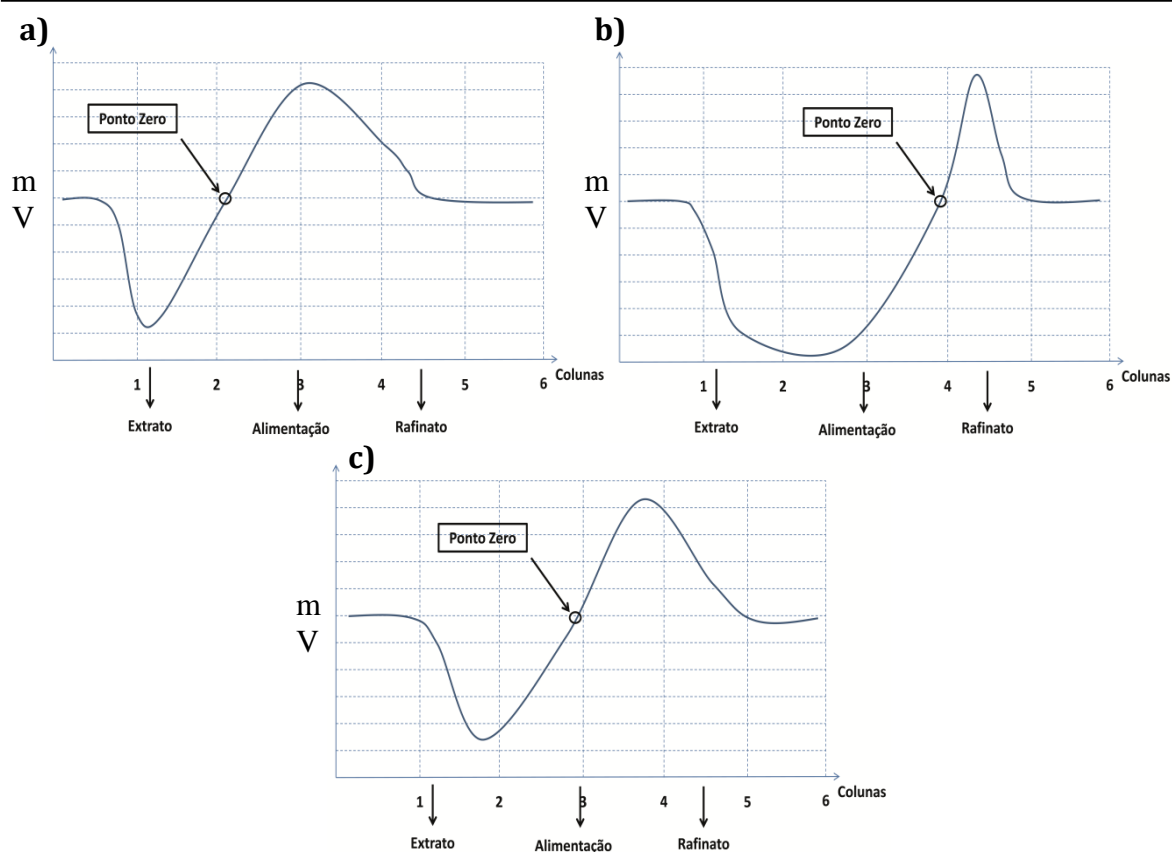
O monitoramento das vazões na zona de separação ocorre de maneira a manter a vazão da alimentação constante, considerando:

$$Q_{III} - Q_{II} = Q_{alimentação}$$

Desta forma, o sinal do polarímetro, quando for igual a zero, deve estar localizado entre as zonas II e III, ou seja, no ponto de alimentação:

$$C_{(+)-enantiômero} = C_{(-)-enantiômero}$$

Se o sinal do polarímetro estiver deslocado no sentido da linha do extrato, a pureza do extrato será baixa. Da mesma forma, caso o sinal do polarímetro estiver localizado próximo à linha do refinado, este enantiômero estará contaminado (Figura 3. 12).

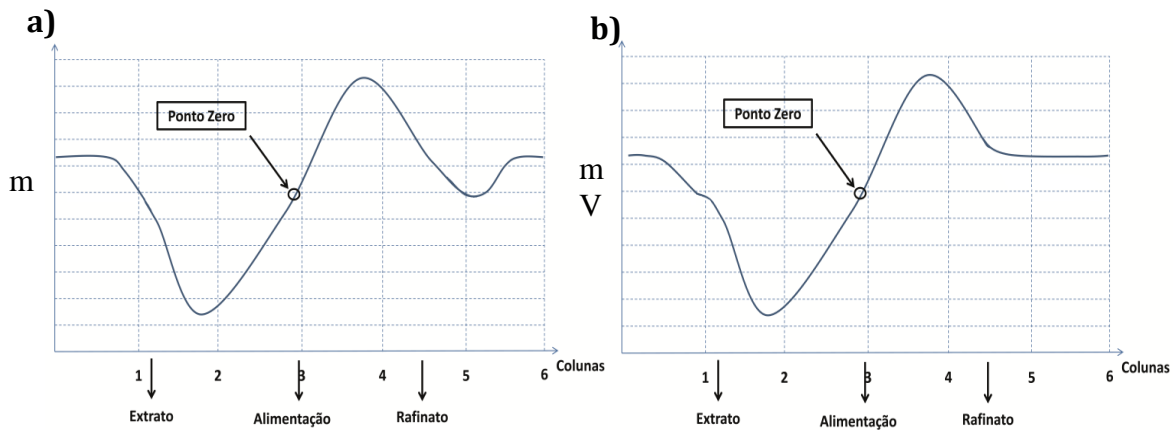


**Figura 3. 12** – Ilustração do ajuste das vazões pelo programa ACS, monitoramento do sinal do polarímetro, **a)** extrato com baixa pureza, **b)** refinado com baixa pureza e **c)** boa pureza para ambos enantiômeros.

No caso da Figura 3. 12a, onde a pureza do extrato não é aceitável, o aumento de QII e QIII deverá ser realizado, na mesma proporção, para que a Qalimentação não seja alterada. Já na Figura 3. 12b as vazões QII e QIII devem ser reduzidas. Estes ajustes nas vazões proporcionarão maior pureza para os enantiômeros coletados.

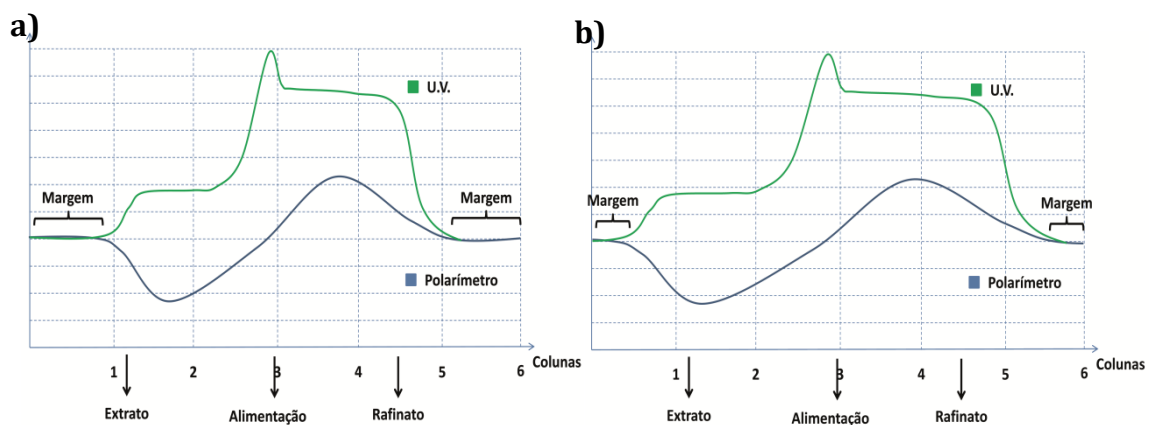
Os ajustes na zona de limpeza ocorrem pela alteração do QI e/ou QIV. No caso de contaminação do extrato pelo refinado na Zona IV (Figura 3. 13), o QIV deverá ser diminuído. Já no caso da contaminação do refinado pelo extrato na Zona I, o QI deverá ser aumentado. Com estes ajustes, a contaminação dos enantiômeros pela zona de limpeza será evitada.





**Figura 3. 13** – Ilustração da contaminação nas zonas I/IV, **a)** contaminação do extrato pelo refinado, **b)** contaminação do refinado pelo extrato.

Os ajustes das vazões nas zonas I/IV são realizados através de pontos pré-estabelecidos e calculados pelo programa ACS, dependendo da opção escolhida. As opções disponíveis são: *soft*, *normal*, *strong*, *hard* e *hardness*. Quanto maior for a rigidez no controle das vazões QI e QIV menor será a chance de ocorrer contaminação pela zonas I/IV. Por outro lado, a contaminação pela zona II/III será mais fácil assim como o aumento da produtividade será mais restrita. A Figura 3. 14 mostra uma ilustração do controle realizado nas zonas I/IV.



**Figura 3. 14** – Ilustração do controle do programa ACS nas zonas I/IV, **a)** Controle *Hardness*, **b)** Controle *Soft*.

No caso do monitoramento pelo detector de ultravioleta o sinal máximo da absorção é marcado como o ponto de alimentação e; portanto, é mantido entre as zonas II e III (Figura 3. 15). Da mesma forma que o monitoramento com o sinal do polarímetro, as margens da zona de limpeza são reguladas para evitar a fuga dos

enantiômeros. Para facilitar o entendimento, o anexo 1, pp.134, apresenta o roteiro de uso do equipamento VARICOL<sup>®</sup>.

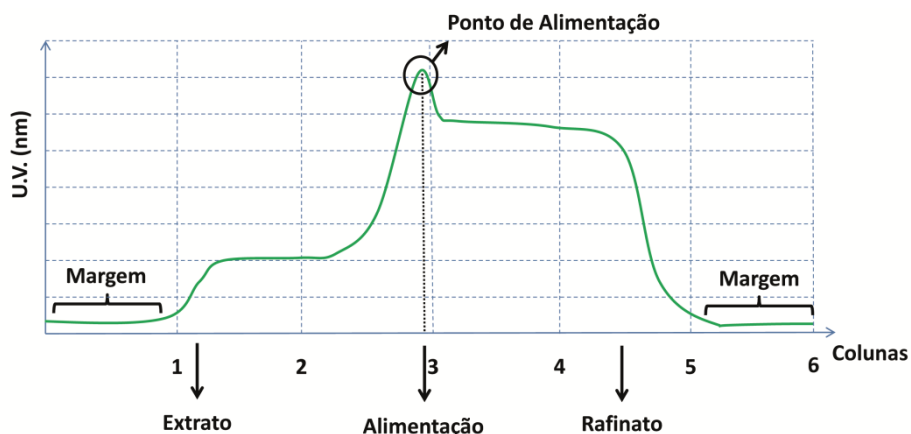


Figura 3. 15 – Controle do ACS com o sinal do ultravioleta.

As separações utilizando o processo VARICOL<sup>®</sup> foram realizadas usando as CSPs CHIRALPAK AS<sup>®</sup>, CHIRALPAK AD<sup>®</sup> e CHIRALCEL OD<sup>®</sup>, de tamanho de partícula de 20  $\mu\text{m}$ . As condições de separação das fases estacionárias CHIRALPAK AS<sup>®</sup> e CHIRALCEL OD<sup>®</sup> foram avaliadas em colunas analíticas (15,0 x 0,46 cm, D.I.) preenchidas com a mesma fase estacionária das colunas preparativas (10,0 x 1,0 cm, D.I.). O poder de discriminação da CHIRALPAK AD<sup>®</sup> foi, entretanto, avaliada, usando uma coluna preparativa similar a usada no VARICOL<sup>®</sup>. As colunas CHIRALPAK AS<sup>®</sup> e CHIRALCEL OD<sup>®</sup> foram preenchidas no laboratório.

### 3.1.1 Preenchimento das colunas quirais de polissacarídeos

A coluna cromatográfica ideal deve possuir alto poder de discriminação quiral, estabilidade e reprodutibilidade. Estes fatores envolvem fenômenos termodinâmicos, relacionados com interações intermoleculares entre a CSP e o analito, assim como fenômenos cinéticos, que descreve como a banda cromatográfica elui pela coluna. Características cinéticas como dimensões das colunas, tamanho das partículas, velocidade da fase móvel, difusão do analito pela coluna e estrutura do leito da fase estacionária são determinantes para a eficiência da coluna<sup>97</sup>.

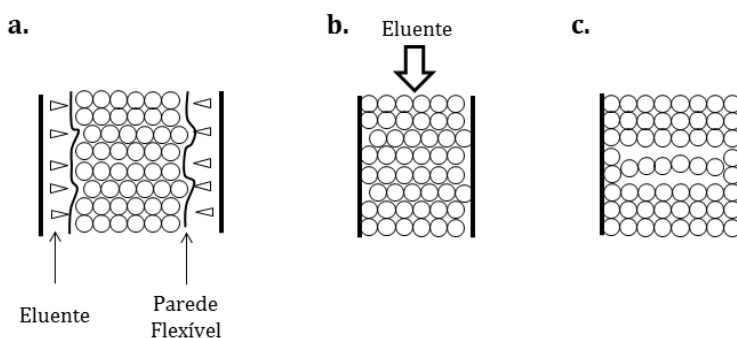
A estrutura do leito cromatográfico é determinada durante o procedimento de preenchimento da coluna, que deve ser seguro, reprodutível e respeitar a integridade da CSP, assim como proporcionar escalabilidade.

Atualmente, as colunas que usam sílica como suporte são preenchidas pela suspensão da fase estacionária (*slurry*), destacando-se os métodos radial e axial. No

primeiro, uma parede flexível composta de um plástico inerte é colocada entre a fase estacionária e o tubo de aço inox. O eluente permanece entre a parede inerte e a parede do tubo, após a suspensão da fase estacionária ser inserida na coluna cromatográfica, inicia-se o processo de compressão e descompressão radial<sup>97</sup> (Figura 3. 16a).

O processo de dispersão axial é mais simples do que o de dispersão radial, neste caso a suspensão é colocada em um tubo pré-coluna cromatográfica, em seguida uma bomba (10000 psi) é ativada de modo a transportar a fase estacionária do tubo para a coluna, pelo movimento da fase móvel<sup>97</sup> (Figura 3. 16b).

Estes dois métodos podem proporcionar a boa sedimentação do leito cromatográfico, de maneira a evitar volume morto e/ou a formação de pontes, que são espaços formados devido a forças friccionais entre as partículas terminais e a parede da coluna cromatográfica<sup>97</sup> (Figura 3. 16c).

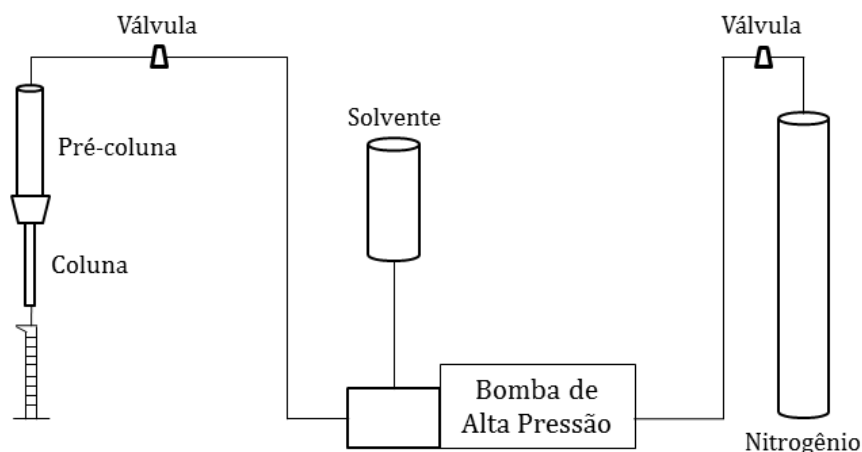


**Figura 3. 16 – a) Esquema da compressão radial, b) Esquema da compressão axial, c) Ponte do leito cromatográfico.**

As fases quirais foram preenchidas através do método de dispersão axial. Inicialmente, as tubulações foram limpas segundo o protocolo de Karger<sup>98</sup> para retirar os resíduos provenientes do preparo das tubulações.

Para o preenchimento das colunas CHIRALCEL OD<sup>®</sup> utilizou-se etanol como fase móvel, já para o preparo das colunas CHIRALPAK AS<sup>®</sup> utilizou-se mistura de etanol/2-propanol, no intuito de aumentar-se a viscosidade do eluente e em consequência a pressão de empacotamento. As suspensões foram colocadas no banho de ultrassom para dispensar agregados.

A Figura 3. 17 ilustra o esquema do equipamento utilizado para preencher as colunas.



**Figura 3. 17** –Esquema de preenchimento de colunas cromatográficas.

A acomodação do leito cromatográfico foi feito pelo condicionamento da coluna, que se deu por 24 horas com *n*-hexano/etanol (90:10) como fase móvel. A eficiência da coluna foi avaliada pela separação do padrão cromatográfico base de Trogër em *n*-hexano/etanol (90:10).

No total foram preparadas 9 colunas CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (10 x 1,0 cm de D.I.), 2 CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (15 x 0,46 cm de D.I.), 9 colunas CHIRALPAK AS<sup>®</sup> (10 x 1,0 cm de D.I.) e 2 colunas CHIRALPAK AS<sup>®</sup> (15 x 0,46 cm de D.I.). A Tabela 3. 2 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos para a separação da base de Trogër, pelas colunas cromatográficas preenchidas.

Tabela 3. 2 – Parâmetros cromatográficos obtidos para as separações da base de trôger nas colunas cromatográficas preenchidas.

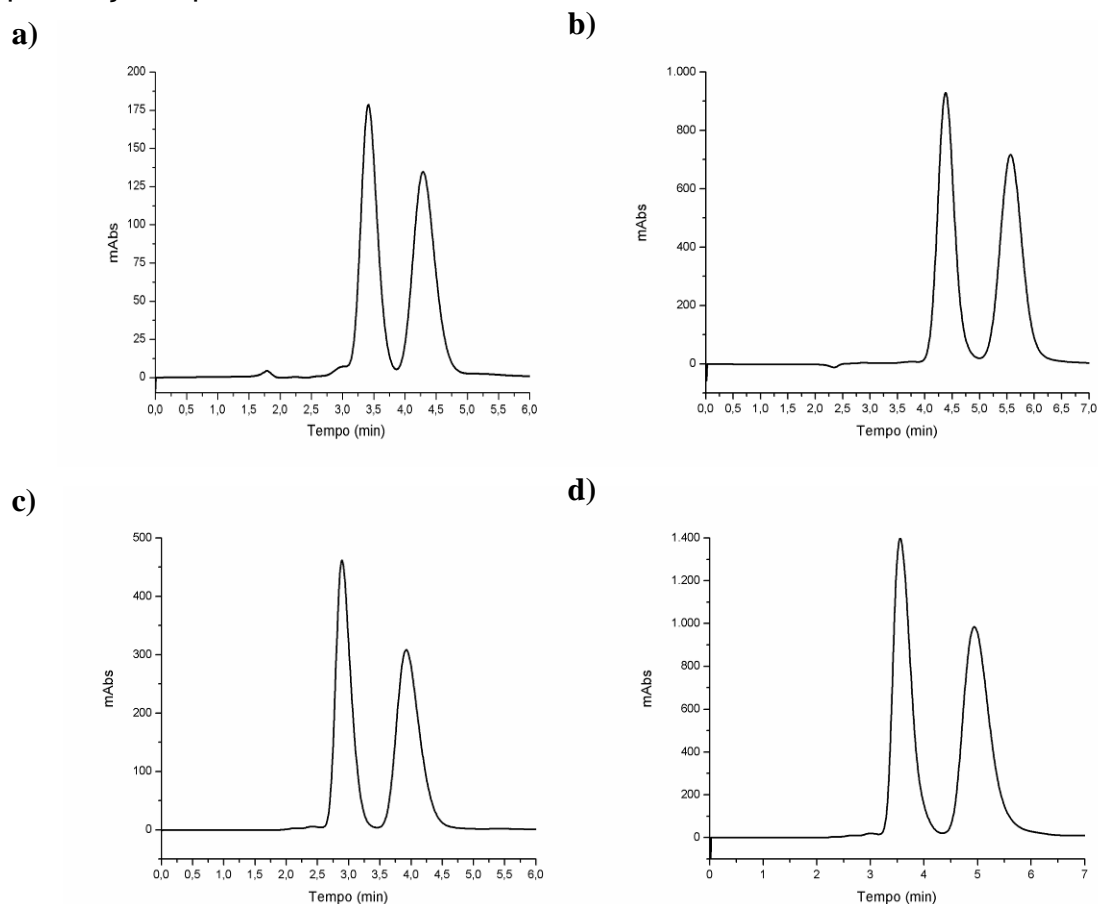
<b>CHIRALCEL OD® (15 x 0,46 cm)<sup>a</sup></b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>α</b>	<b>Rs</b>	<b>N(médio)</b>
I	0,91	1,60	1,66	716
II	0,93	1,53	1,50	712
III	0,94	1,52	1,51	724
Coeficiente de Variação (%)	1,65	2,81	5,76	0,85
<b>CHIRALCEL OD® (10 x 1,0 cm)<sup>b</sup></b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>α</b>	<b>Rs</b>	<b>N(médio)</b>
I	4,23	1,62	1,92	878
II	4,12	1,35	1,50	847
III	4,17	1,27	1,50	694
IV	4,23	1,55	1,93	1092
V	4,25	1,46	1,44	850
VI	4,30	1,48	1,53	863
VII	4,37	1,56	1,84	929
VIII	4,30	1,51	1,72	1004
IX	4,38	1,54	1,70	837
Coeficiente de Variação (%)	2,02	7,55	10,71	12,64
<b>CHIRALPAK AS® (15 x 0,46 cm)<sup>a</sup></b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>α</b>	<b>Rs</b>	<b>N(médio)</b>
I	2,88	1,90	1,79	567
II	2,93	1,86	1,67	635
III	2,95	1,80	1,55	611
Coeficiente de Variação (%)	1,23	2,81	7,19	5,71
<b>CHIRALPAK AS® (10 x 1,0 cm)<sup>b</sup></b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>α</b>	<b>Rs</b>	<b>N(médio)</b>
I	3,41	1,96	2,01	867
II	3,49	2,14	1,98	850
III	3,45	2,11	1,75	820
IV	3,40	2,00	1,90	832
V	3,42	2,06	1,95	860
VI	3,50	1,90	1,93	842
VII	3,46	2,09	1,86	833
VIII	3,35	1,99	1,82	821
IX	3,53	2,03	1,97	839
Coeficiente de Variação (%)	2,25	3,79	4,50	1,93

a Fase Móvel: *n*-hexano/etanol (90:10), 1,0 mL/min, 254nm, volume de injeção:25 µL, conc.: 0,1mg/mL.

b Fase Móvel: *n*-hexano/etanol (90:10), 2,5 mL/min, 254nm, volume de injeção:25 µL, conc.:100 mg/mL.

Apesar dos baixos valores de pratos teóricos, referente ao grande tamanho de partícula das fases estacionárias (20 µm), as CSPs apresentaram alto poder de discriminação quiral para a separação do padrão. Observa-se também a reprodutibilidade entre as colunas preparadas, através dos baixos valores de coeficientes de variação obtidos, para os parâmetros cromatográficos avaliados. É fundamental, para processos MCCs, que as colunas cromatográficas utilizadas, apresentem enantiorresolução semelhante<sup>62</sup>.

A Figura 3. 18 apresenta cromatogramas selecionados do desempenho cromatográfico das colunas preparadas. São observadas bandas cromatográficas simétricas, o que indica a formação homogênea do leito cromatográfico, sem a presença de pontes e/ou volume morto.



**Figura 3. 18** – Cromatogramas obtidos para a separação da Base de Troger pela **a)** coluna analítica II, **b)** coluna preparativa VII; ambas de fase estacionária CHIRALCEL OD® e **c)** colunas analítica III, **d)** coluna preparativa III; ambas de fase estacionária CHIRALPAK AS®.

### 3.1.2 Avaliação da enantiorresolução dos fármacos selecionados para a separação no VARICOL®

As fases quirais de polissacarídeos podem ser utilizadas no modo multimodal<sup>99,100</sup>, a polaridade intermediária do seletor quiral faz com que no modo normal, a fase móvel seja mais apolar do que a CSP e no modo polar orgânico (M.P.O.) ou reverso a fase móvel seja mais polar do que a CSP. De maneira geral, no modo normal a retenção segue o perfil da polaridade, ou seja, quanto mais polar a fase móvel menor retenção para os analitos<sup>99-102</sup>. No modo polar orgânico o perfil

de retenção é governado, majoritariamente, pelas ligações de hidrogênio formado entre o analito e a CSP, desta forma a predição da retenção pela polaridade não pode ser aplicada<sup>73,102,103</sup>.

Devido ao alto poder de discriminação quiral e a complementaridade entre as fases estacionárias de polissacarídeos, principalmente entre a CHIRALPAK AD<sup>®</sup>, CHIRALPAK AS<sup>®</sup> e CHIRALCEL OD<sup>®</sup>, a maioria das misturas enantioméricas podem ser resolvida por estas CSPs<sup>71</sup>.

Aditivos de fase móvel podem ser utilizados para suprimir interações indesejadas entre os analitos e o suporte, que podem causar alargamento e deformação da banda cromatográfica. Utilizam-se aditivos voláteis, como ácido trifluoro acético (TFA) no caso de compostos ácidos e dietilamina (DEA) ou trietilamina (TEA) no caso de compostos básicos. Vale salientar, que todos os aditivos devem ser voláteis para facilitar o isolamento dos compostos enantiopuros<sup>104</sup>.

Baseado em procedimentos de triagem em colunas de polissacarídeos<sup>36,89</sup>, desenvolveu-se um método de avaliação da capacidade de enantiorresolução das colunas de polissacarídeos para os fármacos albendazol sulfóxido (ABZO), atenolol e modafinil (Figura 3. 19). Foram utilizadas as colunas analíticas CHIRALPAK AS<sup>®</sup> e CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (15 x 0,46 cm de D.I., 20 µm) preenchidas e a coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10 x 1,0 cm de D.I., 20 µm).

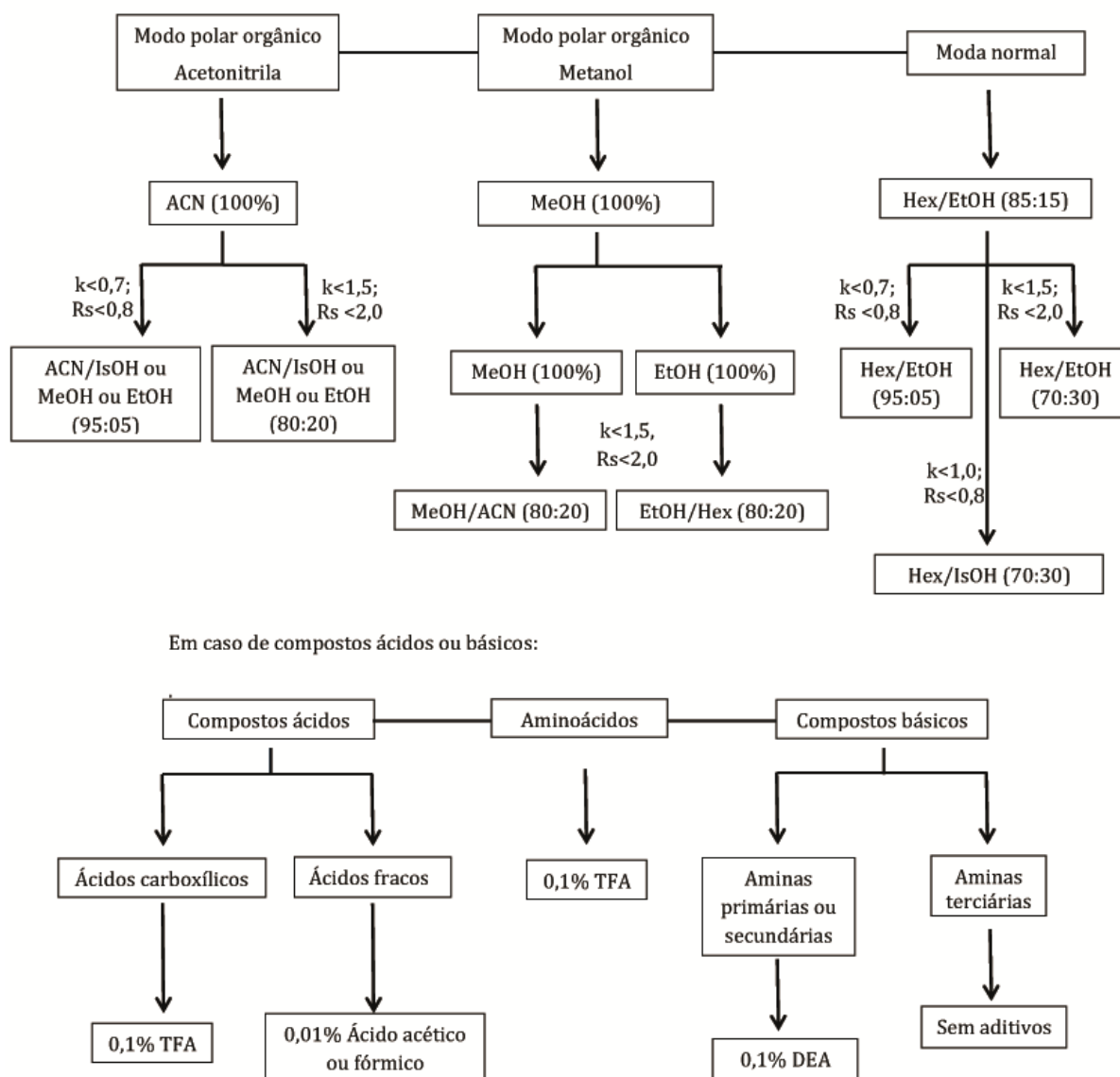


Figura 3. 19 – Esquema utilizado para a avaliação das condições de separação.

Iniciou-se a avaliação, no modo polar orgânico, utilizando-se MeOH (100%) como fase móvel, trata-se de um eluente menos custoso e de simples recuperação. O uso de ACN (100%) como fase móvel foi avaliado apenas em casos que outras fases móveis não foram eficientes, devido ao alto custo. Em seguida, utilizou-se o modo normal de eluição com etanol (EtOH) ou 2-propanol (IsOH) como modificadores, este modo de eluição permite uma maior interação dos analitos com a CSP, já que a utilização de um maior percentual de hidrocarboneto na fase móvel proporciona o aumento da transferência de massa entre os analitos e as CSPs, aumentando a retenção. A seção 5.3.1.2 pp. 113, descreve detalhadamente o procedimento da busca pelas condições de separação para os fármacos selecionados.



A Tabela 3. 3 apresenta as melhores condições de separação obtidas para os fármacos selecionados, nas colunas de polissacarídeos.

**Tabela 3. 3 – Parâmetros cromatográficos obtidos para as melhores separações dos fármacos selecionados.**

Compostos	Condição de Separação	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
modafinil	CHIRALPAK AD <sup>®</sup> <i>n</i> -hexano/etanol (70:30), 2,5 ml/min	3,56	1,44	1,41
	CHIRALPAK AD <sup>®</sup> metanol (100%), 2,5 ml/min	0,45	1,94	1,50
albendazol sulfóxido	CHIRALPAK AD <sup>®</sup> <i>n</i> -hexano/etanol (70:30) 2,5 ml/min	7,25	2,33	3,10
	CHIRALPAK AD <sup>®</sup> metanol (100%), 2,5 ml/min	1,60	3,13	4,05
atenolol	CHIRALCEL OD <sup>®</sup> <i>n</i> -hexano/etanol/DEA (80:20:0,1%) 1,0 ml/min	5,16	1,59	1,30

As colunas de polissacarídeos apresentaram bom poder de enantiorresolução para os fármacos avaliados. O modafinil e o albendazol sulfóxido foram separados com alta enantiosseletividade pela coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup>, sobretudo com metanol (100%) como fase móvel. Já o atenolol foi resolvido apenas na coluna CHIRALCEL OD<sup>®</sup> no modo normal de eluição, neste caso a utilização de DEA como aditivo da fase móvel foi imprescindível, para a obtenção da enantiorresolução.

A escolha de fases móveis para processos de cromatografia em escala preparativa precisa considerar fatores relevantes, em especial, a solubilidade. O modo polar orgânico (acetonitrila, metanol, etanol, 2-propanol) devem ser utilizadas, preferencialmente, já que proporcionam maior solubilidade para os analitos<sup>89</sup>.

Os fármacos aqui selecionados possuem polaridade de intermediária à alta, portanto misturas de fases móveis do modo normal, que contem hidrocarbonetos, não são capazes de solubiliza-los com eficiência (Tabela 3. 4).

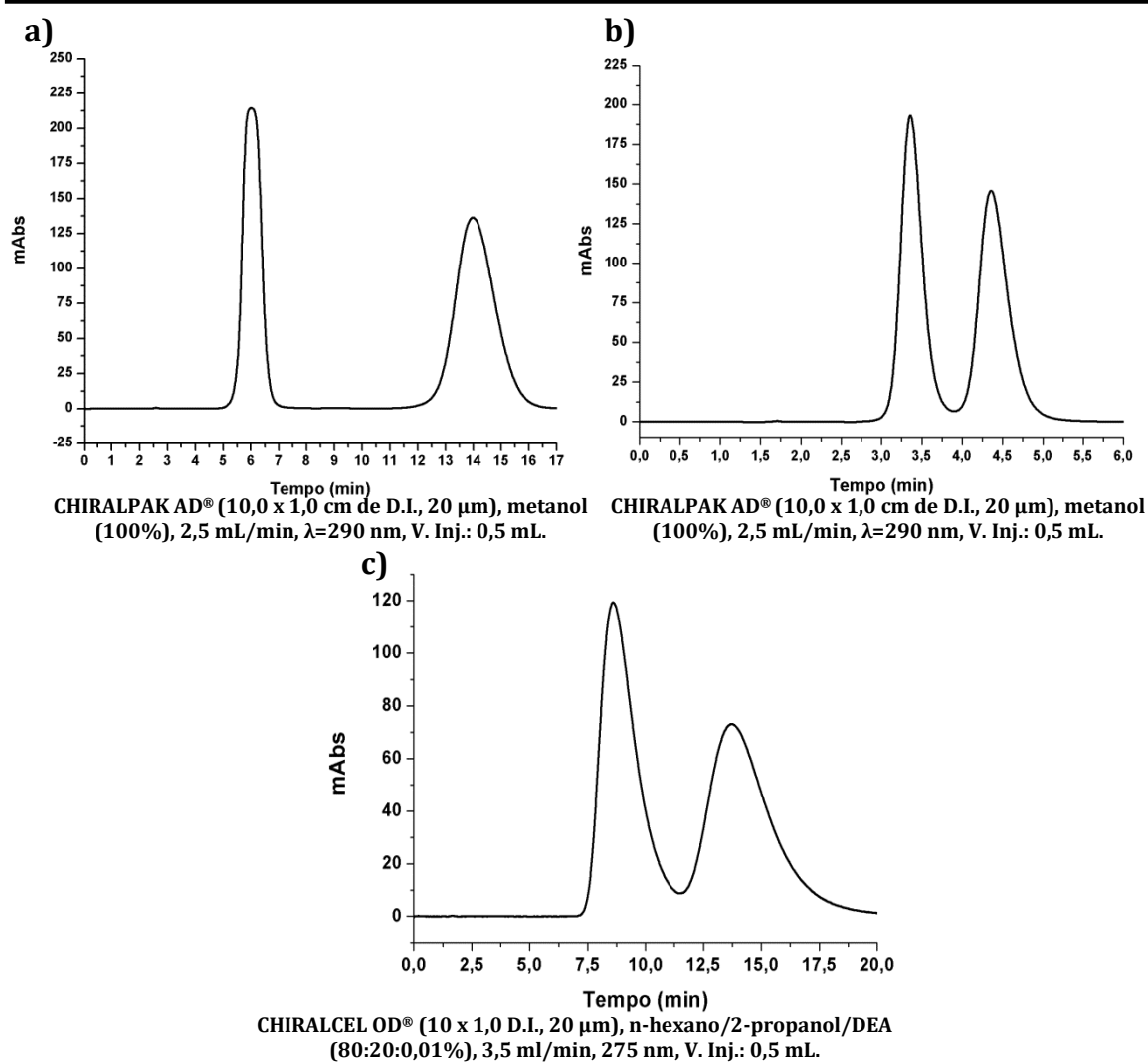
**Tabela 3. 4 – Solubilidade dos fármacos selecionados**

Fármacos	Solubilidade* (mg/ml)	
	modo polar orgânico	modo normal
albendazol sulfóxido	6,25	< 1,0
modafinil	20,0	<1,0
atenolol	8,0	1,50

\* Temperatura ambiente

Além da maior solubilidade, as separações no modo polar orgânico são, em geral, menos retensivas, proporcionando no caso dos procedimentos de MCC separações com menor tempo de ciclo. Outro fator a ser considerado é a recuperação do eluente utilizado, sendo assim fases móveis com menos misturas de solventes e sem aditivo é preferencial. Os aditivos de fase móvel só são utilizados em casos em que são indispensáveis, pois durante o isolamento dos enantiômeros a etapa da neutralização pode ser necessária.

Baseado nos resultados obtidos, escolheu-se a coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> com metanol (100%) para a purificação enantiomérica do albendazol sulfóxido e do modafinil. Como não encontrou-se outra condição de separação para o atenolol nas colunas de polissacarídeos, o estudo de sua separação no VARICOL<sup>®</sup> foi realizada com a coluna CHIRALCEL OD<sup>®</sup> no modo normal de eluição. A Figura 3. 20 demonstra os cromatogramas das separações obtidas para os fármacos nas condições de separação para o VARICOL<sup>®</sup>.



**Figura 3. 20** – Cromatogramas das separações do **a)** albendazol sulfóxido (1,0 mg/mL) **b)** modafinil (1,0 mg/ml) **c)** atenolol (1,0 mg/ml).

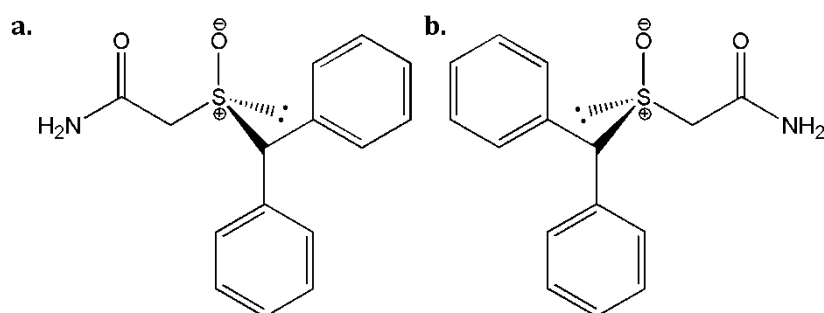
### 3.1.3 Modafinil: purificação enantiomérica pelo processo VARICOL®

O modafinil, (*R,S*)-[2-(difenil)metanosulfinil] acetamida, é um fármaco neurotrópico utilizado em casos de narcolepsia, doença caracterizada por uma sensação irresistível de sono. Este fármaco possui vantagens em relação aos demais fármacos administrados no tratamento de narcolepsia, como anfetamina e os derivados de metilfenidato, já que não possui efeitos colaterais, tais como distúrbios de atenção, riscos cardiovasculares e potencial para ser utilizado como droga de abuso<sup>105,106</sup>.

O modafinil é um fármaco quiral e, inicialmente, foi introduzido como mistura racêmica. Atualmente, este fármaco é administrado tanto em sua forma racêmica como na forma enantiomericamente pura – armodafinil ou (*R*)-(-)-modafinil<sup>107</sup>. O

mecanismo de atuação destes fármacos não é inteiramente conhecido, porém sabe-se que atuam na inibição do transporte de dopamina<sup>106</sup>.

Apesar dos dois enantiômeros do modafinil (Figura 3. 21) possuírem efeito inibitório contra o transporte de neurotransmissores, diferentes propriedades farmacológicas são atribuídas a estes compostos<sup>105,108</sup>. A principal vantagem do uso do (*R*)-(-)-modafinil ao invés do (*S*)-(+)-modafinil ou da mistura racêmica é o diferente tempo de eliminação pelo organismo, estudos farmacológicos afirmam que o (*S*)-(+)-modafinil é eliminado três vezes mais rápido que o (*R*)-(-)-modafinil<sup>106</sup>. Esta propriedade influencia diretamente na dosagem do fármaco administrado, já que dosagens maiores ou mais freqüentes do (*S*)-(+)-modafinil ou da mistura racêmica se faz necessário para se ter o mesmo efeito neurotrópico do (*R*)-(-)-modafinil<sup>106</sup>.



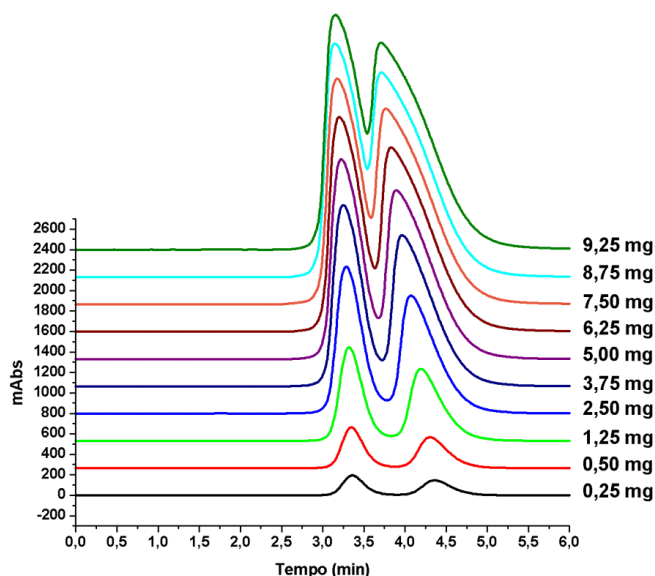
**Figura 3. 21** – Estrutura química, **a)** (*R*)-(-)-modafinil e **b)** (*S*)-(+)-modafinil.

Métodos de obtenção dos enantiômeros do modafinil em larga escala (kg/dia), por EBC, SMB e por cristalização já estão descritos na literatura<sup>107</sup> para este fármaco. Todavia, o conhecimento dos detalhes dos métodos, como influência dos parâmetros fundamentais - vazões internas, externas e concentração de alimentação - é restrito e por isto, este composto foi selecionado para os estudos pelo processo VARICOL<sup>®</sup>.

Além disso, a investigação dos detalhes da separação do modafinil pelo processo VARICOL<sup>®</sup>, nas condições de separação encontrada, é um estudo de caso interessante, já que a resolução do fármaco apresentou enantiosseletividade próximo a 2,0, enantiorresolução de 1,50 e baixo fator de retenção, fatores que limitam o aumento da carga em separações por EBC.

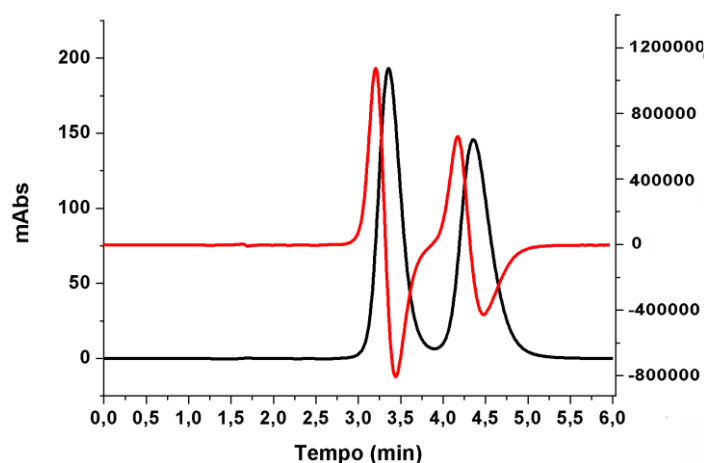
Para isso, diferentes concentrações de modafinil foram injetadas em uma coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10 x 1,0 cm D.I., 20 μm), idêntica as utilizadas no sistema VARICOL<sup>®</sup>, no intuito de se determinar as interações entre os enantiômeros e a fase

estacionária, em condições diluídas e concentradas. A Figura 3. 22 demonstra os cromatogramas de sobrecarga obtidos, para as diferentes massas de injeção.



**Figura 3. 22** – Cromatogramas de sobrecarga para o modafinil, CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10 x 1 cm de D.I., 20  $\mu$ m), metanol (100%), 2,5 ml/min,  $\lambda$ =270 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml, 35°C.

Os primeiros pontos de inflexão das bandas cromatográficas, necessários para se fazer as previsões das condições iniciais de operação do VARICOL<sup>®</sup>, foram determinados através da primeira derivada dos cromatogramas. Desta forma, através dos gráficos formados, facilmente se identifica os tempos das injeções de sobrecarga (Figura 3. 23).



**Figura 3. 23** – 1<sup>o</sup> derivada do cromatograma da separação do modafinil (0,5 mg/ml), CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10 x 1 cm de D.I., 20  $\mu$ m), metanol (100%), 2,5 ml/min,  $\lambda$ =270 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml.

A Tabela 3. 5 demonstra os parâmetros cromatográficos obtidos para a separação do modafinil durante o estudo de sobrecarga de massa. É importante observar que com o aumento da concentração da mistura racêmica há, de maneira geral, a diminuição de todos os parâmetros avaliados, indicando a saturação dos sítios de adsorção e o aumento da competição entre os enantiômeros e a fase estacionária<sup>95</sup>.

**Tabela 3. 5 – Parâmetros cromatográficos obtidos através do estudo de sobrecarga do modafinil.**

Concentração (mg/ml)	Rs	N	tr <sub>1</sub>	tr <sub>2</sub>
0,25	1,68	659	3,24	4,21
0,50	1,60	648	3,23	4,15
1,25	1,21	482	3,20	4,05
2,50	1,14	451	3,16	3,94
3,75	0,97	413	3,12	3,85
5,00	0,80	300	3,09	3,77
6,25	0,68	244	3,07	3,71
7,50	0,59	205	3,04	3,65
8,75	0,53	179	3,02	3,60
9,25	0,49	160	3,02	3,60

\*CHIRALPAK AD® (10 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 2,5 ml/min, λ=270 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml

As isotermas de adsorção de Langmuir competitiva calculadas pelo programa HELP 10.3, baseia-se no método de tempo de retenção<sup>49</sup>. Para os enantiômeros do modafinil obteve-se:

$$q_{R(-)} = 0,7C_{R(-)} + \frac{0,4106C_{R(-)}}{1 + 0,0513C_{R(-)} + 0,1209C_{S(+)}}$$

$$q_{S(+)} = 0,7C_{S(+)} + \frac{0,9676C_{S(+)}}{1 + 0,1209C_{S(+)} + 0,0513C_{R(-)}}$$

Onde,  $q_i$  é a concentração do soluto (i) na fase estacionária,  $C_i$  é a concentração do soluto (i) na fase móvel.

Por se tratar de um processo contínuo, as separações por MCCs não são realizadas com a concentração de alimentação igual a solubilidade máxima da mistura racêmica. Isto é feito para evitar a precipitação da mistura no interior do sistema cromatográfico, resultando na necessidade de se reiniciar o processo de separação ou até mesmo na degradação das colunas cromatográficas.

Para a separação do modafinil avaliou-se a influência de três concentrações de alimentação, sendo elas de 75%, 50% e 25% da solubilidade da mistura racêmica.

*Concentração de Alimentação: 15 g/L*

Inicialmente, calculou-se os parâmetros de operação do VARICOL<sup>®</sup> utilizando-se 15 g/L como concentração da alimentação (Tabela 3. 6).

**Tabela 3. 6 – Parâmetros iniciais de operação do VARICOL<sup>®</sup> para a separação do modafinil.**

Reciclo	Alimentação	Extrato	Vazões (ml/min)		QI	QII	QIII	QIV
			Refinado	Eluente				
10,13	0,62	1,55	2,61	3,54	10,13	8,58	9,20	6,59
Zonas								
I	II		III	IV		Período		
0,98	2,55		1,40	1,07		1,09		

Os parâmetros de controle do programa ACS para a separação do modafinil foram, inicialmente, escolhidos de maneira a garantir um controle rígido nas margens entre as zonas I e IV. Além disso, estipulou-se altas purezas teóricas, o monitoramento das vazões QII e QIII e o composto alvo foi determinado como sendo o (*R*)-(-)-modafinil ou refinado (Tabela 3. 7).

**Tabela 3. 7 – Parâmetros determinados para o ACS para a separação do modafinil.**

Pureza enantiomérica	refinado	extrato
		98%
Composto alvo	refinado	
Controle da zona de separação	QII/QIII	
Detector	polarímetro	
Controle da zona de limpeza	Zona I	Zona IV
	<i>Hard</i>	<i>Hard</i>

Após o início do processo VARICOL<sup>®</sup>, atingiu-se o estado estacionário com 15 ciclos, em seguida ligou-se o ACS. No total, os enantiômeros foram coletados durante 50 ciclos (438 minutos), iniciando-se no ciclo 16. A Tabela 3. 8 apresenta as alterações nas vazões realizadas pelo programa ACS, durante o processo de isolamento dos enantiômeros do modafinil.

Tabela 3. 8 – Vazões internas ajustadas pelo ACS para a separação do modafinil (15 g/L).

Vazão*/Ciclo	15	16	23	30	37	44	51	58	65	66
QI	10,1	10,11	9,61	9,13	8,71	8,49	8,45	8,42	8,35	9,16
QII	8,58	8,74	9,16	8,91	9,10	8,92	8,92	8,77	9,25	8,73
QIII	9,20	9,36	9,78	9,53	9,72	9,54	9,54	9,39	9,87	9,35
QIV	6,59	6,37	6,70	6,69	7,04	7,02	7,15	7,18	7,11	6,75

\* ml/min.

Ao avaliar os valores da Tabela 3. 8, percebe-se uma tendência nos ajustes das vazões internas durante o processo de separação. As vazões da zona de limpeza foram alteradas para aumentar a concentração dos enantiômeros nas linhas do refinado e extrato, logo ocorreu a diminuição do QI e o aumento do QIV.

De maneira geral, as vazões internas da zona de separação (QII e QIII) foram aumentadas, para evitar a contaminação do extrato pelo refinado na zona II (Figura 3. 24).

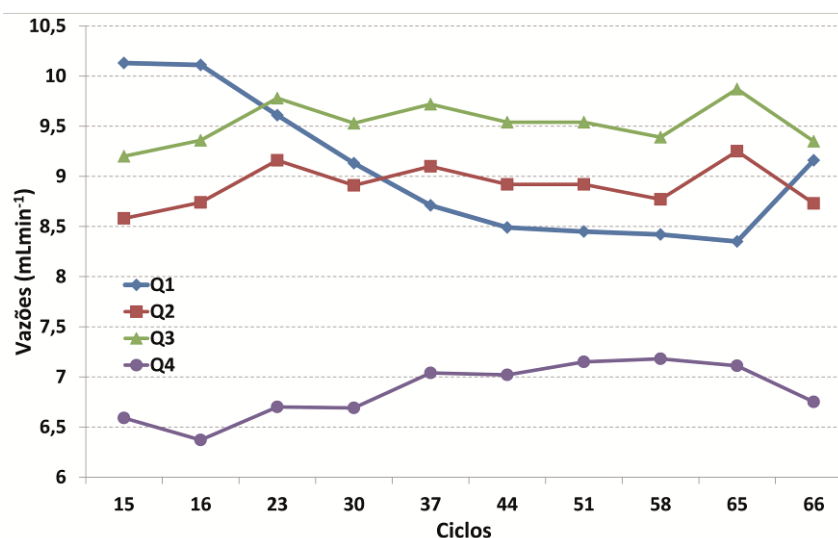


Figura 3. 24 - Ajustes das vazões internas pelo ACS durante a separação do modafinil (15 g/L).

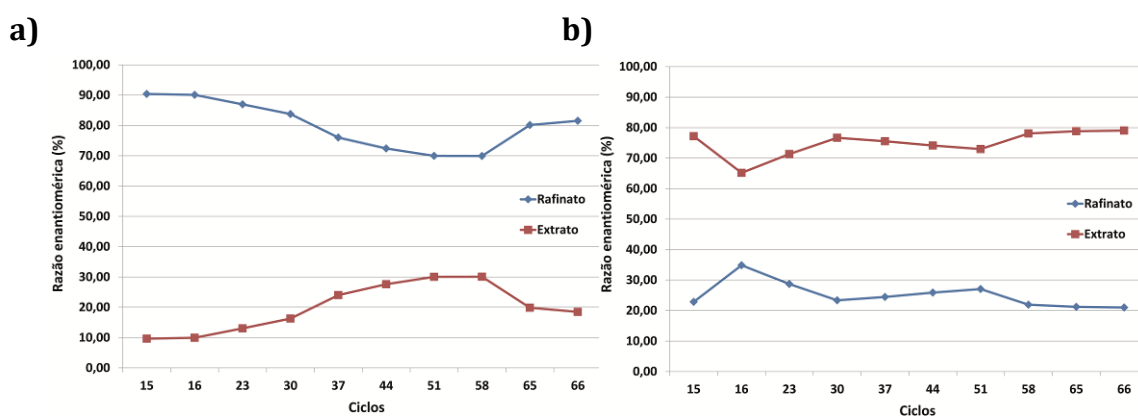
O processo de separação foi encerrado no ciclo 66, devido às baixas purezas dos enantiômeros, que estavam sendo coletados. Além disso, houve ocorrência de uma anormalidade nas alterações realizadas pelo ACS, entre o ciclo 65 e 66, as vazões QI, QII, QIII e QIV foram alteradas em 0,81; 0,52; 0,52 e 0,36 ml/min.

As amostras do refinado e do extrato foram coletadas durante o processo de separação e suas purezas enantioméricas foram medidas, independentemente, no



intuito de se avaliar a eficiência dos ajustes realizados pelo ACS e também ter-se ideia da razão enantiomérica final do refinado e do extrato.

As baixas purezas obtidas para as amostras dos enantiômeros coletadas, durante os ciclos, indicam a ineficiência do ACS ao monitorar as vazões. Isto é evidente ao observar as purezas do refinado, ao atingir o estado estacionário (ciclo 15) a razão enantiomérica do (R)-(-)-modafinil já era de 90,4%, após ligar o ACS ocorreu uma diminuição gradativa desta pureza até atingir 69,9% (Figura 3. 25a).



**Figura 3. 25 - Purezas obtidas durante a separação do modafinil (15 g/L) nas linhas de a) refinado b) extrato.**

Por outro lado, a pureza do extrato sofreu poucas alterações, do ciclo 15 ao ciclo 66, a variação foi de 77,1% à 80,0% (Figura 3. 25b). As mudanças nas vazões internas realizadas pelo ACS resultaram em um aumento de fuga do extrato na zona I, resultando em alta concentração de extrato na linha do refinado.

O pequeno aumento nas vazões QII e QIII não foram suficientes para reduzir a contaminação do extrato pelo refinado na zona II. Por fim, o aumento de QIV proporcionou maiores concentrações de refinado na linha de coleta, não ocorrendo fuga deste enantiômero na zona IV.

Ao observar os cromatogramas da separação percebe-se que as mudanças realizadas pelo ACS prejudicaram, claramente, a zona de limpeza, mesmo com o sistema no estado estacionário. Antes do ACS ser ligado (ciclo 15) tinha-se pouca contaminação na região do eluente ou zona I/IV (região amarela), após ligar o ACS e com as vazões estabilizadas (ciclo 25), é possível perceber a contaminação do extrato e do refinado na região do eluente (Figura 3. 26).

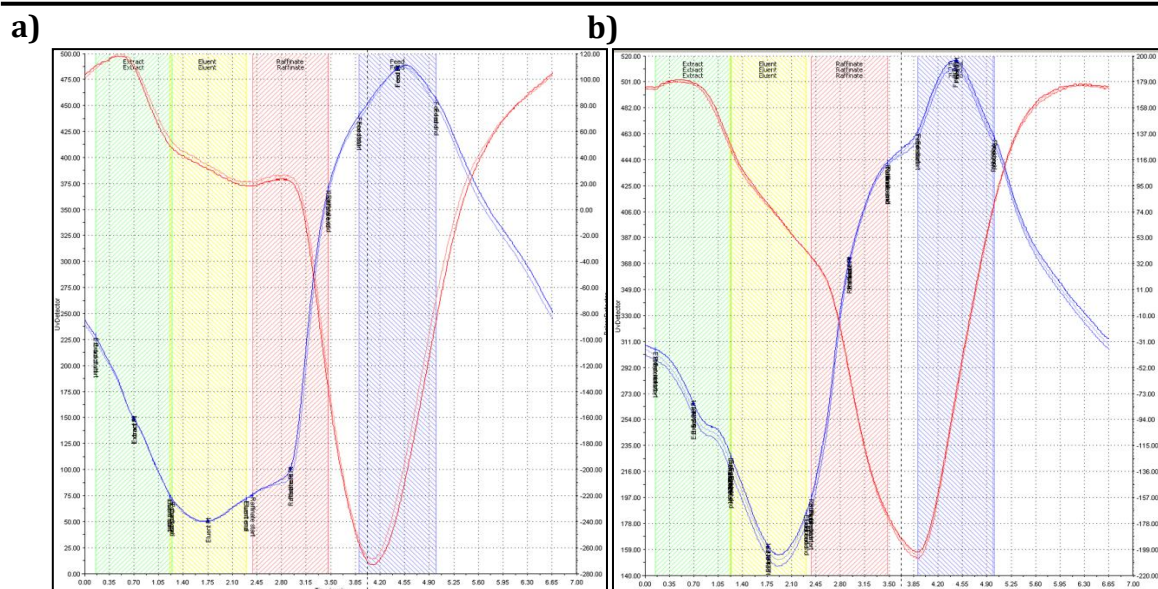


Figura 3. 26 – Cromatograma para a separação do modafinil (15 g/L) **a)** ciclo 15, **b)** ciclo 25.

Por outro lado, com os ajustes realizados pelo ACS a distribuição dos enantiômeros, através de um ciclo, ficou centralizada (Figura 3. 26), indicando que a contaminação nas zonas II/III ocorreu, majoritariamente, devido ao alargamento das bandas cromatográficas. O  $X_c$  destacado na figura abaixo, demonstra que o ponto de inflexão do sinal de polarímetro foi alterado de 40% para 50%. Ao observar o perfil interno teórico do ciclo 15 e ciclo 25 (Figura 3. 27), percebe-se que as margens da zona de limpeza foram prejudicadas com os ajustes realizados pelo ACS.

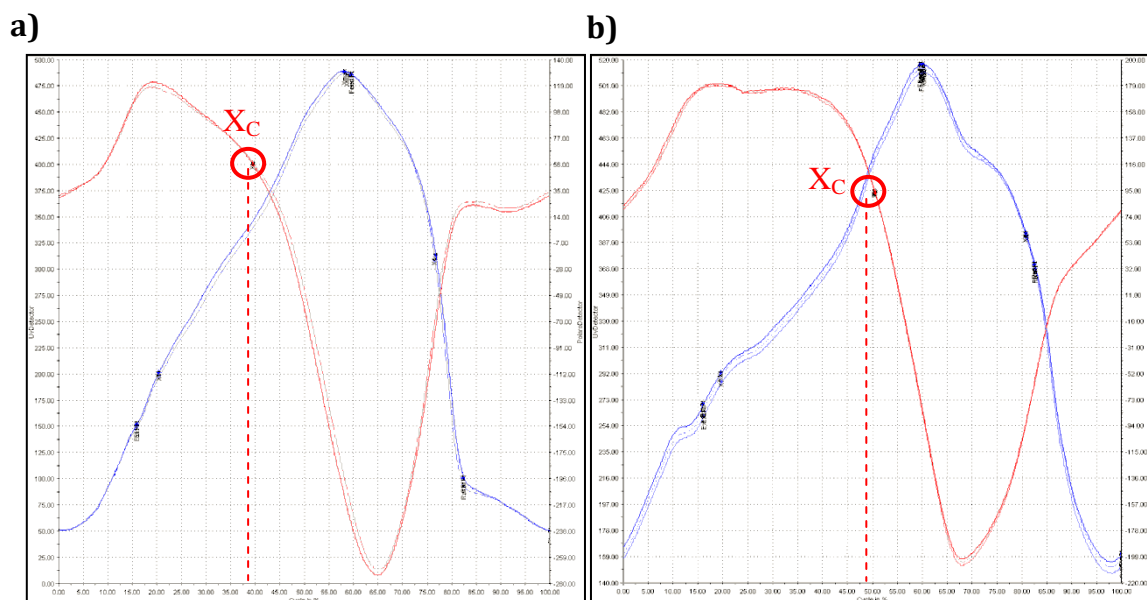


Figura 3. 27 – Perfil interno de concentração do ACS para a separação do modafinil (15 g/L) **a)** ciclo 15, **b)** ciclo 25.

Durante o ciclo 51, amostras foram coletadas para se traçar o perfil interno de concentração, este ciclo foi escolhido devido a estabilidade nas alterações das vazões. Através do perfil interno de concentração experimental, é possível verificar a real distribuição dos enantiômeros pelas diferentes posições durante um ciclo.

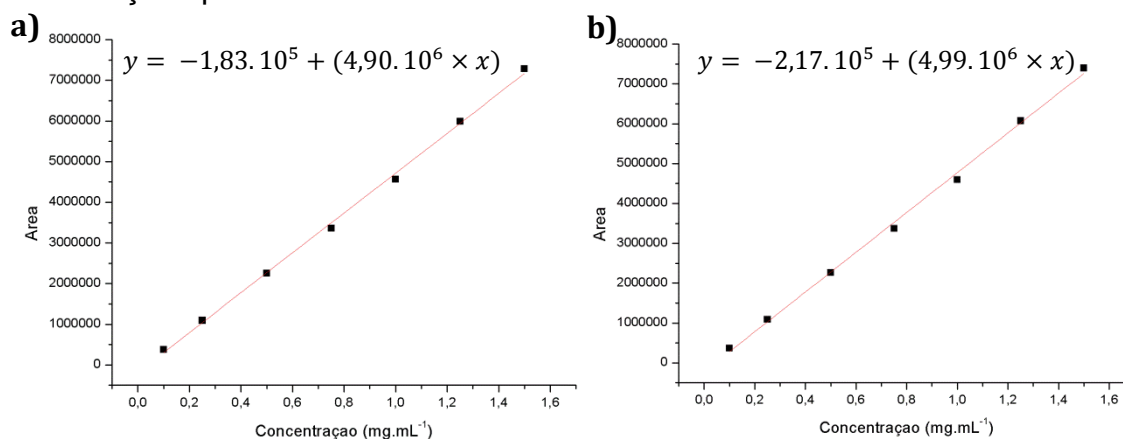
Os pontos de coleta durante este ciclo estão apresentados na (Tabela 3. 9) e foram estipulados considerando as condições de operação do VARICOL®. As coletas foram efetuadas em diferentes posições das zonas durante o ciclo 51, sendo a posição 0,98 a de retirada do extrato, a de 3,53 a de alimentação e a de 4,93 a de retirada do refinado.

**Tabela 3. 9 – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (15 g/L).**

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Posição	0,00	0,25	0,73	0,98	1,23	2,25	3,53	4,23	4,68	4,93	5,18	5,75
Tempo*	2,10	1,83	1,30	1,03	0,76	6,18	4,79	4,03	3,54	3,26	2,99	2,37

\*minutos

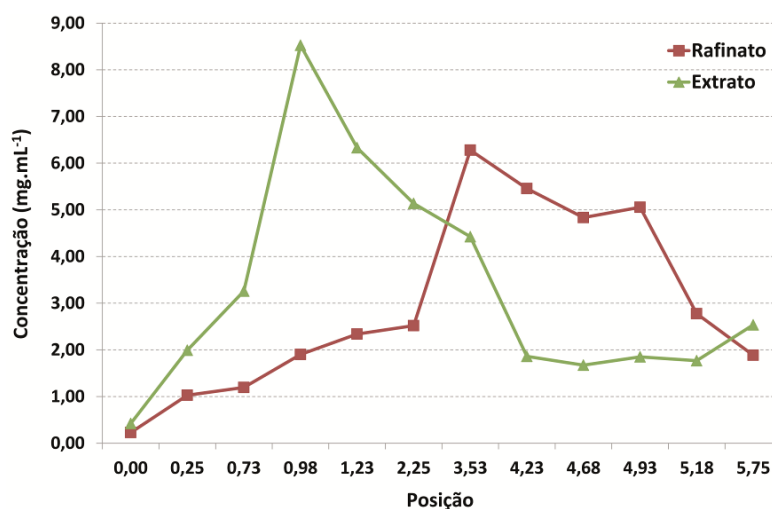
Para se fazer a quantificação dos compostos presentes nas amostras coletas, traçou-se duas curvas de calibração, uma para o refinado e outra para o extrato (Figura 3. 28). As curvas foram obtidas com coeficiente angular superior a 0,99. A faixa de concentração escolhida foi de 0,1 – 1,5 mg/ml, com um total de sete concentrações para cada curva.



**Figura 3. 28 – Curva de calibração para o a) (R)-(-)-modafinil, b) (S)-(+)-modafinil.**

O perfil interno de concentração obtido para a separação do modafinil reflete as baixas purezas enantioméricas obtidas, tanto para o refinado quanto para o extrato. Ao observar a Figura 3. 29 percebe-se a alta contaminação do refinado pelo extrato na zona IV,e, também, na zona II a contaminação do extrato pelo refinado. A coleta

do extrato e do refinado foram realizadas nas posições 0,98 e 4,93, respectivamente, enquanto o ponto de alimentação foi em 3,53.



**Figura 3. 29** – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (15 g/L).

Nos pontos de coleta é possível observar alta contaminação, em especial, nas zonas II/III e pela fuga do refinado na zona IV. Além disso, o ponto de alimentação encontra-se um pouco deslocado no sentido da linha de extrato, o que prejudica ainda mais a pureza do enantiômero com mais afinidade pela fase estacionária (extrato).

A alta contaminação do extrato e do refinado nas zonas II/III indica, que as condições simuladas para o processo não estavam sendo eficazes na dessorção do refinado e na adsorção do extrato. Em condições de saturação, a competitividade entre os analitos e os sítios adsortivos da fase estacionária é muito intensa, o que dificulta o processo de separação. Desta forma, um procedimento com menor concentração de alimentação pode proporcionar maiores purezas aos enantiômeros coletados.

#### *Concentração de Alimentação: 7,5 g/L*

Para o processo de purificação enantiomérica do modafinil, utilizando-se 7,5 g/L como concentração de alimentação, as configurações do ACS foram alteradas, em virtude da fuga dos enantiômeros pela zona de limpeza. Para isso aumentou-se a rigidez do controle das margens, de *HARD* para *HARDNESS*. Os parâmetros iniciais utilizados foram os mesmos do primeiro processo de separação (Tabela 3. 6).

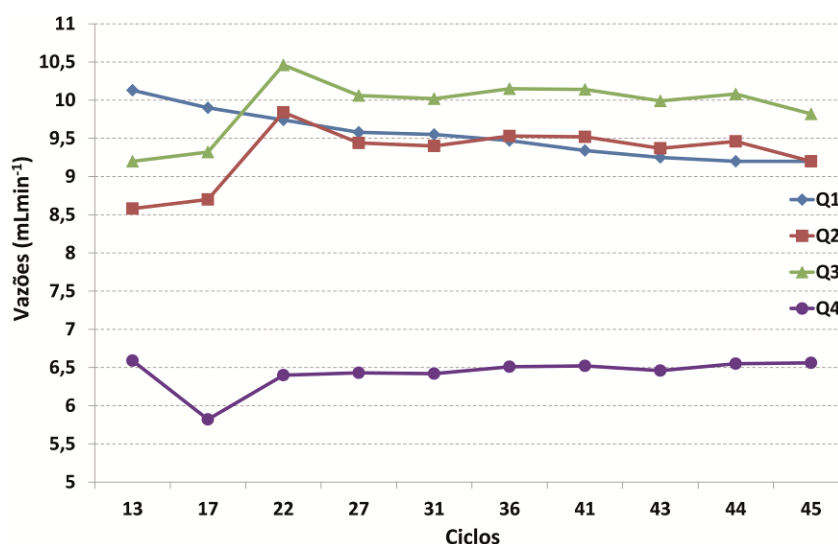
No total 45 ciclos foram realizados, sendo que após 13 ciclos o sistema já estava no estado estacionário e com o ACS ligado. De maneira geral, as alterações realizadas pelo ACS foram muito similares as realizadas para primeiro processo de separação, houve um pequeno aumento no QII e QIII e a diminuição do QI. A única exceção foram as alterações do QIV, que tiveram pequenos decréscimos (Tabela 3. 10).

**Tabela 3. 10 – Vazões internas ajustadas pelo ACS para a separação do modafinil (7,5 g/L).**

Vazão*/Ciclo	13	17	22	27	31	36	41	43	44	45
<b>QI</b>	10,1	9,90	9,74	9,58	9,55	9,47	9,34	9,25	9,20	9,20
<b>QII</b>	8,58	8,70	9,84	9,44	9,4	9,53	9,52	9,37	9,46	9,20
<b>QIII</b>	9,20	9,32	10,5	10,1	10,0	10,2	10,1	9,99	10,1	9,82
<b>QIV</b>	6,59	5,82	6,40	6,43	6,42	6,51	6,52	6,46	6,55	6,56

\* ml/min

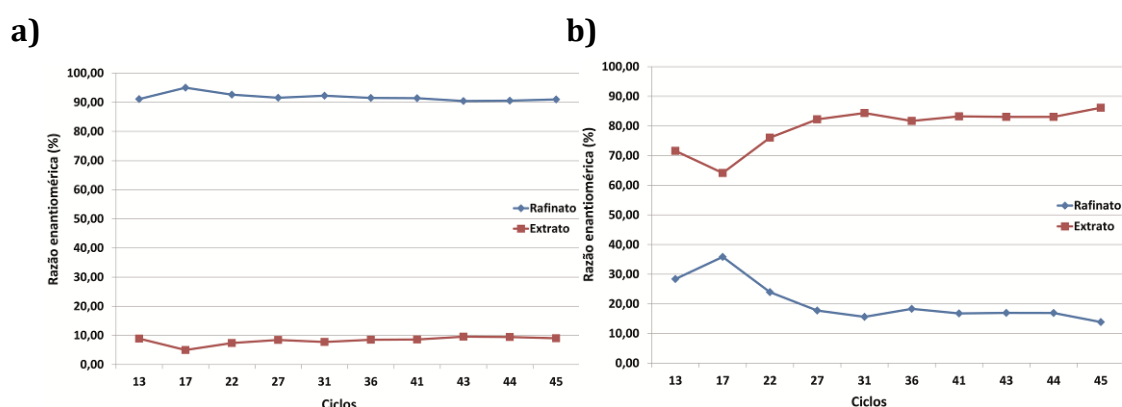
A diminuição do QIV indica que ao atingir o estado estacionário, a contaminação do extrato pelo refinado na zona IV estava ocorrendo. Da mesma maneira que na separação anterior, o aumento do QII e QIII ocorreu para evitar a contaminação do extrato pelo refinado na zona II e a diminuição do QI aumentou a concentração de extrato na linha de coleta (Figura 3. 30).



**Figura 3. 30 – Ajustes das vazões internas pelo ACS para a separação do modafinil (7,5 g/L).**

As amostras coletadas durante os ciclos indicam, que a diminuição na concentração da alimentação resultou em maior pureza enantiomérica para o refinado (91,1%) e menor para o extrato (71,6%), quando comparado com o processo a 15 g/L, como concentração de alimentação.

As alterações nas vazões internas realizadas pelo ACS aumentaram em 15% a pureza do extrato e mantiveram a pureza do refinado estável. No último ciclo registrado, tinham-se purezas de 91,0% para o refinado e 86,2% para o extrato (Figura 3. 31).



**Figura 3. 31** – Purezas enantioméricas obtidas durante a separação do modafinil (7,5 g/L)  
**a)** refinado **b)** extrato.

Ao observar os cromatogramas obtidos para a separação do modafinil, novamente, percebe-se que as alterações produzidas pelo ACS levaram ao alargamento das bandas cromatográficas e, em consequência, aumentaram a concentração de enantiômeros nos pontos de coleta. Por outro lado, estes ajustes proporcionaram uma maior contaminação dos enantiômeros na região do eluente (amarela) (Figura 3. 32).



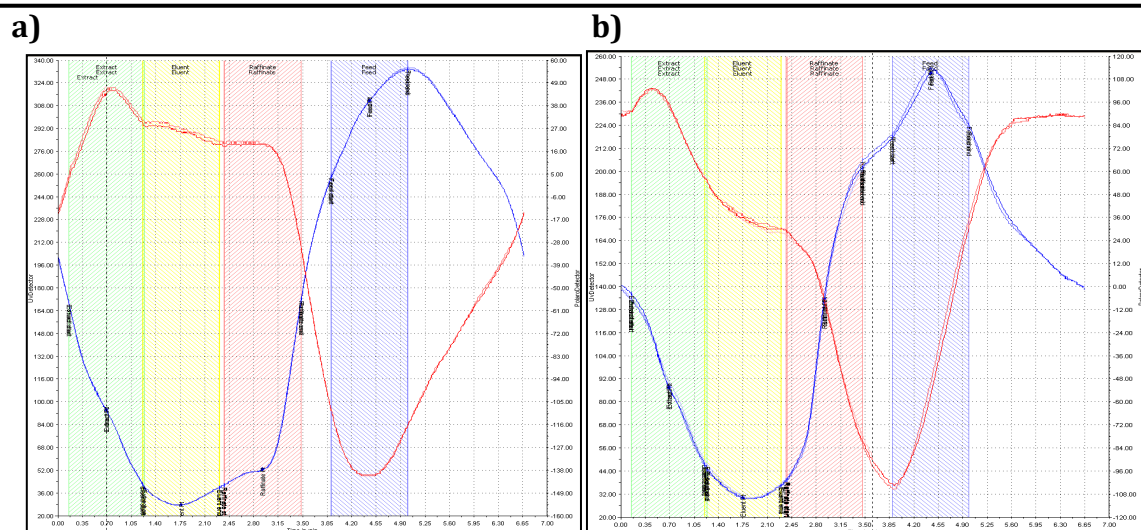


Figura 3.32 – Cromatograma para a separação do modafinil (7,5 g/L) **a)** ciclo 13, **b)** ciclo 36.

Os perfis interno de concentração teóricos, para os ciclos 13 e 36, demonstram que a centralização da distribuição dos enantiômeros através das zonas foi realizada com sucesso, observada pelo sinal do polarímetro. O aumento da rigidez das margens na zona de limpeza pelo ACS influenciou na diminuição da contaminação nas zona I/IV (Figura 3.33).

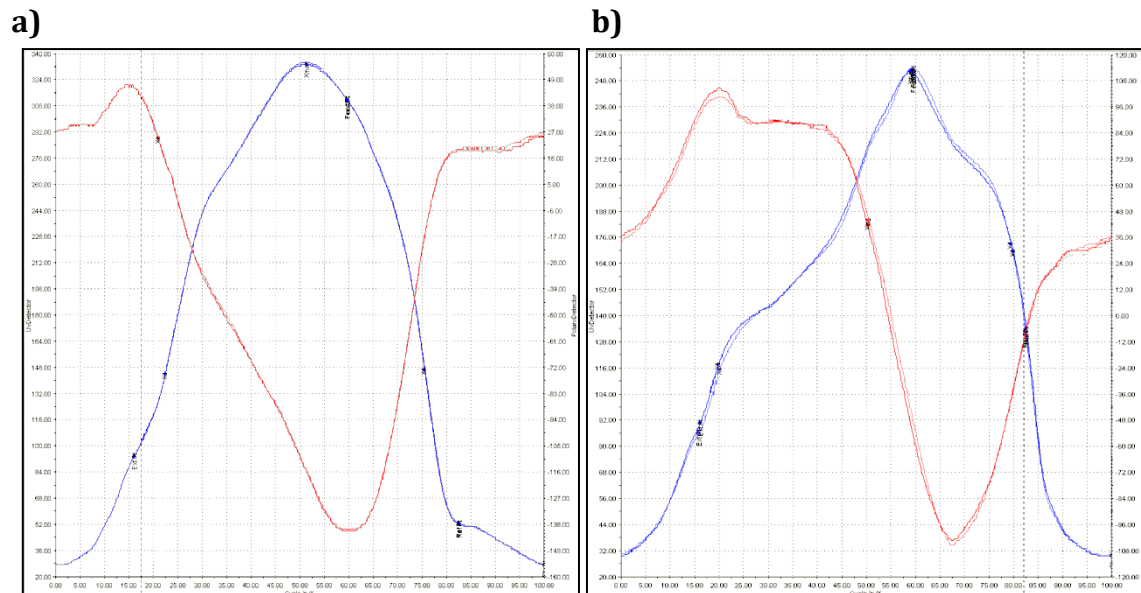


Figura 3.33 – Perfil interno de concentração do ACS para a separação do modafinil (7,5 g/L) **a)** ciclo 13, **b)** ciclo 36.

Ao comparar os perfis do ciclo 25 para a separação utilizando-se 15 g/L (Figura 3.26b, pp.48), com o ciclo 36 da separação com 7,5 g/L (Figura 3.32b), percebe-se menor fuga dos enantiômeros pelas zonas de limpeza. Este é o principal motivo para

o aumento das purzas do refinado e extrato nas duas diferentes condições de separação.

As amostras para se traçar o perfil interno de concentração experimental foram coletadas durante o ciclo 36, após a estabilização das vazões. Os pontos foram coletados segundo as condições de operação do sistema e as posições das válvulas neste ciclo (Tabela 3. 11).

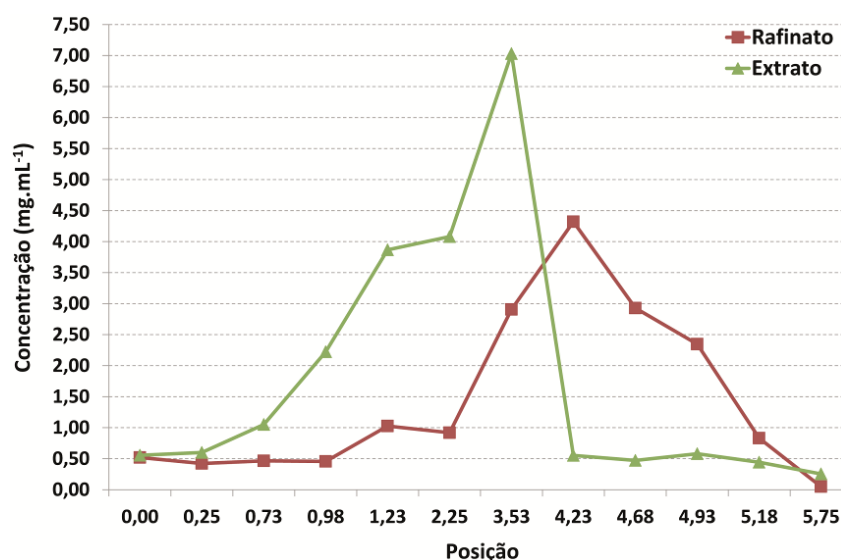
**Tabela 3. 11 – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (7,5 g/L).**

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Posição	0,00	0,25	0,73	0,98	1,23	2,25	3,53	4,23	4,68	4,93	5,18	5,75
Tempo*	2,08	1,80	1,28	1,01	0,74	6,16	4,77	4,01	3,52	3,24	2,97	2,35

\*minutos

As posições de coleta, para os dois processos de separação, são as mesmas, já que as zonas foram mantidas. Os tempos de coleta foram alterados em virtude das diferentes vazões ajustadas pelo ACS. Utilizou-se as mesmas curvas de calibração, usadas para o processo de 15 g/L, para se realizar a interpolação das áreas das bandas.

Através do perfil interno de concentração experimental obtido, para a separação do modafinil (7,5 g/L), é possível observar a contaminação de ambos enantiômeros na zona de limpeza, principalmente do extrato na zona I (Figura 3. 34). Todavia, ao compara-lo com o perfil da separação com 15 g/L (Figura 3. 29, pp. 50), percebe-se a melhor distribuição dos compostos através de todas as zonas, proporcionando; portanto, menores contaminações.



**Figura 3. 34 – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (7,5 g/L).**



A diminuição da concentração de alimentação resultou no decréscimo da fuga do refinado na zona IV, a qual estava muito alta no processo de separação com 15 g/L de alimentação. Além disso, também proporcionou a diminuição da contaminação dos enantiômeros pelas zonas II/III. O ponto da alimentação encontra-se agora um pouco deslocado no sentido da linha do refinado.

Ao comparar os dois perfis de concentração experimental (15 g/L e 7,5 g/L) perceber-se a grande influência da diminuição da concentração de alimentação sobre a separação do modafinil, em especial, na zona III e zona IV. Ao se utilizar maior concentração, foram observadas alta quantidade de extrato no ponto de coleta do refinado (4,93) e a fuga de refinado na zona IV (Figura 3. 29, pp. 50).

Baseado nestes resultados, a separação do modafinil foi novamente avaliada, diminuindo ainda mais a concentração de alimentação .

*Concentração de Alimentação: 3,75 g/L*

As condições iniciais de operação, assim como a configuração do programa ACS foram mantidas para o processo de separação, utilizando-se 3,75 g/L como concentração de alimentação. 60 ciclos foram realizados, sendo que o sistema levou 20 ciclos para atingir o estado estacionário. O ACS foi ligado no início do ciclo 21 e o monitoramento das vazões foi realizado por todo o restante do processo de separação.

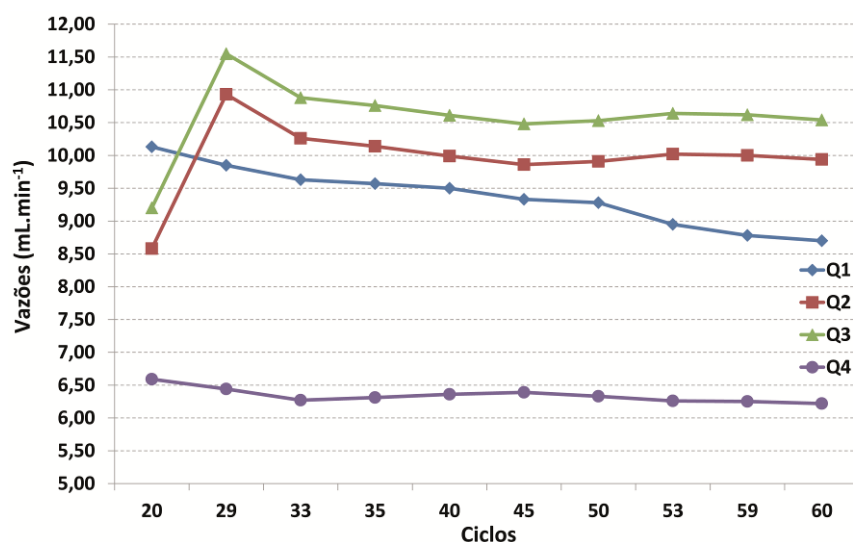
No geral, os ajustes realizados pelo ACS neste processo seguiram a mesma tendência dos ajustes realizados para os outros procedimentos, ocorreu a diminuição do QI e QIV e o aumento do QII e QIII (Tabela 3. 12).

**Tabela 3. 12 – Vazões internas ajustadas pelo ACS para a separação do modafinil (3,75 g/L).**

<b>Vazão*/Ciclo</b>	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>33</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>53</b>	<b>59</b>	<b>60</b>
<b>QI</b>	10,13	9,85	9,63	9,57	9,50	9,33	9,28	8,95	8,78	8,70
<b>QII</b>	8,58	10,93	10,26	10,14	9,99	9,86	9,91	10,02	10,00	9,94
<b>QIII</b>	9,20	11,55	10,88	10,76	10,61	10,48	10,53	10,64	10,62	10,54
<b>QIV</b>	6,59	6,44	6,27	6,31	6,36	6,39	6,33	6,26	6,25	6,22

\*ml/min

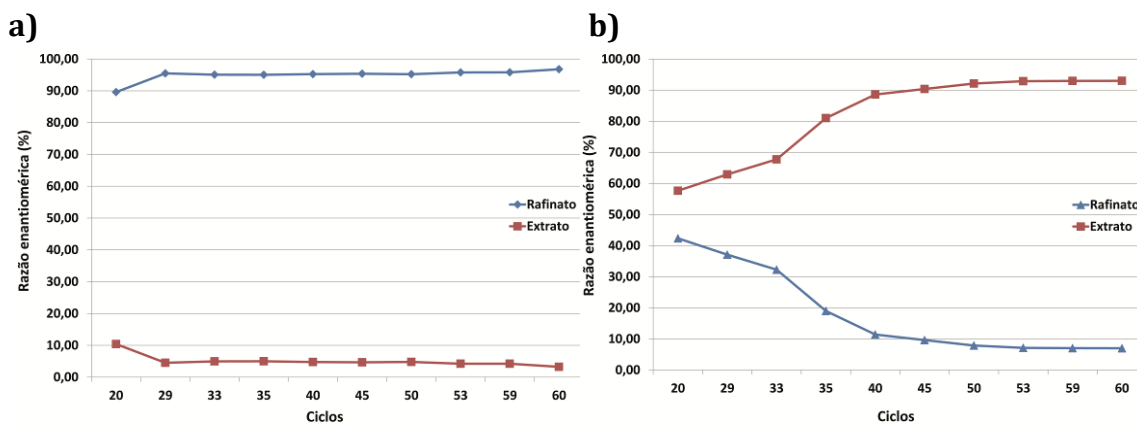
O menor valor das vazões nas zonas da limpeza é a grande diferença das entre os processos de 3,75 g/L e 7,5 g/L. Ao diminuir o QIV, há um melhor controle da fuga do refinado na zona IV, já ao diminuir o QI há o aumento da concentração do extrato na linha de coleta. A Figura 3. 35 mostra o gráfico da distribuição das vazões internas através dos ciclos.



**Figura 3. 35** – Ajustes das vazões internas pelo ACS para a separação do modafinil (3,5 g/L).

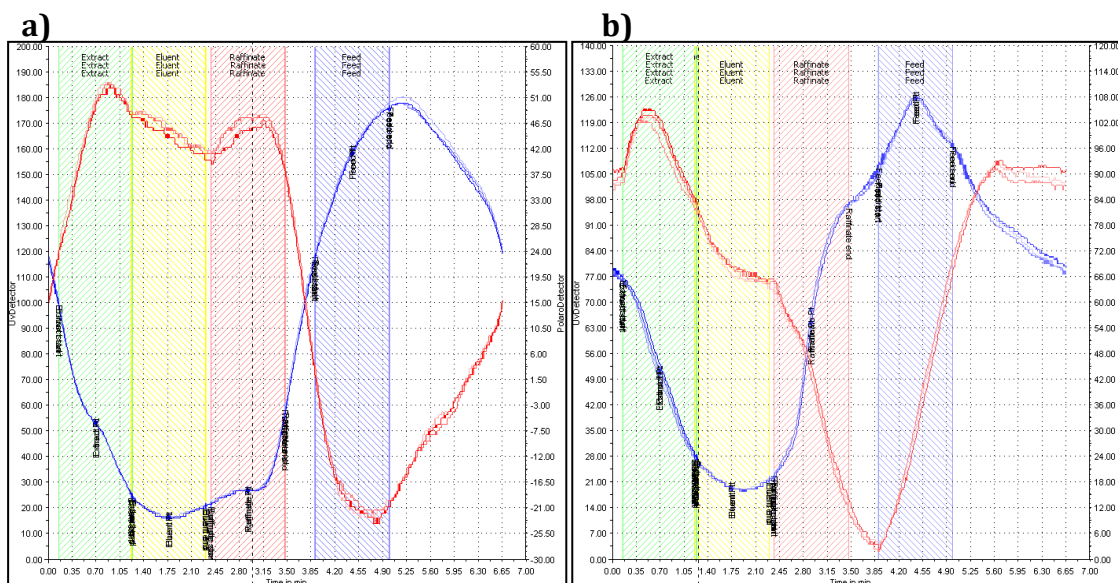
As amostras coletadas durante os ciclos e avaliadas quanto a pureza enantiomérica demonstram que a diminuição da concentração de alimentação, novamente, resultou no aumento da pureza dos enantiômeros, em especial, a do refinado. Ao atingir o estado estacionário, este enantiômero já possuía 89,6% de razão enantiomérica, a qual atingiu o valor de 96,0%, logo após os ajustes dos ACS e se manteve constante até o final do processo (Figura 3. 36a).

Por outro lado, a pureza do extrato, ao atingir o estado estacionário, era somente de apenas 57,6%. Com a diminuição do QI, o ACS aumentou a concentração de extrato na posição de sua coleta. Ao aumentar QII e QIII ocorreu a diminuição da concentração de refinado no ponto de coleta do extrato. Com isso, houve o aumento da pureza do extrato atingindo valores de até 93,0% (Figura 3. 36b).



**Figura 3. 36** – Purezas obtidas durante a separação do modafinil (3,75 g/L) **a)** refinado **b)** extrato.

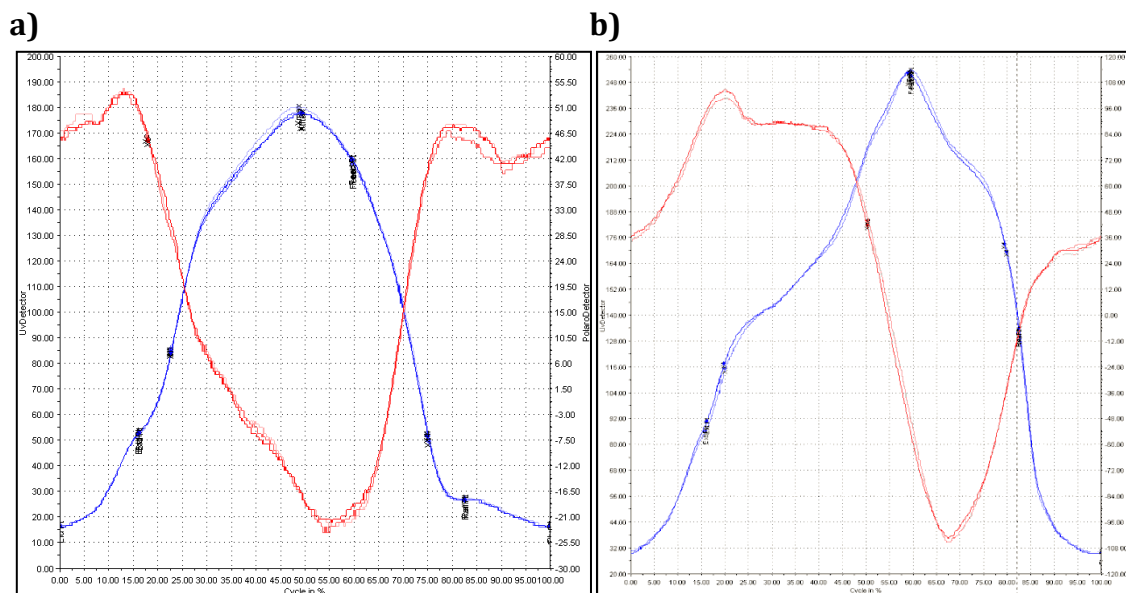
Ao avaliar os cromatogramas obtidos para esta separação do modafinil (Figura 3. 37), percebe-se que os ajustes do ACS proporcionaram, além de maior pureza, maior concentração para os enantiômeros coletados. Na região do refinado (vermelha) percebe-se um deslocamento da banda deste enantiômero no sentido de sua posição de coleta, e na região do extrato (verde) há um alargamento da banda.



**Figura 3. 37** – Cromatograma para a separação do modafinil (3,75 g/L) **a)** ciclo 20, **b)** ciclo 50.

O perfil teórico interno obtido demonstra a centralização da distribuição dos enantiômeros pelo ciclo, observado claramente pelo sinal do polarímetro. É possível também verificar a maior separação dos enantiômeros, através do sinal do ultravioleta. Ao invés de uma banda cromatográfica homogênea, igual a do ciclo 20 (Figura 3. 38a), o ciclo 50 apresenta uma banda com deformações nas posições de

coleta dos enantiômeros (Figura 3. 38b). Este processo foi parado propositalmente no ciclo 60, após 14 ciclos de coleta



**Figura 3. 38** – Perfil interno de concentração do ACS para a separação do modafinil (3,75 g/L) **a)** ciclo 20, **b)** ciclo 50.

Amostras foram coletadas durante o ciclo 50 no intuito de se traçar o perfil interno de concentração experimental. A Tabela 3. 13 descreve as posições e os tempos em que se coletou as amostras.

**Tabela 3. 13** – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (3,75 g/L).

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Posição	0,00	0,25	0,73	0,98	1,23	2,25	3,53	4,23	4,68	4,93	5,18	5,75
Tempo*	2,06	1,78	1,26	0,99	0,72	6,14	4,75	3,99	3,50	3,22	2,95	2,33

\*minutos

O perfil interno obtido demonstra as altas purezas do refinado, em seu ponto de coleta 4,93, baixa concentração de extrato foi registrado (Figura 3. 39). O ponto de mistura racêmica esta localizado próximo ao ponto de alimentação (3,53) e o ponto de retirada do extrato (0,98) possui pequena contaminação de refinado, proveniente da zona II. Baixa fuga na zona de limpeza foi registrada, em especial, do refinado na zona IV, indicando que o controle HARDNESS realizado pelo ACS foi, novamente, eficiente.

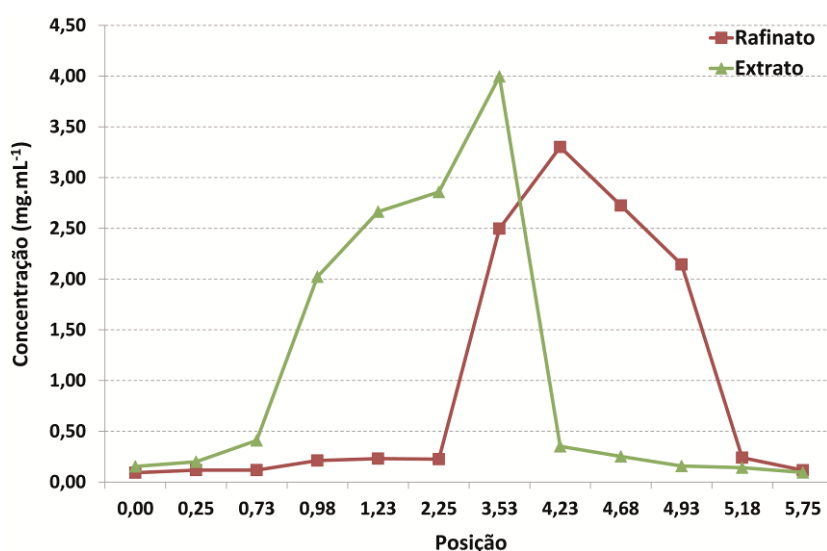


Figura 3. 39 – Perfil interno de concentração para a separação do modafinil (3,75 g/L).

Ao comparar as purezas obtidas para os enantiômeros nos três diferentes processos de separação realizados, percebe-se que a diminuição da concentração de alimentação proporcionou um aumento relevante nas razões enantioméricas (Tabela 3. 14). Na concentração de alimentação mais alta, 15 g/L, os ajustes do ACS não foram eficientes para aumentar a pureza dos enantiômeros já nos outros dois casos, os ajustes do ACS proporcionaram o aumento e/ou a permanência das purezas.

Tabela 3. 14 – Purezas obtidas nos ciclos durante a separação do modafinil.

Coleta	Purezas do refinado (%)			Purezas do extrato (%)		
	15 g/L	7,5 g/L	3,75 g/L	15 g/L	7,5 g/L	3,75 g/L
1	90,38	91,11	89,60	77,18	71,61	57,65
2	90,08	95,01	95,48	65,15	64,16	62,90
3	86,96	92,62	95,05	71,30	76,06	67,72
4	83,75	91,56	95,02	76,65	82,26	81,01
5	76,00	92,27	95,25	75,54	84,38	88,60
6	72,39	91,50	95,35	74,11	81,69	90,38
7	69,95	91,40	95,21	72,95	83,24	92,13
8	69,93	90,44	95,78	78,08	83,06	92,89
9	80,14	90,56	95,79	78,82	83,07	92,98
10	<b>81,54</b>	<b>91,00</b>	<b>96,77</b>	<b>79,03</b>	<b>86,15</b>	<b>93,00</b>

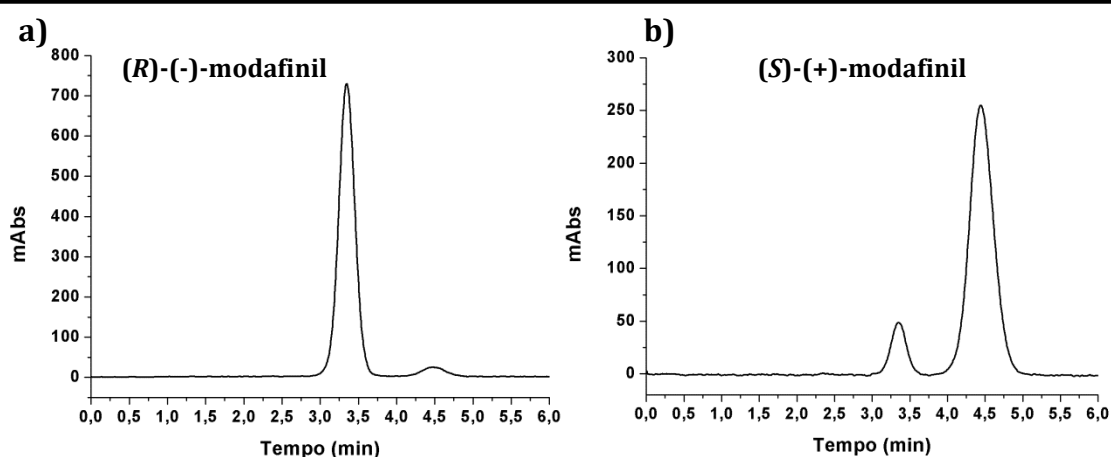
Em separações em escala preparativas dois parâmetros distintos são muito importantes e devem ser avaliados durante o processo de desenvolvimento do método: a pureza e a produtividade<sup>89</sup>.

A diminuição da concentração de injeção ou alimentação facilita a obtenção de maiores purezas para os compostos. A menor competitividade entre os analitos e os sítios adsorptivos do seletor quiral resulta em melhores resoluções. Por outro lado, este decréscimo resulta em menor massa de composto coletada por ciclo e, conseqüentemente, menor produtividade<sup>35</sup>.

Embora, idealmente, se objetive alta pureza com alta produtividade, em alguns casos não é possível operar sistemas MCCs no máximo de sua eficiência. Casos onde se tem baixa solubilidade dos analitos na fase móvel e/ou baixa quantidade do composto para se desenvolver os métodos (produtos naturais, síntese complexa), são exemplos que obrigam o desenvolvimento de métodos em condições diluídas.

Além disso, a maneira com que o método de separação é desenvolvido deve considerar a quantidade de compostos enantiopuros requeridas. Ou seja, se o objetivo é obter grandes quantidades de compostos (quilogramas ou toneladas), processos com alta produtividade são indispensáveis, já que neste caso o custo e tempo por análise são relevantes. Por outro lado, se pequenas quantidades (miligramas ou gramas) são requisitadas, processos com baixa produtividade e alta pureza podem ser úteis, em especial, nos casos em que a fase móvel pode ser facilmente reciclada.

Apesar do processo de separação desenvolvido para o modafinil em baixa concentração de alimentação (3,75 g/L) ter limitado a produtividade e levado apenas ao enriquecimento do extrato, a pureza de 96,0% para o (*R*)-(-)-modafinil, a fase móvel utilizada - facilmente recuperada (95%) - e a taxa de composto coletado, na ordem de 1,5 g/dia, são considerados pontos positivos<sup>109,110</sup>. A Figura 3. 40 ilustra os cromatogramas obtidos para as amostras de refinado e extrato.



**Figura 3. 40** – Cromatogramas obtidos para os enantiômeros do modafinil, CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20  $\mu$ m), metanol (100%), 2,5 ml/min,  $\lambda$ =240 nm, volume de Injeção: 0,5 ml, **a)** refinado **b)** extrato.

No intuito de se obter um processo de separação para o modafinil com maior produtividade, a avaliação da influência das vazões internas foi realizada durante um novo procedimento de separação. Para isso, alterou-se as vazões internas manualmente e de forma independente, durante um procedimento com concentração de alimentação igual a 7,5 g/L. Os parâmetros iniciais utilizados foram os mesmo dos procedimentos anteriores (Tabela 3. 6, pp. 45). Após 10 ciclos o sistema já havia atingido o estado estacionário, e o ACS foi ligado com configuração rígida nas zonas de limpeza, e com o refinado como alvo (Tabela 3. 7, pp. 45).

O procedimento de separação, com o ACS ligado, foi realizado por 34 ciclos e as alterações realizadas nas vazões internas foram registradas (Figura 3. 41). De maneira geral, todas as vazões foram aumentadas, indicando que a distribuição dos enantiômeros, ao atingir o estado estacionário, estava deslocada para o ponto de coleta do extrato.

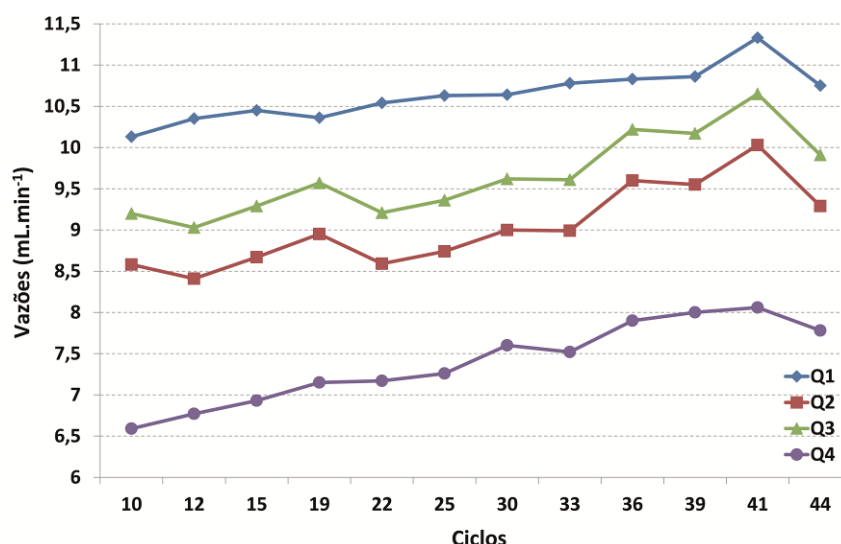


Figura 3. 41 – Ajustes das vazões internas pelo ACS para a separação do modafinil (7,5 g/L).

Ao avaliar as purezas das amostras coletadas durante os ciclos, percebe-se que os ajustes realizados pelo ACS não foram eficientes e não apresentava tendência no aumento das purezas. Altas variações foram verificadas nas duas linhas de coleta (Figura 3. 42).

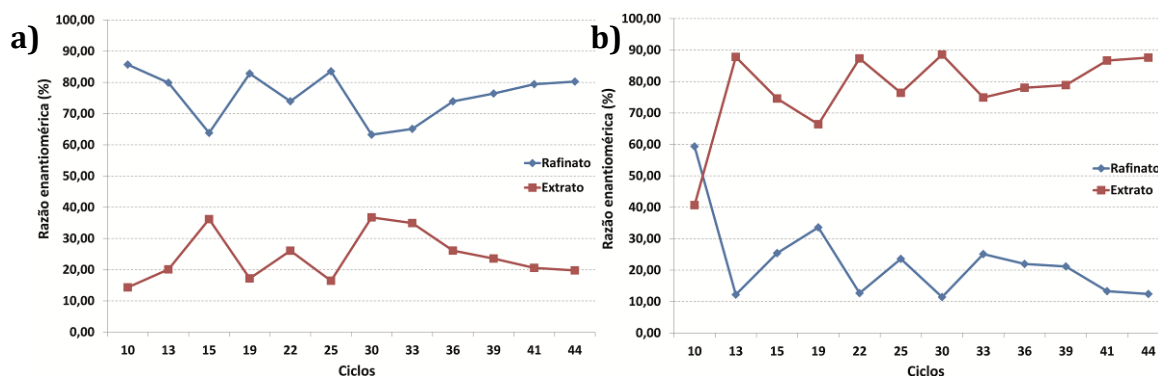


Figura 3. 42 – Purezas obtidas durante a separação do modafinil (7,5 g/L) a) refinado b) extrato.

O ACS foi então desligado após o ciclo 44 e deu-se início as alterações manuais, sempre realizadas com o sistema no estado estacionário. As alterações foram efetuadas baseando-se nos ajustes realizados pelo ACS, durante os outros procedimentos de separação.

Inicialmente, optou-se por aumentar o QII e diminuir o QIII, no intuito de descontaminar a zona de separação. Esta alteração resulta no decréscimo da vazão



de alimentação, por isso deve ser realizada com cautela, no caso diminuiu-se 0,1 ml/min (Tabela 3. 15). A diminuição das vazões da zona II/III proporcionou um aumento considerável na pureza do extrato, atingindo 93,1%, já a pureza do refinado foi mantida, 80,0%.

**Tabela 3. 15 – Alterações manuais e purezas enantioméricas para a separação do modafinil (7,50 g/L).**

Vazões (ml/min)	Ciclos				
	44	48	55	62	67
<b>Qalimentação</b>	0,62	0,52	0,52	0,52	0,52
<b>Qrefinado</b>	2,13	2,08	2,08	1,58	1,58
<b>Qeluente</b>	2,97	2,97	3,47	3,47	2,97
<b>Qreciclo</b>	10,75	10,75	11,25	11,25	11,25
<b>Qextrato</b>	1,46	1,41	1,91	2,41	1,91
<b>QI</b>	10,75	10,75	11,25	11,25	11,25
<b>QII</b>	9,29	9,34	9,34	8,84	9,34
<b>QIII</b>	9,91	9,86	9,86	9,36	9,86
<b>QIV</b>	7,78	7,78	7,78	7,78	8,28
<b>Pureza Refinado (%)</b>	80,26	80,11	86,46	82,24	86,50
<b>Pureza Extrato (%)</b>	87,60	93,06	94,59	85,01	93,34

Após 7 ciclos, aumentou-se o QI para diminuir a fuga do extrato pela zona I, esta alteração proporcionou um pequeno aumento na pureza do refinado atingindo 86,4% e aumentou em um por cento a pureza do extrato (94,6%).

No intuito de diminuir a contaminação do refinado pelo extrato na zona III, realizou-se a diminuição do QIII. Para que o Qalimentação permanecesse constante, o QII foi diminuído na mesma proporção. Estes ajustes resultaram na diminuição da pureza de ambos enantiômeros, o refinado passou a ter pureza de 82,2% e o extrato de 85,0% (ciclo 62).

Visando o acréscimo da pureza do refinado, as vazões foram reconfiguradas para os valores do ciclo 55 (Tabela 3. 15), porém com o aumento do QIV. O aumento da concentração de refinado em seu ponto de coleta resultou nas purezas de 86,5% e 93,3% para o refinado e para o extrato, respectivamente.

Com as purezas satisfatórias nas duas linhas de coleta, ligou-se novamente o ACS com a mesma configuração anteriormente determinada (HARDNESS/HARDNESS). Desta forma, novas alterações foram efetuadas nas vazões do procedimento de separação.

Durante 14 ciclos, o sistema foi operado no estado estacionário mantendo altas purezas nas duas linhas de coleta, em média 96,4% e 96,0% para refinado e extrato, respectivamente (Figura 3. 43).

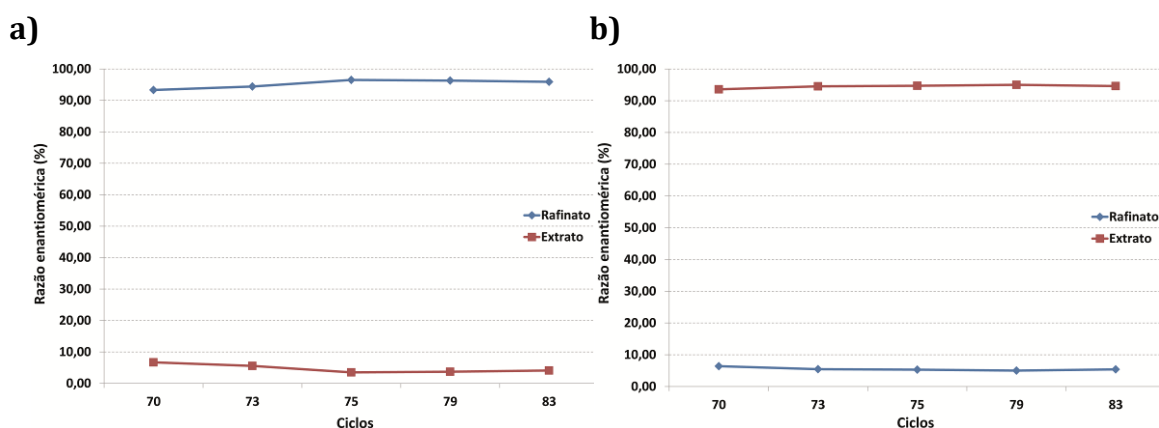


Figura 3. 43 – Purezas obtidas durante a separação do modafinil (7,5 g/L) a) refinado b) extrato.

No total foram coletados 145 mg de refinado e 167 mg de extrato, o que resulta em uma taxa de produção de 2,24 e 2,58 g/dia, respectivamente. As purezas dos enantiômeros coletados foram avaliadas, sendo de, aproximadamente, 96% para ambos (Figura 3. 44).

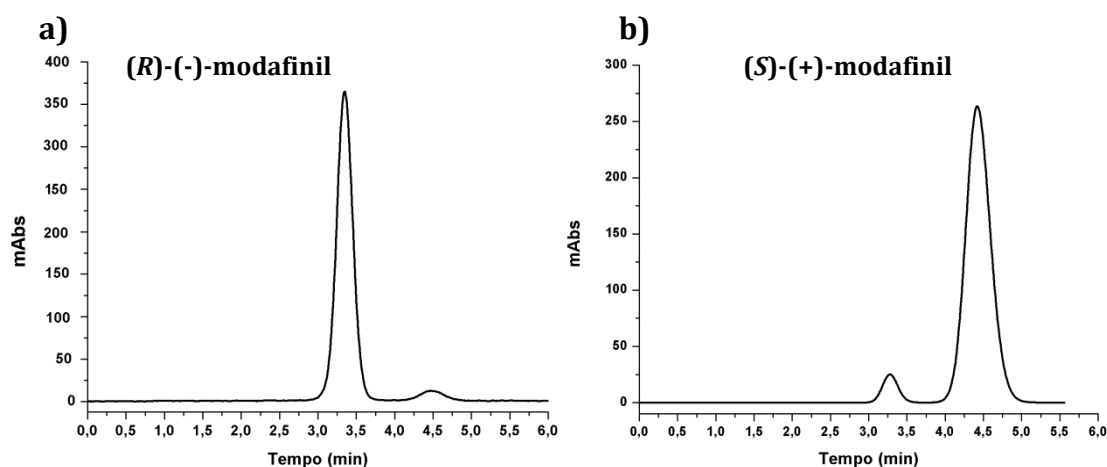


Figura 3. 44 – Cromatogramas obtidos para os enantiômeros do modafinil, CHIRALPAK AD® (10 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 2,5 ml/min, λ=240 nm, volume de Injeção: 0,5 ml, a) refinado b) extrato.

A Tabela 3. 16 apresenta os parâmetros do processo obtidos para a purificação enantiomérica do modafinil, utilizando-se 7,50 g/L como concentração de alimentação.

**Tabela 3. 16 – Parâmetros do processo de purificação enantiomérica do modafinil (7,50 g/L).**

<b>Parâmetros</b>	
Produtividade do Refinado (g refinado/Kg CSP.dia)	10,0
Razão enantiomérica do Refinado (%)	96,0
Massa de Refinado Obtida (g)	0,14
Taxa de produção refinado (g/dia)	2,24
Recuperação do Refinado (%)	95,5
Produtividade do Extrato (g extrato/Kg CSP.dia)	10,0
Razão enantiomérica do Extrato (%)	96,0
Massa do Extrato obtido (g)	0,17
Taxa de produção extrato (g/dia)	2,58
Recuperação do Extrato (%)	94,2
Consumo de solvente total (L/g de enantiômero)	1,27
Número de ciclos de coleta	14
Tempo do ciclo (min)	6,65
Tempo total de coleta (min)	93,1

O ajuste manual das vazões internas, em especial, a diminuição da vazão de alimentação, auxiliou o programa ACS na otimização do processo de separação, aumentando a pureza dos compostos coletados. Esta pode ser uma alternativa de operação para métodos onde, inicialmente, não se obtêm altas purezas para ambos enantiômeros.

### 3.1.4 Atenolol: purificação enantiomérica

O atenolol (Figura 3. 45) é um fármaco pertencente ao grupo dos beta bloqueadores, administrado para combater doenças cardiovasculares, mais especificamente, para o tratamento de pós enfarte do miocárdio e de hipertensão. Este fármaco, assim como os demais beta bloqueadores, pode causar fadiga, depressão, confusão mental e alucinações, principalmente, pelo fato de diminuir a oxigenação do cérebro<sup>111</sup>.

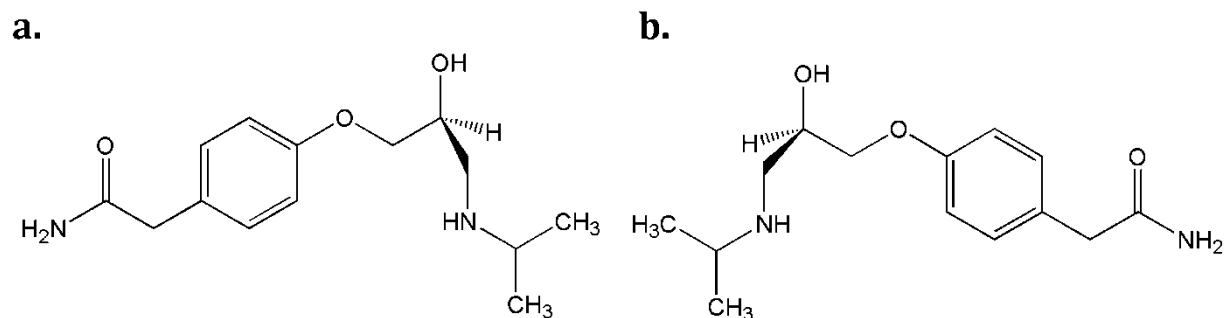


Figura 3. 45 – a) (S)-(-)-atenolol e b) (R)-(+)-atenolol.

O atenolol é um fármaco administrado em sua forma racêmica, porém sabe-se que o (S)-(-)enantiômero possui um maior efeito beta bloqueador do que o (R)-(+)-enantiômero<sup>111</sup>. Stoschitzky et al. demonstraram que o mesmo efeito do atenolol racêmico pode ser obtido pela administração de meia dose de (S)-(-)-atenolol<sup>112</sup>.

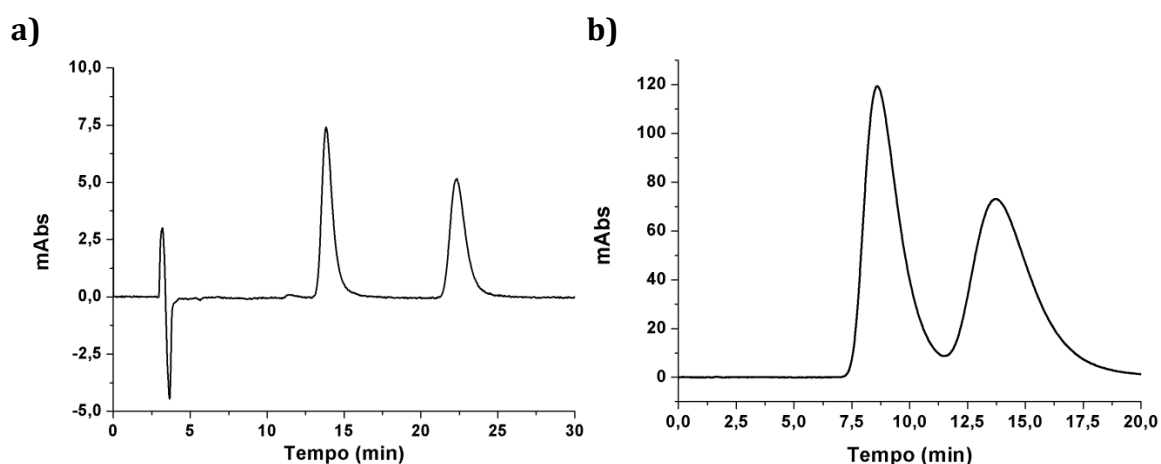
A disposição cinética do atenolol também é estereosseletiva, o que resulta em maiores concentrações de (R)-(+)-atenolol no plasma e em urina. Isto pode ser explicado pelo menor volume de distribuição deste enantiômero<sup>113</sup>. O comportamento estereosseletivo do atenolol, no organismo humano, proporciona menores efeitos colaterais para o (S)-(-)enantiômero, indicando mais uma vantagem da administração deste enantiômero.

A literatura descreve diversas metodologias de síntese assimétrica para a obtenção do (S)-(-)-atenolol<sup>114-117</sup>, porém todas elas possuem rotas árduas e de baixo rendimento. Logo, a síntese aquiral do atenolol seguido de resolução quiral pode ser uma boa alternativa para a produção deste composto.

Além das colunas de polissacarídeos, diversos tipos de colunas quirais foram testados durante a busca por condição de separação para o atenolol. As colunas de glicopeptídeos macrocíclicos e de polímero sintético foram avaliadas no modo polar iônico/reverso e normal/polar orgânico, respectivamente.

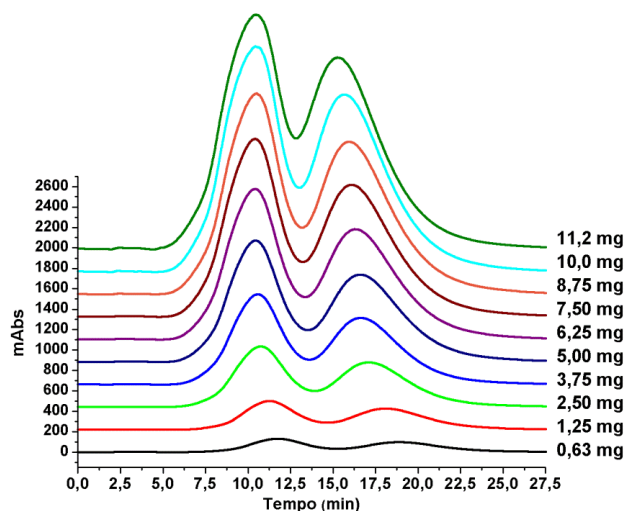
A fase estacionária tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose possui um grande poder de enantiorresolução para o atenolol, sobretudo, quando utilizada no modo normal de eluição com aditivo básico na fase móvel<sup>118</sup>. Ao utilizar a coluna analítica CHIRALCEL OD-H<sup>®</sup> (25,0 x 0,46 D.I., 5  $\mu$ m) obteve-se altos valores de seletividade e resolução para o atenolol,  $k_1=3,40$ ,  $\alpha=1,78$ ,  $R_s=5,51$  (Figura 3. 46).

Para separações em sistemas de MCC é indicado o uso de fases estacionárias com tamanho de partícula grande (20  $\mu$ m)<sup>62</sup>. O aumento do tamanho da partícula confere maior capacidade de carga e menor queda de pressão à separação cromatográfica. Por outro lado, acarreta também na diminuição da área superficial do seletor quiral, resultando na diminuição da velocidade linear e transferência de massa entre os enantiômeros e a fase estacionária<sup>24</sup>. Sendo assim, ao separar o atenolol na coluna preparativa (10,0 x 1,0 D.I., 20  $\mu$ m), nas mesmas condições cromatográficas da separação na coluna analítica, obteve-se perda de enantiorresolução com aumento da retenção,  $k_1=5,16$ ,  $\alpha=1,59$ ,  $R_s=1,30$  (Figura 3. 46)



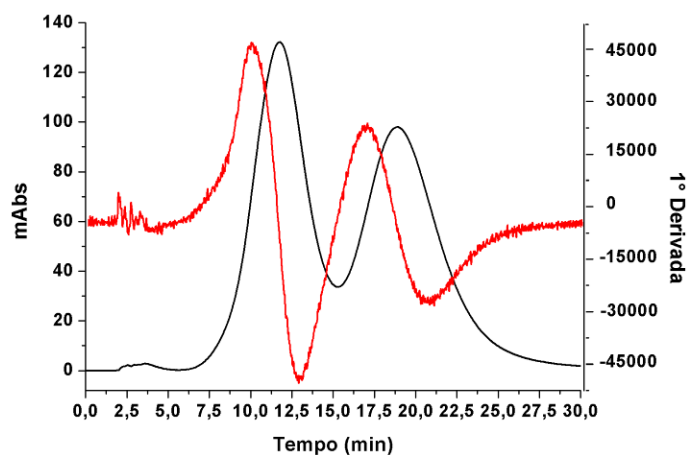
**Figura 3. 46** – Cromatograma da separação do atenolol, **a)** CHIRALCELOD-H<sup>®</sup> (25 x 0,46 D.I., 5  $\mu$ m), *n*-hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,01%), 1,0 ml/min, 275 nm **b)** CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (10 x 1,0 D.I., 20  $\mu$ m), *n*-hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,01%), 3,5 ml/min, 275 nm.

Para o estudo da separação do atenolol no VARICOL<sup>®</sup>, realizou-se os experimentos de sobrecarga de massa, a faixa de concentração avaliada foi de 22,5 – 1,25 mg/ml, com 0,5 ml de volume de injeção. Como a solubilidade do atenolol é muito baixa em *n*-hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,01%), as amostras para o estudo de sobrecarga foram solubilizadas em 2-propanol, possibilitando o encontro das bandas dos enantiômeros (Figura 3. 47).



**Figura 3. 47** – Cromatogramas de sobrecarga para o atenolol, CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20  $\mu$ m), *n*-hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,1%), 2,5 ml/min,  $\lambda$ =275 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml, 35°C.

Os tempos de inflexão das bandas cromatográficas, obtidos pela primeira derivada do cromatogramas foram utilizados para a simulação das condições iniciais de operação do VARICOL<sup>®</sup> e para a obtenção das isotermas de adsorção. A Figura 3. 48 demonstra o cromatograma da primeira derivada para a separação do atenolol em condição de diluição.



**Figura 3. 48** - 1<sup>ª</sup> derivada do cromatograma da separação do atenolol (1,25 mg/ml), CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (10 x 1 cm de D.I., 20  $\mu$ m), *n*-hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,1%), 2,5 ml/min,  $\lambda$ =275 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml, 35°C.

Com o aumento da massa injetada observou-se a saturação dos sítios adsorptivos do seletor quiral, resultando na diminuição da eficiência da separação. A Tabela 3. 17 demonstra os parâmetros cromatográficos obtidos para a separação do atenolol, durante o estudo de sobrecarga.

**Tabela 3. 17 – Parâmetros cromatográficos obtidos do estudo de sobrecarga atenolol.**

Concentração (mg/ml)	Rs	N	tr <sub>1</sub>	tr <sub>2</sub>
1,25	0,96	65,71	10,13	17,10
2,50	0,94	64,49	9,56	16,34
5,00	0,90	60,48	9,10	15,43
7,50	0,87	60,29	8,88	15,00
10,00	0,87	56,68	8,71	14,97
12,50	0,82	54,39	8,61	14,72
15,00	0,78	52,29	8,41	14,36
17,50	0,75	50,97	8,40	14,34
20,00	0,69	46,69	8,32	14,16
22,50	0,68	43,34	8,26	13,78

\*CHIRALPAK AD® (10 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), *n*-hexano/etanol/DEA (80:20:0,1%), 2,5 ml/min, λ=275 nm, Volume de Injeção: 0,5 ml.

As isotermas de adsorção de Langmuir competitiva obtidas para o atenolol foram:

$$q_{R(+)} = 0,70C_{R(+)} + \frac{4,87C_{R(+)}}{1 + 0,16C_{R(+)} + 0,29C_{S(-)}}$$

$$q_{S(-)} = 0,70C_{S(-)} + \frac{8,66C_{S(-)}}{1 + 0,29C_{S(-)} + 0,16C_{R(+)}}$$

Onde,  $q_i$  é a concentração do soluto (i) na fase estacionária,  $C_i$  é a concentração do soluto (i) na fase móvel.

Os parâmetros iniciais de operação do VARICOL® foram calculados utilizando-se, inicialmente, 1,0 g/L como concentração de alimentação, 70,0% da solubilidade do composto na fase móvel (Tabela 3. 18).

**Tabela 3. 18 – Parâmetros iniciais de operação do VARICOL® para a separação do atenolol (1,0 g/L).**

Reciclo	Alimentação	Vazões (ml/min)				QI	QII	QIII	QIV
		Extrato	Refinado	Eluente					
12,61	2,42	5,40	3,05	6,03	12,61	7,21	9,63	6,58	
		Zonas							
I	II	III	IV	Período					
0,98	1,83	1,47	1,72	3,92					

O processo de separação do atenolol no VARICOL<sup>®</sup> atingiu o estado estacionário após 8 ciclos, após o que ACS foi ligado com flexibilidade nas zonas de limpeza, visando o máximo de produtividade para o método (Tabela 3. 19).

**Tabela 3. 19 – Parâmetros determinados para o ACS para a separação do atenolol (1,0 g/L).**

Pureza enantiomérica	refinado	extrato
	98%	95%
Composto alvo	refinado	
Controle da zona de separação	QII/QIII	
Detector	polarímetro	
Controle da zona de limpeza	Zona I	Zona IV
	<i>Strong</i>	<i>Strong</i>

Após dois ciclos de separação observou-se o aumento da pressão das cinco bombas, decorrente da precipitação do atenolol nas tubulações do sistema cromatográfico. Novamente, a solubilidade mostra ser um parâmetro fundamental para processos cromatográficos em escala preparativa. Além de influenciar diretamente na produtividade e na pureza dos compostos coletados, pode também prejudicar a robustez dos processos contínuos, já que a precipitação dos compostos resulta na perda da eficiência e em casos mais graves na necessidade do planejamento de uma nova separação.

No caso, foi-se necessário realizar uma nova separação, utilizando-se como concentração de alimentação 0,5 g/L. A Tabela 3. 20 demonstra as condições iniciais de operação para este procedimento.

**Tabela 3. 20 – Parâmetros iniciais de operação do VARICOL<sup>®</sup> para a separação do atenolol (0,5 g/L).**

Reciclo	Alimentação	Extrato	Vazões (ml/min)				QIV	
			Refinado	Eluente	QI	QII		QIII
11,86	2,92	4,72	3,54	5,34	11,86	7,14	10,06	6,52
Zonas								
I	II	III	IV	Período				
0,98	1,60	1,60	1,83	4,17				



Ao comparar os parâmetros iniciais dos processos, com as duas concentrações de alimentação, percebe-se alterações em todas as vazões utilizadas. Além disso, há também alterações nas zonas II, III e IV.

Com a diminuição da concentração do atenolol, há um aumento no Qalimentação visando o máximo de produtividade. O Qreciclo e o Qeluyente são diminuídos já que se tem menos compostos para ser desorvido, ao se utilizar 1,0 g/L e 0,5 g/L têm-se, respectivamente, 2,42 g/min e 1,46 g/min de composto sendo alimentado no sistema.

As alterações do Qrefinado e Qextrato estão de acordo com as alterações das zonas. Com o acréscimo do Qrefinado, as zonas responsáveis pela adsorção (ZIII e ZIV) também aumentaram para evitar o deslocamento da distribuição dos compostos.

Por outro lado, ocorreu o decréscimo da zona II, já que o aumento do Qrefinado diminuiu a quantidade de composto a ser desorvido nesta zona. O Qextrato foi diminuído para o balanço de massa permanecer constante e a zona I permaneceu a mesma, para adsorver de maneira eficiente o extrato.

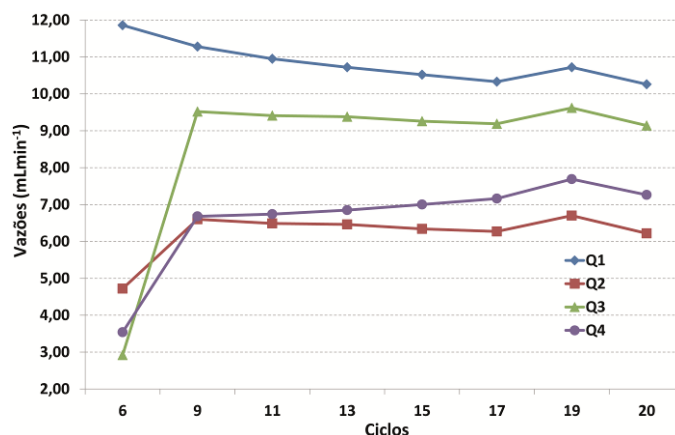
O novo processo de separação atingiu o estado estacionário após 6 ciclos, em seguida, o programa ACS foi ligado. As configurações utilizadas anteriormente foram mantidas, com exceção do detector a ser monitorado. Neste processo, em virtude da solução diluída utilizada como alimentação, o sinal do polarímetro não pode ser utilizado, já que os valores dos sinais dos analitos estavam próximos ao do ruído do detector (Tabela 3. 21).

**Tabela 3. 21 – Parâmetros determinados para o ACS para a separação do atenolol (0,5 g/L).**

Pureza enantiomérica	refinado	extrato
	98%	95%
Composto alvo	refinado	
Controle da zona de separação	QII/QIII	
Detector	ultravioleta	
Controle da zona de limpeza	Zona I	Zona IV
	<i>Strong</i>	<i>Strong</i>

As alterações do ACS foram realizadas durante 14 ciclos, de maneira geral, ocorreu a diminuição do QI e o aumento do QII, QIII e QIV. A diminuição do QI foi

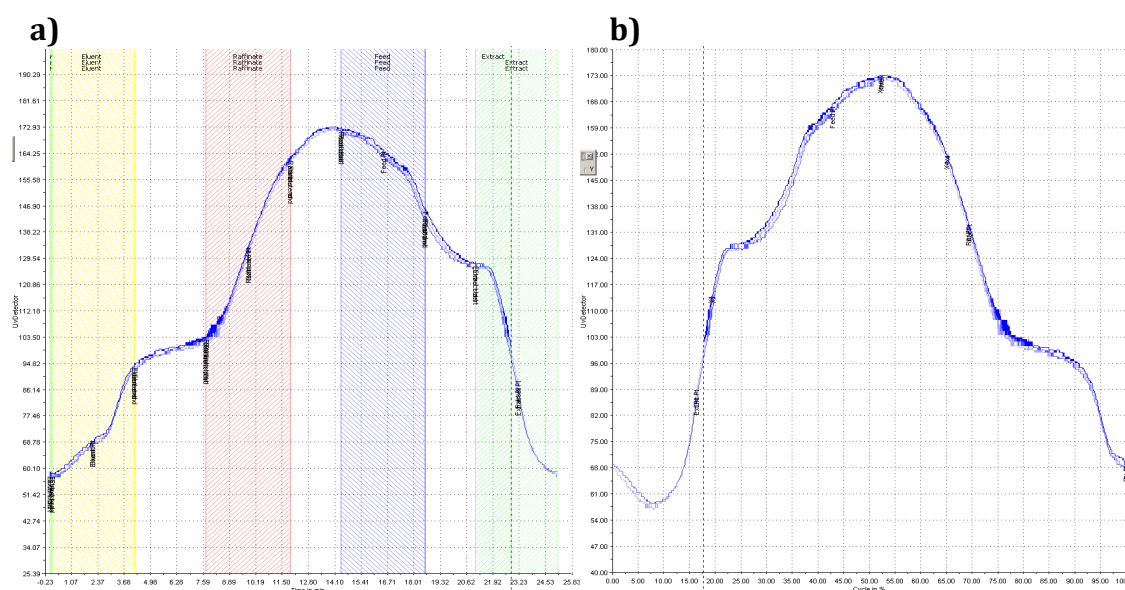
realizada para aumentar a concentração de extrato no ponto de coleta, já o aumento do QII foi realizado para diminuir a contaminação do extrato pelo refinado na zona II. O aumento das vazões nas zonas de adsorção foi realizado para aumentar-se a concentração de refinado no ponto de coleta (Figura 3. 49).



**Figura 3. 49** – Ajustes das vazões internas pelo ACS para a separação do atenolol (0,5 g/L).

Os ajustes realizados pelo programa ACS não proporcionaram altas purezas para os enantiômeros. Ao avaliar as purezas das amostras coletadas entre os ciclos 6 à 20, teve-se uma faixa de 54,0-65,4% de razão enantiomérica para o refinado e de 51,3-61,2% para o extrato.

Ao observar o cromatograma e o perfil da distribuição dos enantiômeros no ciclo 20, percebe-se grande contaminação, em especial nas zonas de limpeza (região amarela) (Figura 3. 50).



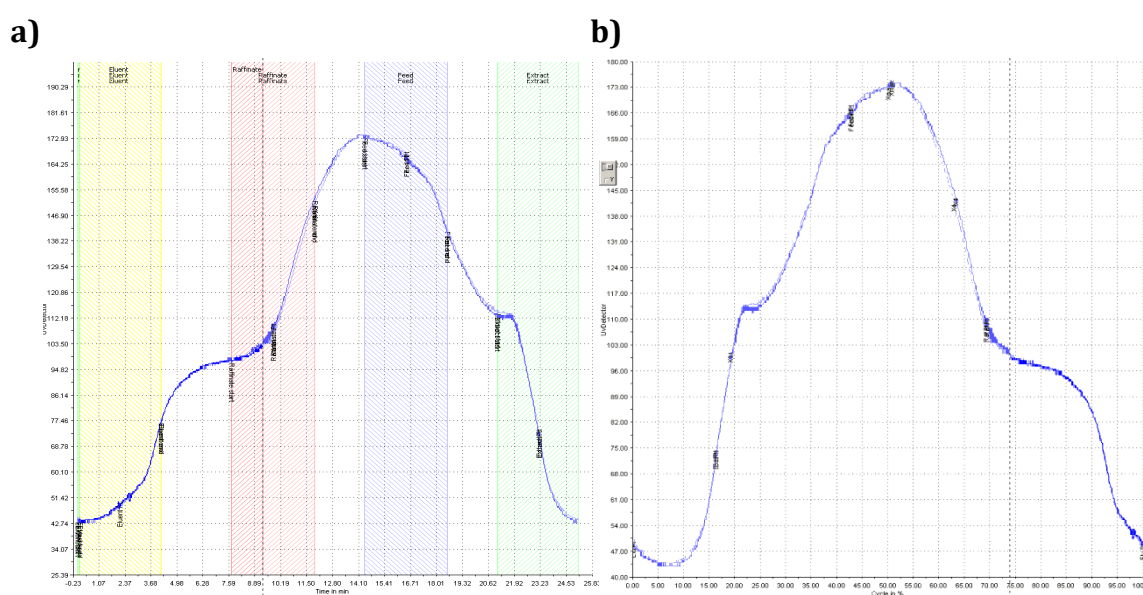
**Figura 3. 50** – a) Cromatograma e b) Perfil interno de concentração do ACS, da separação do atenolol (0,5 g/L) durante o ciclo 20.

Diante das baixas purezas obtidas, alterou-se manualmente a vazão QIV, no intuito de se diminuir a contaminação do extrato pelo refinado na zona IV. As mudanças foram efetuadas com o sistema no estado estacionário, entre os ciclos 21 e 28, no total diminuiu-se 1,06 ml/min (Tabela 3. 22).

**Tabela 3. 22 – Alteração manual do QIV durante o processo de separação do atenolol (0,5 g/L).**

	Ciclo 20	Ciclo 22	Ciclo 24	Ciclo 26	Ciclo 28	Ciclo 30
<b>QIV</b>	7,26	7,00	6,90	6,70	6,20	7,00
<b>Qalimentação</b>	2,92	2,92	2,92	2,92	2,92	2,92
<b>Qrefinado</b>	1,88	2,14	2,24	2,44	2,94	2,04
<b>Qeluyente</b>	3,00	3,26	3,36	3,56	4,06	3,13
<b>Qextrato</b>	4,04	4,04	4,04	4,04	4,04	4,01
<b>Qreciclo</b>	10,26	10,26	10,26	10,26	10,26	10,13

As alterações no QIV proporcionaram menor contaminação na zona de limpeza (Figura 3. 51), diminuindo, principalmente, a fuga do refinado. Após atingir o estado estacionário, o ACS foi ligado, novamente, com o controle rígido (*HARDNESS*) das zonas I e IV. Todavia, percebeu-se a mesma tendência anterior, ao realizar os ajustes das vazões internas, o ACS realizou o aumento do QI e a diminuição das outras vazões (Figura 3. 49, pp.72).



**Figura 3. 51 – a) Cromatograma e b) Perfil interno de concentração do ACS, da separação do atenolol (0,5 g/L) durante o ciclo 28.**

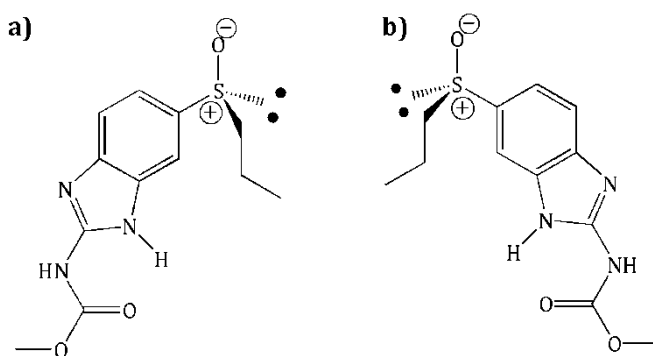
No ciclo 28, as purezas enantioméricas do refinado e do extrato eram de 75,3% e 69,0%, respectivamente, indicando que a diminuição no QIV proporcionou a maior adsorção do refinado na zona IV.

Separações com um longo tempo de ciclo tornam as mudanças manuais das vazões inviáveis, já que a avaliação da influência de cada alteração requisita, ao menos, dois ciclos de processo, resultando em um alto consumo de solvente. Um ciclo para a separação do atenolol tem tempo de 25 minutos, em virtude da alta retenção dos compostos na condição de separação escolhida.

Para que a resolução do atenolol pelo processo VARICOL<sup>®</sup> se torne viável, uma condição de separação com curto tempo de ciclo e/ou com fase móvel em que o atenolol seja solúvel é necessária. Desta forma, a alteração manual das vazões para obter-se maiores purezas e/ou o monitoramento da separação através do sinal do polarímetro pelo ACS poderão ser efetuados. As fases estacionárias aqui estudadas (CHIRALPAK AD<sup>®</sup>, CHIRALPAK AS<sup>®</sup> e CHIRALCEL OD<sup>®</sup>) não possuem poder de enantiorresolução para o atenolol com estas características, nas condições de eluição examinadas (secção 5.3.1.2, pp. 113)

### 3.1.5 Albendazol sulfóxido: purificação enantiomérica

A neurocisticercose é uma doença conhecida por causar diversos tipos de efeitos colaterais em humanos contaminados, como por exemplo: epilepsia, fortes dores de cabeça, etc<sup>119</sup>. O albendazol é uma das substâncias mais utilizadas no tratamento desta doença, ao ser administrado este pró-fármaco sofre oxidação pelas enzimas do fígado, produzindo o metabólito ativo albendazol sulfóxido (Figura 3. 52), que é novamente oxidado dando origem aos metabólitos inativos albendazol sulfona e 2-amino-sulfona<sup>120</sup>.



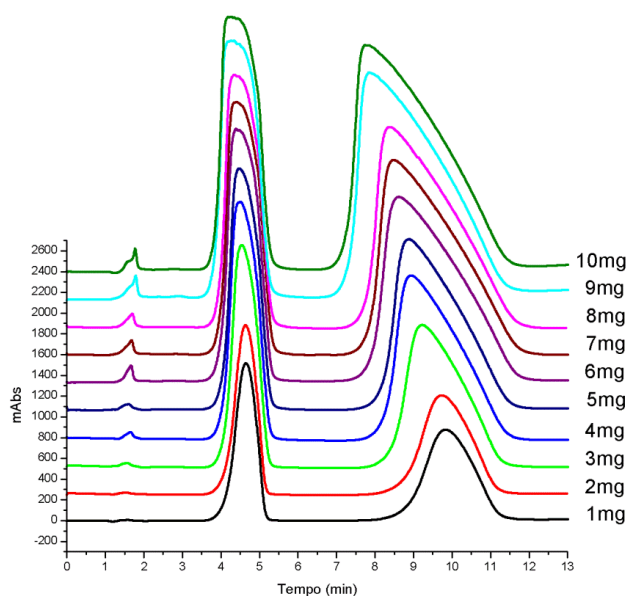
**Figura 3. 52** – Estrutura química, **a)** (S)-albendazol sulfóxido e **b)** (R)-albendazol sulfóxido.

Estudos farmacocinéticos demonstram que o albendazol sulfóxido é a substância responsável tanto pela atividade anti-helmíntica, quanto pelos efeitos toxicológicos dos pacientes. Além disso, a reação de sulfoxidação do albendazol (pró-fármaco) mostrou ser estereosseletiva e inerente a espécie<sup>120,121</sup>. A biotransformação do albendazol em seres humanos, cabras e cachorros mostrou ser favorável para a produção do (+)-albendazol sulfóxido, já maior concentração de (-)-albendazol sulfóxido foi encontrado com predominância em plasma de ratos, após a administração do pró-fármaco<sup>122,123</sup>.

Além da atividade anti-helmíntica conferida ao albendazol sulfóxido, esta substância tem sido testada sobre diversos tipos de células tumorais, apresentando resultados promissores<sup>124,125</sup>.

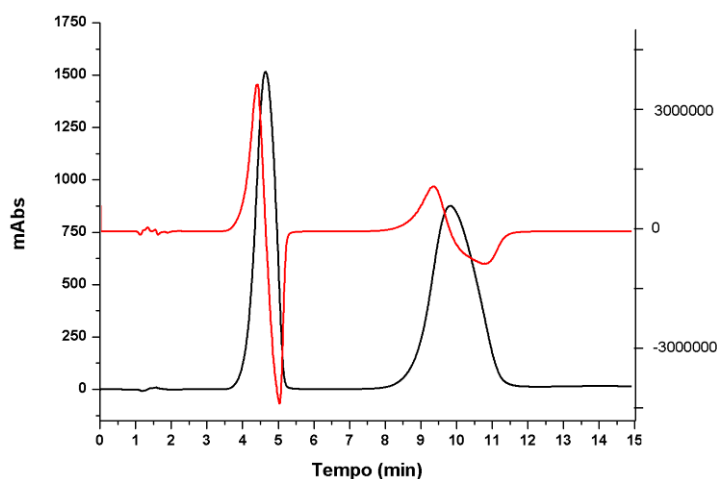
Apesar do grande poder farmacológico do albendazol sulfóxido, procedimentos para o isolamento de seus enantiômeros é restrito, sendo descrito na literatura apenas dois métodos cromatográficos por eluição<sup>123,126</sup>. Desta forma, o desenvolvimento de processos de purificação enantiomérica do albendazol sulfóxido em larga escala são requisitados, para suprir a necessidade por testes de atividade de ambos enantiômeros puros. Neste contexto, desenvolveu-se um procedimento de resolução do albendazol sulfóxido utilizando o processo VARICOL<sup>®127</sup>.

Desenvolveu-se o estudo de sobrecarga para o albendazol sulfóxido nas condições de separação encontradas, após o estudo pela busca por condições de separação e consulta na literatura<sup>128</sup>. O experimento foi realizado através da variação de concentração da mistura racêmica, com o volume de injeção fixo, sendo a concentração máxima igual à solubilidade do albendazol sulfóxido em metanol. Desta forma, variou-se as concentrações de 0,5 à 5,0 mg/mL, com a taxa de variação de 0,5 mg/mL (Figura 3. 53). O comprimento de absorção utilizado para o estudo de sobrecarga foi de  $\lambda=305\text{nm}$ , já que o comprimento de absorção máximo ( $\lambda=290\text{ nm}$ ) causa a saturação do detector, nestas concentrações.



**Figura 3. 53** – Cromatogramas do estudo de sobrecarga para o alendazol sulfóxido, CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20 $\mu$ m), metanol (100%), 3,0 mL/min,  $\lambda$ =305 nm, Volume de Injeção: 2,0 mL.

Os pontos de inflexão das bandas cromatográficas foram determinados pela 1<sup>o</sup> derivada dos cromatogramas, os quais foram identificados como os valores máximos das mesmas. No caso da injeção de 1mg, por exemplo, os valores para os pontos de inflexão da primeira e segunda banda cromatográfica são, respectivamente, 4,38 e 9,33min. (Figura 3. 54).



**Figura 3. 54** – 1<sup>o</sup> derivada do cromatograma da separação do alendazol sulfóxido (0,5 mg/mL), CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20  $\mu$ m), metanol (100%), 3,0 mL/min,  $\lambda$ =305 nm, Volume de Injeção: 2,0 mL.

A Tabela 3. 23 apresenta os resultados obtidos onde nota-se a mesma tendência já observada para os outros fármacos. Ou seja, com o aumento da carga injetada na coluna cromatográfica há diminuição do ponto de inflexão.

**Tabela 3. 23 – Parâmetros cromatográficos obtidos do estudo de sobrecarga do albendazol sulfóxido.**

Concentração (mg/ml)	Rs	N	tr <sub>1</sub>	tr <sub>2</sub>
0,5	3,01	310	4,40	9,35
2,0	2,91	300	4,39	9,26
1,5	2,28	214	4,30	8,82
2,0	1,97	173	4,25	8,56
2,5	1,86	155	4,24	8,49
3,0	1,53	130	4,18	8,21
3,5	1,48	114	4,17	8,14
4,0	1,48	111	4,13	8,05
4,5	1,17	93	4,00	7,57
5,0	1,15	85	4,00	7,49

\*CHIRALPAK AD® (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20 µm), metanol (100%), 3,0 mL/min, λ = 305 nm, Vol. Inj.: 2,0 mL.

A partir dos dados das condições analíticas e das condições de sobrecarga da separação calculou-se as isotermas de adsorção para ambos enantiômeros do albendazol sulfóxido e determinou-se as condições de operação do sistema VARICOL®. As isotermas de adsorção obtidas foram:

$$q_{(-)} = 1,0C_{(-)} + \frac{1,53C_{(-)}}{1 + 0,17C_{(-)} + 0,64C_{(+)}}$$

$$q_{(+)} = 1,0C_{(+)} + \frac{5,73C_{(+)}}{1 + 0,17C_{(+)} + 0,64C_{(-)}}$$

Onde,  $q_i$  é a concentração do soluto (i) na fase estacionária,  $C_i$  é a concentração do soluto (i) na fase móvel.

Os parâmetros iniciais de operação foram obtidos através da simulação no programa HELP 10.3. Observa-se elevados valores para as vazões das zonas de dessorção (Qeluate/Qreciclo/Qextrato), em virtude da grande retenção do extrato, em relação ao refinado (Tabela 3. 24).

Tabela 3. 24 – Parâmetros iniciais de operação do VARICOL® para a separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).

Reciclo	Alimentação	Extrato	Vazões (ml/min)		QI	QII	QIII	QIV
			Refinado	Eluente				
18,26	1,42	11,91	2,12	12,61	18,26	6,35	7,77	5,65
Zonas								
I	II		III	IV			Período	
0,98	2,38		1,43	1,21			2,0	

O tempo de ciclo para a separação do albendazol sulfóxido, no sistema VARICOL®, foi de 12,10 minutos. Após 10 ciclos, o sistema atingiu o estado estacionário e o programa ACS foi ligado na configuração mostrada na Tabela 3. 25.

Tabela 3. 25 – Parâmetros determinados para o ACS para a separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).

Pureza enantiomérica	refinado	extrato
	98%	95%
Composto alvo	refinado	
Controle da zona de separação	QII/QIII	
Detector	polarímetro	
Controle da zona de limpeza	Zona I	Zona IV
	Hardness	Hardness

O procedimento de separação foi realizado durante um total de 55 ciclos ou 663,3 minutos, sendo que a coleta dos enantiômeros foi realizada por 45 ciclos, apenas durante o estado estacionário. A Tabela 3. 26 apresenta os ajustes das vazões do programa ACS durante todo o processo.

Tabela 3. 26 – Variação de vazões realizada pelo programa sistema de controle avançado para a separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).

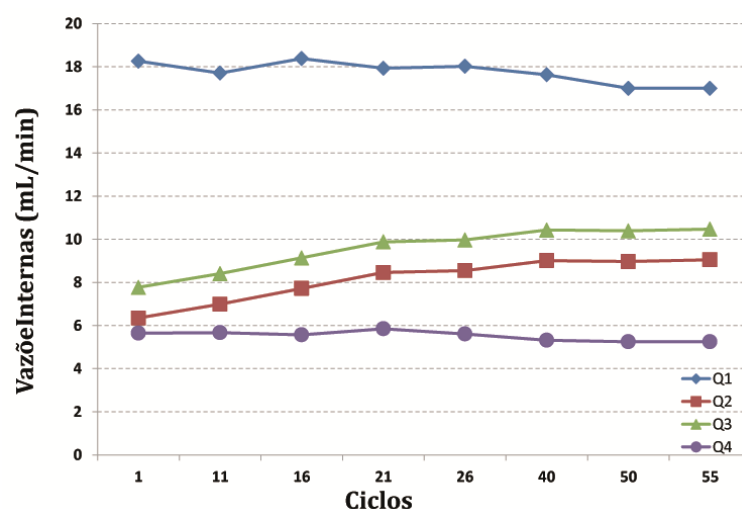
Vazões*/Ciclos	1	11	16	21	26	40	50	55
QI	18,26	17,71	18,38	17,93	18,02	17,63	17,00	17,00
QII	6,35	6,99	7,72	8,46	8,55	9,01	8,97	9,05
QIII	7,77	8,41	9,14	9,88	9,97	10,43	10,39	10,47
QIV	5,65	5,67	5,57	5,85	5,61	5,32	5,25	5,25

\*mL/min



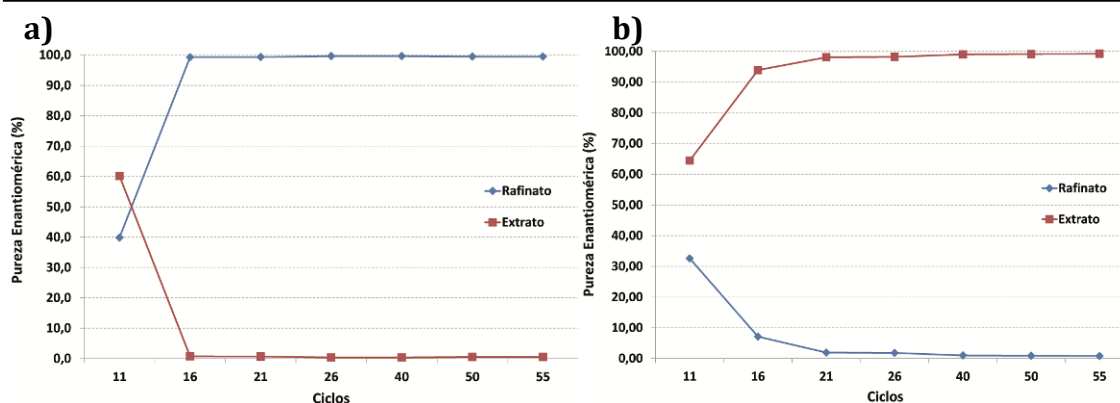
Através dos dados da tabela percebe-se uma tendência do programa ACS para os ajustes das vazões internas. De maneira geral, ocorreu a diminuição do QI e QIV, enquanto que QII e QIII foram aumentados. Ao diminuir as vazões da zona de limpeza o programa monitora o sistema para evitar contaminação do extrato pelo refinado pela zona 4 e aumenta a concentração do extrato em seu ponto de coleta. A variação no QI indica, que as vazões da zona de dessorção simuladas pelo HELP 10.3 estavam muito elevadas.

Com o aumento das vazões na zona de separação, o programa ACS evita a contaminação do extrato pelo refinado na zona 2, mantendo a vazão de alimentação constante. A Figura 3. 55 apresenta o perfil das vazões internas durante o processo.



**Figura 3. 55** – Perfil das vazões internas durante o processo de separação do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).

Para se avaliar a pureza enantiomérica do extrato e do refinado durante o processo, amostras foram coletadas nos pontos de retirada dos enantiômeros e analisadas. Com esse procedimento, foi possível estipular a eficiência da separação. Ao atingir o estado estacionário as purezas obtidas para ambos enantiômeros eram baixas, na ordem de 60,0%. Com as mudanças realizadas pelo ACS, após 5 ciclos a pureza do refinado já era elevada, enquanto que o extrato passou a ter pureza alta somente a partir do ciclo 21. Os gráficos da Figura 3. 56 ilustram as purezas enantioméricas alcançadas durante os ciclos do processo.



**Figura 3. 56** – Pureza enantiomérica durante o processo de separação do alendazol sulfóxido (5,0 g/L) **a)** Refinado, **b)** Extrato.

Os ajustes realizados pelo ACS e as purezas obtidas para as amostras coletadas, indicam que as condições iniciais do QII e QIII não estavam sendo eficientes para a separação dos enantiômeros. Ao aumentar as vazões da zona de separação, a contaminação do extrato pelo refinado foi solucionada e o aumento da concentração de refinado em seu ponto de coleta, proporcionou elevada pureza para este enantiômero. Além de otimizar a separação da mistura racêmica no estado estacionário, o programa ACS foi capaz de manter elevadas purezas enantioméricas durante todo o processo. A Tabela 3. 27 apresenta os valores para as purezas enantioméricas em relação aos ciclos.

**Tabela 3. 27** – Pureza enantiomérica dos compostos durante a separação do alendazol sulfóxido (5,0 g/L).

Ciclos	Extrato (%)		Refinado (%)	
	1º Enantiômero	2º Enantiômero	1º Enantiômero	2º Enantiômero
11	32,59	64,4	39,9	60,15
16	7,11	93,9	99,3	0,70
21	1,92	98,1	99,4	0,65
26	1,80	98,2	99,7	0,34
40	1,00	99,0	99,7	0,34
50	0,89	99,1	99,5	0,50
55	0,80	99,2	99,5	0,50

O procedimento de separação foi parado propositalmente no ciclo 55, os parâmetros obtidos para purificação do alendazol sulfóxido demonstram a grande

eficiência que o processo VARICOL<sup>®</sup> pode atingir. Durante os 45 ciclos de coleta, obteve-se aproximadamente 1,0 g de cada enantiômero puro, com recuperação média de 97,0% (Tabela 3. 28).

**Tabela 3. 28 – Parâmetros do processo de purificação enantiomérica do albendazol sulfóxido (5,0 g/L).**

Parâmetros	
Produtividade do refinado (g refinado/Kg CSP.dia)	64,9
Razão enantiomérica do refinado (%)	99,5
Massa de refinado obtida (g)	0,88
Taxa de produção refinado (g/dia)	1,90
Recuperação do refinado (%)	94,8
Produtividade do Extrato (g extrato/Kg CSP.dia)	67,9
Razão enantiomérica do Extrato (%)	99,0
Massa do Extrato obtido (%)	0,93
Taxa de produção extrato (g/dia)	1,99
Recuperação do extrato (%)	99,2
Consumo de solvente total (L/kg de enantiômero)	4,23
Número de ciclos de coleta	45
Tempo do ciclo (min)	12,10
Tempo total de coleta (min)	544,5

Apesar do parâmetro de produtividade (Kg/Kg.dia) ser utilizado para avaliar a eficiência do processo de purificação enantiomérica, há divergências na literatura sobre sua utilidade e a aplicabilidade sobre um processo de separação, em especial para processos na escala g/dia.

De maneira geral, Welch<sup>24</sup> considera que um processo de purificação enantiomérico por SMB é bom quando a produtividade é de, aproximadamente, 1kg/kg.dia, entretanto, para o processo se tornar rotineiro na obtenção de enantiômeros puros, a produtividade deve ser próxima de 10kg/kg.dia<sup>24</sup>. Contudo, Quallich<sup>110</sup> e Francotte<sup>109</sup> relatam como positivo a purificação enantiomérica da sertralina e gaifenesina por EBC, na ordem de gramas/dia, respectivamente. Os processos que utilizam fases móveis poucos agressivas ao meio ambiente e/ou recuperáveis também são vantajosos.

O VARICOL-Micro<sup>®</sup> é projetado para ser utilizado na fase de descobrimento para o desenvolvimento de um novo fármaco (Figura 3. 57)<sup>35</sup>. Desta forma, o processo aqui desenvolvido atinge as expectativas, já que ambos os enantiômeros do albendazol sulfóxido foram obtidos com altas purezas na escala g/dia, podendo suprir a necessidade para testes de atividade *In Vitro* ou até mesmo *In Vivo* em animais de pequeno porte.

	Descobrimento	Descobrimento Inicial	Descobrimento Final	Produção
<b>Quantidade</b>	mg – 50 g	100 g -10 kg	5 – 100 kg	toneladas
<b>Enantiômero</b>	Ambos	Ambos	Ativo	Ativo
<b>Tempo</b>	Dias	Semanas	Meses	---
<b>Custo</b>	Dispensável	Dispensável	Importante	importante
<b>Escalonamento</b>	Dispensável	Dispensável	Importante	Importante

**Figura 3. 57** - Esquema dos estágios de produção de fármacos quirais (Adaptado Ref 35).

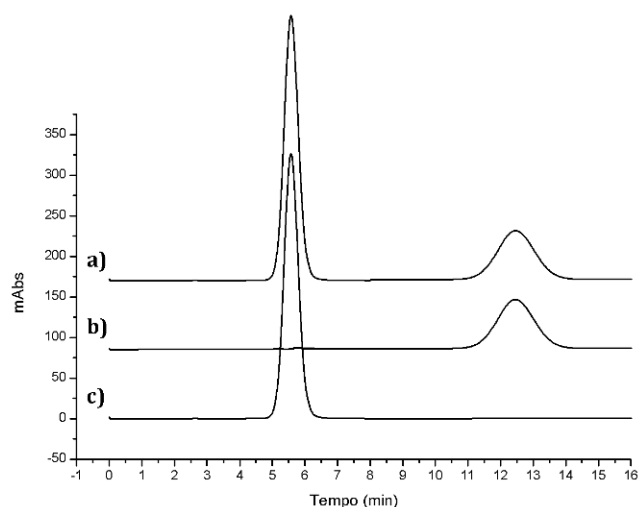
A produtividade baixa do processo de purificação do albendazol sulfóxido – 70,0 g/Kg.dia para o extrato e 60,0 g/Kg.dia para o refinado - é atribuída a baixa solubilidade deste composto nos solventes permitidos para colunas quirais de polissacarídeos (adsorvidos ao suporte). Com isso, baixa concentração de alimentação foi utilizada, o que restringiu a quantidade de composto coletada.

Se por um lado a solubilidade do albendazol sulfóxido é baixa em metanol, por outro o uso exclusivo deste eluente como fase móvel proporcionou sua recuperação de maneira simples e eficiente. Durante o procedimento de rotaevaporação do solvente para a obtenção dos enantiômeros puros, o metanol foi destilado e recuperado em 95,0 %, com alto grau de pureza confirmado por <sup>1</sup>HRMN. Desta forma, a fase móvel utilizada é quase totalmente reutilizável.

O processo de purificação mostrou-se reprodutível interdias. Ao repetir o experimento, reiniciou-se o processo de purificação com as vazões e zonas finais (ciclo 55) do primeiro dia. Atingiu-se o estado estacionário com apenas 4 ciclos e, no 5<sup>o</sup> ciclo, já tinha-se purezas de 99,0% para o refinado e 99,4% para o extrato.

É importante salientar, que no segundo dia de experimento não foi necessário ligar o sistema de controle avançado (ACS), já que as condições do experimento mostraram-se estáveis para se ter purezas enantioméricas elevadas.

A Figura 3. 58 mostra os cromatogramas obtidos para os enantiômeros do albendazol sulfóxido após a purificação enantiomérica.



**Figura 3. 58** – Cromatograma da separação do **a)** ( $\pm$ )–albendazol sulfóxido, **b)** (+)–albendazol sulfóxido e **c)** (-) – albendazol sulfóxido, pela CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm de D.I., 20  $\mu$ m), metanol (100%), 3,0 mL/min,  $\lambda$ =290 nm, Vol. de Inj.: 0,1 mL.

Os enantiômeros puros coletado foram submetidos à caracterização por espectrometria de massas e polarimetria. Realizou-se experimentos de polarimetria para a mistura racêmica, para o extrato e para o refinado, obtendo-se valores de  $[\alpha]_D^{25^\circ C} = -0,26$ ;  $[\alpha]_D^{25^\circ C} = -108,56$  e  $[\alpha]_D^{25^\circ C} = +108,43$ ; respectivamente. Os módulos semelhantes de rotação óptica do refinado e do extrato e os valores próximos dos já reportados<sup>123</sup> confirmam as purezas enantioméricas. Os espectros de massas de ambos enantiômeros apresentaram os sinais do íon molecular  $[M+H]^+ = 282$  e dos fragmentos principais  $[M-C_9H_{10}O_3N_3S]^+ = 240$ ,  $[M-C_8H_6O_2N_3S]^+ = 208$ .

No intuito de se avaliar a distribuição dos enantiômeros do albendazol através das zonas de um ciclo, o perfil interno de concentração experimental para a separação foi determinado. Para se fazer a quantificação dos enantiômeros do albendazol sulfóxido foi necessário desenvolver uma curva de calibração para os enantiômeros, a partir da mistura racêmica. Foram preparadas 7 soluções com concentrações variando de 0,1 à 1,5 mg/mL. As curvas de calibração foram obtidas com coeficientes angulares maiores do que 0,99 (Figura 3. 59).

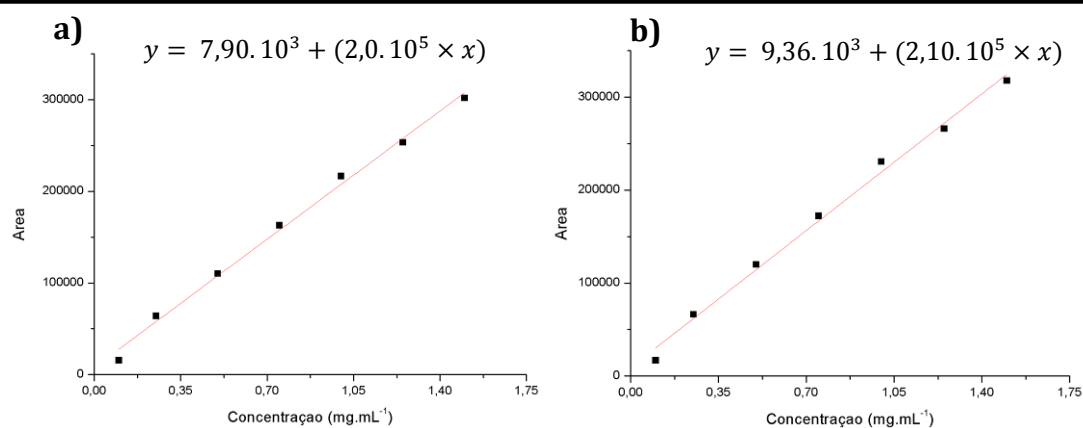


Figura 3. 59 – Curva de calibração do a) (+) – albendazol sulfóxido e b) (-) – albendazol sulfóxido.

Os pontos de coleta foram determinados considerando as condições de operação do sistema e as posições das válvulas durante um ciclo. Durante o ciclo 55 as vazões de operação estavam estabilizadas e, portanto, coletou-se em onze posições diferentes (Tabela 3. 29).

Tabela 3. 29 – Perfil interno de concentração do albendazol sulfóxido

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Posição	0,00	0,25	0,73	0,98	1,23	2,17	3,36	4,08	4,79	5,04	5,75
Tempo*	3,40	2,90	1,94	1,44	0,94	11,06	8,68	7,25	5,82	5,32	3,90

\*minutos

A distribuição dos enantiômeros mostrou-se um pouco deslocada em direção a zona I, já que o ponto da mistura racêmica estava localizado em, aproximadamente, 3,0 e não em 3,36. Os pontos de coleta dos enantiômeros 0,98 do extrato e 4,79 do refinado mostraram-se isento de contaminação e com alta concentração de enantiômero coletado. A fuga do refinado pela zona IV (ponto 5,75) não resultou em contaminação do extrato, já que ocorreu em pouca quantidade.. A Figura 3. 60 demonstra o gráfico do perfil interno de concentração para o processo de purificação do albendazol sulfóxido.

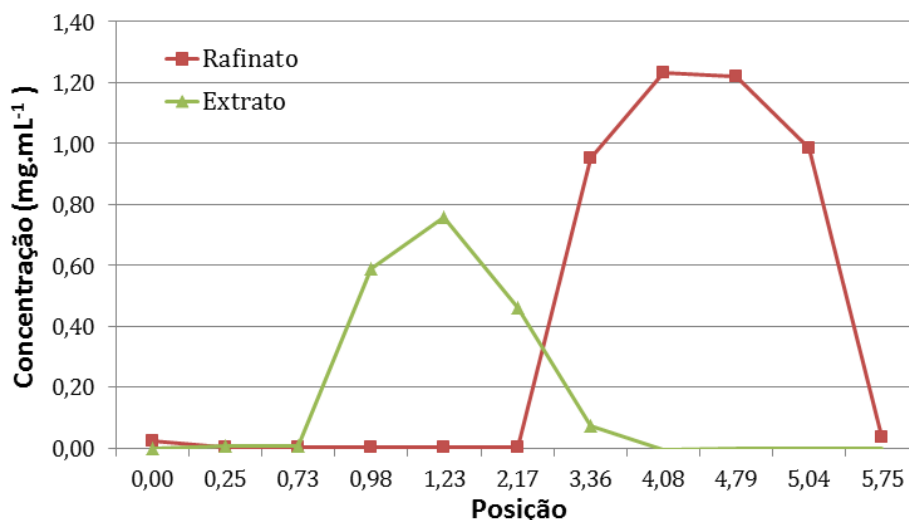


Figura 3. 60 – Perfil interno de concentração do processo de purificação do albendazol sulfóxido.

Os ótimos resultados obtidos para a pureza enantiomérica dos compostos indicam que o deslocamento das concentrações não prejudicou o processo de purificação. Contudo, pequenos ajustes para aumentar a vazão de alimentação e para cessar a contaminação do extrato pelo refinado na zona IV podem ser realizados, proporcionando um procedimento mais produtivo. Para aumentar a região de alimentação deve-se diminuir QII e aumentar QIII, já para evitar a contaminação do extrato pelo refinado deve-se diminuir o QIV.

Os cromatogramas obtidos durante a separação do albendazol sulfóxido mostraram-se isento de contaminação, sobretudo após o ACS ser ligado. Ao comparar os cromatogramas do ciclo 10 e 55, observa-se que os ajustes da vazões realizadas pelo ACS proporcionou a dessorção do extrato na zona I, evitando a contaminação do refinado por esta zona. Além disso, o polarímetro “zerado” na região do eluente e com seu ponto de inflexão no centro da região de alimentação, indicam altas purezas para os enantiômeros (Figura 3. 61).

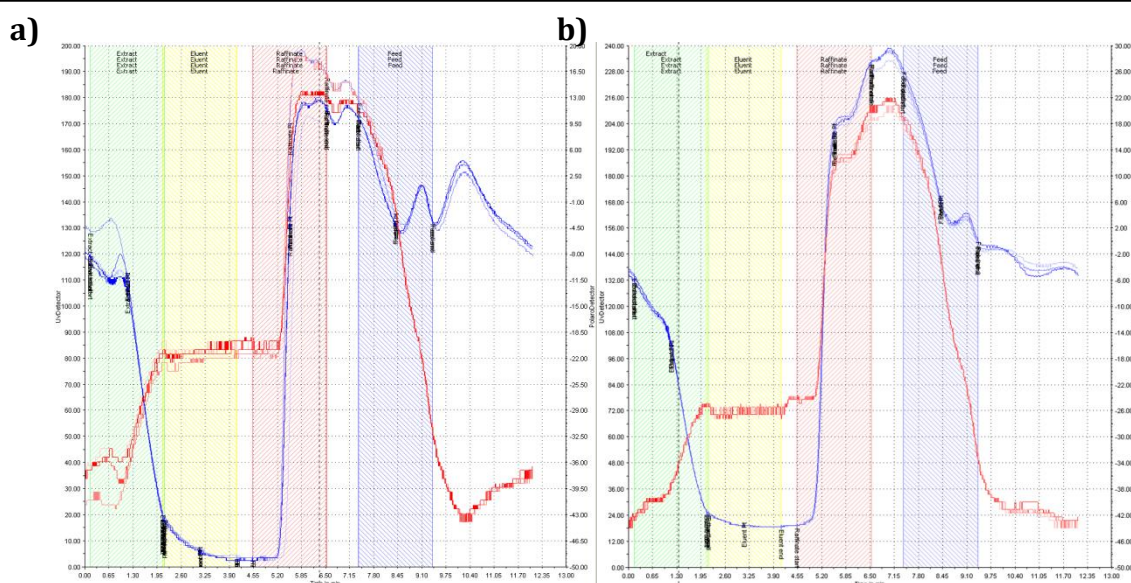


Figura 3. 61 - Cromatograma obtido durante o processo de purificação do albendazol sulfóxido a) ciclo 10 b) ciclo 55.

O perfil interno teórico dos enantiômeros durante o procedimento de separação demonstra a centralização da distribuição dos enantiômeros, por todo o processo, indicando a eficiência da simulação realizada pelo HELP 10.3. Observa-se, novamente, a pequena contaminação na zona I antes do programa ACS ser ligado (ciclo 10). O  $X_c$  localizado em 50,0% e a coleta dos enantiômeros nas extremidades da banda indicam a obtenção de altas purezas para os compostos coletados (Figura 3. 62).

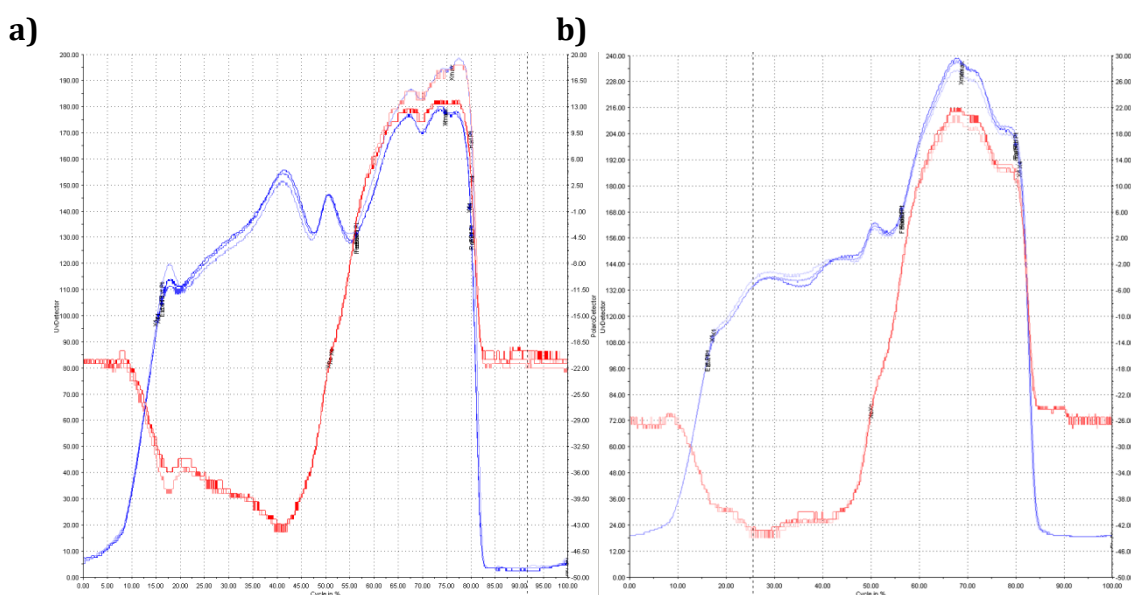


Figura 3. 62 – Perfil interno teórico obtido durante o processo de purificação do albendazol sulfóxido a) ciclo 10 b) ciclo 55.

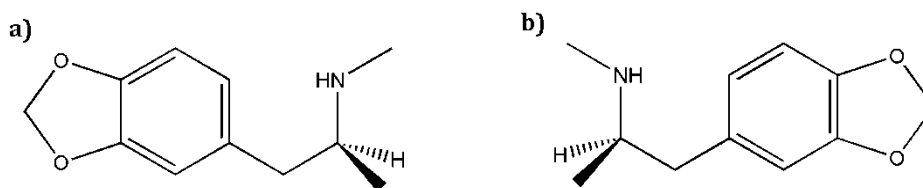


O processo de separação do albandazol sulfóxido pelo VARICOL<sup>®</sup> proporcionou a coleta de ambos enantiômeros com alta pureza enantiomérica<sup>127</sup>, possibilitando a realização de testes de atividade biológica sobre cistos de *Taenia solium* e também a determinação da configuração absoluta dos centros estereogênico através do uso de dicroísmo vibracional circular (VCD, *Vibrational Circular Dichroism*).

### 3.2 3,4-Metilenodioxi-metaanfetamina: Purificação Enantiomérica

O MDMA (3,4-Metilenodioxi-metaanfetamina) ou *ecstasy* é uma conhecida droga de abuso, que ao ser consumido causa efeito de euforia e entusiasmo. Ultimamente, teve-se um acréscimo no consumo desta droga, devido a popularização de festas raves e de músicas eletrônicas<sup>129</sup>.

Apesar de ser um composto quiral, o MDMA é consumido em sua forma racêmica (Figura 3. 63). Estudos relatam que os enantiômeros do MDMA possuem efeitos farmacológicos distintos, enquanto o (S)-(+)-MDMA é metabolizado por humanos mais rapidamente e é responsável pelo efeito estimulante, o (R)-(-)-MDMA possui propriedades alucinógenas<sup>130</sup>.



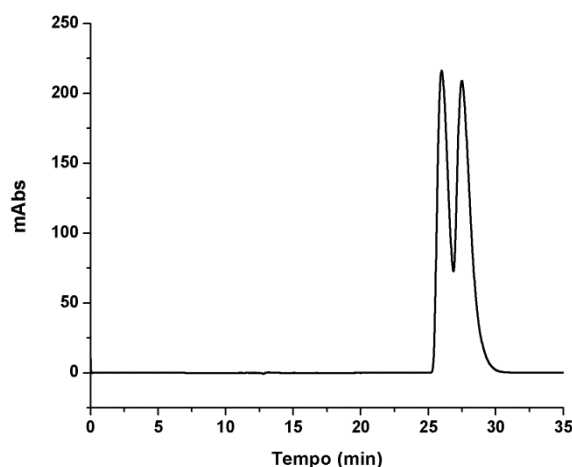
**Figura 3. 63** - Estrutura química, **a)** (S)-(+)-MDMA e **b)** (R)-(-)-MDMA.

Apesar da demanda pelos enantiômeros puros do MDMA, há poucos relatos na literatura sobre métodos de obtenção em escala multimiligrama. De maneira geral, síntese assimétrica é aplicada para a obtenção dos compostos enantiopuros<sup>131,132</sup>.

Meyer *et al.* utilizaram EBC para resolver o MDMA, neste caso utilizou-se uma coluna de ciclodextrina Hibar ChiraDex<sup>®</sup> (25,0 x 1,0 cm D.I., 5 µm), acetonitrila/tampão acetato de amônia (pH 6.5, 100 mM) (85:15) como fase móvel e um coletor de frações automatizado. Apesar de ter atingido alto grau de pureza para ambos enantiômeros, pequena quantidade de composto foi isolada (12 mg/enantiômero), já que utilizou-se 500 µg como massa injetada – 100 µL de uma solução 5 mg/ml<sup>43</sup>.

No intuito de se obter os enantiômeros puros do MDMA para estudos tóxicológicos, realizou-se o estudo da busca por condições de separação para esta mistura racêmica em quatro tipos de colunas quirais. Colunas de polissacarídeos, glicopeptídeos macrocíclicos, ciclodextrina e polímero sintético foram avaliadas em todos os modos de eluição permitidos.

Dentre as colunas analisadas, a única coluna capaz de enantiorresolver o MDMA foi a de  $\beta$ -ciclodextrina, no modo reverso de eluição, mesmo assim com baixa enantiorresolução,  $\alpha = 1,11$  e  $R_s = 0,84$  (Figura 3. 64). As colunas de  $\beta$ -ciclodextrina são conhecidas por possibilitarem a formação de complexos de inclusão, em cavidades constituídas por sete unidades  $\alpha$ -D-glicose conectadas por ligações  $\alpha - (1,4)$ <sup>71</sup>.



**Figura 3. 64** - Cromatograma da separação obtida para o MDMA (0,1 mg/ml), Hibar ChiraDex<sup>®</sup> (25,0 x 1,0 cm, 5  $\mu$ m), acetonitrila/tampão acetato de amônia (pH 6.5, 100 mM) (70:30), 500  $\mu$ l, 270 nm.

A EBC com reciclo é uma alternativa eficiente e muito útil, em especial, para separações com baixa enantiosseletividade<sup>37,39</sup>. A possibilidade de realizar a separação em condição de sobrecarga, de realizar o *shaving* e de reciclar o eluente durante o procedimento, abrindo a válvula de reciclo apenas durante as coletas, faz com que os métodos sejam desenvolvidos com economia de solvente e com maior produtividade, em comparação a métodos de EBC sem reciclo (Figura 3. 65)<sup>128,133</sup>.

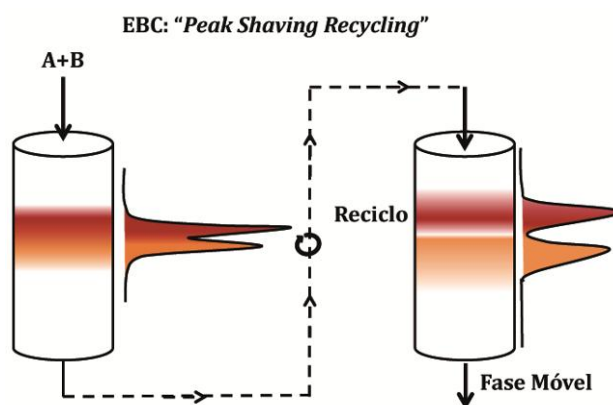


Figura 3. 65 - Esquema de EBC com *peak shaving recycling*.

Sendo assim, a técnica de *peak shaving recycling*, com sobrecarga de massa, foi utilizada para a separação do MDMA em escala preparativa. Foram realizadas, 16 injeções com quatro reciclo cada, 20 mg/ml como concentração de amostra e 500  $\mu$ l como volume de injeção. A vazão de 3,0 ml/min foi escolhida, considerando a sobreposição das bandas cromatográficas durante o reciclo<sup>133</sup>. O tempo de cada separação foi de 135 minutos, sendo a válvula de coleta aberta por apenas 21 minutos de cada ciclo ou 336 minutos em todo o processo (Figura 3. 66).

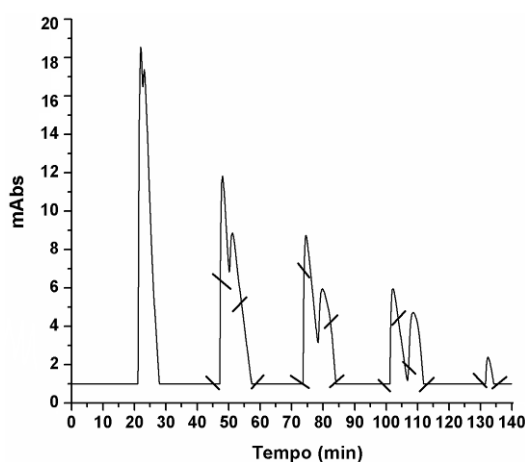


Figura 3. 66 - Cromatograma da separação preparativa para o MDMA (20,0 mg/ml), Hibar ChiraDex<sup>®</sup> (25,0 x 1,0 cm, 5  $\mu$ m), acetonitrila/tampão acetato de amônia (pH 6.5, 100 mM) (70:30), 500  $\mu$ l, 270 nm (os traços representam as posições de coleta).

A taxa média de produção do MDMA enantiopuro obtida foi de 40 mg/dia, o que proporcionou um total de 45,0 mg do primeiro e 75,0 mg do segundo enantiômero, com recuperação de 56,0% e 93,0%, respectivamente (Tabela 3. 30). A ordem de eluição foi determinada por dicroísmo circular e a configuração absoluta atribuída de acordo com a literatura<sup>134</sup>.

Tabela 3. 30 – Parâmetros do processo para o isolamento dos enantiômeros do MDMA.

	Parâmetros	Valores
(R)-(-)-MDMA	Razão enantiomérica (%)	99,0
	Massa coletada (mg)	45,0
	Taxa de produção (mg/dia)	30,0
	Recuperação (%)	56,0
(S)-(+)-MDMA	Razão enantiomérica (%)	96,0
	Massa coletada (mg)	75,0
	Taxa de produção (mg/dia)	50,0
	Recuperação (%)	93,0
Consumo de solvente (L)		1,00

A razão enantiomérica dos compostos foi medida por cromatografia líquida, nas mesmas condições de separação utilizada para se fazer a separação em escala preparativa. Teve-se 99,0% de pureza para o (R)-(-)-MDMA e 96%,0 para o (S)-(+)-MDMA (Figura 3. 67).

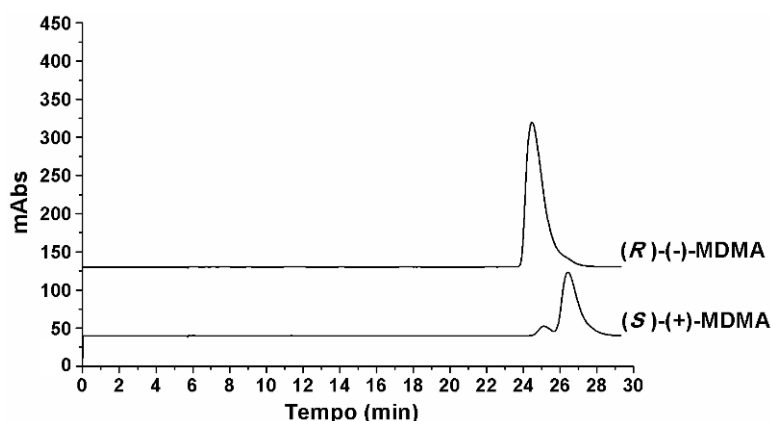
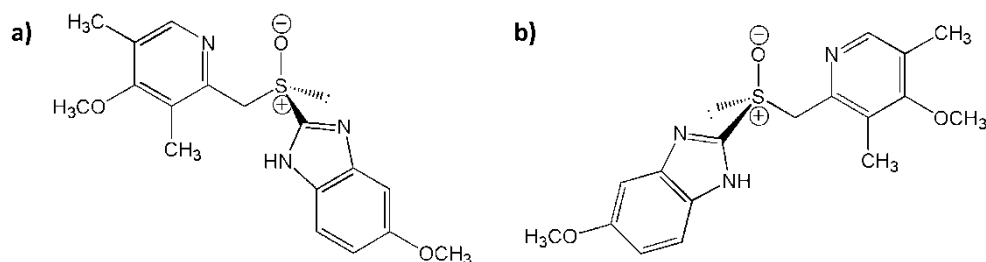


Figura 3. 67 - Cromatograma dos enantiômeros do MDMA (0,5 mg/ml), Hibar ChiraDex<sup>®</sup> (25,0 x 1,0 cm, 5 µm), acetonitrila/tampão acetato de amônia (pH 6,5, 100 mM) (70:30), 500 µl, 270 nm.

O isolamento dos enantiômeros do MDMA com alta pureza enantiomérica e com massas na ordem de mg/dia proporcionou a realização de testes *In Vitro* de stress oxidativo em fígado de rato<sup>135</sup>.

### 3.3 Omeprazol: Purificação enantiomérica

O omeprazol (Figura 3. 68) é um importante pró fármaco inibidor da bomba protônica, administrado em casos de gastrites e úlceras. A hipersecreção ácida é interrompida através da ligação covalente entre o fármaco e a superfície das células parietais gástricas. Desta forma, a atuação da  $H^+/K^+$  ATPase é inibida e a desordem da última etapa de secreção de íons  $H^+$  no suco gástrico é amenizada<sup>136,137</sup>.



**Figura 3. 68** – Estrutura química do **a)** (R)-(+)-omeprazol **b)** (S)-(-)-omeprazol.

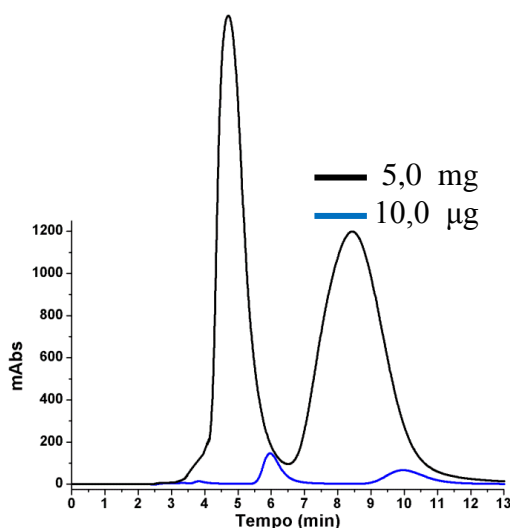
Este fármaco é administrado tanto em sua forma racêmica, quanto na forma enantiomericamente pura – (S)-(-)-enantiômero – chamado esomeprazol. Ambos, são metabolizados no fígado pelo citocromo P450<sup>128</sup>. O S-enantiômero possui propriedades metabólicas favoráveis em relação à mistura racêmica<sup>138</sup>, principalmente, por ter uma menor variabilidade clínica<sup>139</sup>.

O grande interesse nos enantiômeros puros do omeprazol resultou na existência de diversos métodos de obtenção, em especial, por cromatografia líquida<sup>128,138,140,141</sup> e síntese assimétrica<sup>142</sup>. Devido ao excelente poder de enantiorresolução das colunas de polissacarídeos para o omeprazol, tanto os métodos cromatográficos de eluição<sup>128,138,140</sup> quanto os de multicolumnas<sup>141</sup> já foram aplicados para a separação deste fármaco.

A obtenção dos enantiômeros do omeprazol, para testes de degradação biótica e para dar continuidade a estudos de interação, entre este composto e os seletores quirais de polissacarídeos<sup>102,143,144</sup>, agora por RMN cromatográfico<sup>145</sup>, justifica a separação do omeprazol desenvolvida por EBC em escala grama/dia.

A separação do omeprazol em condições diluídas pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica, com metanol 100% como fase móvel, possui excelente enantiosseletividade ( $\alpha=2,07$ ) e enantiorresolução ( $R_s=2,55$ ), além disso baixos fatores de retenção ( $k_1=1,72$ ;  $k_2=3,56$ ) são obtidos (Figura 3. 69). Por

comparação ao artigo de Belaz *et al.* <sup>128</sup> tem-se que o primeiro enantiômero eluído é o (S)-(-)-omeprazol o segundo é o (R)-(+)-omeprazol.



**Figura 3. 69** – Separação do omeprazol pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (15 x 0,46 cm D.I., 10 µm), metanol (100%), 1,0 ml/min,  $\lambda=325$  nm.

Avaliou-se a capacidade de carga da separação do omeprazol, no intuito de se trabalhar no máximo de produtividade, atingiu-se o máximo de carga de injeção com 5 mg de mistura racêmica na coluna analítica (Figura 3. 69).

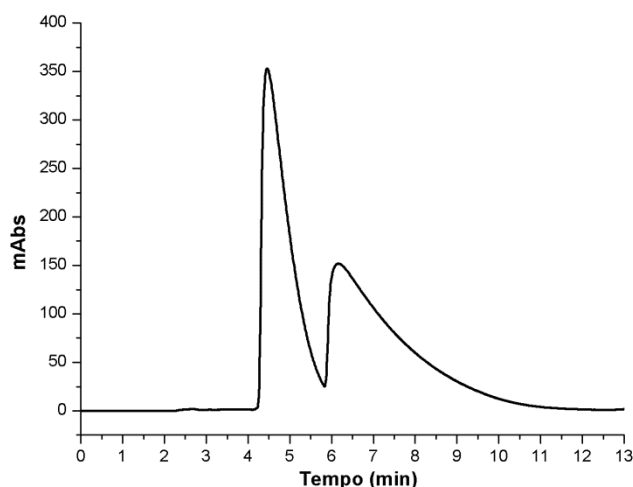
O escalonamento de colunas com pequeno volume interno para colunas maiores é um importante atrativo para separações em escala preparativa. Desta forma, os estudos de triagem por condições de separação e de capacidade de carga podem ser realizados, previamente, em condições de diluição, requerendo; portanto, uma menor quantidade de mistura racêmica<sup>34</sup>.

Através do fator (S) realizou-se o escalonamento da coluna analítica (15,0 x 0,46 cm D.I., 10 µm) para a coluna preparativa (20,0 x 0,70 cm D.I., 10 µm), ambas preenchidas com a mesma fase estacionária.

$$S = \frac{Rp^2.Lp}{Ra^2.La} = 3,09$$

Para a separação na coluna analítica a vazão usada foi de 1,0 ml/min e atingiu-se a capacidade de carga máxima com 5 mg de composto. Com isso, aplicando o fator de escalonamento, para a coluna preparativa deve-se utilizar a vazão de 3,0 ml/min e a capacidade de carga de 15 mg/ml. O cromatograma apresentado na

Figura 3. 70 demonstra a separação do omeprazol na coluna preparativa, em condição de sobrecarga.



**Figura 3. 70** – Separação do omeprazol (30 mg/ml) pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (20 x 0,70 cm D.I., 10  $\mu$ m), metanol (100%), 3,0 ml/min,  $\lambda$ =325 nm, Vol. Inj. 500  $\mu$ l.

Apesar de uma menor eficiência apresentada pela coluna preparativa em relação a coluna analítica (Tabela 3. 31), a injeção na coluna de 20 x 0,70 cm D.I., nas condições calculadas pelo escalonamento, apresentou uma separação muito similar a separação atingida pela coluna 15 x 0,46 cm D.I., em especial, pelo tempo do início de eluição do primeiro enantiômero (4,2 min) e o tempo de eluição do segundo enantiômero (12,5 min).

**Tabela 3. 31** – Estudo de capacidade de carga para a separação do omeprazol\*

	Concentração (mg/ml)	Volume de Injeção (ml)	Massa de Injeção (mg)	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
Analítica	10,0	0,50	5,00	0,79	2,80	1,46
Preparativa	30,0	0,50	15,0	0,70	1,93	0,84

A eficiência da separação do omeprazol em condição de sobrecarga foi avaliada medindo-se a pureza enantiomérica dos enantiômeros, após a coleta durante uma injeção. Teve-se purezas elevadas para ambos enantiômeros, sendo de 99,8% para o (S)-(-)-omeprazol e de 99,7% para o (R)-(+)-omeprazol.

As características da separação do omeprazol são ideais para a realização de procedimento de purificação enantiomérica por cromatografia de eluição com injeção do tipo *stack*. O alto poder de resolução, o baixo tempo de retenção e a alta capacidade de carga, possibilita um método eficiente e produtivo através da desconsideração do volume morto (Figura 3. 71).

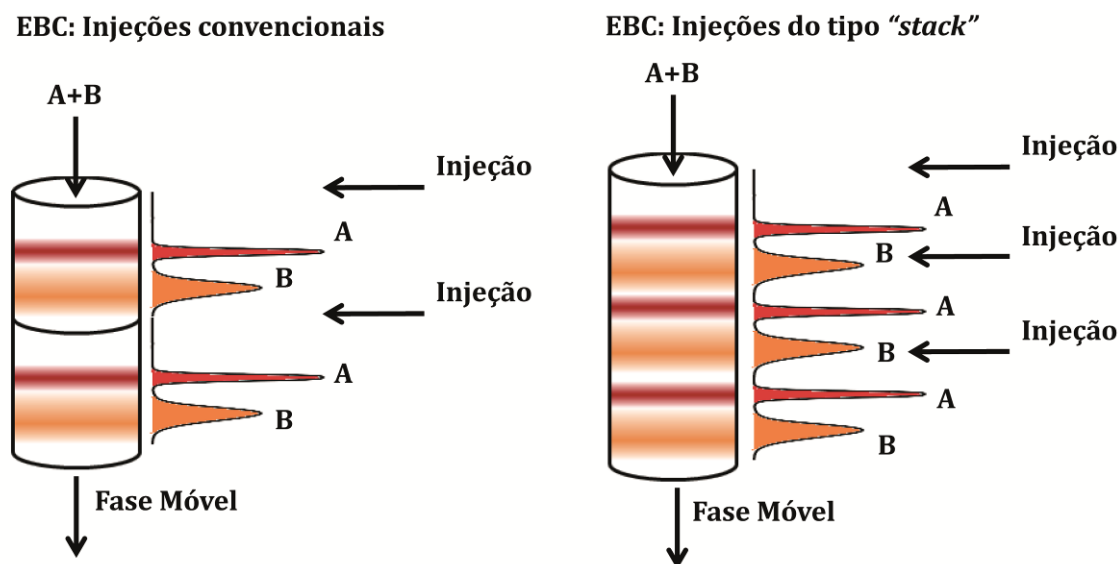


Figura 3. 71 – Esquema ilustrativo da injeção do tipo *stack*.

Para se realizar injeções do tipo *stack* dois tempos da separação são muito importantes de serem medidos, o tempo do início de eluição do primeiro enantiômero ( $t_a^i$ ) e o tempo do fim da eluição do segundo enantiômero ( $t_b^i$ ). A diferença entre estes dois parâmetros é o tempo real em que a mistura enantiomérica é eluída da coluna, sendo; portanto, o tempo das injeções *stack* ( $t_i^1$ ) para cada separação (Figura 3. 72).

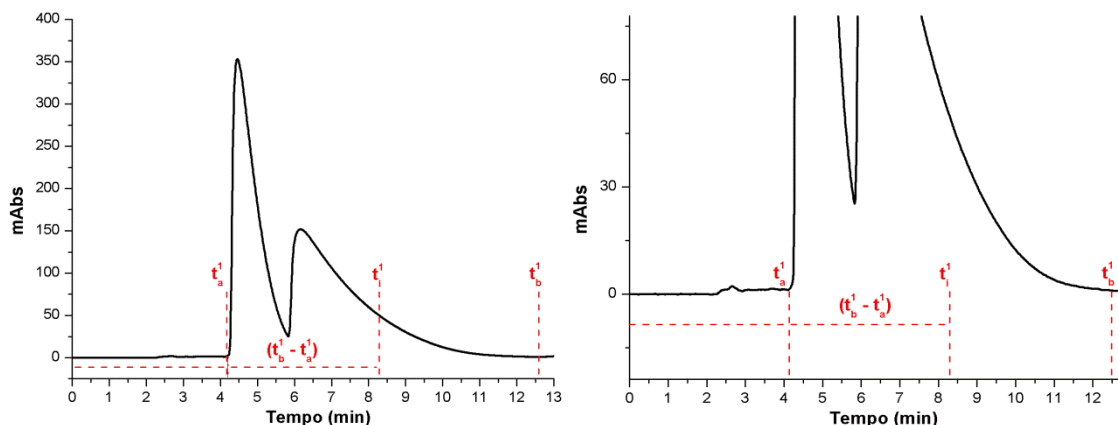


Figura 3. 72 – Cromatograma para o cálculo do tempo da injeção *stack* ( $t_i^1$ ), para a separação do omeprazol (30,0 mg/ml) pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (20,0 x 0,70 cm D.I., 10  $\mu$ m), metanol (100%), 3,0 ml/min,  $\lambda=325$ nm,

Vol. Inj. 500  $\mu$ l.



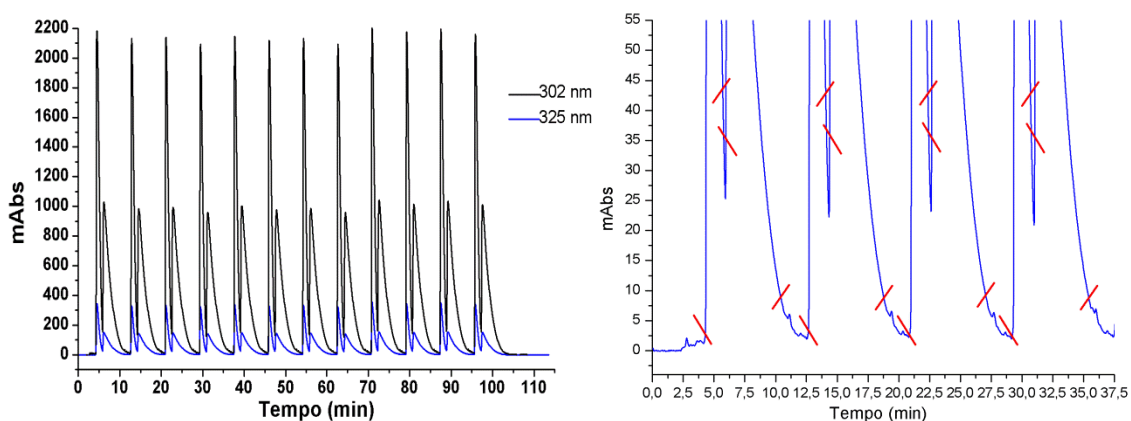
Através destes parâmetros é possível calcular os tempos de injeção para a separação do tipo *stack*, sempre considerando o  $t_a^i$  e o  $t_b^i$  para cada injeção. A Tabela 3. 32 mostra os tempos de todas as injeções realizadas, assim como os tempos de eluição para cada separação.

**Tabela 3. 32 – Tempos de eluição e injeção para a separação do omeprazol**

Injeções	$t_l^i$ (min)	$t_a^i$ (min)	$t_b^i$ (min)
0	0	4,2	12,5
1	8,3	12,5	20,8
2	16,6	20,8	29,1
3	24,9	29,1	37,4
4	33,2	37,4	45,7
5	41,5	45,7	54
6	49,8	54	62,3
7	58,1	62,3	70,6
8	66,4	70,6	78,9
9	74,7	78,9	87,2
10	83	87,2	95,5
11	91,3	95,5	103,8
12	99,6	103,8	112,1

A separação do tipo *stack* foi realizada duas vezes para se avaliar a reprodutibilidade e robustez do método. No total foram injetadas 12 e 11 amostras (30 mg/ml) em cada separação *stack*, totalizando 345 mg de mistura racêmica. Foram monitorados dois comprimentos de onda na região do ultravioleta durante a separação, o máximo de absorção do composto em 302 nm e o de 325 nm, para estipular os pontos de coleta sem a saturação do detector.

O método mostrou-se reprodutível e os tempos de eluição calculados foram confirmados durante as coletas dos enantiômeros do omeprazol. A Figura 3. 73 demonstra um dos cromatogramas *stack* obtidos e uma ampliação deste cromatograma demonstrando os pontos de coleta dos enantiômeros.



**Figura 3. 73** – Cromatograma da separação *stack* do omeprazol (30,0 mg/ml) pela coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (20,0 x 0,70 cm D.I., 10  $\mu$ m), metanol (100%), 3,0 ml/min, Vol. Inj. 500  $\mu$ l.

No total foram isolados 160,4 mg do (S)-(-)-omeprazol e 155,8 mg do (R)-(+)-omeprazol, conferindo ao procedimento um alto valor de recuperação, acima de 90,0%. A Tabela 3. 33 demonstra os parâmetros obtidos para o processo de separação em escala preparativa.

**Tabela 3. 33** – Parâmetros para a separação do omeprazol em escala preparativa.

Parâmetros		Valores
(S)-(-)-omeprazol	Razão enantiomérica (%)	99,7
	Massa coletada (mg)	160,4
	Taxa de produção (g/dia)	1,07
	Recuperação (%)	93,0
(R)-(+)-omeprazol	Razão enantiomérica (%)	98,8
	Massa coletada (mg)	155,8
	Taxa de produção (g/dia)	1,04
	Recuperação (%)	90,3
Consumo de solvente (L)		0,65

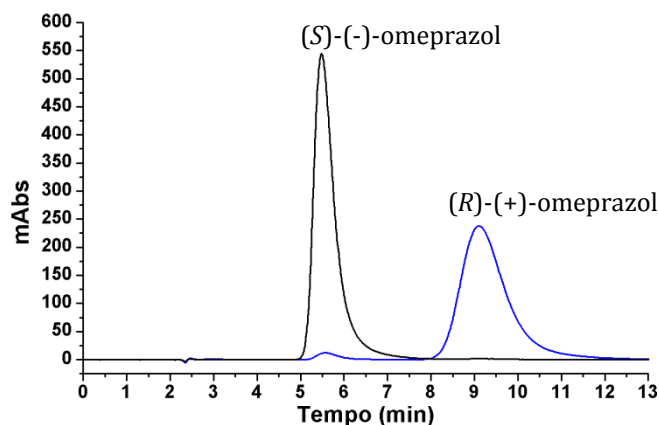
Altos valores de pureza enantiomérica foram obtidos para ambos enantiômeros, além disso uma taxa de produção na ordem de 1,0 g/dia também foi alcançada, devido ao uso das injeções *stack* e da alta carga injetada.

Ao comparar os valores obtidos para esta separação, com valores de alguns procedimentos relatados na literatura, percebe-se a grande eficiência do método desenvolvido. Belaz *et al.*<sup>128</sup> reportam taxas de produções de no máximo 0,175 g/dia, enquanto Toribio *et al.*<sup>138</sup> atingiram no máximo 0,5 g/dia na separação do

omeprazol por cromatografia de eluição com fluido supercrítico. Já Wei *et al.*<sup>141</sup> obtiveram baixa pureza para os enantiômeros do omeprazol ao utilizar SMB.

O diferencial do procedimento aqui descrito é a economia do tempo e de fase móvel, em relação aos outros métodos de cromatografia de eluição. Por descartar o volume morto do sistema, durante as injeções *stack*, o método foi capaz de economizar um total de 214,8 ml de fase móvel (28,0%) e 71,6 minutos (33,2%), em comparação a uma eventual separação por cromatografia de eluição convencional.

Além disso, como a fase móvel utilizada foi metanol 100%, recuperou-a (94,3%) durante o procedimento de rotaevaporação do eluente. A Figura 3. 74 demonstra os cromatogramas obtidos para o (S)-(-)-omeprazol e para o (R)-(+)-omeprazol.



**Figura 3. 74** – Cromatograma para ambos enantiômeros do omeprazol (0,20 mg/ml), coluna tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvida em sílica (15,0 x 0,46 cm D.I., 10 µm), metanol (100%), 1,0 ml/min, Vol. Inj. 0,50 µl.

O procedimento aqui descrito possui um grande potencial para a produção de enantiômeros, considerando até a etapa de desenvolvimento inicial 0,10 kg – 10,0 kg (Figura 3. 57, pp. 82). Realizando o escalonamento para colunas preparativas maiores e estimando a produtividade, têm-se a possibilidade de se obter altas taxas de produção, chegando até a 550,0 g/dia. Colunas um pouco superiores as utilizadas, com dimensões de 25,0 x 2,1 cm D.I. **(2)** ou 25,0 x 3,0 cm D.I. **(3)** poderiam proporcionar taxas de produção de até 12,15 ou 24,80 g/dia, respectivamente. Nestes casos equipamentos preparativos de EBC de pequeno porte, com vazão máxima 450,0 mL/min poderiam ser utilizados (Tabela 3. 34).

**Tabela 3. 34 – Parâmetros para o escalonamento\*.**

	Dimensões da Coluna (cm)	Fator de Escalonamento (S)	Vazão (mL/min)	Massa de Injeção (mg)	Taxa de Produção** (g/dia)
<b>1</b>	0,46 x 15,0	--	1,0	5,0	--
<b>2</b>	0,70 x 20,0	3,09	3,09	15,44	1,08
<b>3</b>	2,10 x 25,0	34,74	34,74	173,68	12,15
<b>4</b>	3,00 x 25,0	70,89	70,89	354,44	24,80
<b>5</b>	5,00 x 25,0	196,91	196,91	984,56	68,88
<b>6</b>	5,00 x 50,0	393,82	393,82	1969,12	137,76
<b>7</b>	10,00 x 50,0	1575,30	1575,30	7876,50	551,02

\* Todos os cálculos de escalonamento foram realizados em relação a coluna analítica (1).\*\* Foram estimadas em relação a separação realizada para a coluna (2).

Os enantiômeros puros do omeprazol, isolados por cromatografia de eluição com injeções do tipo *stack*, serão utilizados, nos estudos de degradação biótica e para os estudos de mecanismos de discriminação quiral pelas fases quirais de polissacarídeos usando RMN cromatográfico, em andamento no nosso grupo.

### 3.4 Aplicações

#### 3.4.1 Albendazol sulfóxido: determinação da configuração absoluta

A determinação da configuração absoluta de moléculas quirais é importante para qualquer abordagem relacionada à quiralidade, em especial, para fármacos.

Atualmente, a maneira mais comum de se determinar a configuração absoluta de compostos enantiopuros é através de cristalografia de raio-X, contudo em alguns casos não é possível obter os cristais com a qualidade requerida, requisito indispensável para a aplicação desta técnica. Outra forma de se determinar a configuração de centros quirais é através da modificação química das moléculas de interesse, à uma molécula com configuração absoluta conhecida, desta forma por comparação presume-se a configuração relativa.

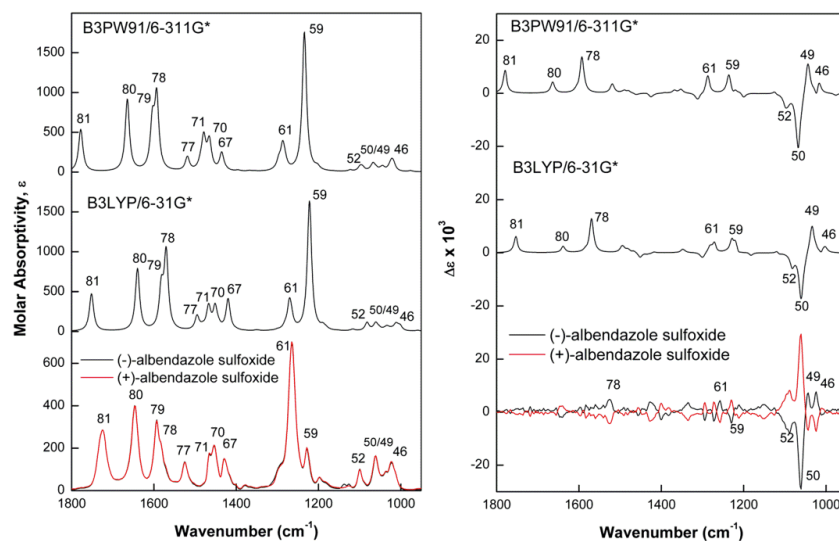
Dicroísmo circular vibracional (VCD) associado a cálculos teóricos de densidade funcional (DFT, *Density Functional Theory*) pode ser aplicado para a atribuição da configuração absoluta<sup>146</sup>. Diferentes classes de moléculas incluindo sulfóxidos quirais<sup>147,148</sup>, já foram caracterizadas por essa técnica. VCD é uma extensão de dicroísmo circular eletrônico, porém ao invés de utilizar radiação na região do

ultravioleta, aplica-se frequência de onda na região do infravermelho (IR, *Infrared*), onde transições vibracionais ocorrem<sup>146</sup>.

No intuito de se determinar a configuração absoluta para os enantiômeros do ABZO, isolados por cromatografia de multicolumnas, espectro de IR e de VCD foram medidos. Por comparação, dos espectros empíricos com cálculos teóricos de DFT, a configuração do centro estereogênico pôde ser determinada. Os cálculos foram realizados pela combinação de duas bases de calculo e funções B3LYP/6-31G\*, que é a mais utilizada para VCD e B3PW91/6-311G\* que utiliza base Gaussiana<sup>149</sup>.

Para evitar a formação de agregados, os experimentos foram realizados com concentração de amostra de 0,1 M. Ao comparar os espectros de IR e de VCD experimentais e teóricos (Figura 3. 75), observa-se a grande similaridade entre os espectros obtidos para o (-)-ABZO com os da configuração (S).

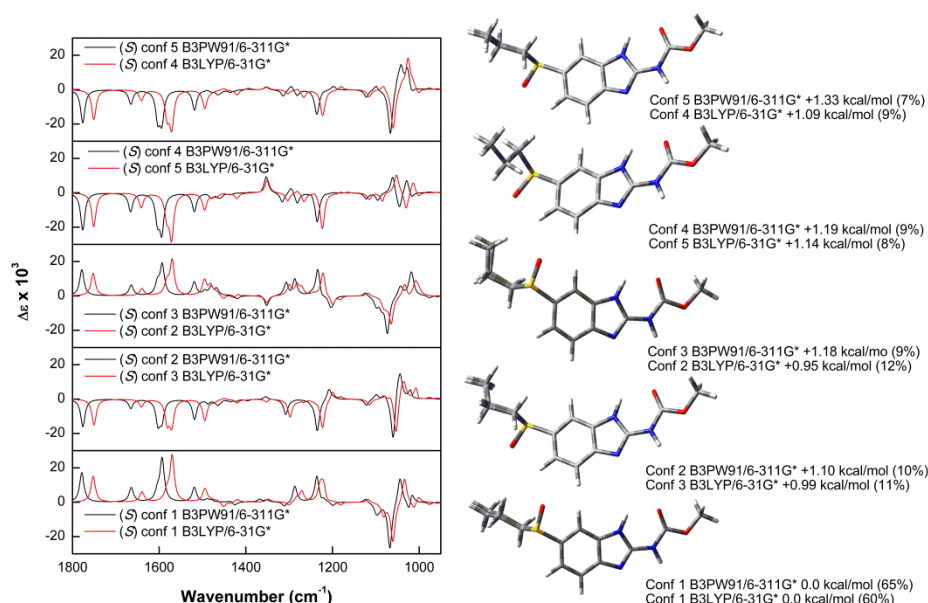
A atribuição da configuração absoluta esta baseado nos fundamentos 46, 49, 50 e 52 (destacados na Figura 3. 75) atribuídos, em especial, ao deslocamento da ligação S–O, assim como aos deslocamentos aromáticos C–H e não aromáticos C–H<sub>2</sub> das ligações com o centro estereogênico.



**Figura 3. 75 – a)** Espectro na região do IR experimental para o (-)-ABZO e (+)-ABZO e cálculo do espectro de IR para o (S)-enantiômero utilizando B3LYP/6-31G\* e B3PW91/6-311G\*. **b)** Espectro de VCD experimental para o (-)-ABZO e (+)-ABZO e cálculo do espectro de VCD para o (S)-enantiômero utilizando as duas bases teóricas.

As maiores diferenças entre os espectros de IR teóricos e experimentais são os diferentes deslocamentos dos fundamentos 59 e 61, resultantes das ligações N–H e C=O. Os cálculos teóricos não consideram a possível ligação de hidrogênio, entre o hidrogênio da amina secundária e o oxigênio carboxílico, formando um pseudo anel de seis membros.

Os cinco confôrmeros mais estáveis do (*S*)-enantiômero mostraram-se similares, divergindo-se apenas pela rotação da ligação S-Csp<sup>2</sup> e pela diferente posição do grupo isopropílico ligado ao centro estereogênico (Figura 3. 76).



**Figura 3. 76** – Estrutura dos confôrmeros mais estáveis do (*S*)-(-)-albendazol sulfóxido, energias relativas, fator Boltzman e espectros de VCD utilizando-se as bases de cálculo B3LYP/6-31G\* e B3PW91/6-311G\*.

Através do estudo de VCD foi possível determinar a configuração absoluta dos enantiômeros do albendazol sulfóxido pela primeira vez, sendo (*S*)-(-)-albendazol sulfóxido e (*R*)-(+)-albendazol sulfóxido<sup>127</sup>.

### 3.4.2 Albendazol sulfóxido: testes *In Vitro* sobre cistos de *Taenia solium*

A neurocisticercose (NCC) é uma doença com grande incidência em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, pois é ocasionada, principalmente, por problemas de saneamento básico.

A *Taenia Solium* no estágio adulto localiza-se no intestino humano. Ao defecar, o hospedeiro elimina ovos infectados, os quais podem ser ingeridos por animais, entre eles pelos porcos. Os porcos são os transmissores desta doença, os ovos ingeridos são desenvolvidos à cistos, que se alocam, principalmente, no cérebro e nos músculos dos animais. Ao ingerir carne suína infectada os humanos consomem os cistos, que são transportados até o intestino humano e, após entrarem em contato com a bile, se desenvolvem ao estágio adulto, dando origem a Teníase.

A NCC ocorre quando os humanos ingerem alimentos contaminados pelo ovo do helminto, desta forma os cistos são desenvolvidos e alocados no cérebro do paciente, desencadeando a proliferação de infecções (Figura 3. 77).

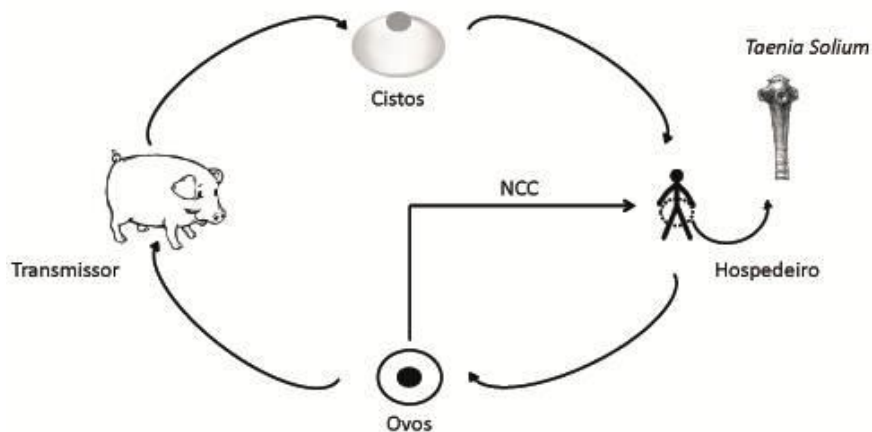


Figura 3. 77 – Ciclo da *Taenia Solium*.

Recentemente, Mahanty *et al.* desenvolveram um novo método para se avaliar a influência da administração do albendazol e praziquantel sobre os cistos de *Taenia Solium*, considerando parâmetros macroscópicos, microscópicos e bioquímicos. Este estudo sugere que os fármacos administrados possuem efeitos sinérgicos e devem ser administrados conjuntamente no tratamento de neurocisticercose<sup>150</sup>.

No intuito de se avaliar a influência dos enantiômeros do albendazol sulfóxido sobre os cistos de *Taenia Solium*, foram feitos testes *In Vitro* com ambos enantiômeros, de acordo com o procedimento de Mahanty *et al*<sup>150</sup>. Avaliou-se os parâmetros macroscópicos como medida de tamanho e capacidade de evaginação, assim como os parâmetros microscópicos e bioquímicos, medindo-se a

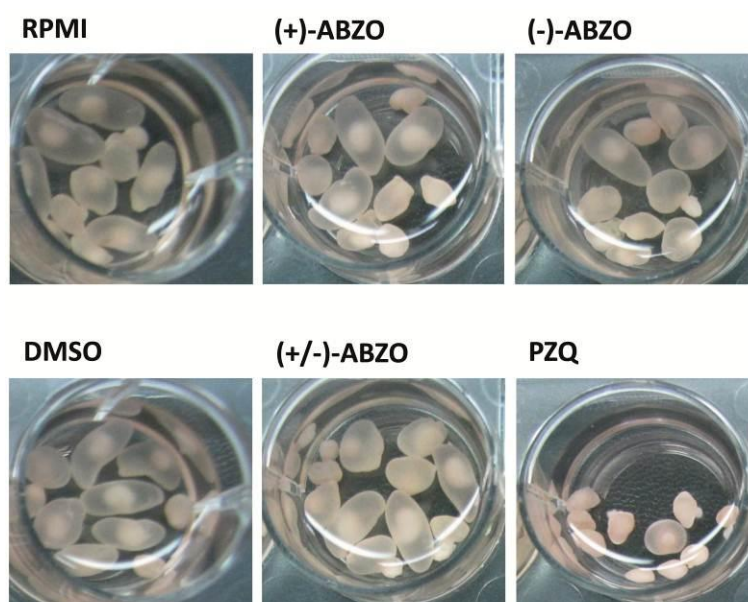
concentração da enzima alcalina fosfatase e a concentração da secreção do antígeno da *Taenia Solium* (Ag).

Para os testes, além de ambos enantiômeros do ABZO, foram também usados a mistura racêmica do ABZO e o praziquantel (PZQ), em seis diferentes concentrações, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/ml. Além disso, amostras controle com apenas o tampão de cultivo e do tampão com DMSO (solvente utilizado para solubilizar os compostos) também foram avaliados. O PZQ foi utilizado nos testes, pois é o fármaco mais potente administrado contra NCC<sup>150</sup>.

Para os testes *In Vitro*, 10 cistos foram cultivados, por poço de placas de microtitulação, em meio de cultivo e avaliou-se três diferentes períodos, após 24, 48 e 72 horas de adição do fármaco.

#### *Tamanho dos cistos e capacidade de evaginação*

A mistura racêmica do albendazol sulfóxido e ambos enantiômeros não alteraram de maneira efetiva o tamanho dos cistos. Após 72 horas de experimento, os cistos permaneceram com dimensões semelhantes as dos cistos dos poços controles. Já ao administrar o fármaco PZQ pode-se perceber a redução do tamanho, evidente após 72 horas (Figura 3. 78).



**Figura 3. 78** – Fotografia mostrando a diferente influência dos fármacos (250 ng/ml), (+/-) ABZO, (R)-(+)-ABZO, (S)-(-)-ABZO e PZQ no tamanho dos cistos após 72 horas.



Após se alocar nos diferentes órgãos humanos, os cistos evaginam dando origem a *scolex* e ventosas, que se prendem na parede dos órgãos e dos quais se desenvolvem à *Taenia* adulta. Portanto, fármacos que inibem a evaginação dos cistos impedem a evolução da enfermidade.

Cistos saudáveis evaginam espontaneamente após 72 horas de cultura ou após exposição à bile<sup>150</sup>. De maneira geral, o ABZO racêmico e ambos enantiômeros não influenciaram na capacidade de evaginação dos cistos, sendo que após 72 horas a maioria dos cistos desenvolveram *scolex*, em todas as concentrações avaliadas (Figura 3. 79).

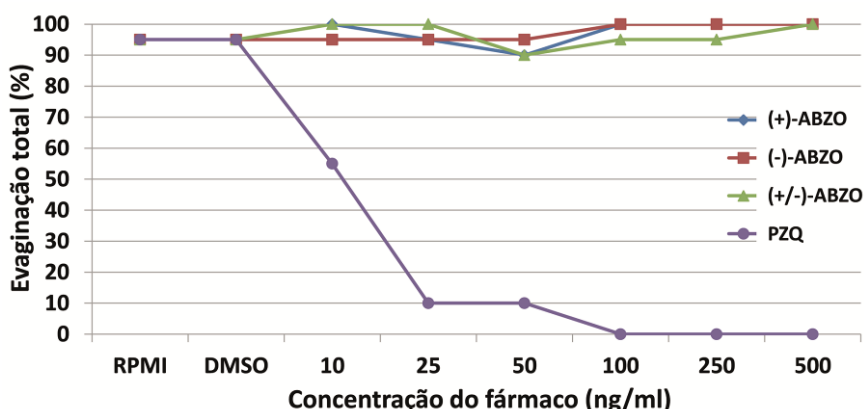


Figura 3. 79 – Evaginação dos cistos após a administração dos fármacos 72 horas.

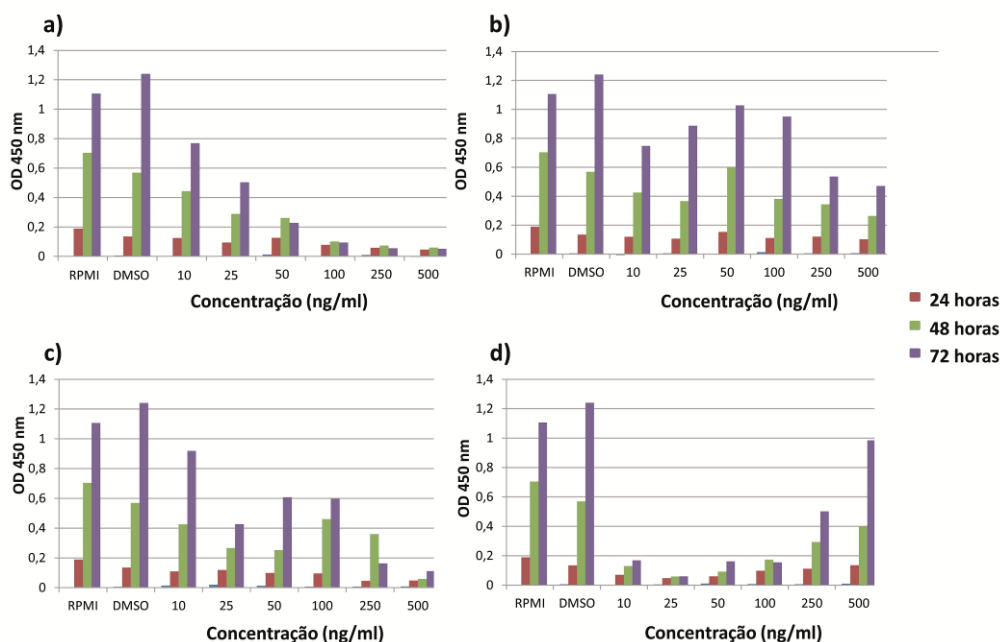
O PZQ mostrou alta capacidade na inibição da evaginação dos cistos, principalmente, com concentrações acima de 10 ng/ml, sendo capaz de evitar no mínimo 85% das evaginações.

#### Inibição de secreção da enzima alcalina fosfatase

A enzima alcalina fosfatase (AP, *Alcaline Phosphatase*) é relacionada ao crescimento celular e tem sido utilizada como marcador para a viabilidade de diferentes céstodos<sup>151</sup>, incluindo o de *Taenia Solium*<sup>150</sup>, por ser facilmente quantificado através de método colorimétrico.

No caso de céstodos de *Taenia Solium*, testes *In Vitro* com PZQ e com o racêmico de ABZO causaram a diminuição dos níveis de AP, indicando a inativação dos cistos<sup>150</sup>. Desta forma, este marcador foi utilizado nos testes com os enantiômeros do ABZO, no intuito de se identificar a diferente influência destes compostos na viabilidade dos cistos.

Os enantiômeros do ABZO apresentaram atividade distinta sobre os cistos de *Taenia Solium*, de maneira geral, o (R)-(+)-ABZO mostrou-se mais ativo do que o (S)-(-)-ABZO, principalmente, ao utilizar altas concentrações de fármaco (100, 250 ou 500 ng/ml). Ao comparar os níveis de inibição da AP pelo racêmato com o (R)-(+)-ABZO, percebe-se que este enantiômero é também o mais ativo, indicando que este é o maior responsável pela inibição enzimática (Figura 3. 80).



**Figura 3. 80** – Inibição da enzima alcalina fosfatase pelos fármacos; **a)** (R)-(+)-ABZO **b)** (S)-(-)-ABZO **c)** (+/-)-ABZO **d)** PZQ.

Assim como para o PZQ, o perfil de inibição da AP demonstrado para o racêmato do ABZO e para o (S)-(-)-ABZO mostrou-se independente da concentração administrada. Já para o (R)-(+)-ABZO o perfil de inibição mostrou-se dependente da concentração, sendo a dose ideal de 250 ng/mL.

A estereosseletividade na inibição da AP causada pelos enantiômeros do ABZO é um descobrimento importante, pois indica que ao administrar ABZO racêmico apenas meia dose está agindo sobre os céstodos, tornando-o o fármaco menos eficiente.

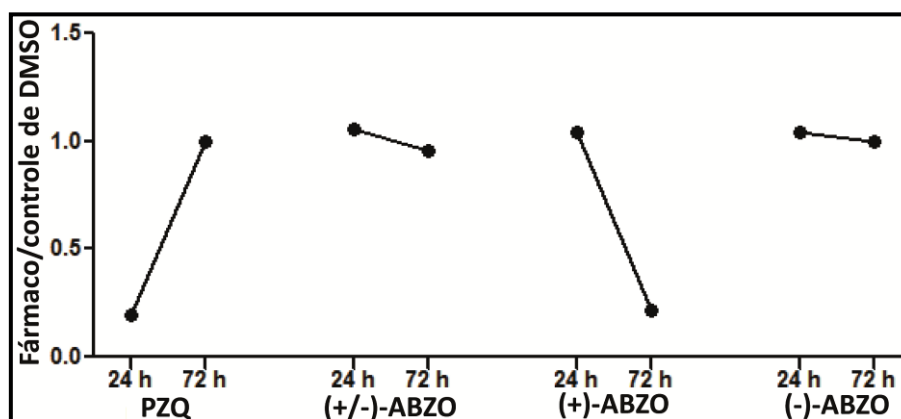
O PZQ é o fármaco mais eficiente administrado no tratamento de *Taenia Solium*, apesar do mecanismo não ser inteiramente descrito, sabe-se que sua atuação é na destruição do tegumento dos céstodos<sup>121</sup>. Contudo, muitos efeitos colaterais são atribuídos a este fármaco, como disfunção hepática, gastrointestinal, febre, manchas pelo corpo<sup>152</sup>. A atuação do ABZO é mais branda do que a do PZQ e age como barreira de glucose na membrana do parasita, causando a redução energética dos

cistos<sup>121</sup>. Assim, o (*R*)-(+)-ABZO pode ser uma alternativa eficiente para tratamentos, porém com menos efeito colateral.

#### *Inibição de secreção de antígeno AG*

Antígenos podem ser utilizados como biomarcadores para identificar a eficiência do tratamento em diferente doenças, no caso de NCC, utiliza-se a MAb B158C11A10 para a identificação de antígenos específicos, presentes no fluido cerebral de pacientes contaminados. Os fármacos ABZ e PZQ atuam na membrana celular dos cistos, causando a diminuição da permeabilidade e, em consequência, na menor secreção de antígenos<sup>153</sup>.

A inibição da AG também se mostrou estereosseletiva e o (*R*)-(+)-ABZO foi o composto que melhor inibiu a secreção do antígeno pelos céstodos. Ao comparar este enantiômero com o racêmato de ABZO e o (*S*)-(-)-ABZO, percebe-se a grande diferença de ação, principalmente, após 72 horas de administração (Figura 3. 81).



**Figura 3. 81** – Inibição do antígeno AG pelos fármacos (100 ng/ml).

Ao comparar o PZQ com o (*R*)-(+)-ABZO percebe-se semelhança na capacidade de inibição de secreção do antígeno AG. O (*R*)-(+)-ABZO inibiu em 72 horas o mesmo que o PZQ em 24 horas. .

A administração conjunta dos fármacos ABZO e PZQ no tratamento de NCC é uma tendência, já que ambos proporcionam efeito sinérgico, por possuírem diferente mecanismo de ação<sup>150</sup>. Como a ação do ABZO sobre os céstodos de *Taenia Solium* mostrou-se estereosseletiva, deve-se investigar a administração do PZQ e do (*R*)-(+)-ABZO de maneira conjunta para avaliar efeitos sinérgicos. Desta forma, um

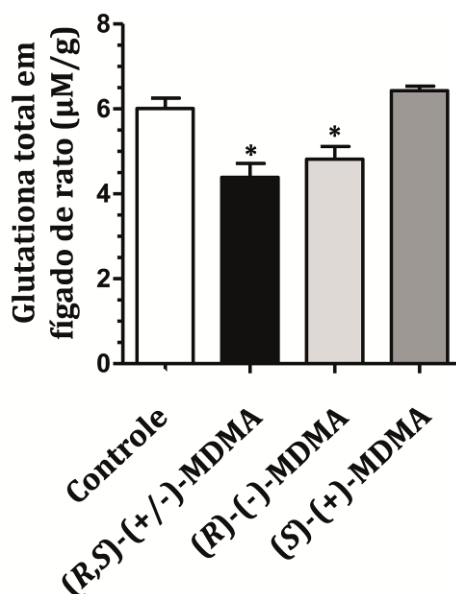
tratamento mais eficaz pode, talvez, ser obtido, já que o (*R*)-(+)-ABZO mostrou ser o enantiômero ativo.

### 3.4.3 MDMA enantiômeros: testes de *stress* oxidativo em fígado de ratos

A glutathiona (GSH) é um antioxidante natural, que desempenha papel fundamental na proteção das células. A diminuição dos níveis deste composto no organismo pode causar danos irreversíveis para as células ou até sua morte<sup>135</sup>.

Relatos da literatura descrevem que o MDMA causa a diminuição dos níveis de GSH em ratos. Todavia, não há relatos sobre a influência individual dos enantiômeros neste processo de depleção<sup>154</sup>.

Os enantiômeros isolados demonstraram diferente influência na produção de GSH. Enquanto o (*R*)-(-)-MDMA se comporta de maneira semelhante ao MDMA racêmico diminuindo os níveis de GSH no fígado de rato, o (*S*)-(+)-MDMA mostrou-se inativo, ou seja, não proporcionou influencia nos níveis de GSH total. Sendo assim, infere-se que o (*R*)-(-)-MDMA é o composto responsável pela redução dos níveis de GSH. (Figura 3. 82)<sup>135</sup>.

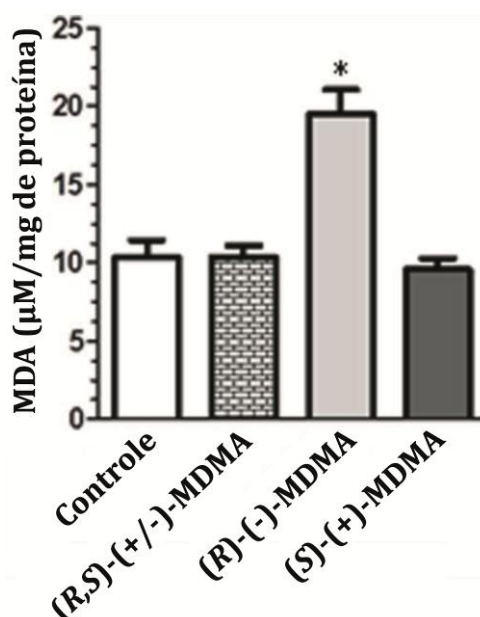


**Figura 3. 82** - Efeito do (*R,S*)-(+/-)-MDMA e dos enantiômeros (*R*)-(-)-MDMA, (*S*)-(+)-MDMA sobre os níveis de glutathiona em fígados de ratos. \**p* < 0,05 comparado com outros grupos e não é diferente (Anova seguido por Tukey-Kramer's teste de comparação múltiplo).

Os lipídeos são os maiores alvos de biomoléculas envolvidos no processo de *stress* oxidativo. O malondialdeído (MDA) é o principal produto secundário formado pela oxidação dos ácidos graxos. Além de ser extremamente tóxico e de acelerar o

processo oxidativo, este aldeído também possui efeitos mutagênicos em bactérias, células mamárias e possui efeito carcinogênico em ratos<sup>135</sup>.

Por ser considerado um marcador no processo de oxidação de lipídeos, o MDA foi quantificado em fígado de ratos, após a administração da mistura racêmica de MDMA e de ambos enantiômeros. Novamente, o (*R*)-(-)-MDMA foi o enantiômero responsável pelo processo de *stress* oxidativo, produzindo maior concentração de MDA quando comparado com a mistura racêmica e (*S*)-(+)-MDMA. Além disso, o (*S*)-enantiômero mostrou potencial inibitório para a produção de MDA (Figura 3. 83)<sup>135</sup>.



**Figura 3. 83** – Efeito do (*R,S*)-(+/-)-MDMA e dos enantiômeros (*R*)-(-)-MDMA, (*S*)-(+)-MDMA sobre a produção de MDA em fígados de ratos. \* $p < 0,05$  comparado com outros grupos e não é diferente (Anova seguido por Tukey-Kramer's teste de comparação múltiplo).

Estudos com o (*S*)-(+)-MDMA estão sendo realizados, no intuito de se investigar como e com qual intensidade este enantiômero protege as células do fígado de rato.

#### **4. Conclusões e Perspectivas**

Diferentes abordagens de processos cromatográficos para a resolução de misturas racêmicas em escala preparativa foram avaliadas e aplicadas de maneira eficaz.

O processo VARICOL<sup>®</sup> possui alta capacidade para a purificação de misturas enantioméricas, o desenvolvimento dos procedimentos de separação podem ser realizados de maneira efetiva pela simulação das condições iniciais de operação no programa HELP 10.3 e pelo uso do programa ACS para o monitoramento e otimização das vazões.

Diferentes concentrações do fármaco modafinil foram estudadas com a mesma configuração de zonas e período, no intuito de se avaliar a influência deste parâmetro sobre a pureza dos enantiômeros coletados. Além disso, alterações manuais das vazões internas foram realizadas baseando-se nos ajustes realizados pelo programa ACS. De maneira geral, a concentração de alimentação intermediária (7,5 g/L), controle rígido das zonas de limpeza e alteração manual, em especial, do QI e QIV proporcionaram um método mais eficiente.

O estudo da separação dos enantiômeros do atenolol pelo processo VARICOL<sup>®</sup> foi realizado e concluiu-se que é necessário encontrar-se outra condição de separação na qual o fármaco tenha maior solubilidade na fase móvel. Durante este estudo constatou-se que o uso do sinal do ultravioleta para o monitoramento das vazões pelo programa ACS não foi capaz de proporcionar altas purezas para os enantiômeros coletados.

A purificação enantiomérica do alendazol sulfóxido foi realizada com sucesso pelo processo VARICOL<sup>®</sup>. Os enantiômeros foram obtidos com alta pureza - 99,0% para o extrato e 99,5% para o refinado - na taxa de 2 g/dia. A recuperação efetiva da fase móvel utilizada torna este método útil, sobretudo para estudos de mecanismos de ação como os descritos neste trabalho.

Os enantiômeros puros do alendazol sulfóxido foram submetidos a estudo de determinação da configuração absoluta, pela primeira vez, por dicroísmo circular vibracional e cálculos teóricos DFT, atribuiu-se como (S)-(-)-alendazol sulfóxido e (R)-(+)-alendazol sulfóxido.

Testes de atividade dos enantiômeros do alendazol sulfóxido contra cistos de *Taenia Solium* também foram realizados, considerou-se parâmetros macroscópicos, microscópicos e bioquímicos. O (R)-(+)-ABZO mostrou ser o enantiômero

responsável pela inibição da enzima alcalina fosfatase e do antígeno (AG), possuindo; portanto, maior efeito antihelmíntico que o (S)-(-)-ABZO e que a mistura racêmica.

A capacidade da EBC também foi avaliada para duas diferentes aplicações. Cromatografia de eluição com *peak shaving recycling* foi utilizado para a separação enantiomérica do MDMA de maneira eficiente. Obteve-se 40,0 mg/dia como taxa de produção e purezas de 99,0% e 96,0% para o (R)-(-)-MDMA e (S)-(+)-MDMA, respectivamente. Esta técnica mostrou-se uma alternativa útil para a separação de compostos com baixa resolução, na escala mg/dia. Os enantiômeros isolados foram submetidos a testes de *stress* oxidativo em fígado de rato, demonstrando diferente comportamento. O (R)-(-)-MDMA mostrou ser o enantiômero responsável pelo efeito oxidativo, diminuindo os níveis de GSH e aumentando os de MDA.

A EBC com injeções do tipo *stack* foi aplicada para a separação em escala preparativa do omeprazol. Esta técnica proporcionou a obtenção dos enantiômeros puros deste racemato - 99,7% para o (S)-(-)-omeprazol e de 98,8% (R)-(+)-omeprazol - com taxa de produção média de 1,05 g/dia. A possibilidade de se recuperar facilmente a fase móvel, composta por 100% metanol, e de se fazer o escalonamento para separações em maiores escalas são outros atrativos do procedimento desenvolvido.

O trabalho aqui desenvolvido mostra que a escolha das condições cromatográficas para a obtenção de substâncias enantiopuras, em escala preparativa, deve levar em consideração a quantidade requerida e a quantidade disponível da mistura racêmica para o desenvolvimento dos métodos. De qualquer forma, a enantiosseletividade conseguida e a solubilidade do composto na fase móvel selecionada são parâmetros fundamentais para se realizar a melhor escolha.

## **5. Parte Experimental**

### **5.1 Generalidades**

O sistema cromatográfico de leito móvel simulado com zona variável utilizado foi o micro-VARICOL<sup>®</sup>, desenvolvido e comercializado pela NOVASEP (Pompey, França). O equipamento possui cinco bombas de impulsionamento de fase móvel, um detector de ultravioleta, um detector polarimétrico e um forno de convecção para controle de temperatura. O programa utilizado, para o monitoramento das vazões durante o processo de separação, foi o Sistema de Controle Avançado (ACS) e para a previsão das condições de operação foi o HELP 10.3, ambos desenvolvidos pela NOVASEP. O equipamento foi adquirido no projeto temático FAPESP 2007/02872-4 e encontra-se no laboratório de Bioseparação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

O sistema analítico de cromatografia líquida utilizado foi o Shimadzu (Kioto, Japão), composto por uma bomba modelo LC-10ATvp acoplado a um detector de ultravioleta SPD-10Avp, a uma alça de injeção da marca reodhyne 7725-018 e a um forno de convecção CTO-10ASvp. Este equipamento está ligado a interfaces SCL10Avp e os cromatogramas são registrados através do programa CLASS-VP. O detector de dicroísmo circular utilizado é da marca JASCO (Easton, EUA) modelo CD-2095plus.

O sistema cromatográfico de escala preparativa utilizado foi o Shimadzu (Kioto, Japão), composto por uma bomba LC-6AD, um detector de ultravioleta SPD-10AVvp e uma alça de injeção da marca reodhyne 7725-018. Este equipamento estava conectado com uma SCL-10Avp e os cromatogramas foram registrados através do programa CLASS-VP. Para os experimentos de *peak shaving recycling* utilizou-se uma válvula de reciclo de 3 portas, conectado na saída do detector e na entrada da bomba.

As colunas cromatográficas CHIRALPAK AD<sup>®</sup> e as fases estacionárias quirais CHIRALPAK AS<sup>®</sup> e CHIRALCEL OD<sup>®</sup> foram adquiridas da Chiral Technologies (West Chester, Estados Unidos). Para o preenchimento das colunas CHIRALPAK AS<sup>®</sup> e CHIRALCEL OD<sup>®</sup> utilizou-se uma bomba pneumática líquida Haskel TP-DSF. A coluna Hibar ChiralDex<sup>®</sup> foi obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha) e a Kromasil KR100-16CH-TBB<sup>®</sup> da Akzonobel (Amsterdam, Holanda). As colunas de glicopeptídeos macrocíclicos e as colunas P-CAP<sup>®</sup>, P-CAP DP<sup>®</sup> são comercializadas



pela Astec (Whippany, EUA). Por fim a coluna de polímero sintético DEAVB foi, gentilmente, doada pelo Prof. Dr. Daniel W. Armstrong.

A pesagem dos compostos foi realizada em balança analítica AND, modelo HR200, com precisão de 0,0001 g.

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas todos grau HPLC, etanol, 2-propanol (J. T .Baker) e *n*-hexano, metanol (Tedia) foram filtrados a vácuo em um sistema Millipore (São Paulo, Brasil), utilizando-se membranas de nylon Phenomenex de 0,45 µm e, posteriormente, degaseificados em ultra-som Cole-Palmer 8852 (Vernon Hills, EUA). Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume e a ordem de eluição dos enantiômeros foi determinada através do sinal de rotação do dicroísmo circular ou polarímetro. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Para os experimentos de determinação da secreção da enzima alcalina fosfatase e antígeno (AG) dos cistos de *Taenia Solium* utilizou-se um detector colorimétrico (Roche, Brandford, CT) equipado com leitor de microplacas VersaMax (MolecularDevices, Sunnyvale, CA).

As misturas racêmicas utilizadas para os experimentos foram, gentilmente, doados por corporações farmacêuticas. O albendazol sulfóxido, o atenolol e o modafinil foram cedidos, respectivamente, pela Ouro Fino Saúde Animal (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), EMS (Campinas, São Paulo, Brasil) e Libbs Farmacêutica (São Paulo, São Paulo, Brasil).

O trabalho envolvendo o MDMA (3,4-Metilenodioximetamfetamina) foi desenvolvido em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Regina Lucia M. Moreau da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, a qual realizou os experimentos de *stress* oxidativo.

O estudo da determinação absoluta do centro quiral dos enantiômeros do albendazol sulfóxido foi realizado em colaboração com o Dr João Marcos Batista Junior e da Prof<sup>a</sup> Dra Maysa Furlan do Instituto de Química da UNESP, Araraquara. As análises por VDC foram feitas sobre a responsabilidade do Prof. Dr. Laurence A. Nafie da Department of Chemistry, 1-014CST, Syracuse University, Syracuse, NY, USA.

Os experimentos de atividade dos enantiômeros do ABZO sobre os cistos de *Taenia Solium* foram realizados durante um estágio no Laboratório de Imunopatologia Experimental, da Escola de Ciências da Universidade Peruana

Cayetano Heredia, Lima, Peru, em colaboração com o Prof. Dr. Hector H. Garcia e Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Guerra-Giraldez.

## 5.2 Parâmetros Cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos foram calculados segundo as fórmulas:

- Fator de Retenção (k):

$$k_1 = \frac{(t_1 - t_0)}{t_0}$$

- Enantiosseletividade ( $\alpha$ ):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

- Resolução (Rs):

$$R_s = 1,8 \cdot \frac{(t_2 - t_1)}{(w_2 + w_1)}$$

- Número de pratos teóricos (N):

$$N = 5,54 \cdot \frac{t^2}{w^2}$$

Onde t é o tempo de retenção do composto, t<sub>0</sub> é o tempo do volume morto da coluna e w é a largura de banda dos compostos medidos a meia altura.

Os primeiros tempos de inflexão (tr), de cada banda cromatográfica, foram calculados através da primeira derivada dos cromatogramas, obtida através do programa Origin 8.0.

## 5.3 Procedimento Experimental

### 5.3.1 Separações utilizando o sistema VARICOL<sup>®</sup>

#### 5.3.1.1 Preenchimento de fases estacionárias quirais

Os tubos de aço inox foram preenchidas com as CSPs sob pressão máxima de 8000 psi para as colunas analíticas (15,0 x 0,46 cm D.I.) e 5000 psi para as colunas preparativas (10,0 x 1,0 cm D.I.). Inicialmente, as tubulações foram limpas com os solventes acetona, hexano, solução aquosa de 10% de ácido nítrico, água e 2-propanol, respectivamente.

- Colunas CHIRALCEL OD: A fase estacionária – 6,0 g (preparativa); 2,0 g (analítica) - foi suspensa em 30 mL de etanol e sonicada por 30 segundos. Em seguida preencheu-se a coluna com 1000 mL de etanol, sendo que foi eluído 450 mL de solvente de cima para baixo e 550 mL no sentido oposto. As colunas foram condicionadas com *n*-hexano/etanol (90:10) como fase móvel por 24 horas e, posteriormente, avaliadas com o padrão ( $\pm$ ) base de Tröger.
- Colunas CHIRALCEL AS: A fase estacionária – 6,0 g (preparativa); 2,0 g (analítica) - foi suspensa em 30 mL de etanol/2-propanol (50:50) e sonicada por 30 segundos. Em seguida preencheu-se a coluna com 1000 mL de etanol/2-propanol (50:50), sendo que foi eluído 450 mL de solvente de cima para baixo e 550 mL no sentido oposto. As colunas foram condicionadas com *n*-hexano/etanol (90:10) como fase móvel por 24 horas e, posteriormente, avaliadas com o padrão ( $\pm$ ) base de Tröger.

No total foram preenchidas 9 colunas preparativas CHIRALCEL OD, 3 colunas analíticas CHIRALCEL OD, 9 colunas preparativas CHIRALPAK AS e 3 colunas analíticas CHIRALPAK AS.

### **5.3.1.2 Avaliação das condições de separação do modafinil, do atenolol e do alendazol sulfóxido**

As colunas avaliadas foram as de polissacarídeo adsorvido CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20  $\mu$ m), CHIRALPAK AS<sup>®</sup> (15,0 x 0,46 cm D.I. 20  $\mu$ m) e CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (15,0 x 0,46 cm D.I., 20  $\mu$ m).

Analisou-se de maneira sistemática, para os três fármacos, o modo normal de eluição utilizando-se *n*-hexano/etanol ou *n*-hexano/2-propanol como fase móvel, iniciou-se o estudo com hidrocarboneto/alcóol (75:25), variando-se até 95,0% de *n*-hexano, na faixa de 10%. As fases móveis do polar orgânico avaliadas foram metanol (100%), acetonitrila (100%) e metanol/etanol (50:50). Para a separação do atenolol aditivo básico de fase móvel foi necessário, sendo utilizado dietilamina.

Para fazer as análises preparou-se soluções dos fármacos em 2-propanol, nas concentrações de 100  $\mu$ g/ml, pela dissolução de 1 mg de composto em 10 ml de solvente.

### **5.3.1.3 Estudo de sobrecarga do modafinil**

Foi preparado uma solução estoque de modafinil na concentração de 20 mg/ml, através da dissolução de 100 mg de composto em 5 ml de metanol, em balão volumétrico.

A partir desta solução preparou-se, através de diluição em metanol, dez soluções de trabalho com volume total de 1,0 ml. As concentrações preparadas foram de 18,5; 17,5; 15,0; 12,5; 10,0; 7,5; 5,0; 2,5; 1,0; 0,5 mg/ml.

As amostras foram injetadas em sistema cromatográfico analítico convencional em coluna idêntica as utilizadas no sistema VARICOL<sup>®</sup>. Utilizou-se coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20  $\mu$ m), metanol (100%) como fase móvel, 2,5 ml/min,  $\lambda$ =270 nm, Volume de injeção de 0,5 ml e temperatura de 35°C.

### **5.3.1.4 Processo de purificação enantiomérica do modafinil**

O programa HELP 10.3 foi utilizado para se realizar a simulação das condições iniciais de operação e o cálculo da isoterma de adsorção.

Preparou-se a alimentação através da dissolução de 7,5 g, 3,75 g ou 1,875 g de composto em 500 ml de metanol, obtendo-se como concentração de alimentação 15,0 mg/ml, 7,5 mg/ml e 3,75 mg/ml, respectivamente. Utilizou-se seis colunas cromatográficas CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20  $\mu$ m) como fase estacionária, metanol (100%) como fase móvel, comprimento de onda no ultravioleta de 270 nm, polarímetro configurado com VAR 200/FAC 10 e temperatura de 35 °C.

Iniciou-se os processos de purificação com as vazões: Qreciclo = 10,13 ml/min, Qextrato = 1,55 ml/min, Qalimentação = 0,62 ml/min, Qrefinado = 2,61 ml/min e Qeluente = 3,54 ml/min. O período foi de 1,09 minutos, a distribuição das zonas foi zona I = 0,98, zona II = 2,55, zona III = 1,40 e zona IV = 1,07 e o tempo do ciclo foi de 6,65 minutos.

Amostras de, aproximadamente, 200  $\mu$ L foram coletadas durante o processo de separação. As razões enantioméricas foram determinadas por cromatografia líquida em sistema cromatográfico analítico convencional nas condições: coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20  $\mu$ m), metanol (100%) como fase móvel, 2,5 ml/min,  $\lambda$ =240 nm, volume de injeção de 20  $\mu$ L.

Nos processos em que se tinha pureza enantiomérica acima de 95% para um dos enantiômeros isolados, coletaram-se amostras por 14 ciclos, no intuito de se calcular os parâmetros do processo.

Com o fim de cada separação o eluente da alimentação e das coletas foram rota-evaporados e; portanto, a mistura racêmica e o metanol foram recuperados.

### **5.3.1.5 Perfil interno de concentração do VARICOL<sup>®</sup> durante a purificação enantiomérica do modafinil**

#### *Curva de calibração*

Para a quantificação dos enantiômeros durante o ciclo obteve-se duas curvas de calibração, de maneira simultânea. As soluções de calibração foram preparadas em simplificada nas seguintes concentrações de mistura racêmica: 0,1 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,75 mg/ml; 1,0 mg/ml; 1,25 mg/ml e 1,5 mg/ml. As diferentes soluções foram analisadas em cromatógrafo analítico na seguinte condição cromatográfica: coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20 µm), metanol (100%) como fase móvel, 2,5 ml/min,  $\lambda=240$  nm, volume de injeção de 20 µL

As curvas de calibração foram obtidas a partir de regressão linear, considerando a área da banda de cada concentração dos enantiômeros. Foram considerados as setes concentrações e a linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.

#### *Perfil interno de concentração*

As amostras foram coletadas em diferentes posições durante um ciclo. As posições de coleta foram: 0,00; 0,25; 0,73; 0,98; 1,23; 2,25; 3,53; 4,23; 4,68; 4,93; 5,18 e 5,75, sendo que as posições 0,98; 3,53 e 4,93 são o ponto de coleta de extrato, de alimentação e o ponto de coleta de refinado, respectivamente.

Todos os pontos coletados foram analisados em cromatógrafo líquido convencional na seguinte condição cromatográfica: coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20 µm), metanol (100%) como fase móvel, 2,5 ml/min,  $\lambda=240$  nm, volume de injeção de 20 µL. As áreas das bandas dos enantiômeros foram interpoladas com a curva de calibração e a concentração de cada amostra coletada foi determinada.

### **5.3.1.6 Estudo de sobrecarga do atenolol**

Foi preparado uma solução estoque de atenolol na concentração de 25 mg/ml, através da dissolução de 125 mg de composto em 5 ml de 2-propanol, em balão volumétrico.

A partir desta solução preparou-se, através de diluição em 2-propanol, dez soluções de trabalho com volume total de 1 ml. As concentrações preparadas foram de 22,5; 20,0; 17,5; 15,0; 12,5; 10,0; 7,5; 5,0; 2,5; 1,25 mg/ml.

As amostras foram injetadas em sistema cromatográfico analítico convencional em coluna idêntica as utilizadas no sistema VARICOL<sup>®</sup>. Utilizou-se coluna CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20  $\mu$ m), *n*-hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,01) como fase móvel, 2,5 ml/min,  $\lambda$ =275 nm, Volume de injeção de 0,5 ml e temperatura de 35°C.

### **5.3.1.7 Processo de purificação enantiomérica do atenolol**

O programa HELP 10.3 foi utilizado para se realizar a simulação das condições iniciais de operação e o cálculo da isoterma de adsorção.

Preparou-se a alimentação através da dissolução de 500 mg de composto em 1000 ml de metanol, obtendo-se como concentração de alimentação 0,5 mg/ml. Utilizou-se seis colunas cromatográficas CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20  $\mu$ m) como fase estacionária, *n*-hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,01) como fase móvel, comprimento de onda no ultravioleta de 275 nm, polarímetro configurado com VAR 20/FAC 15 e temperatura de forno de 35°C.

Iniciou-se o processo de purificação com as vazões: Qreciclo = 11,86 ml/min, Qextrato = 4,72 ml/min, Qalimentação = 2,92 ml/min, Qrefinado = 3,54 ml/min e Qeluente = 5,34 ml/min. O período foi de 4,17 minutos, a distribuição das zonas foi zona I = 0,98, zona II = 1,60, zona III = 1,60 e zona IV = 1,60 e o tempo do ciclo foi de 25,0 minutos.

Amostras de, aproximadamente, 200  $\mu$ L foram coletadas durante o processo de separação. As razões enantioméricas foram determinadas por cromatografia líquida nas condições: coluna CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (15,0 x 0,46 cm D.I., 20  $\mu$ m), *n*-hexano/2-propanol/DEA (80:20:0,01) como fase móvel, 2,5 ml/min,  $\lambda$ =275 nm, volume de injeção de 20  $\mu$ L.

### **5.3.1.8 Estudo de sobrecarga do albendazol sulfóxido**

Foi preparado uma solução estoque do albendazol sulfóxido na concentração de 10 mg/mL, através da dissolução de 250 mg de composto em 25 mL de metanol, em balão volumétrico, na temperatura de 50°C.

A partir desta solução preparou-se, através de diluição em metanol, dez soluções de trabalho com volume total de 2 mL. As concentrações preparadas foram de 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 e 0,5 mg/mL.

As amostras foram injetadas em sistema cromatográfico analítico convencional em coluna idêntica as utilizadas no VARICOL<sup>®</sup>. Utilizou-se coluna CHIRALPAK AD (10,0 x 1,0 cm D.I., 20 µm), metanol (100%) como fase móvel, 3 mL/min,  $\lambda=305$ /nm, Volume de injeção de 2mL e temperatura de 20°C.

### **5.3.1.9 Processo de purificação enantiomérica do albendazol sulfóxido**

O programa HELP 10.3 foi utilizado para se realizar a simulação das condições iniciais de operação e o cálculo da isoterma de adsorção.

Preparou-se a alimentação através da dissolução de 10,0 g de composto em 2000 mL de MeOH, obtendo-se a concentração de alimentação igual a 5,0 mg/mL. Utilizou-se seis colunas cromatográficas CHIRALPAK AD (10,0 x 1,0 cm D.I., 20 µm) como fase estacionária, metanol (100%) como fase móvel, comprimento de onda de 305nm, polarímetro configurado com VAR 200/FAC 10 e temperatura de forno de 20°C.

Iniciou-se o processo de purificação com as vazões:  $Q_{reciclo}=18,26$  mL/min,  $Q_{extrato}=11,91$  mL/min,  $Q_{alimentação}=1,42$  mL/min e  $Q_{refinado}=2,12$  mL/min. O período foi de 2 minutos, a distribuição das zonas foi: Zona I=0,98, Zona II=2,38, Zona III=1,43 e Zona IV=1,21 e o tempo de ciclo de 12,10 minutos.

Os enantiômeros foram coletados durante 45 ciclos. A fase móvel foi recuperada durante o procedimento de rotaevaporação e sua pureza avaliada por <sup>1</sup>H-RMN.

Como os enantiômeros do albendazol sulfóxido foram utilizados em experimentos de atividade biológica e para a determinação da configuração absoluta do centro quiral, foram submetidos a caracterização por espectrometria de massas, polarimetria e as razões enantioméricas foram determinados por cromatografia líquida, na mesma condição de separação realizada para o estudo de sobrecarga.

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados no modo full scan ESI<sup>+</sup>, com energia do capilar de 2,06kv, energia do cone de 53,35v e temperatura da fonte de 150°C.

**Refinado, albendazol sulfóxido:**  $[\alpha]_D^{25^\circ C} = +108,56$  (etanol);  $[M+H]^+ = 282$ ;  $[M-C_9H_{10}O_3N_3S]^+ = 240$ ;  $[M-C_8H_6O_2N_3S]^+ = 208$ .

**Extrato, (-) albendazol sulfóxido:**  $[\alpha]_D^{25^\circ C} = -108,43$  (etanol);  $[M+H]^+ = 282$ ;  $[M-C_9H_{10}O_3N_3S]^+ = 240$ ;  $[M-C_8H_6O_2N_3S]^+ = 208$ .

**Metanol Recuperado: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz;  $\delta$ ):** 3,39(t, 3H); 2,0 (s, 1H).

A determinação absoluta do centro quiral dos enantiômeros do albendazol sulfóxido foi realizado pelo Msc. João Marcos Batista Junior em colaboração Dr. Yanan He e o Prof. Dr. Laurence A Nafie.

### **5.3.1.10 Perfil interno de concentração do VARICOL<sup>®</sup> durante a purificação enantiomérica do albendazol sulfóxido**

#### *Curva de calibração*

As curvas de calibração foram determinadas usando-se a mistura racêmica. As soluções de calibração foram preparadas, como amostras únicas, nas seguintes concentrações da mistura racêmica: 0,1 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,75 mg/ml; 1,0 mg/ml; 1,25 mg/ml e 1,5 mg/ml. As diferentes soluções foram analisadas em cromatógrafo analítico na seguinte condição cromatográfica: coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20  $\mu$ m), metanol (100%) como fase móvel, 3,0 ml/min,  $\lambda=290$  nm, volume de injeção de 20  $\mu$ L.

As curvas de calibração foram obtidas a partir de regressão linear, considerando a área da banda de cada concentração dos enantiômeros. Foram considerados as setes concentrações e a linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.



### *Perfil interno de concentração*

As amostras foram coletadas em diferentes posições durante um ciclo. As posições de coleta foram: 0,00; 0,25; 0,73; 0,98; 1,23; 2,17; 3,36; 4,08; 4,79; 5,04 e 5,75 sendo que as posições 0,98; 3,36 e 4,79 são o ponto de coleta de extrato, de alimentação e o ponto de coleta de refinado, respectivamente.

Todas as amostras coletadas foram analisados em cromatógrafo líquido convencional na seguinte condição cromatográfica: coluna CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10,0 x 1,0 cm D.I., 20 µm), metanol (100%) como fase móvel, 3,0 ml/min, λ=290 nm, volume de injeção de 20 µL. As áreas das bandas dos enantiômeros foram interpoladas com a curva de calibração e a concentração de cada amostra coletada foi determinada.

## **5.3.2 Teste de atividade do (+/-)-albendazol sulfóxido, (+)-albendazol sulfóxido, (-)-albendazol sulfóxido em céstodos de *Taenia Solium***

### **5.3.2.1 Coleta e cultura dos Céstodos**

Os cistos de *Taenia Solium* foram coletados de porcos naturalmente infectados em regiões endêmicas da periferia de Lima, Peru. Os animais foram sacrificados segundo protocolo aprovado pela Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional Maior de São Marcos. Os cistos foram coletados do músculo e transportados para um recipiente contendo tampão fosfato pH 7.4 para o armazenamento.

Os cistos foram lavados duas vezes com tampão fosfato estéril pH 7.4 e uma vez com o meio de cultivo, compostos por meio RPMI 1640 suplementado com tampão HEPES (10 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), anfotericina B (0,25 µg/ml). Em seguida, foram mantidos em estufa a 37°C e 5% de dióxido de carbono por 12 horas.

Para os estudos *In Vitro*, 10 cistos por poço foram mantidos em placa de cultivo de 12 poços com volume final de 2 ml de meio de cultivo. Os fármacos foram preparados em DMSO e adicionados no meio para atingir diferentes concentrações finais (10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/ml). Foram também mantidos poços controles com o meio de cultivo e com o meio de cultivo adicionado DMSO. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C e 5% de dióxido de carbono, nos períodos de 24 horas o sobrenadante foi coletado e recomposto. Todas as condições foram avaliadas em triplicata.

### **5.3.2.2 Medida do tamanho dos céstodos**

O tamanho dos cistos foi medido pela média ( $m$ ) do comprimento e da largura dos 10 cistos de um mesmo poço da placa de cultura. As medidas foram tomadas em fotografias das placas de cultura tiradas com um padrão de *layout* em todos os tempos de análise. A porcentagem de diminuição do tamanho dos cistos foi medida através da fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{m \text{ tamanho}(t_a)}{m \text{ tamanho}(t_0)} \times 100$$

Onde  $t_a$  é o tempo de análise e  $t_0$  o tempo inicial.

### **5.3.2.3 Evaginação**

A capacidade de evaginação dos cistos foi avaliada após a adição de bile de porco nos poços de cultura. Após 72 horas, 1 ml de meio de cultura foi substituído por 1ml de 50% de bile de porco e 50% de meio de cultura e, em seguida, foram incubados por 12 horas em estufa a 37°C e 5% de dióxido de carbono. Os cistos evaginados foram contados e calculou-se a porcentagem de evaginação.

$$\% \text{ evaginação} = \frac{n^\circ \text{ cistos evaginados}}{n^\circ \text{ cisto total}} \times 100$$

### **5.3.2.4 Medida de secreção da enzima alcalina fosfatase (AP)**

A concentração da enzima alcalina fosfatase dos sobrenadantes da cultura dos cistos foram determinadas utilizando-se um detector colorimétrico adaptado para medidas da enzima AP.

O meio de cultura de cada poço (50  $\mu$ l) foi misturado com 25  $\mu$ l de *p*-nitrofenilfosfato (99,5 mM, ph 8,5) e com 125  $\mu$ l do kit de reagente. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C no escuro e, em seguida, as densidades ópticas (Ods) a 492 nm foram determinadas, utilizando-se um leitor de microplacas. Meio de cultura sem parasita e outro preparado na hora foram também medidos como controle.

Os resultados estão expressos como OD corrigido:

$$OD_{\text{corrigido}} = OD_{\text{amostra}} - OD_{\text{controle}}$$

Kit reagente: 2-amino-2-metil-1-propanol (1,10 M, pH 10,50), acetato de magnésio (2,50 mM), sulfato de zinco (0,5 mM) e ácido hidroxietililenodiamino-triacético (2,50 mM)

### **5.3.2.5 Medida de secreção do antígeno (AG)**

A secreção do antígeno (Ag) nos sobrenadantes dos cistos de *Taenia Solium* foi detectada através de teste de *ELISA* como descrito previamente<sup>153,155</sup>. Esta abordagem requer os anticorpos monoclonados (Mabs; designado B158 e B60).

### **5.3.3 Avaliação das condições de separação do MDMA**

Todos os modos de eluição permitidos para as colunas cromatográficas estudadas foram avaliadas de maneira sistemática.

As colunas de glicopeptídeos macrocíclicos (15,0 x 0,46 cm D.I., 5 µm) CHIROBIOTIC V<sup>®</sup>, CHIROBIOTIC T<sup>®</sup>, CHIROBIOTIC TAG<sup>®</sup>, CHIROBIOTIC R<sup>®</sup> e a coluna de ciclodextrina Hibar CHIRALDex<sup>®</sup> (25,0 x 1,0 cm D.I., 5 µm) foram avaliadas no modo polar orgânico, reverso e polar iônico.

As colunas de polissacarídeos CHIRALPAK AD<sup>®</sup> (10 x 1,0 cm D.I., 20 µm), CHIRALPAK AS<sup>®</sup> (15 x 0,46 cm D.I. 20 µm) e CHIRALCEL OD<sup>®</sup> (15 x 0,46 cm D.I., 20 µm) e as colunas de polímeros sintéticos Kromasil KR100-16CH-TBB<sup>®</sup> (25,0 x 1,0 cm D.I., 16 µm) e P-CAP<sup>®</sup>, P-CAP DP<sup>®</sup>, DEAVB (25,0 x 0,46 cm D.I., 5 µm) foram avaliadas no modo normal e polar orgânico.

O modo polar orgânico foi avaliado utilizando-se acetonitrila (100%), metanol (100%) ou mistura destes dois solventes como fase móvel. O modo normal foi examinado utilizando-se diferentes composições de *n*-hexano/etanol ou *n*-hexano/2-propanol como fase móvel, em algumas análises dietilamina foi utilizada como aditivo da fase móvel.

Por fim, as fases móveis compostas por metanol/água, acetonitrila/água, metanol/tampão acetato de amônio (pH 6,0, 100 mM) e acetonitrila/tampão acetato de amônio (pH 6,0, 100 mM) foram avaliadas. O modo polar iônico foi avaliado com acetonitrila/metanol/trietilamina/acido acético (30:70:0,2:0,3).

#### **5.3.4 Purificação enantiomérica do MDMA**

Como condição de separação utilizou-se a coluna Hibar CHIRALDex<sup>®</sup> (25,0 x 1,0 cm D.I., 5 µm), metanol/tampão acetato de amônio (pH 6,0, 100 mM) (30:70) como fase móvel, 3,0 ml/min, 0,5 ml como volume de injeção e 270 nm. A solução trabalho foi preparada pela dissolução de 160 mg de mistura racêmica em 8 ml de fase móvel (10 mg/ml de cada enantiômero).

Os enantiômeros foram isolados após 16 injeções, com 4 ciclos cada. O enantiômero menos retido foi coletado nos intervalos 47,1 – 47,4 min; 73,9 – 74,1 min e 101,1 – 102,9 min, enquanto que o segundo enantiômero nos tempos 54,7 – 57,5 min; 81,9 – 84,0 min; 107,5 – 112,2 min e 130,2 – 134,9 min. Um tubo com pequeno volume interno foi utilizado pós detector.

O eluente foi inicialmente rotaveaporado e, em seguida, liofilizado. O produto final foi re-suspendido em acetato de etila e lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio.

As razões enantioméricas dos enantiômeros isolados foram avaliadas nas condições cromatográficas estabelecidas para a purificação em escala multimiligramas, com o volume de injeção de 20 µl. A concentração das amostras injetadas foi de 500 µg/ml.

Os testes de *stress* oxidativo com os enantiômeros puros do MDMA foram realizados pela prof<sup>a</sup> Dra Regina Lucia M. Moreau no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

#### **5.3.5 Purificação enantiomérica do omeprazol**

O preparo da coluna cromatográfica tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose, assim como a condição de separação do omeprazol neste tipo de coluna já está reportada na literatura<sup>128</sup>.

Para este estudo foram utilizadas duas colunas distintas preenchidas com a mesma fase estacionária, uma analítica (15,0 x 0,46 cm D.I., 10 µm) e uma preparativa (20,0 x 0,70 cm D.I., 10 µm). Vale salientar, que as fases estacionárias utilizadas foram preparadas no mesmo lote e uniformizadas antes do preenchimento das colunas.

Para o estudo de sobrecarga na coluna analítica, preparou-se soluções de omeprazol racêmico nas concentrações de 0,2 mg/ml e 10 mg/ml, através da

dissolução de 1,0 mg de composto em 5 ml de metanol e de 10 mg de composto em 1,0 ml de metanol, respectivamente. Em seguida, injetou-se na coluna analítica na seguinte condição de separação: metanol (100%), 1,0 ml/min, volume de injeção de 0,5 ml,  $\lambda=302/325$  nm.

As soluções de injeção do omeprazol (30 mg/ml) para a separação preparativa foram preparadas através da dissolução de 375 mg de composto em 12,5 ml de omeprazol. A condição de separação utilizada na coluna preparativa foi de metanol (100%), 3,0 ml/min, volume de injeção de 0,5 ml,  $\lambda=302/325$  nm. Para estas separações uma cela de detecção de escala preparativa e um tubo com pequeno volume interno pós detector foram utilizados.

Os tempos de injeção, de eluição e de coleta dos enantiômeros durante a separação do tipo *stack* foram calculados considerando o início tempo de eluição do primeiro enantiômero (4,2 min) e o tempo de eluição do segundo enantiômero (12,5 min) e estão presentes na Tabela 3. 32, pp. 95.

Os enantiômeros foram coletados em banho de gelo e rota-evaporados no fim de cada separação do tipo *stack*. Após isolados os enantiômeros foram armazenados em freezer - 20°C. As purezas enantiomérica dos compostos foram avaliadas por cromatografia líquida em condição de separação diluída na coluna analítica.

### Referências Bibliográficas

1. TESTA, B., "Chiral aspects of drug metabolism". *Trends Pharmacol. Sci.* **7**(2): 60, 1986.
2. MARTINEZ-GIRON, A.B.; CREGO, A.L.; GONZALEZ, M.J. & MARINA, M.L., "Enantiomeric separation of chiral polycyclic musks by capillary electrophoresis: Application to the analysis of cosmetic samples". *J. Chromatogr., A.* **1217**(7): 1157, 2011.
3. PEREZ-FERNANDEZ, V.; GARCIA, M.A. & MARINA, M.L., "Chiral separation of agricultural fungicides". *J. Chromatogr., A.* **1218**(38): 6561, 2011.
4. HUMPHREYS, A., "World's Best-Selling Medicines". *Med. Ad. News.* **14**(7): 3, 2008.
5. ARIENS, E.J., "Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **26**(6): 663, 1984.
6. THAYER, A.M., "Centering on Chirality". *Chemical and Engineering News.* **85**(32): 11, 2007.
7. HANESSIAN, S., *Total Synthesis of Natural Products: The "Chiron" Approach*, in *Total Synthesis of Natural Products: The "Chiron" Approach*. 1983. p. 291 pp.
8. EVANS, D.A., "Studies in asymmetric synthesis. The development of practical chiral enolate synthons". *Aldrichimica Acta.* **15**(2): 23, 1982.
9. EVANS, D.A. & SHAW, J.T., "Recent advances in asymmetric synthesis with chiral imide auxiliaries". *Actualite Chimique*, (4-5): 35, 2003.
10. MEYERS, A.I., "Chiral oxazolines - Their legacy as key players in the renaissance of asymmetric synthesis". *Journal of Heterocyclic Chemistry.* **35**(5): 991, 1998.
11. MEYERS, A.I. & BRENGEL, G.P., "Chiral bicyclic lactams: useful precursors and templates for asymmetric syntheses". *Chemical Communications*, (1): 1, 1997.
12. SEEBACH, D.; BECK, A.K. & HECKEL, A., "TADDOLs, their derivatives, and TADDOL analogs: versatile chiral auxiliaries". *Angewandte Chemie.* **40**(1): 92, 2001.
13. TROST, B.M., "Atom economy - a challenge for organic synthesis: homogeneous catalysis leads the way". *Angewandte Chemie, International Edition in English.* **34**(3): 259, 1995.
14. GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. & RODRIGUES, R.C., "Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance". *Adv. Synth. Catal.* **353**(16): 2885, 2011.
15. HOLLAND, H.L., "Chiral sulfoxidation by biotransformation of organic sulfides". *Chemical Reviews.* **88**(3): 473, 1988.
16. GIRODIER, L.; MAIGNAN, C. & ROUESSAC, F., "Syntheses of enantiomerically pure furyl and thienyl p-tolyl sulfoxides". *Tetrahedron: Asymmetry.* **3**(7): 857, 1992.
17. LEGROS, J.; DEHLI, J.R. & BOLM, C., "Applications of catalytic asymmetric sulfide oxidations to the syntheses of biologically active sulfoxides". *Advanced Synthesis & Catalysis.* **347**(1): 19, 2005.
18. BUSACCA, C.A.; FANDRICK, D.R.; SONG, J.J. & SENANAYAKE, C.H., "The Growing Impact of Catalysis in the Pharmaceutical Industry". *Adv. Synth. Catal.* **353**(11-12): 1825, 2011.
19. CORBEIL, C.R. & MOITESSIER, N., "Theory and application of medium to high throughput prediction method techniques for asymmetric catalyst design". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical.* **324**(1-2): 146, 2010.
20. SALCICCIOLI, M.; STAMATAKIS, M.; CARATZOULAS, S. & VLACHOS, D.G., "A review of multiscale modeling of metal-catalyzed reactions: Mechanism development for complexity and emergent behavior". *Chem. Eng. Sci.* **66**(19): 4319, 2011.
21. BRANDS, K.M.J.; PAYACK, J.F.; ROSEN, J.D.; NELSON, T.D.; CANDELARIO, A.; HUFFMAN, M.A.; ZHAO, M.M.; LI, J.; CRAIG, B.; SONG, Z.J.; TSCHAEN, D.M.; HANSEN, K.; DEVINE, P.N.; PYE, P.J.; ROSSEN, K.; DORMER, P.G.; REAMER, R.A.; WELCH, C.J.; MATHRE, D.J.; TSOU, N.N.; MCNAMARA, J.M. & REIDER,

- P.J., "Efficient Synthesis of NK1 Receptor Antagonist Aprepitant Using a Crystallization-Induced Diastereoselective Transformation". *Journal of the American Chemical Society*. **125**(8): 2129, 2003.
22. KOZMA, D., *CRC Handbook of Optical Resolutions via Diastereomeric Salt Formation*, in *CRC Handbook of Optical Resolutions via Diastereomeric Salt Formation*. 2002, CRC Press: Englaterra. p. 704.
  23. DE FAVERI, C.; HUBER, F.A.M. & DANCER, R.J., *Resolution of escitalopram from enantiomeric mixture*. 2008, UK2448848: Grã Bretanha. p. 29pp.
  24. WELCH, C.J., *Chiral chromatography in support of pharmaceutical process research*, in *Preparative Enantioselective Chromatography*, COX, G.B., Editor. 2005, Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK. p. 1.
  25. WILEN, S.H., "The Molecule and Its Double". *Journal of Chemical. Education*. **71**(2): 53, 1994.
  26. KOSTYANOVSKY, R.G., "Louis Pasteur did it for us especially". *Mendeleev Communications*, (3): 85, 2003.
  27. JONES, R.T.; KRIEGER, K.H. & JAMES, L., *Direct resolution of alpha-methyl-3, 4-dihydroxyphenylalanine*. 1964, US3158648: Estados Unidos.
  28. MATSUO, N. & MIYAMOTO, J., "Development of synthetic pyrethroids with emphasis on stereochemical aspects". *ACS Symposium Series*. **658**(Phytochemicals for Pest Control): 183, 1997.
  29. REKOSKE, J.E., "Chiral separations". *AIChE Journal*. **47**(1): 2, 2001.
  30. XIE, R.; CHU, L.-Y. & DENG, J.-G., "Membranes and membrane processes for chiral resolution". *Chem. Soc. Rev*. **37**(6): 1243, 2008.
  31. ALI, I.; KUMERER, K. & ABOUL-ENEIN, H.Y., "Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis". *Chromatographia*. **63**(7-8): 295, 2006.
  32. ROCCO, A. & FANALI, S., "Enantiomeric separation of acidic compounds by nano-liquid chromatography with methylated- $\beta$ -cyclodextrin as a mobile phase additive". *Journal of Separation Science*. **32**(10): 1696, 2009.
  33. FRANCOTTE, E.R. & RICHERT, P., "Applications of simulated moving-bed chromatography to the separation of the enantiomers of chiral drugs". *J. Chromatogr., A*. **769**(1): 101, 1997.
  34. WELCH, C.J.; SAJONZ, P.; SPENCER, G.; LEONARD, W.; HENDERSON, D.; SCHAFER, W. & BERNARDONI, F., "Microscale HPLC Predicts Preparative Performance at Millionfold Scale". *Org. Process Res. Dev*. **12**(4): 674, 2008.
  35. FRANCOTTE, E.R., "Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers". *J. Chromatogr., A*. **906**(1-2): 379, 2001.
  36. DINGENEN, J., *Scaling-up of preparative chromatographic enantiomer separations*, in *Preparative Enantioselective Chromatography*, COX, G.B., Editor. 2005, Blackwell Publishing. p. 110.
  37. DINGENEN, J. & KINKEL, J.N., "Preparative chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases on laboratory and production scales by closed-loop recycling chromatography". *J. Chromatogr., A*. **666**(1-2): 627, 1994.
  38. CHARTON, F.; BAILLY, M. & GUIOCHON, G., "Recycling in preparative liquid chromatography". *J. Chromatogr., A*. **687**(1): 13, 1994.
  39. CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V., "Separation of Multimilligram Quantities of Gossypol Enantiomers on Polysaccharide based stationary phases". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **25**(5): 819, 2002.
  40. MERICKO, D.; LEHOTAY, J.; SKACANI, I. & ARMSTRONG, D.W., "Separation and thermodynamic studies of chiral sulfoxides on teicoplanin-based stationary phase". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. **30**(9&10): 1401, 2007.

41. PETER, A.; VEKES, E. & ARMSTRONG, D.W., "Effects of temperature on retention of chiral compounds on a ristocetin A chiral stationary phase". *J. Chromatogr., A*. **958**(1-2): 89, 2002.
42. SILVA, I.J.; SARTOR, J.P.; ROSA, P.C.P.; DE VEREDAS, V.; BARRETO JUNIOR, A.G. & SANTANA, C.C., "High-performance liquid chromatographic separation of rolipram, bupivacaine, and omeprazole using a tartardiamide-based stationary phase". *J. Chromatogr., A*. **1162**(1): 97, 2007.
43. MEYER, M.R.; PETERS, F.T. & MAURER, H.H., "The role of human hepatic cytochrome P450 isozymes in the metabolism of racemic 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its enantiomers". *Drug Metab. Dispos.* **36**(11): 2345, 2008.
44. LEHOUCQ, S.; VERHEVE, D.; VANDE WOUWER, A. & CAVOY, E., "SMB enantioseparation: process development, modeling, and operating conditions". *AIChE Journal*. **46**(2): 247, 2000.
45. SILVA, I.J.; VEREDAS, V.; DOS SANTOS, M.A.G.; SANTANA, C.C.; CARPES, M.J.S. & CORREIA, C.R.D., "Simulated moving bed chromatography in production of enantiomerically pure or enriched compounds in large scale". *Química Nova*. **29**(5): 1027, 2006.
46. ALVES, G.; FORTUNA, A. & FALCAO, A., "High-performance liquid chromatography and its impact in the development of chiral drugs: a review". *Trends in Chromatography*. **4**: 1, 2008.
47. LI, P.; YU, J.; XIU, G. & RODRIGUES, A.E., "Separation Region and Strategies for Proteins Separation by Salt Gradient Ion-Exchange SMB". *Separation Science and Technology*. **43**(1): 11, 2008.
48. ZHANG, Z.; MAZZOTTI, M. & MORBIDELLI, M., "Multiobjective optimization of simulated moving bed and Varicol processes using a genetic algorithm". *Journal of Chromatography, A*. **989**(1): 95, 2003.
49. LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; NICOUD, R.M. & BAILLY, M., "The "VARICOL" process: a new multicolumn continuous chromatographic process". *Sep. Sci. Technol.* **35**(12): 1829, 2000.
50. HOUWING, J.; JENSEN, T.B.; VAN HATEREN, S.H.; BILLIET, H.A.H. & VAN DER WIELEN, L.A.M., "Positioning of salt gradients in ion-exchange SMB". *AIChE Journal*. **49**(3): 665, 2003.
51. JIN, W. & WANKAT, P.C., "Thermal Operation of Four-Zone Simulated Moving Beds". *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **46**(22): 7208, 2007.
52. MIGLIORINI, C.; WENDLINGER, M.; MAZZOTTI, M. & MORBIDELLI, M., "Temperature Gradient Operation of a Simulated Moving Bed Unit". *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **40**(12): 2606, 2001.
53. KEARNEY, M.M. & MUMM, M.W., *Simulated moving bed process for the preparation of sorbent beds for chromatographic separators*. 1990: WO 9006796. p. 28.
54. KEARNEY, M.M. & HIEB, K.L., *Time variable simulated moving bed process*. 1991: WO 9108815. p. 21.
55. MUN, S. & WANG, N.-H.L., "Optimization of productivity in solvent gradient simulated moving bed for paclitaxel purification". *Process Biochem.* **43**(12): 1407, 2008.
56. MAZZOTTI, M.; STORTI, G. & MORBIDELLI, M., "Supercritical fluid simulated moving bed chromatography". *Journal of Chromatography, A*. **786**(2): 309, 1997.
57. KAEMMERER, H.; BRUNNER, G. & JOHANNSEN, M., "Management and control of modifier content in preparative SFC solvent cycles". *Journal of Supercritical Fluids*. **43**(2): 204, 2007.



58. SCHRAMM, H.; KASPEREIT, M.; KIENLE, A. & SEIDEL-MORGENSTERN, A., "Improving simulated moving bed processes by cyclic modulation of the feed concentration". *Chem. Eng. Technol.* **25**(12): 1151, 2002.
59. SCHRAMM, H.; KASPEREIT, M.; KIENLE, A. & SEIDEL-MORGENSTERN, A., "Simulated moving bed process with cyclic modulation of the feed concentration". *J. Chromatogr., A.* **1006**(1-2): 77, 2003.
60. KIM, J.K. & WANKAT, P.C., "Designs of Simulated-Moving-Bed Cascades for Quaternary Separations". *Ind. Eng. Chem. Res.* **43**(4): 1071, 2004.
61. KESSLER, L.C. & SEIDEL-MORGENSTERN, A., "Theoretical study of multicomponent continuous countercurrent chromatography based on connected 4-zone units". *J. Chromatogr., A.* **1126**(1-2): 323, 2006.
62. SA GOMES, P. & RODRIGUES, A.E., "Simulated Moving Bed Chromatography: From Concept to Proof-of-Concept". *Chem. Eng. Technol.* **35**(1): 17, 2012.
63. PAIS, L.S. & RODRIGUES, A.E., "Design of simulated moving bed and Varicol processes for preparative separations with a low number of columns". *J. Chromatogr., A.* **1006**(1-2): 33, 2003.
64. LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; PIGORINI, G.; NICOUD, R.M.; ROSS, D.S. & TERFLOTH, G., "Application of the "VARICOL" process to the separation of the isomers of the SB-553261 racemate". *Journal of Chromatography, A.* **947**(1): 59, 2002.
65. FRANCOTTE, E.R., *Chromatography as a separation tool for the preparative resolution of racemic compounds*, in *Chiral Separations*, AHUJA, S., Editor. 1997, American Chemical Society: Washington, D. C. p. 271.
66. GUIOCHON, G. & TARAFDER, A., "Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography". *J. Chromatogr., A.* **1218**(8): 1037, 2011.
67. BHATT, H.S.; PATEL, G.F.; VEKARIYA, N.V. & JADAV, S.K., "Super critical fluid chromatography-an overview". *Journal of Pharmacy Research.* **2**(10): 1606, 2009.
68. PHINNEY, K.W. & STRINGHAM, R.W., "Chiral separations using supercritical fluid chromatography". *Chiral Separation Techniques (3rd Edition)*: 135, 2007.
69. VAN DER VORST, G.; VAN LANGENHOVE, H.; DE PAEP, F.; AELTERMAN, W.; DINGENEN, J. & DEWULF, J., "Exergetic life cycle analysis for the selection of chromatographic separation processes in the pharmaceutical industry: preparative HPLC versus preparative SFC". *Green Chemistry.* **11**(7): 1007, 2009.
70. ARMSTRONG, D.W. & ZHANG, B., "Chiral stationary phases for HPLC". *Anal. Chem.* **73**(19): 557A, 2001.
71. LOURENCO, T.C.; CASSIANO, N.M. & CASS, Q.B., "Chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography". *Quim. Nova.* **33**(10): 2155, 2010.
72. FELIX, G. & BERTHOD, A., "Commercial Chiral Stationary Phases for the Separations of Clinical Racemic Drugs". *Separation and Purification Reviews.* **36**(4): 285, 2007.
73. BERTHOD, A., "Chiral recognition mechanisms". *Analytical chemistry.* **78**(7): 2093, 2006.
74. OKAMOTO, Y. & IKAI, T., "Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers". *Chemical Society Reviews.* **37**(12): 2593, 2008.
75. IKAI, T. & OKAMOTO, Y., "Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography". *Chemical Reviews.* **109**(11): 6077, 2009.
76. YASHIMA, E., "Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation". *Journal of Chromatography, A.* **906**(1-2): 105, 2001.

77. ZHANG, T. & FRANCO, P., *Analytical and preparative potential of immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases*, in *Chiral Separation Techniques*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 2007, Wiley-VCH: Weinheim. p. 99.
78. FRANCOTTE, E. & HUYNH, D., "Immobilized halogenophenylcarbamate derivatives of cellulose as novel stationary phases for enantioselective drug analysis". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **27**(3-4): 421, 2002.
79. FRANCOTTE, E., *Thermally immobilized polysaccharide derivatives*. 1997: WO9749733. p. 24.
80. FRANCOTTE, E. & ZHANG, T., *Photochemically crosslinked polysaccharide derivatives having no photopolymerizable functional groups*. 1997: WO9704011. p. 34 pp.
81. ZHANG, T.; NGUYEN, D. & FRANCO, P., "Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilised polysaccharide-based chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **1191**(1-2): 214, 2008.
82. FRANCO, P. & ZHANG, T., "Common approaches for efficient method development with immobilised polysaccharide-derived chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, B*. **875**(1): 48, 2008.
83. PIRKLE, W.H. & WELCH, C.J., "Chromatographic separation of the enantiomers of acylated amines on chiral stationary phases". *Journal of Organic Chemistry*. **49**(1): 138, 1984.
84. BEESLEY, T.E. & LEE, J.T., *Method development and optimization of enantioseparations using macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases*, in *Chiral Separation Techniques*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 2007, Wiley-VCH: Weinheim. p. 1.
85. BEESLEY, T.E., "Review of chiral stationary phase development and chiral applications". *LC-GC Eur*. **24**(5): 270, 2011.
86. SAJONZ, P.; GONG, X.; LEONARD, W.R., JR.; BIBA, M. & WELCH, C.J., "Multiparallel chiral method development screening using an 8-channel microfluidic HPLC system". *Chirality*. **18**(10): 803, 2006.
87. WELCH, C.J.; SAJONZ, P.; BIBA, M.; GOUKER, J. & FAIRCHILD, J., "Comparison of multiparallel microfluidic HPLC instruments for high throughput analyses in support of pharmaceutical process research". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **29**(15): 2185, 2006.
88. ROUSSEL, C. & PIRAS, P., "Chirbase: a molecular database for storage and retrieval of chromatographic chiral separations". *Pure Appl. Chem*. **65**(2): 235, 1993.
89. SUTEU, C., *Method development for preparative enantioselective chromatography*, in *Preparative Enantioselective Chromatography*, COX, G.B., Editor. 2005, Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK. p. 78.
90. CASS, Q.B.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; CASSIANO, N.M.; DEGANI, A.L.G. & PEDRAZZOLI, J.J., "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*. **798**(2): 275, 2003.
91. BARREIRO, J.C.; VANZOLINI, K.L.; MADUREIRA, T.V.; TIRITAN, M.E. & CASS, Q.B., "A column-switching method for quantification of the enantiomers of omeprazole in native matrices of waste and estuarine water samples". *Talanta*. **82**(1): 384, 2010.
92. GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. & KATTI, A., *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, in *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, COX, G.B., Editor. 1994, Academic Press: San Diego, Estados Unidos.

93. STRUBE, J.; HAUMREISSER, S.; SCHMIDT-TRAUB, H.; SCHULTE, M. & DITZ, R., "Comparison of batch elution and continuous simulated moving bed chromatography". *Org. Process Res. Dev.* **2**(5): 305, 1998.
94. RAJENDRAN, A.; PAREDES, G. & MAZZOTTI, M., "Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers". *J. Chromatogr., A.* **1216**(4): 709, 2009.
95. NICOUD, R.M. & SEIDEL-MORGENSTERN, A., "Adsorption isotherms. Experimental determination and application to preparative chromatography". *Isolation and Purification.* **2**(3): 165, 1996.
96. JAMES, F.; SEPULVEDA, M.; CHARTON, F.; QUINONES, I. & GUIOCHON, G., "Determination of binary competitive equilibrium isotherms from the individual chromatographic band profiles". *Chem. Eng. Sci.* **54**(11): 1677, 1999.
97. BEESLEY, T.E. & SCOTT, R.P.W., *Chiral Chromatography*, in *Separation Science Series* SCOTT, R.P.W.; SIMPSON, C.F. & KATZ, E.D., Editors. 1998, John Wiley and Sons: West Sussex, Inglaterra. p. 265.
98. KARGER, B.L.; CONROE, K. & ENGELHARDT, H., "Use of surface textured beads for high speed column liquid chromatography". *Journal of Chromatographic Science.* **8**(May): 242, 1970.
99. 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.* **23**(7): 1029, 2000.
100. 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.* **26**(13): 2083, 2003.
101. ABOUL-ENEIN, H.Y. & ALI, I., "Normal phase chiral HPLC of methylphenidate: comparison of different polysaccharide-based chiral stationary phases". *Chirality.* **14**(1): 47, 2002.
102. COIMBRA, M. *Determinação do coeficiente cromatográfico de partição, kw, de inibidores da bomba de prótons.* São Carlos, Departamento de Química, 2007. p 110.
103. CASS, Q.B. & BATIGALHIA, F., "Enantiomeric resolution of a series of chiral sulfoxides by high-performance liquid chromatography on polysaccharide-based columns with multimodal elution". *26th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques.* **987**(1): 445, 2003.
104. ANDERSSON, S., *Preparative chiral chromatography - a powerful and efficient tool in drug discovery*, in *Chiral Separation Techniques*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 2007, Wiley-VCH: Weinheim, Germany. p. 585.
105. MOTA, J.P.B.; ARAUJO, J.M.M. & RODRIGUES, R.C.R., "Optimal design of simulated moving-bed processes under flow rate uncertainty". *AIChE Journal.* **53**(10): 2630, 2007.
106. BROWN, J.N. & WILSON, D.T., "Safety and efficacy of armodafinil in the treatment of excessive sleepiness". *Clin. Med. Insights: Ther.* **3**: 159, 2011.
107. HAUCK, W.; ADAM, P.; BOBIER, C. & LANDMESSER, N., "Use of large-scale chromatography in the preparation of armodafinil". *Chirality.* **20**(8): 896, 2008.
108. MINCEVA, M. & RODRIGUES, A.E., "Two-level optimization of an existing SMB for p-xylene separation". *Computers & Chemical Engineering.* **29**(10): 2215, 2005.
109. FRANCOTTE, E., *Chiral stationary phases for preparative enantioselective chromatography*, in *Preparative Enantioselective Chromatography*, COX, G.B., Editor. 2005, Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK. p. 48.
110. QUALLICH, G.J., "Development of the commercial process for Zolof/sertraline". *Chirality.* **17**(Suppl.): S120, 2005.

111. TURNER, D., "A review of the use of modafinil for attention-deficit hyperactivity disorder". *Expert Review of Neurotherapeutics*. **6**(4): 455, 2006.
112. STOSCHITZKY, K.; EGGINGER, G.; ZERNIG, G.; KLEIN, W. & LINDNER, W., "Stereoselective features of (R)- and (S)-atenolol: Clinical pharmacological, pharmacokinetic, and radioligand binding studies". *Chirality*. **5**(1): 15, 1993.
113. CLEMENTI, W.A.; GARVEY, T.Q.; CLIFTON, G.D.; MCCOY, R.A.; BRANDT, S. & SCHWARTZ, S., "Single dose pharmacokinetics of (S)-atenolol administered orally as a single enantiomer formulation and as a racemic mixture (Tenormin)". *Chirality*. **6**(3): 169, 1994.
114. BOSE, D.S. & NARSAIAH, A.V., "An efficient asymmetric synthesis of (S)-atenolol using hydrolytic kinetic resolution". *Bioorg. Med. Chem.* **13**(3): 627, 2005.
115. KITAORI, K.; TAKEHIRA, Y.; FURUKAWA, Y.; YOSHIMOTO, H. & OTERA, J., "A practical synthesis of optically active atenolol from chiral epichlorohydrin". *Chem. Pharm. Bull.* **45**(2): 412, 1997.
116. BEVINAKATTI, H.S. & BANERJI, A.A., "Lipase catalysis in organic solvents. Application to the synthesis of (R)- and (S)-atenolol". *J. Org. Chem.* **57**(22): 6003, 1992.
117. DAMLE, S.V.; PATIL, P.N. & SALUNKHE, M.M., "Chemoenzymatic synthesis of (R)- and (S)-atenolol and -propranolol employing lipase catalyzed enantioselective esterification and hydrolysis". *Synth. Commun.* **29**(22): 3855, 1999.
118. SANTORO, M.I.R.M.; CHO, H.S. & KEDOR-HACKMANN, E.R.M., "Enantiomeric separation and quantitative determination of atenolol in tablets by chiral high-performance liquid chromatography". *Drug Dev. Ind. Pharm.* **26**(10): 1107, 2000.
119. TAKAYANAGUI, O.M.; ODASHIMA, N.S.; BONATO, P.S.; LIMA, J.E. & LANCHOTE, V.L., "Medical management of neurocysticercosis". *Expert Opin. Pharmacother.* **12**(18): 2845, 2011.
120. LANCHOTE, V.L.; TAKAYANAGUI, O.M. & MATEUS, F.H., "Enantioselective renal excretion of albendazole metabolites in patients with neurocysticercosis". *Chirality*. **16**(8): 520, 2004.
121. TAKAYANAGUI, O.M., "Therapy for neurocysticercosis". *Expert Rev. Neurother.* **4**(1): 129, 2004.
122. PROST, F.; CASLAVSKA, J. & THORMANN, W., "Chiral analysis of albendazole sulfoxide enantiomers in human plasma and saliva using capillary electrophoresis with on-column absorption and fluorescence detection". *Journal of Separation Science*. **25**(15-17): 1043, 2002.
123. ZHAI, Z.; LUO, X.; WU, X.; ZHANG, H.; SHI, Y.; CHEN, L. & LI, Y., "Analytical and semipreparative resolution of enantiomers of albendazole sulfoxide by HPLC on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **62**(1): 69, 2005.
124. POURGHOLAMI, M.H.; AKHTER, J.; WANG, L.; LU, Y. & MORRIS, D.L., "Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis". *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**(5): 425, 2005.
125. PULIDO, M.M.; MOLINA, A.J.; MERINO, G.; MENDOZA, G.; PRIETO, J.G. & ALVAREZ, A.I., "Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep". *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **29**(4): 279, 2006.
126. TORIBIO, L.; NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L. & NIETO, E.M., "Use of semipreparative supercritical fluid chromatography to obtain small quantities of the albendazole sulfoxide enantiomers". *J. Chromatogr., A*. **1011**(1-2): 155, 2003.

127. LOURENÇO, T.C.; BATISTA, J.M.; FURLAN, M.; HE, Y.; NAFIE, L.A.; SANTANA, C.C. & CASS, Q.B., "Albendazole sulfoxide enantiomers: preparative chiral separation and absolute stereochemistry". *J.Chrom. A*, 2012. doi:10.1016/j.chroma.2012.01.070.
128. BELAZ, K.R.A.; COIMBRA, M.; BARREIRO, J.C.; MONTANARI, C.A. & CASS, Q.B., "Multimilligram enantioresolution of sulfoxide proton pump inhibitors by liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phase". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**(1): 81, 2008.
129. KALANT, H., "The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs". *CMAJ*. **165**(7): 917, 2001.
130. DE LA TORRE, R.; FARRE, M.; ROSET, P.N.; PIZARRO, N.; ABANADES, S.; SEGURA, M.; SEGURA, J. & CAMI, J., "Human pharmacology of MDMA. Pharmacokinetics, metabolism, and disposition". *Ther. Drug Monit.* **26**(2): 137, 2004.
131. HUOT, P.; JOHNSTON, T.H.; LEWIS, K.D.; KOPRICH, J.B.; REYES, M.G.; FOX, S.H.; PIGGOTT, M.J. & BROTCHE, J.M., "Characterization of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) enantiomers in vitro and in the MPTP-lesioned primate: R-MDMA reduces severity of dyskinesia, whereas S-MDMA extends duration of on-time". *J. Neurosci.* **31**: 7190, 2011.
132. VON AMELN, N. & VON AMELN-MAYERHOFER, A., "Atypical development of behavioural sensitization to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy') in adolescent rats and its expression in adulthood: role of the MDMA chirality. ". *Addict. Biol.* **15**: 35, 2010.
133. CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V., "Separation of multi-milligram quantities of gossypol enantiomers on polysaccharide-based stationary phases". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **25**(5): 819, 2002.
134. SADEGHIPOUR, F. & VEUTHEY, J.L., "Enantiomeric separation of four methylenedioxyated amphetamines on beta -cyclodextrin chiral stationary phases". *Chromatographia.* **47**(5/6): 285, 1998.
135. LOURENÇO, T.C.; BÓRIO, G.C.; CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B. & MOREAU., R.L.M., "Chiral separation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) enantiomers using batch chromatography with peak shaving recycling and its effects on oxidative stress status in rat liver". *J. Pharm. Biom. Anal.*, 2012. doi: 10.1016/j.jpba.2012.01.025.
136. RAMAKRISHNA, N.V.S.; VISHWOTTAM, K.N.; WISHU, S.; KOTESHWARA, M. & KUMAR, S.S., "High-performance liquid chromatography method for the quantification of rabeprazole in human plasma using solid-phase extraction". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **816**(1-2): 209, 2005.
137. KANAZAWA, H.; OKADA, A.; HIGAKI, M.; YOKOTA, H.; MASHIGE, F. & NAKAHARA, K., "Stereospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 phenotype". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**(6): 1817, 2003.
138. TORIBIO, L.; ALONSO, C.; DEL NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L. & MARTIN, M.T., "Semipreparative enantiomeric separation of omeprazole by supercritical fluid chromatography". *J. Chromatogr., A.* **1137**(1): 30, 2006.
139. KALE-PRADHAN, P.B.; LANDRY, H.K. & SYPULA, W.T., "Esomeprazole for acid peptic disorders". *Ann. Pharmacother.* **36**(4): 655, 2002.
140. ZANITTI, L.; FERRETTI, R.; GALLINELLA, B.; LA TORRE, F.; SANNA, M.L.; MOSCA, A. & CIRILLI, R., "Direct HPLC enantioresolution of omeprazole and its chiral impurities: Application to the determination of enantiomeric purity of esomeprazole magnesium trihydrate". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52**(5): 665, 2010.

141. WEI, F.; SHEN, B. & CHEN, M., "From Analytical Chromatography to Simulated Moving Bed Chromatography: Resolution of Omeprazole Enantiomers". *Ind. Eng. Chem. Res.* **45**(4): 1420, 2006.
142. COTTON, H.; ELEBRING, T.; LARSSON, M.; LI, L.; SORENSEN, H. & VON UNGE, S., "Asymmetric synthesis of esomeprazole". *Tetrahedron: Asymmetry.* **11**(18): 3819, 2000.
143. MONTANARI, M.L.C.; CASS, Q.B.; ANDRICOPULO, A.D.; LEITÃO, A. & MONTANARI, C.A., "Identification of chiral selectors for improved enantioseparation based on molecular interaction fields". *Analytica Chimica Acta.* **545**(1): 33, 2005.
144. MONTANARI, M.L.C.; CASS, Q.B.; LEITÃO, A.; ANDRICOPULO, A.D. & MONTANARI, C.A., "The role of molecular interaction fields on enantioselective and nonselective separation of chiral sulfoxides". *J. Chrom., A.* **1121**(1): 64, 2006.
145. KAVAKKA, J.S.; I. KILPELÄINEN, I. & S. HEIKKINEN, S., "General Chromatographic NMR Method in Liquid State for Synthetic Chemistry: Polyvinylpyrrolidone Assisted DOSY Experiments ". *Org. Lett.* **11**: 1349, 2009.
146. NAFIE, L.A., "Vibrational circular dichroism: a new tool for the solution-state determination of the structure and absolute configuration of chiral natural product molecules". *Nat. Prod. Commun.* **3**(3): 451, 2008.
147. PETROVIC, A.G.; HE, J.; POLAVARAPU, P.L.; XIAO, L.S. & ARMSTRONG, D.W., "Absolute configuration and predominant conformations of 1,1-dimethyl-2-phenylethyl phenyl sulfoxide". *Org. Biomol. Chem.* **3**(10): 1977, 2005.
148. STEPHENS, P.J.; AAMOUCHE, A.; DEVLIN, F.J.; SUPERCHI, S.; DONNOLI, M.I. & ROSINI, C., "Determination of Absolute Configuration Using Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy: The Chiral Sulfoxide 1-(2-methylnaphthyl) Methyl Sulfoxide". *J. Org. Chem.* **66**(11): 3671, 2001.
149. BATISTA, J.M., JR.; BATISTA, A.N.L.; MOTA, J.S.; CASS, Q.B.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FREEDMAN, T.B.; LOPEZ, S.N.; FURLAN, M. & NAFIE, L.A., "Structure Elucidation and Absolute Stereochemistry of Isomeric Monoterpene Chromane Esters". *J. Org. Chem.* **76**(8): 2603, 2011.
150. MAHANTY, S.; PAREDES, A.; MARZAL, M.; GONZALEZ, E.; RODRIGUEZ, S.; DORNY, P.; GUERRA-GIRALDEZ, C.; GARCIA, H.H. & NASH, T., "Sensitive in vitro system to assess morphological and biochemical effects of praziquantel and albendazole on *Taenia solium* cysts". *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**(1): 211, 2011.
151. STETTLER, M.; SILES-LUCAS, M.; SARCIRO, E.; LAWTON, P.; GOTSTEIN, B. & HEMPHILL, A., "Echinococcus multilocularis alkaline phosphatase as a marker for metacestode damage induced by in vitro drug treatment with albendazole sulfoxide and albendazole sulfone". *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(8): 2256, 2001.
152. TAKAYANAGUI, O.M. & JARDIM, E., "Therapy for neurocysticercosis. Comparison between albendazole and praziquantel". *Arch. Neurol.* **49**(3): 290, 1992.
153. RODRIGUEZ, S.; DORNY, P.; TSANG VICTOR, C.W.; PRETELL, E.J.; BRANDT, J.; LESCANO ANDRES, G.; GONZALEZ ARMANDO, E.; GILMAN ROBERT, H. & GARCIA HECTOR, H., "Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T. solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis". *J. Infect. Dis.* **199**(9): 1345, 2009.
154. MOON, K.-H.; UPRETI, V.V.; YU, L.-R.; LEE, I.J.; YE, X.; EDDINGTON, N.D.; VEENSTRA, T.D. & SONG, B.-J., "Mechanism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-mediated mitochondrial dysfunction in rat liver". *Proteomics.* **8**(18): 3906, 2008.

## *Referências Bibliográficas*

---

155. BRANDT, J.R.A.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRIJS, L. & FALLA, N., "A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis". *Int. J. Parasitol.* **22**(4): 471, 1992.

**Anexo 1 - Procedimento para o uso do VARICOL®**

- ⇒ Ligar o computador,
- ⇒ Virar a chave ao lado esquerdo do VARICOL®,
- ⇒ Abrir o programa Fix Startup,



- ⇒ Clicar no “cadeado”.



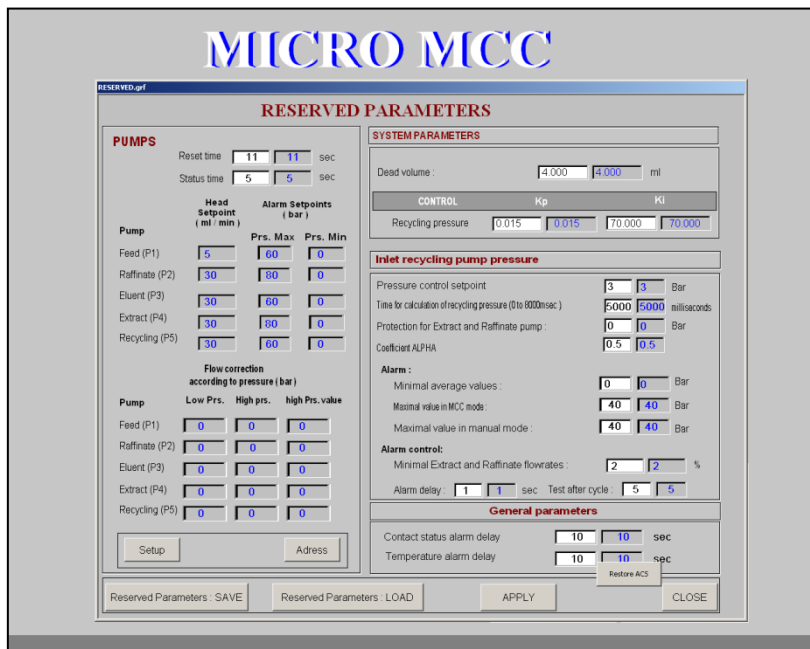


⇒ Fazer o Login/Password: Admin/Admin



⇒ Alarm – Acknowledge (obs:até parar todos os alarmes)

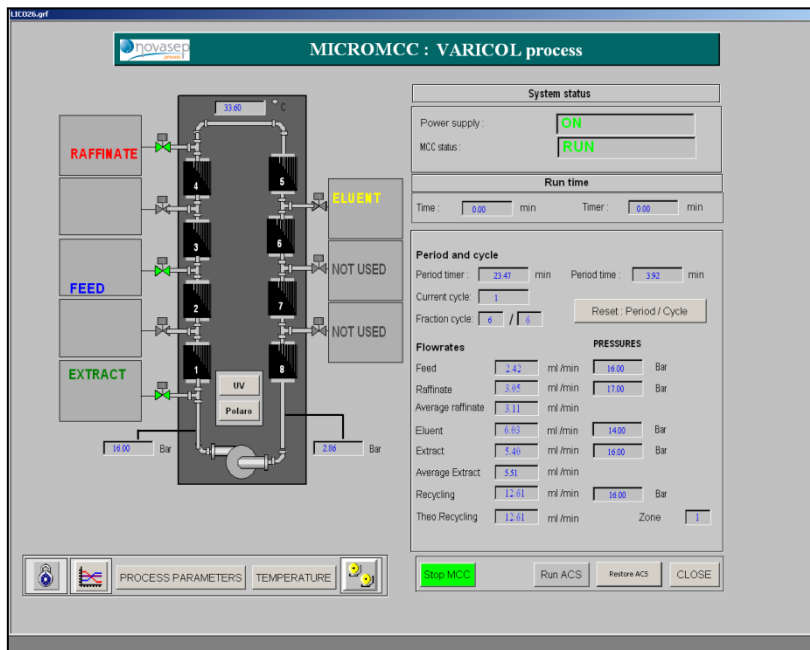
⇒ Reserved – Load Reserved Parameters, Apply, Close



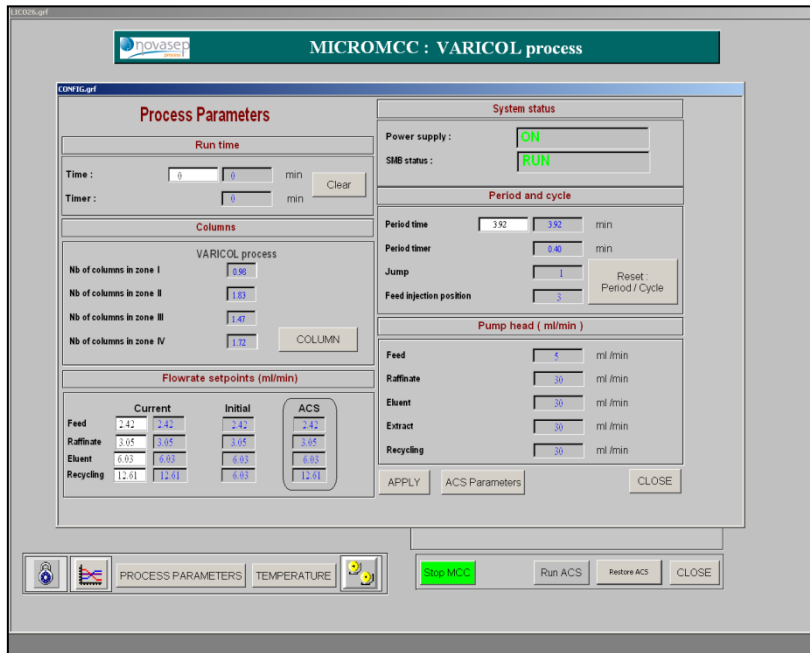
⇒ Power Supply: ON



⇒ Flow Sheet:

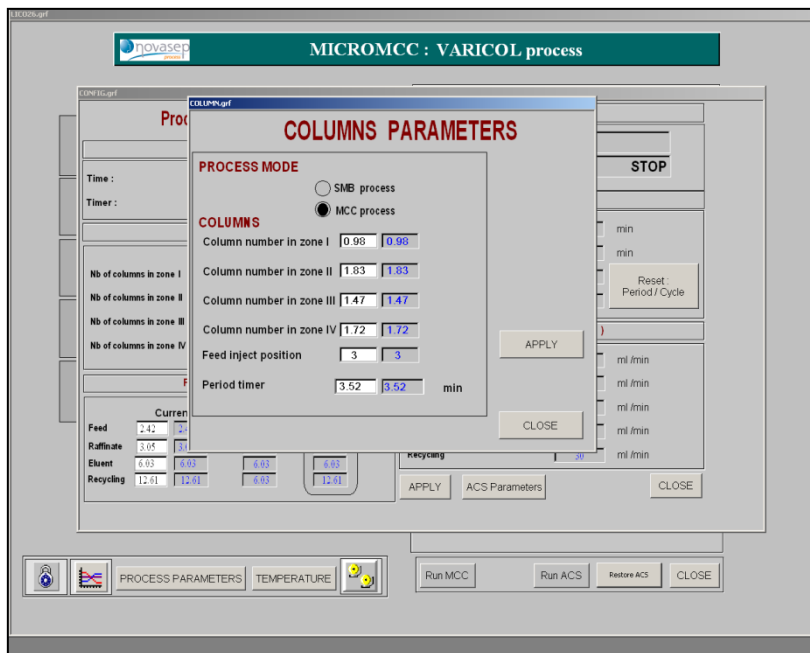


⇒ Process Parameters



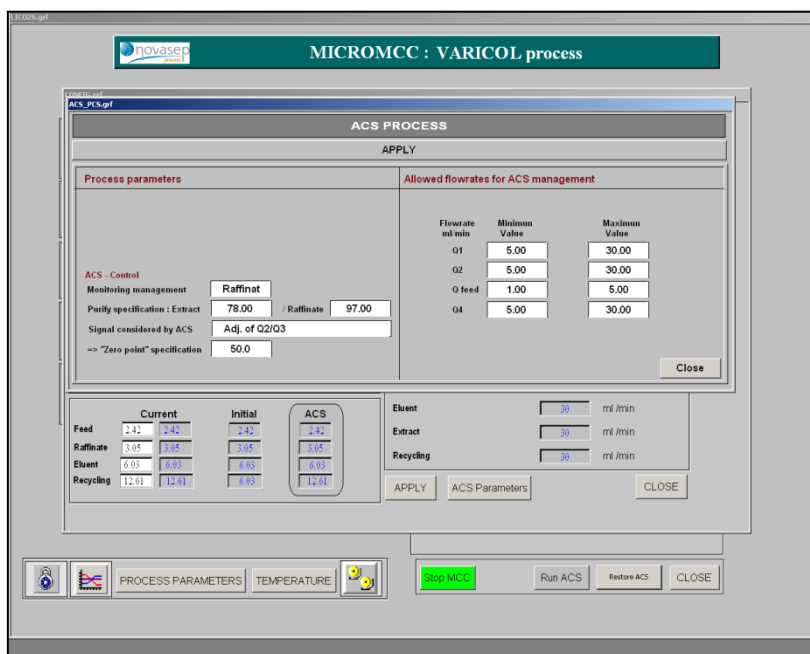
- Reset Period/Cycle, preencher com o período.

⇒ Column – colocar as zonas e o período.



- Colocar os parâmetros iniciais no FlowRate Parameters – Feed, Raffinate, Extract, Recycling.
- Apply, Close.

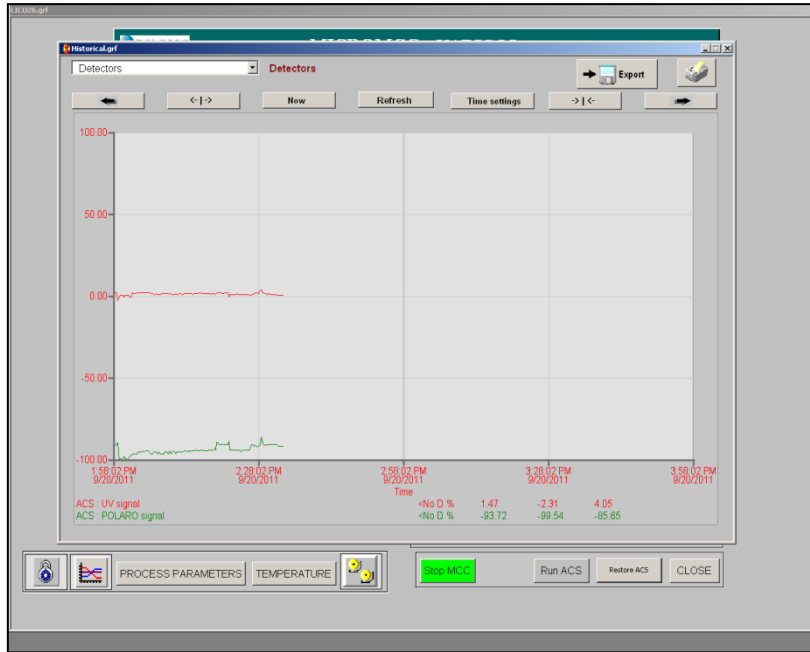
- ⇒ Run MCC, no flowsheet, obs: pode-se acompanhar o processo no Launch ACS.
- ⇒ Após estado estacionário abrir process parameters e:
- ⇒ ACS parameters



- Pode se alterar os parâmetros da janela ACS Process Parameters dependendo do processo de separação.
  - Monitoring management: Qual dos enantiômeros vai se monitorar?
  - Purity Specification: Qual a pureza desejada para os enantiômeros?
  - Signal considered by ACS: Qual vazões internas o software deve considerar?
  - Zero Point Specification: Qual região do ciclo o software deve localizar o feed?

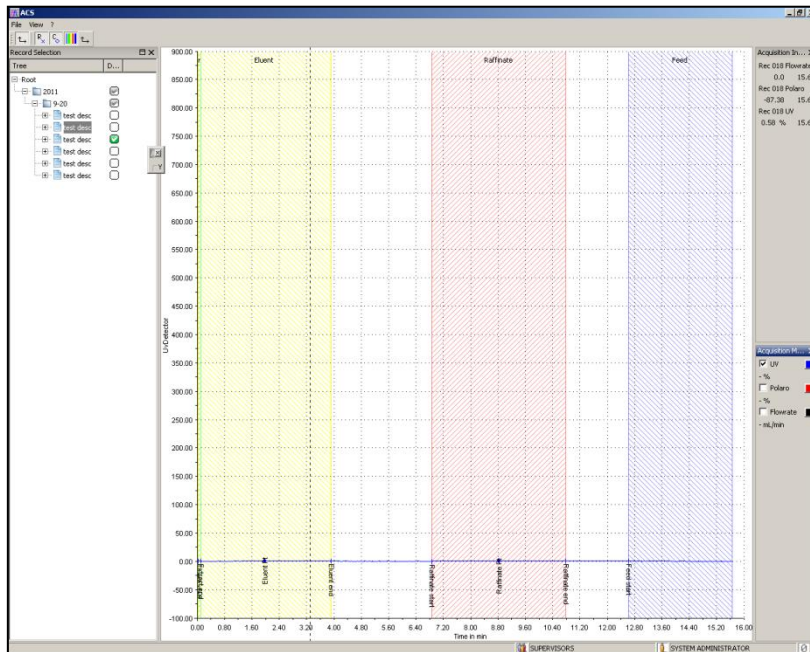
Após ajustar todos os parâmetros do ACS, ligar o ACS no flowsheet.

- ⇒ Para acompanhar o desempenho das bombas on flow, dos detectores, temperatura, etc. clicar na janela tracability do flowsheet.

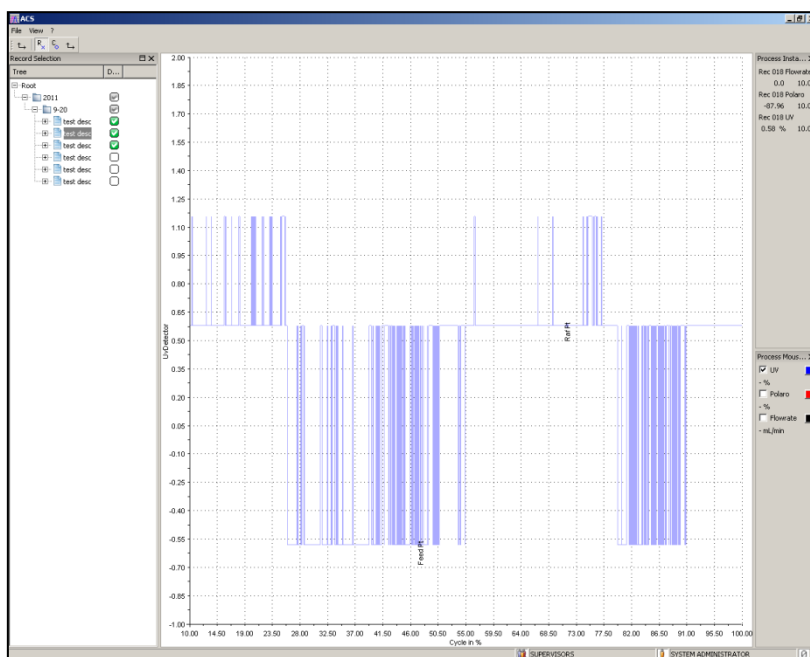


⇒ Abrir o ACS no flowsheet (Launch ACS) para acompanhar os cromatogramas e a distribuição dos enantiômeros.

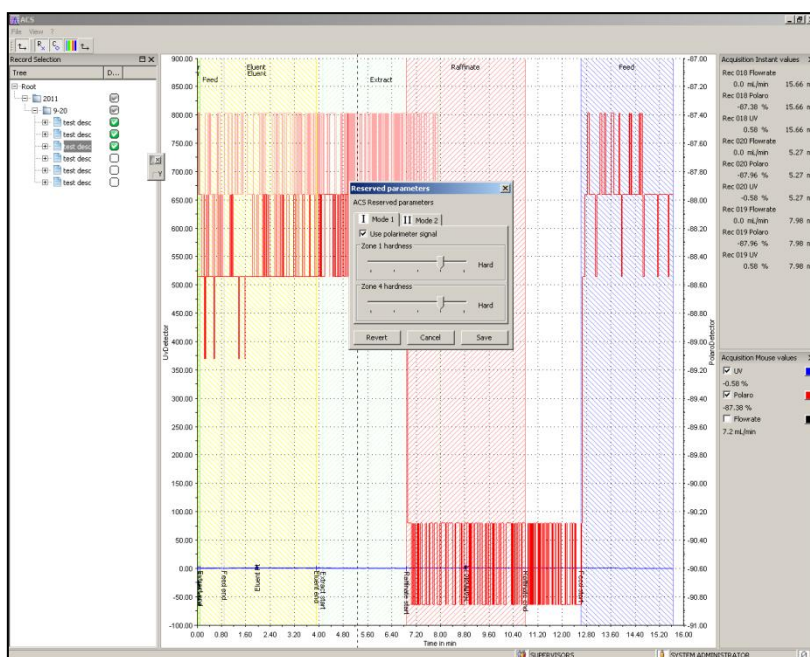
- ACS Live Acquisition:



- Process Parameters:



- ACS Reserved Parameters:



- A janela do Reserved Parameters pode ser alterada dependendo do processo de separação:
  - Ao desclicar o polarimeter signal, o ACS fara o acompanhamento da separação pelo signal do UV, indicado para separações não quirais ou para misturas enantioméricas (não tem 50% de cada enantiômero)

- Quanto maior o controle da Zona I e Zona IV maior será a margem de segurança para não haver contaminação dos enantiômeros por esta zona.

**Procedimento para desligar o VARICOL**

- ⇒ STOP MCC.
- ⇒ Power Supply: OFF
- ⇒ Ctrl + TAB : fechar o software Fix Startup.
- ⇒ Virar a chave lateral.