

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

**“Determinação do Coeficiente Cromatográfico
de Partição, $\log k_w$, de
Inibidores da Bomba H^+/K^+ -ATPase”**

Mariana Coimbra

São Carlos-SP

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**“Determinação do Coeficiente Cromatográfico
de Partição, $\log k_w$, de
Inibidores da Bomba H^+/K^+ -ATPase”**

Mariana Coimbra*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Química Orgânica

Orientação: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

Co-orientação: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

* bolsista CAPES

São Carlos-SP

2007

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

C679dc

Coimbra, Mariana.

Determinação do coeficiente cromatográfico de partição, $\log k_w$, de inibidores da bomba H^+/K^+ - ATPase / Mariana Coimbra. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

146 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Sulfóxidos quirais. 3. Colunas de polissacarídeos. 4. Multimodal. 5. Seletor quiral. I. Título.

CDD: 543.0894 (20^a)

“A vida é uma longa lição de humildade....”

Dedico essa dissertação,

A minha mãe, **Maria Aparecida**, pelo apoio, preocupação e amor a mim demonstrado durante toda a minha vida e ao meu namorado, **João Francisco**, pela sua amizade, carinho, compreensão e, principalmente, pelo incentivo durante toda esta jornada.

Agradecimentos

Primeiramente a **Deus**.

Em especial, a minha orientadora, **Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass**, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço sua orientação, paciência e apoio durante estes anos de convívio e, principalmente, durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari** pela sua disposição em ensinar.

A **Universidade Federal de São Carlos**.

A todo **corpo acadêmico, técnico e administrativo** do Departamento de Química da UFSCar e ao **Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE**.

As minhas amigas do grupo **Angela, Bianca, Carmen, Juliana, Kênia, Lúcia, Marcela, Patrícia, Roberta e Vanessa**, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos de angústias e preocupações, trazendo sempre uma palavra de carinho, conforto e motivação. Obrigada, pela cooperação na concretização deste trabalho, vocês me ajudaram muito!

Aos meninos do grupo, **Fernando Campos, Fernando e Tiago**, e pelos que por ali passaram **Flávio e Túlio**, e que deixaram sua marca de apoio e amizade.

A **Kátia Roberta** pelos ensinamentos sobre separações em escala multimiligrama e pela cooperação nos trabalhos desenvolvidos.

Ao técnico e amigo **Alexandre Cruz**.

A **Capes**, pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do grupo de pesquisa NEQUIMED-PN da Universidade de São Paulo/São Carlos, **Adriana, Helton, Juliana, Maria Goretti, Maria Luiza e Renato**, pela ajuda, apoio e pela amizade durante estes meses de convívio.

A minha mãe **Maria Aparecida**, aos meus irmãos **Márcia e Marcos**, aos cunhados **Vânia e Francisco**, aos meus lindos sobrinhos **Maria Clara, João Guilherme e João Henrique**, a prima **Ana Paula** e ao meu namorado **João Francisco**, que sempre me apoiaram e acreditaram nesta realização.

E a todas as pessoas que fazem ou fizeram parte desta história e que de alguma maneira contribuíram para eu me tornar mais forte e acreditar em mim.

Muito obrigada.

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

APS: 3-aminopropilsílica

CSP: Chiral Stationary Phase

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EtOH: etanol

FEQ: Fase Estacionária Quiral

HAc: ácido acético

IV: infravermelho

THF: tetrahidrofurano

TEA: trietilamina

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

TABELA 1.1. Relação dos dez fármacos mais vendidos mundialmente.....	08
TABELA 1.2. Algumas colunas quirais baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente.....	15
TABELA 3.1. Dados referentes às colunas analíticas empregadas neste trabalho..	35
TABELA 3.2. Análise elementar da fase tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose	38
TABELA 3.3. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-1, para os cinco compostos quirais, tendo como o ponto inicial de estudo o modo reverso de eluição	45
TABELA 3.4. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-2, para os cinco compostos quirais, tendo como o ponto inicial de estudo o modo reverso de eluição	46
TABELA 3.5. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-3, para os cinco compostos quirais, tendo como o ponto inicial de estudo o modo reverso de eluição	47
TABELA 3.6. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-1, para os cinco compostos quirais, tendo como o ponto inicial de estudo o modo polar-orgânico de eluição	48
TABELA 3.7. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-2, para os cinco compostos quirais, tendo como o ponto inicial de estudo o modo polar-orgânico de eluição	49

TABELA 3.8. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-3, para os cinco compostos quirais, tendo como o ponto inicial de estudo o modo polar-orgânico de eluição	50
TABELA 3.9. Dados teóricos e experimentais referentes à porcentagem de etanol que intercepta a mudança do modo de retenção, para os cinco compostos, nas três fases quirais sob condições de modo reverso.....	51
TABELA 3.10. Dados teóricos e experimentais referentes à porcentagem de água que intercepta a mudança do modo de retenção, para os cinco compostos, nas três fases quirais sob condições de modo reverso.....	52
TABELA 3.11. Valores do coeficiente cromatográfico de partição dos inibidores da bomba de prótons obtidos pelas equações de segundo grau e a comparação com os valores de $\log P$	54
TABELA 3.12. Parâmetros cromatográficos das análises do lansoprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso de eluição	57
TABELA 3.13. Parâmetros cromatográficos das análises do omeprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso de eluição	58
TABELA 3.14. Parâmetros cromatográficos das análises do pantoprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso de eluição	59
TABELA 3.15. Parâmetros cromatográficos das análises do rabeprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso de eluição	60
TABELA 3.16. Parâmetros cromatográficos das análises do Ro 18-5364 nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso de eluição	61
TABELA 3.17. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-1, para os cinco compostos quirais, sob condições de modo normal de eluição.....	71

TABELA 3.18. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-2, para os cinco compostos quirais, sob condições de modo normal de eluição.....	72
TABELA 3.19. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-3.1, para os cinco compostos quirais, sob condições de modo normal de eluição	73
TABELA 3.20. Dados teóricos e experimentais referentes à porcentagem de etanol que intercepta a mudança do modo de retenção, para os cinco compostos, nas três fases estacionárias sob condições de modo normal.	74
TABELA 3.21. Parâmetros cromatográficos das análises do lansoprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição	75
TABELA 3.22. Parâmetros cromatográficos das análises do omeprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição	76
TABELA 3.23. Parâmetros cromatográficos das análises do pantoprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição	81
TABELA 3.24. Parâmetros cromatográficos das análises do rabeprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição	82
TABELA 3.25. Parâmetros cromatográficos das análises do Ro 18-5364 nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição	83
TABELA 3.26. Comparação entre as porcentagens de etanol, com a CSP-1, necessárias para interceptar as mudanças de retenção do modo reverso e do normal para o polar orgânico.....	90
TABELA 3.27. Comparação entre as porcentagens de etanol, com a CSP-2, necessárias para interceptar as mudanças de retenção do modo reverso e do normal para o polar orgânico.....	91

TABELA 3.28. Comparação entre as porcentagens de etanol, com a CSP-3 e 3.1, necessárias para interceptar as mudanças de retenção do modo reverso e do normal para o polar orgânico.....	92
TABELA 3.29. Ponto de isoeluição (P.I) dos inibidores da bomba de prótons nas fases estacionárias de polissacarídeos	101
TABELA 3.30. Valores dos fatores de retenção no ponto de isoeluição para os benzimidazóis nas fases estacionárias de polissacarídeos.....	101
TABELA 3.31. Dados referentes às colunas semi-preparativas empregadas neste trabalho	103
TABELA 3.32. Dados referentes à separação semi-preparativa dos enantiômeros do lansoprazol	106
TABELA 3.33. Dados referentes à separação semi-preparativa dos enantiômeros do rabeprazol.....	110
TABELA 3.34. Dados da separação semi-preparativa dos enantiômeros do Ro 18-5364.....	112
TABELA 3.35. Dados da separação semi-preparativa dos enantiômeros do omeprazol utilizando o método convencional.....	115
TABELA 3.36. Dados da separação semi-preparativa dos enantiômeros do omeprazol utilizando o método de injeção em fase sólida	117
TABELA 3.37. Comparação entre os dois modos de injeção na separação dos enantiômeros do omeprazol em escala semi-preparativa	118

Lista de Figuras e Esquemas

Lista de Figuras e Esquemas

Introdução

- FIGURA 1.1. Modelo de Beckett proposto para o receptor da epinefrina..... 03
- FIGURA 1.2. Estrutura dos enantiômeros da fluoxetina..... 04
- FIGURA 1.3. Estrutura dos enantiômeros da warfarina 05
- FIGURA 1.4. Estrutura dos enantiômeros da penicilamina 05
- FIGURA 1.5. Evolução do licenciamento de fármacos enantiomericamente puros.. 07
- FIGURA 1.6. Princípio da resolução quiral. (a) Fase estacionária quiral e mistura racêmica (b) Interação baseada na regra de três pontos (c) Formação do complexo diastereoisomérico intermediário e determinação da ordem de eluição 12
- FIGURA 1.7. Representação da fase estacionária usada na coluna Welk-O 1..... 14
- FIGURA 1.8. Representação das possíveis interações do carbamato com os compostos quirais. Como exemplo, temos a fase estacionária quiral de polissacarídeo tris-[1-(S)-feniletilcarbamato] de amilose 17
- FIGURA 1.9. Representação da problemática envolvida na cromatografia quiral diante da presença de vários seletores quirais, modos de eluição e composição de fases móveis..... 22
- FIGURA 1.10. Representação do processo de extrapolação a 100% de água para a obtenção do coeficiente cromatográfico de partição. Variação do modificador orgânico $0,2 < \varphi < 0,8$ 26
- FIGURA 1.11. Representação estrutural de inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase 27

Resultados e Discussões

ESQUEMA 3.1. Síntese do tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose	36
ESQUEMA 3.2. Reação do isocianato com a água.....	37
FIGURA 3.1. Espectro no IV da fase tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose..	37
FIGURA 3.2. Representação da estrutura do hexâmero tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose	38
ESQUEMA 3.3. Cálculo do ponto de isoeluição valendo-se das equações obtidas através do estudo sistematizado do modo normal e reverso de eluição	100
FIGURAS 3.3. Atividade óptica dos enantiômeros do lansoprazol através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: etanol; Vazão: 0,8 mL.min ⁻¹ ; V.injeção: 20 µL, λ:289 nm e e polaridade negativa. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-lansoprazol, (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-lansoprazol	106
FIGURAS 3.4. Atividade óptica dos enantiômeros do rabeprazol através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: etanol; Vazão: 0,8 mL.min ⁻¹ ; V.injeção: 20 µL, λ:289 nm e polaridade negativa. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-rabeprazol, (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-rabeprazol.....	109
FIGURAS 3.5. Atividade óptica dos enantiômeros do Ro 18-5364 através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: etanol; Vazão: 0,8 mL.min ⁻¹ ; V.injeção: 20 µL, λ:289 nm e polaridade negativa .(a) 1º enantiômero: (+)-Ro 18-5364, (b) 2º enantiômero: (-)-Ro 18-5364.....	112

FIGURA 3.6. Pré-coluna utilizada na injeção de amostra em fase sólida 114

FIGURAS 3.7. Atividade óptica dos enantiômeros do omeprazol através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica tris (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-2), Fase móvel: etanol; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹, V.injeção: 20 µL, λ:302 nm e polaridade negativa. (a) 1º enantiômero: (S)-(-)-omeprazol, (b) 2º enantiômero: (R)-(+)-omeprazol 119

Lista de Gráficos

Lista de Gráficos

- GRÁFICOS 3.1. Relação entre $\log k_1$ dos benzimidazóis avaliados *versus* porcentagem de etanol nas três colunas quirais avaliadas sob condições de modo reverso de eluição: (a) CSP-1; (b) CSP-2 e (c) CSP-3 41
- GRÁFICOS 3.2. Perfis de retenção do rabeprazol na CSP-1. (a) $\log k$ *versus* concentração de etanol, (b) $\log k$ *versus* concentração de água..... 42
- GRÁFICOS 3.3. Relação entre $\log k_1$ e $\log k_2$ dos enantiômeros do omeprazol *versus* porcentagem de água nas três fases estacionárias de polissacarídeos: (a) CSP-1, (b) CSP-2 e (c) CSP-3..... 56
- GRÁFICOS 3.4. Gráficos de $\log k_1$ *versus* porcentagem de etanol nas colunas quirais sob condições de modo normal de eluição: (a) CSP-1; (B) CSP-2 e (c) CSP-3.1..... 68
- GRÁFICOS 3.5. Perfil de retenção para o Ro 18-5364 na CSP-2 sob condições de modo normal de eluição: (a) $\log k$ *versus* concentração de etanol, (b) $\log k$ *versus* concentração de hexano, onde $k_1= 1^\circ$ enantiômero e $k_2= 2^\circ$ enantiômero 69
- GRÁFICOS 3.6. Mudança no modo de retenção sob condições de modo normal de eluição: (a) CSP-1 para o lansoprazol, (b) CSP-2 para o Ro 18-5364 e (c) CSP-3.1 para o rabeprazol., onde $k_1= 1^\circ$ enantiômero e $k_2= 2^\circ$ enantiômero..... 76
- GRÁFICOS 3.7. Relação entre $\log k_1$ e $\log k_2$ dos enantiômeros do lansoprazol *versus* porcentagem de água nas três fases estacionárias de polissacarídeos: (a) CSP-1, (b) CSP-2 e (c) CSP-3.1 78
- GRÁFICOS 3.8. Estudo comparativo da retenção no modo normal e reverso de eluição nas colunas quirais de polissacarídeos: (a) CSP-1 para o pantoprazol, (b) CSP-2 para o rabeprazol e (c) CSP-3 e 3.1 para o Ro 18-5364, onde $k_{1_rev} = 1^\circ$ enantiômero no modo reverso, $k_{2_rev} = 2^\circ$ enantiômero no modo reverso, $k_{1_nor} = 1^\circ$ enantiômero no modo normal, $k_{2_nor} = 2^\circ$ enantiômero no modo normal 89

- GRÁFICOS 3.9. Perfis de retenção para o composto omeprazol nas fases estacionárias de polissacarídeos: (a) CSP-1, (b) CSP-2 e (c) CSP-3 e CSP-3.1, onde k_1 = 1º enantiômero, k_2 = 2º enantiômero..... 94
- GRÁFICOS 3.10. Perfil de enantioseparação, de dois dos cinco PPI's, nas fases estacionárias de polissacarídeos (a) pantoprazol na CSP-1 (b) Ro 18-5364 na CSP-2 e (c) Ro 18-5364 nas CSP-3 e CSP-3.1. para o, onde k_1 = 1º enantiômero, k_2 = 2º enantiômero..... 97
- GRÁFICOS 3.11. Ponto de isoeluição nas colunas quirais de polissacarídeos: (a) CSP-1 para o rabepazol, (b) CSP-2 para o Ro 18-5364 e (c) CSP-3 e CSP-3.1 para o omeprazol , onde k_{1_rev} = 1º enantiômero no modo reverso, k_{2_rev} = 2º enantiômero no modo reverso, k_{1_nor} = 1º enantiômero no modo normal, k_{2_nor} = 2º enantiômero no modo normal..... 99

Lista de Cromatogramas

Lista de Cromatogramas

CROMATOGRAMAS 3.1. Análises da mistura racêmica do omeprazol: (a) Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1); (b) Coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2); (c) Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3); em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Fase Móvel: etanol/água (45:55 v/v); Vazão: 0,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:302 nm . 63

CROMATOGRAMAS 3.2. Análises da mistura racêmica do rabeprazol: (a) Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1); (b) Coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2); (c) Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3) ; em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Fase Móvel: etanol/água (45:55 v/v); Vazão: 0,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm . 64

CROMATOGRAMAS 3.3. Análises da mistura racêmica do rabeprazol: Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1) em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Vazão: 0,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL ; λ:289 nm; Fase Móvel: etanol/água: (a) etanol, (b) 05% água, (c) 15% água, (d) 25% água, (e) 35% água, (f) 45% água, (g) 55% água e (h) 65% água 66

CROMATOGRAMAS 3.4. Análises da mistura racêmica do Ro 18-6354: (a) Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1); (b) Coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2); (c) Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3.1); em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Fase Móvel: hexano/etanol (80:20 v/v); Vazão: 1,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm..... 85

CROMATOGRAMAS 3.5. Análises da mistura racêmica do rabeprazol: (a) Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1); (b) Coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2); (c) Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3) ; em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Fase Móvel: hexano/etanol (50:50 v/v); Vazão: 1,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm 86

CROMATOGRAMAS 3.6. Análises da mistura racêmica do lansoprazol: Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3.1) em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Vazão: 1,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL ; λ:289 nm; Fase Móvel: hexano/etanol: (a) 10% etanol, (b) 30% etanol, (c) 50% etanol, (d) 70% etanol, (e) 90% etanol e (f) 100% etanol 87

CROMATOGRAMA 3.7. Separação do enantiômeros do lansoprazol em escala analítica. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP 3.1); Fase móvel: hexano/etanol (70:30 v/v); Vazão: 0,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm 104

CROMATOGRAMA 3.8. Reciclos realizados na separação dos enantiômeros do lansoprazol. Coluna semi-preparativa: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Hypersil (120 Å, 5 µm) (20% g/g) (25 x 0,8 cm)(CSP-4); Fase móvel: hexano/etanol (70:30 v/v); Vazão: 2,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:289 nm 105

CROMATOGRAMAS 3.9. Determinação da pureza enantiomérica do lansoprazol. Coluna semi-preparativa: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Hypersil (120 Å, 5 µm) (20% g/g) (25 x 0,8 cm)(CSP-4); Fase móvel: hexano/etanol (70:30 v/v); Vazão:2,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:289 nm. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-lansoprazol, (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-lansoprazol 105

CROMATOGRAMAS 3.10. Separação em escala semi-preparativa do enantiômeros do rabeprazol. Coluna semi-preparativa: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-5); Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v) + 0,02% HAc + 0,02% TEA; Vazão: 2,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:289 nm 108

CROMATOGRAMAS 3.11. Determinação da pureza enantiomérica do rabeprazol. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v) + 0,02% HAc + 0,02% TEA; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-rabeprazol, (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-rabeprazol 109

CROMATOGRAMA 3.12. Separação em escala semi-preparativa do enantiômeros do Ro 18-5364. Coluna semi-preparativa: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-5); Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v) + 0,02% HAc + 0,02% TEA; Vazão: 2,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:289 nm 111

CROMATOGRAMAS 3.13. Determinação da pureza enantiomérica do Ro 18-5364. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v) + 0,02% HAc + 0,02% TEA; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm. (a) 1º enantiômero: (+)-Ro 18-5364, (b) 2º enantiômero: (-)-Ro 18-5364 111

CROMATOGRAMA 3.14. Separação em escala semi-preparativa dos enantiômeros do omeprazol pelo método convencional. Coluna semi-preparativa: tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-6); Fase móvel: metanol; Vazão:3,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:302 nm 114

CROMATOGRAMAS 3.15. Determinação da pureza enantiomérica do omeprazol. Coluna analítica: tris (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-2); Fase móvel: metanol; Vazão: 1,0 mL.min⁻¹, V.injeção: 20 µL e λ:302 nm. (a) 1º enantiômero: (S)-(-)-omeprazol , (b) 2º enantiômero: (R)-(+)-omeprazol 115

CROMATOGRAMA 3.16. Separação em escala semi-preparativa dos enantiômeros do omeprazol por injeção em fase sólida. Coluna semi-preparativa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-6); Fase móvel: metanol ; Vazão:3,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:302 nm 116

CROMATOGRAMAS 3.17. Determinação da pureza enantiomérica do omeprazol. Coluna analítica tris (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-2), Fase móvel: metanol; Vazão: 1,0 mL.min⁻¹, V.injeção: 20 µL e λ:302 nm. (a) 1º enantiômero: (S)-(-)-omeprazol, (b) 2º enantiômero: (R)-(+)-omeprazol 117

Resumo



Resumo

“DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE CROMATOGRÁFICO DE PARTIÇÃO, $\log k_w$, DE INIBIDORES DA BOMBA H^+/K^+ -ATPase ”

A retenção relativa e a enantiosseletividade de uma série homóloga de cinco benzimidazóis, inibidores da bomba K^+/H^+ -ATPase, foram determinados em três fases quirais de tris-fenilcarbamatos de amilose, no modo reverso e normal de eluição, utilizando etanol como modificador orgânico. Foram verificados perfis de retenção similares para a série homóloga de benzimidazóis, nas três fases quirais avaliadas no modo reverso de eluição. A passagem do modo reverso para o modo polar-orgânico de eluição, mesmo sob condições de modo reverso, e ainda com porcentagem de água, na fase móvel, em torno de 15% é claramente observada e discutida. Os perfis de retenção da série de benzimidazóis nas três colunas quirais também foram similares quando a eluição foi no modo normal. Entretanto, a mudança do modo normal para o modo polar-orgânico é lenta, indicando que os mecanismos de retenção/separação, que operam nos dois modos de eluição, são mais próximos. A capacidade de discriminação quiral destas fases estacionárias foi diferenciada quando se utilizou etanol como modificador orgânico nos três modos de eluição. A fase tris (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2) mostrou alto poder de resolução ($0,90 \leq R_s \leq 3,46$ e $1,25 \leq \alpha \leq 2,24$) para os enantiômeros do omeprazol nos três modos de eluição. A fase tris [(S)-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3.1), por sua vez, apresentou capacidade de resolução para todos os enantiômeros da série homóloga no modo normal de eluição. Neste trabalho, foi estabelecida, pela primeira vez, uma relação entre o modo normal e reverso de eluição através da determinação do ponto de isoeluição. Numa mesma porcentagem de etanol, no modo normal, e de água, no modo reverso, as retenções são similares, quando se utilizam as fases de polissacarídeos como seletores quirais. Foram realizadas as separações enantioméricas dos enantiômeros da série em escala multi-miligramas, e a determinação da ordem de eluição dos mesmos foi avaliada nos três modos de eluição. A separação dos enantiômeros do omeprazol foi feita em escala multi-miligrama, como modelo, usando a técnica de injeção em fase sólida. Os resultados foram comparados com os obtidos da separação utilizando o modo clássico de injeção de amostras. Estes resultados são apresentados e discutidos.

Abstract

Abstract

“DETERMINATION OF CHROMATOGRAPHIC PARTITION COEFFICIENT, $\log k_w$, OF H^+/K^+ - ATPase PUMP INHIBITORS”

The relative retention and enantioselectivity of a homologue series constituted by five benzimidazoles, K^+/H^+ - ATPase pump inhibitors, was determined for three amylose tris-phenylcarbamate chiral stationary phases (CSP), under reverse and normal phase modes of elution, using ethanol as a organic modifier. It was verified similar retention profiles for the benzimidazoles homologue series on the three evaluated chiral phases, under reversed mode of elution. The switch between reversed to polar organic mode of elution, under same conditions of reversed mode, and even with a percentage of water, in the mobile phase, around 15% it is clearly observed and discussed. Also, the benzimidazoles series retention profiles on three chiral columns were similar when in the normal elution mode. However, a switch from normal to polar organic mode is slow, indicating that retention/separation mechanisms, that operate in both elution modes, are very comparable. The discrimination chiral capacity of these stationary phases was differentiated when ethanol was used as organic modifier on three elution modes. The amylose tris (3,5 dimethylphenylcarbamate) phase (CSP-2) showed high resolution (R_s) power ($0.90 \leq R_s \leq 3.46$ and $1.25 \leq \alpha \leq 2.24$) for omeprazole enantiomers on the three elution modes. The amylose tris [(S)-phenylethylcarbamate) phase (CSP-3), in turn, display resolution capacity for all series of homologous enantiomers in normal mode of elution. Herein, it was established for first time a relation between normal and reversed elution mode through the isoelution point determination. Under the same percentage of ethanol, in normal mode, and water in reversed mode, the retentions are similar, when polysaccharides phases are used as chiral selectors. The enantiomeric separations of enantiomers series were carried out in multimilligram scale, and the determination of its elution order was evaluated in the three elution modes. The omeprazole enantiomers separation was performed in multimilligram scale, as a model, using the solid-phase injection technique. The results were compared with those obtained from the separation by means of classical volume injection of sample. These results are presented and discussed.

Sumário



Sumário

1. <i>Introdução</i>	01
1.1. Fármacos e Quiralidade	02
1.1.1. Ambos enantiômeros com atividade terapêutica	03
1.1.2. Enantiômeros com atividades similares e potências distintas	04
1.1.3. Um dos enantiômeros é o responsável pelos efeitos colaterais	05
1.2. Resolução Enantiomérica: O Estado da Arte	09
1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	10
1.3. Fases Estacionárias Quirais	13
1.3.1. Fases Estacionárias Quirais Tipo I	13
1.3.2. Fases Estacionárias Quirais Tipo II: Polissacarídeos	14
1.3.3. Fases Estacionárias Quirais Tipo III	18
1.3.4. Fases Estacionárias Quirais Tipo IV.....	20
1.3.5. Fases Estacionárias Quirais Tipo V	20
1.4. Resolução Enantiomérica por Cromatografia Quiral: Tentativas e Erros.....	22
1.5. Fármacos no Organismo	24
1.6. Coeficiente de Partição.....	25
1.7. Inibidores da Bomba de Prótons (PPIs).....	27
2. <i>Objetivos</i>	31
3. <i>Resultados e Discussões</i>	33
3.1. Fases Estacionárias Quirais	34
3.1.1. Síntese, caracterização e avaliação da fase tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil	36
3.2. Análise sistemática no modo reverso de eluição	40
3.2.1. Efeitos da fase estacionária e da composição da fase móvel no reconhecimento quiral sob condições de modo reverso de eluição	55
3.3. Análise sistemática no modo normal de eluição	67
3.3.1. Efeitos da fase estacionária e da composição da fase móvel no reconhecimento quiral sob condições de modo normal de eluição	78
3.4. Estudo comparativo entre o modo reverso e normal de eluição	89

3.4.1. Comportamento de retenção	89
3.4.2. Discriminação quiral	96
3.5. Ponto de isoeluição	99
3.6. Separações do enantiômeros em escala multi-miligramas.....	102
3.6.1. Separação dos enantiômeros do lansoprazol.....	104
3.6.2. Separação dos enantiômeros do rabeprazol e do Ro 18-5364	107
3.6.2.1. Separação dos enantiômeros do rabeprazol	108
3.6.2.2. Separação dos enantiômeros do Ro 18-5364	110
3.6.3. Separação dos enantiômeros do omeprazol em escala multi-miligrama empregando-se injeção em fase sólida de amostra: uma comparação com o método convencional.....	113
3.6.3.1. Método convencional.....	114
3.6.3.2 Método de injeção em fase sólida	116
4. <i>Conclusões</i>	121
5. <i>Parte Experimental</i>	125
6. <i>Referências Bibliográficas</i>	137

*“Uma jornada de duzentos quilômetros começa
com um simples passo”*

Provérbio chinês

Introdução

1. Introdução

1.1. Fármacos e Quiralidade

A maioria dos fármacos produzidos ou em desenvolvimento são compostos quirais administrados clinicamente na forma de uma mistura racêmica, cuja composição tem como base as dificuldades diante dos processos de purificação e obtenção de uma síntese estereoespecífica ¹.

Os enantiômeros apresentam propriedades termodinâmicas similares ², interagem com a luz plano polarizada em igual extensão, mas em direção oposta e, por possuírem diferenças na estrutura tridimensional, apresentam respostas biológicas diferenciadas e extremamente relevantes .

Resposta metabólica, toxicidade e propriedades farmacocinéticas distintas são apresentadas, frequentemente, pelos enantiômeros administrados como fármacos, uma vez que são metabolizados por macromoléculas como enzimas e receptores, que agem estereosseletivamente no sistema biológico.

A estereosseletividade apresenta uma grande importância não somente nos processos farmacodinâmicos envolvendo interações de agentes bioativos com macromoléculas no organismo alvo, mas também nos processos farmacocinéticos, envolvendo a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco.

A interação de um fármaco quiral com uma macromolécula assimétrica, como as enzimas metabolizadoras do fígado e as proteínas do plasma, resulta na formação de complexos diastereoisoméricos transitórios, de modo que a disponibilidade de cada enantiômero é resultado da discriminação quiral ³. As principais forças moleculares de interações são as eletrostáticas, de dispersão, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes ⁴. A presença de grupos específicos na molécula e seus arranjos espaciais determinam o tipo e a intensidade dessas interações. Se o fármaco possuir todos os grupos necessários para a interação e estes se encontrarem em uma posição favorável de acoplamento, a interação será ótima resultando na resposta biológica.

O modelo de Beckett proposto para o receptor epinefrina mostra as possíveis interações entre o fármaco quiral e seu receptor (*Figura 1.1*). O (R)-(+)-epinefrina, um neurotransmissor adrenérgico, pode estabelecer, segundo este

modelo, três tipos de interações com o bioreceptor (interações π - π , dipolo-dipolo e ligação de hidrogênio), enquanto que para o enantiômero (S)-(-)-epinefrina, a interação por ligação de hidrogênio com o bioreceptor não ocorre. Como conseqüência, o isômero (R) apresenta maior afinidade com o receptor, mostrando-se mais ativo do que o isômero (S) ⁵.

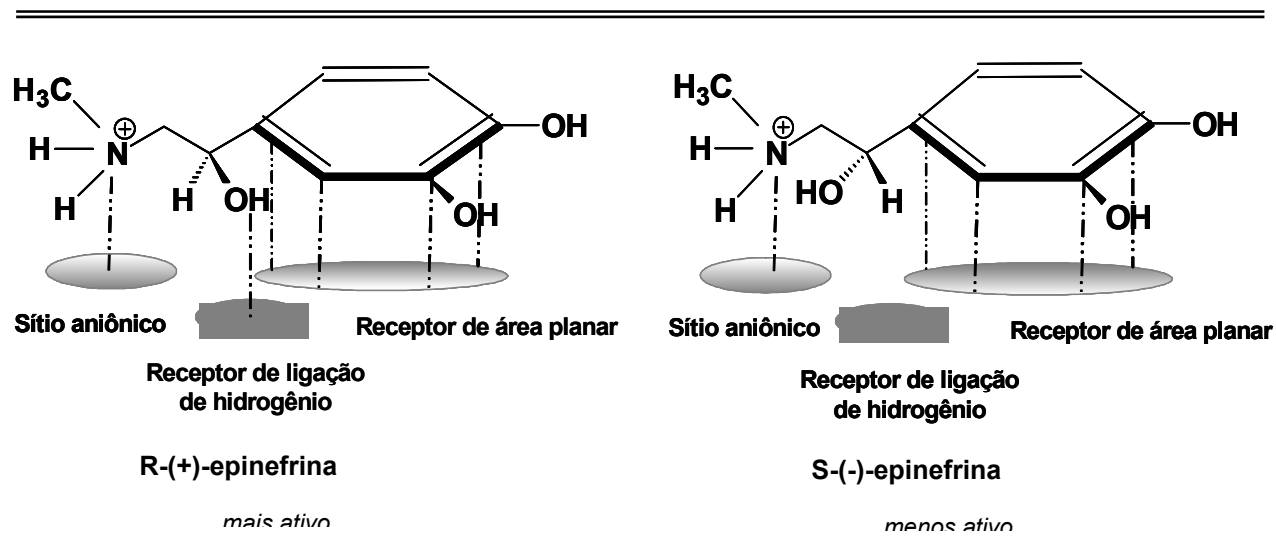


FIGURA 1.1. Modelo de Beckett proposto para o receptor da epinefrina ⁵.

A estreita relação existente entre atividade farmacológica e quiralidade, como resultado da ação de enzimas e receptores estereoespecíficos faz com que sejam considerados alguns dos possíveis comportamentos biológicos apresentados pelos enantiômeros administrados como fármacos.

1.1.1. Ambos enantiômeros com atividade terapêutica

A mistura racêmica (\pm)-fluoxetina, comercializada como Prozac[®], foi desenvolvida, lançada e patenteada pela Eli Lilly em 1977, como sendo o primeiro fármaco inibidor seletivo da reabsorção da serotonina (SRRI), amplamente empregado no tratamento da depressão. Ambos enantiômeros apresentam interações semelhantes com os receptores. Em 1996 a empresa Sepracor[®] patenteou o uso diferenciado dos enantiômeros da fluoxetina, sendo o (R)-(-)-fluoxetina utilizado como anti-depressivo e o (S)-(+)-fluoxetina empregado no tratamento da enxaqueca (Figura 1.2) ⁶. No entanto, tentativas da utilização da (R)-(-)-fluoxetina como enantiômero puro no tratamento da depressão, por causa de sua

cinética mais simples e menor efeito inibidor da enzima CYP2D6, não foram bem sucedidas em razão dos efeitos colaterais observados (ritmo cardíaco anormal) em estudos clínicos, que não são observados com a administração do racemato ⁷.

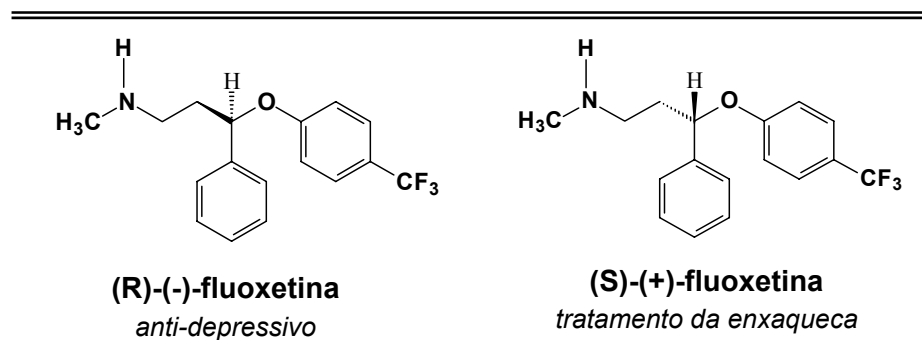


FIGURA 1.2. Estruturas dos enantiômeros da fluoxetina.

O enantiômero (2S,3R)-(+)-dextropropoxifeno comercializado como Darvon[®] possui atividade analgésica, enquanto que seu antípoda Norvad[®], (2R,3S)-(-)-levopropoxifeno é um antitussígeno ^{8,9}.

1.1.2. Enantiômeros com atividades similares e potências distintas

A nimodipina, um potente antagonista do cálcio, apresenta estereosseletividade de ação para seus enantiômeros em estudos realizados *in vivo*. O enantiômero (S)-(-)-nimodipina possui atividade biológica duas vezes mais intensa frente à forma racêmica e esta, por sua vez, mostra-se mais ativa do que o enantiômero (R)-(+)-nimodipina ¹⁰.

Diferenças nos perfis farmacocinético e farmacodinâmico também são relatadas para o fármaco quiral warfarina, um anti-coagulante empregado no tratamento da trombose (*Figura 1.3*). A potência do isômero (S)-(-)-warfarina *in vivo* é cerca de 3 a 5 vezes maior que o seu antípoda (R)-(+)-warfarina ¹¹.

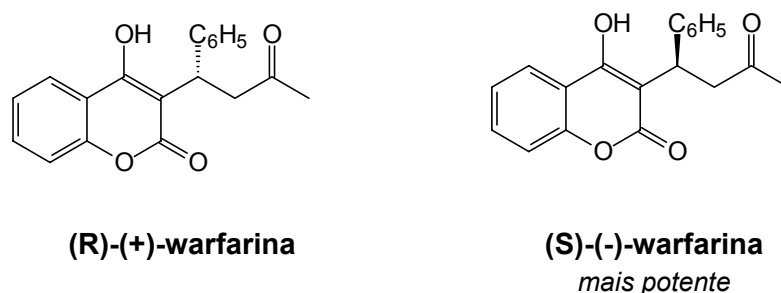


FIGURA 1.3. Estrutura dos enantiômeros da warfarina.

1.1.3. Um dos enantiômeros é o responsável pelos efeitos colaterais

Agente quelante, utilizado no tratamento de várias doenças como artrite-reumatóide e Doença de Wilson, a penicilamina também apresenta atividades distintas para os seus enantiômeros, ressaltando os efeitos colaterais (*Figura 1.4*)¹².

A (R)-penicilamina, responsável pela atividade terapêutica, atua no tratamento da Doença de Wilson a fim de retirar o cobre depositado em tecidos no organismo, mediante complexação estável com este metal, posteriormente eliminado pela urina. Por se tratar de um agente quelante, este enantiômero, também é empregado na desintoxicação de metais pesados como mercúrio, níquel, chumbo e arsênio. O enantiômero (S)-penicilamina, por sua vez, é o responsável pelos efeitos colaterais associados à inibição da vitamina B6 (piridoxina), essencial para o metabolismo das proteínas, hemoglobina e na atividade do sistema nervoso central. Sua deficiência pode causar dermatites, anemia e problemas neurológicos.

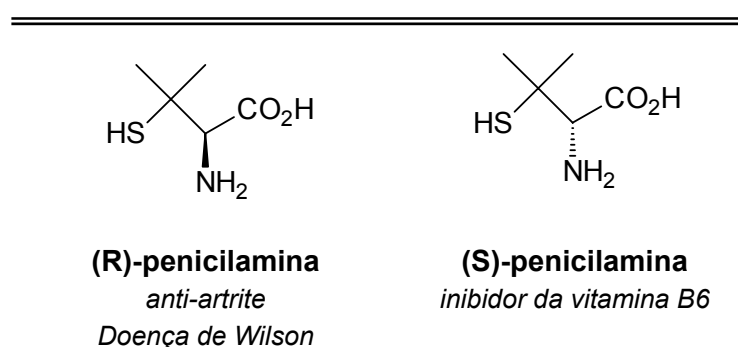


FIGURA 1.4. Estrutura dos enantiômeros da penicilamina.

O enantiômero (R)-ácido metilfenilpropilbarbitúrico apresenta efeito terapêutico anestésico enquanto que o (S)-enantiômero mostra efeito convulsante¹².

É válido ressaltar a presença de outras atividades que podem ser constatadas através da administração de uma mistura racêmica sendo:

- A.** Um dos estereoisômeros pode apresentar atividade farmacológica e o outro ser inativo;
- B.** Ambos enantiômeros podem apresentar potência e atividades similares;
- C.** Um estereoisômero pode antagonizar o efeito secundário do outro;
- D.** A atividade terapêutica pode ser atribuída ao par enantiomérico enquanto que o efeito indesejado pode ser provocado por apenas uma forma isomérica;

A partir da constatação de que diferenças enantioméricas podem dar origem a diferenças na atividade biológica, o reconhecimento e a possibilidade de desenvolvimento de estereoisômeros isolados passaram a ser uma abordagem de importância para a indústria farmacêutica^{1,7,11}.

De acordo com as normas estabelecidas pelos órgãos que regulamentam o registro de fármacos como, FDA (Food and Drug Administration – USA), CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products) e o International Conference on Harmonization (ICH), para a aprovação de novos fármacos quirais é exigido que a quiralidade do fármaco em questão seja conhecida e que o estereoisômero responsável pela atividade desejada seja identificado. Deve-se ter o conhecimento da configuração absoluta e a descrição detalhada da síntese, bem como a apresentação de um método analítico enantiosseletivo. Justificativas devem ser apresentadas quanto a forma estereoisomérica escolhida para a comercialização^{6,7,13,14}.

O uso de uma mistura racêmica para novos medicamentos só é permitida mediante realização de ensaios clínicos e toxicológicos de cada enantiômero puro seguida da comparação com os ensaios feitos com a mistura racêmica^{4,13}.

Com a obtenção dos fármacos na forma enantiomérica pura torna-se possível a sua prescrição em quantidades adequadas e muitas vezes menores, a redução dos efeitos colaterais e a presença de produtos mais ativos com perfis farmacológicos mais elevados^{3,12,15}.

O mercado de fármacos enantiomericamente puros está em contínuo crescimento frente aos racematos e os aquirais (*Figura 1.5*). Esta evolução está relacionada à qualidade dos medicamentos elaborados com matérias-primas enantiomericamente puras e, também, com a manutenção de seus mercados, pois na medida em que as patentes dos fármacos licenciados como racematos expiram a preparação destas substâncias em forma opticamente pura pode ser patenteada ^{4,13}.

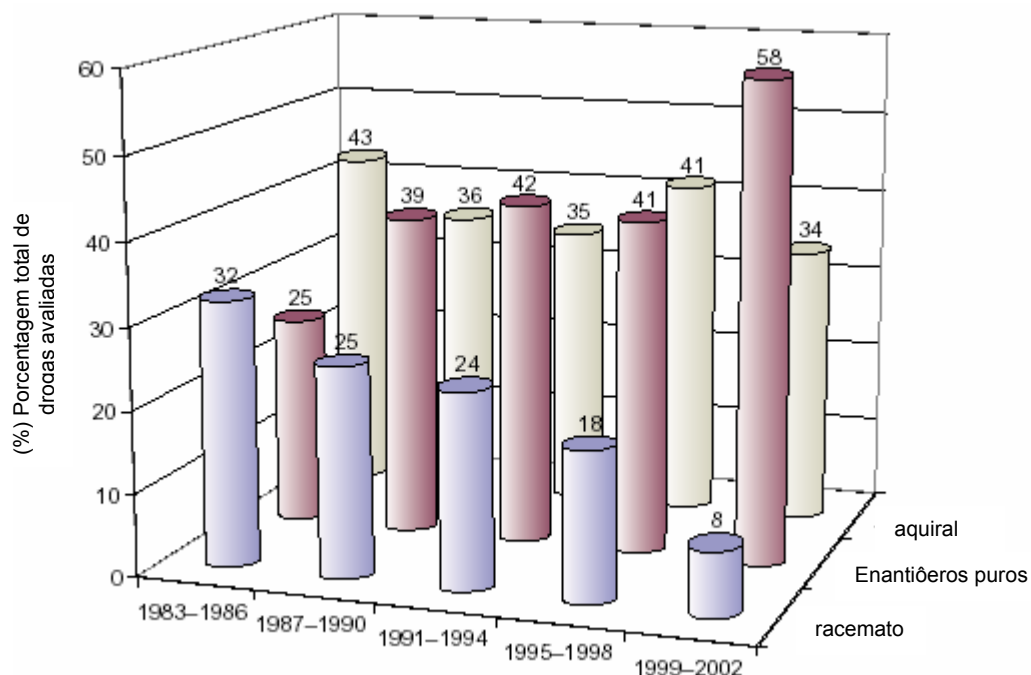


FIGURA 1.5. Evolução do licenciamento de fármacos enantiomericamente puros ¹⁴.

Dos dez medicamentos mais vendidos no mercado mundial no ano de 2004 com a marca “blockbuster” (vendas anuais maiores do que US\$ 1 bilhão), seis deles são comercializados na forma enantiomericamente pura, dois como racematos e apenas um é aquiral, evidenciando a grande importância da quiralidade entre os fármacos. Dentre estes, destacam-se o líder de mercado, Lipitor[®], utilizado no controle da taxa de lipídeos com vendas superiores a 10 bilhões de dólares, e o medicamento Advair[®], onde um dos enantiômeros puro é utilizado como anti-inflamatório e a mistura racêmica como broncodilatadora (*Tabela 1.1*).

TABELA 1.1. Relação dos dez medicamentos mais vendidos no mercado global no ano de 2004 ¹⁶.

Medicamentos	Mercado Global (US\$ bilhões)	Fármaco	Forma do Princípio Ativo	Uso Terapêutico
Lipitor [®]	10,3	Atorvastatina	<i>Enantiômero puro</i>	Controle da taxa de lipídeos
Zocor [®]	6,1	Simvastatina	<i>Enantiômero puro</i>	Controle da taxa de lipídeos
Zyprexa [®]	4,8	Olanzapina	Aquiral	Agente psicotrópico
Norvasc [®]	4,5	Anlodipina	Racemato	Bloqueador de canal de cálcio
Procrit [®]	4,0	Epoetina	Proteína	Estimulante das células sanguíneas
Prevacid [®]	4,0	Lansoprazol	Racemato	Inibidor da secreção gástrica
Nexium [®]	3,8	Esomeprazol	<i>Enantiômero puro</i>	Inibidor da secreção gástrica
Advair [®]	3,7	Salmeterol	Racemato	Broncodilatador
		Fluticasona	<i>Enantiômero puro</i>	Anti-inflamatório
Plavix [®]	3,7	Clopidrogel	<i>Enantiômero puro</i>	Inibidor da agregação plaquetária
Zoloft [®]	3,4	Sertralina	<i>Enantiômero puro</i>	Inibidor seletivo da absorção de serotonina

Estes dados refletem a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento dos procedimentos analíticos para a quantificação dos enantiômeros administrados como fármacos, seja em fluidos biológicos ou em preparações farmacêuticas, a fim de estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e realizar o controle de qualidade dos mesmos ^{7,13}.

1.2. Resolução Enantiomérica: O Estado da Arte

Devido às exigências impostas pelos órgãos reguladores dos produtos farmacêuticos, para que haja a aprovação do registro de um fármaco quiral seus enantiômeros devem ser testados separadamente ^{2,11,13}.

A resolução enantiomérica apresenta-se como um grande desafio para a Química Moderna, pois por apresentarem propriedades termodinâmicas similares, os enantiômeros, na maioria das vezes, não podem ser resolvidos pelos métodos convencionais. Dentro deste contexto, a obtenção dos enantiômeros puros pode ser realizada através da síntese assimétrica ou mediante técnicas analíticas de separação ^{1,13,17}.

Na área da síntese assimétrica a estereoespecificidade da síntese é influenciada por fatores de importância para a otimização dos processos tais como condições de reação, capacidade, equipamentos, matéria-prima, segurança e pureza dos reagentes ¹⁷. Uma das grandes dificuldades está relacionada ao controle dos centros estereogênicos da molécula alvo e a disponibilidade de auxiliares, como microorganismos e catalizadores, que controlam o curso da reação de modo a favorecer a formação de um único enantiômero.

Embora, um número significativo de procedimentos sintéticos enantiosseletivos possam ser encontrados e aplicados para a produção de um único enantiômero, relativamente poucos são selecionados para preparação em larga escala, particularmente, devido às inúmeras etapas sintéticas, alto custo e aos baixos rendimentos ¹³. Além de ser necessário recorrer a uma série de técnicas analíticas para assegurar a qualidade dos produtos, principalmente quando há indicativo de que um determinado isômero é responsável por efeitos indesejáveis.

Técnicas de enantioseparação são aplicadas para a obtenção dos enantiômeros puros, sendo através do uso de membranas, sensores, eletroforese capilar, extração líquido-líquido, biotransformação catalítica assimétrica, cristalização e cromatografia ¹³.

As principais técnicas de separação enantiomérica são: Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia por Fluido Super Crítico (FSC), Eletroforese Capilar (EC) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ¹³.

1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Nas últimas décadas métodos cromatográficos enantiosseletivos, particularmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, têm sido desenvolvidos com o objetivo de suprir as necessidades essenciais para a análise e separação de enantiômeros.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência apresenta-se como uma técnica útil e prática na determinação da pureza enantiomérica de preparações farmacêuticas, na obtenção de enantiômeros puros e para a validação de métodos de quantificação de enantiômeros em fluídos biológicos ⁷.

Os enantiômeros podem ser separados, por CLAE, pelo método indireto ou direto ¹⁸.

A maneira clássica para se resolver enantiômeros por CLAE envolve a derivação da mistura enantiomérica com um reagente quiral, resultando na formação dos respectivos diastereoisômeros que, por apresentarem propriedades termodinâmicas distintas, podem ser separados usando fases estacionárias aquirais ^{18,19}. Aminas, carbamatos e uréias são os produtos diastereoisoméricos mais comuns das reações de misturas racêmicas com reagentes quirais ¹⁹.

Esse método apresenta a vantagem de se trabalhar com fases convencionais, no entanto, para obter somente a formação de um par de diastereoisômeros é necessária uma alta pureza do reagente quiral e, em condições de cromatografia preparativa, faz-se necessário a conversão dos diastereoisômeros para se obter os enantiômeros na sua forma pura, tornando o processo indireto desvantajoso ^{13,18,19}.

O método direto baseia-se na separação direta dos enantiômeros em colunas quirais ou através da adição de aditivos quirais à fase móvel, não sendo necessária derivação prévia dos enantiômeros. O uso de aditivos quirais na fase móvel encarece o método, provoca com freqüência problemas de detecção, além de baixa resolução ¹⁹. Já os métodos que utilizam colunas com fases estacionárias quirais (CSP) são os que possuem maior aplicabilidade, resultando num grande impacto na indústria farmacêutica, tanto no campo da síntese assimétrica quanto da bioquímica ^{20,21}.

Segundo o modelo de três-pontos de interação ^{22,23,24}, para que haja o reconhecimento quiral são necessários no mínimo três pontos de interações entre o

enantiômero e o seletor quiral. (*Figura 1.6*). Estas três interações, no mínimo, devem ser simultâneas e devem ocorrer com três diferentes substituintes do centro estereogênico. Duas interações com o mesmo substituinte aumentam a energia de ligação entre o seletor quiral e o analito, mas não aumentam a eficiência da discriminação quiral. As interações analito-fase quiral podem ser atratoras ou repulsoras formadas por interações do tipo ligação de hidrogênio, π - π , dipolo-dipolo, sendo que pelo menos uma precisa ser dependente da estereoquímica.

O mecanismo básico de interação entre o enantiômero e a fase estacionária quiral é estabelecido pelo equilíbrio adsorção-dessorção²⁵. Na primeira fase do processo os analitos encontram-se solvatados e a fase quiral adsorvida pelas moléculas do solvente. Com o processo de eluição, a adsorção do analito ocorre mediante deslocamento das moléculas do solvente. Dependendo do número de interações existentes, entre o seletor quiral e o enantiômero, há formação de dois complexos diastereoisoméricos intermediários com energias de Gibbs distintas. Esta diferença de energia determina o tempo de existência de cada complexo diastereoisomérico e a ordem de eluição de cada enantiômero.

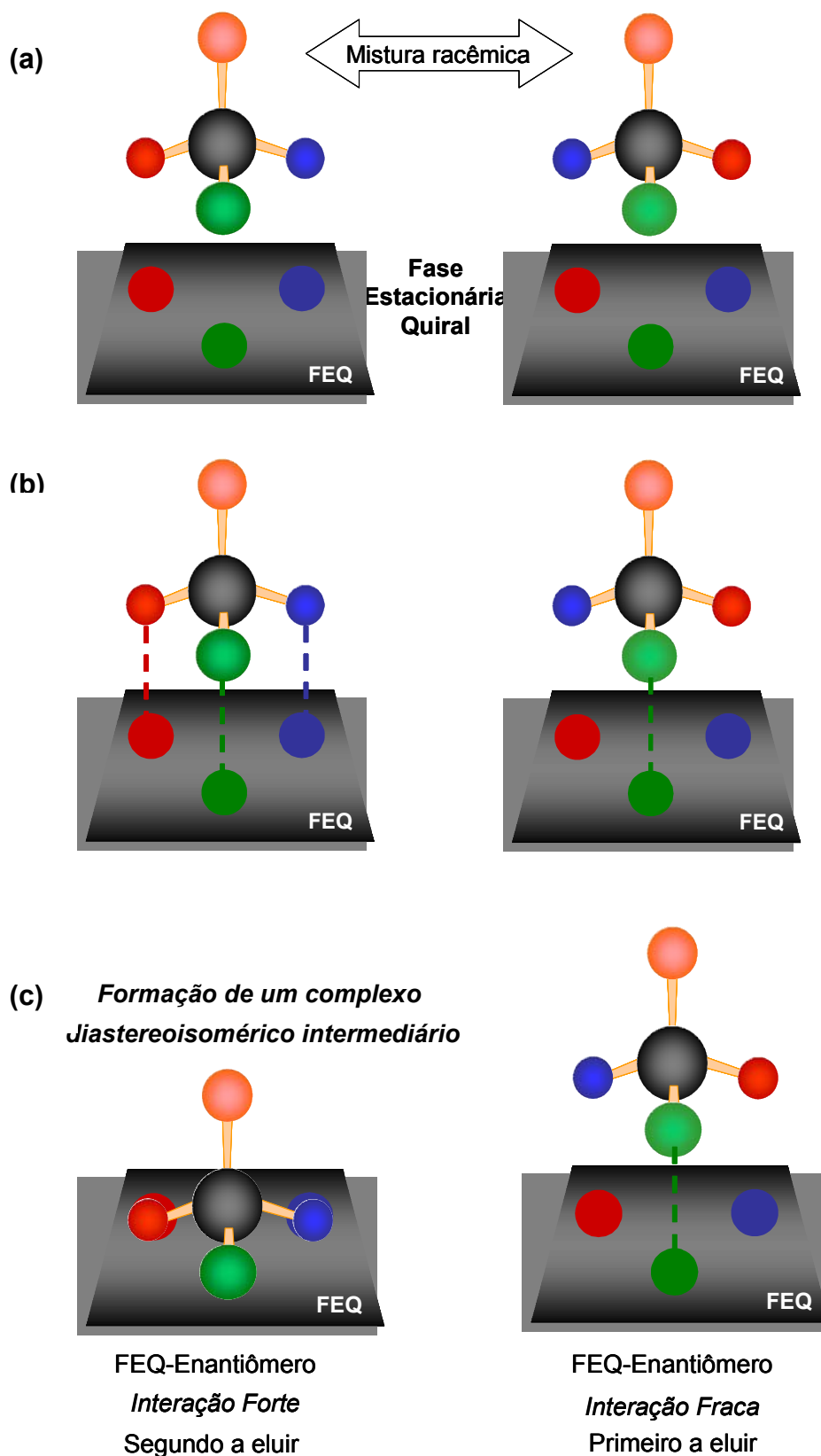


FIGURA 1.6. Princípio da resolução quiral. (a) Fase estacionária quiral e mistura racêmica (b) Interação baseada na regra de três pontos (c) Formação do complexo diastereoisomérico intermediário e determinação da ordem de eluição.

1.3. Fases Estacionárias Quirais

Eficiência, praticidade e versatilidade na resolução enantiomérica, tanto em escala analítica quanto em preparativa ²⁶, fizeram com que, nos últimos anos, o número de fases estacionárias quirais desenvolvidas aumentasse significativamente. Sua aplicabilidade no desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de enantiômeros em fluídos biológicos e em formulações farmacêuticas, como é o caso do fármaco quiral propranolol ²⁷, também impulsionou este crescimento.

As fases estacionárias quirais são preparadas a partir de pequenas moléculas ou polímeros quirais adsorvidos ou quimicamente ligados a um suporte, geralmente sílica ²⁸.

Devido a grande diversidade de seletores quirais disponíveis, como polissacarídeos, ciclodextrinas, antibióticos, proteínas, polímeros ^{3,18,26}, estes foram classificados por Wainer de acordo com o tipo de interação possível entre o seletor e o analito ²⁹.

1.3.1. Fases Estacionárias Quirais Tipo I

As primeiras fases comerciais, preparadas a partir de moléculas quirais são conhecidas como fases estacionárias do tipo "Pirkle" (derivadas de aminoácidos), cujo mecanismo de reconhecimento quiral baseia-se na formação de um complexo diastereoisomérico entre o seletor quiral e as moléculas do soluto por intermédio de interações atrativas como ligação de hidrogênio, interações π - π e dipolo-dipolo. De acordo com o tipo de interação π - π , as fases tipo Pirkle são denominadas como doadoras, aceptoras ou ainda doadoras-aceptoras de elétrons.

Uma das mais utilizadas entre as fases aceptoras é a 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina (DNBFG), muito eficiente na separação de ácidos, amins, álcoois e de enantiômeros aromáticos doadores de elétrons. Além de grupos aceptores de elétrons, o grupo DNBFG contém dois hidrogênios ácidos e dois grupos carbonila básicos que favorecem a formação de ligações de hidrogênio com amidas, amins e hidroxilas ¹⁹.

No grupo das fases doadoras de elétrons, encontram-se várias fases com o anel naftaleno, sendo este tipo de fase comumente empregada na resolução de aminoácidos, aminoálcoois, amins, dióis e tióis.

A principal representante do grupo doador-aceptor é a coluna Whelk-O 1 (Figura 1.7), preparada mediante ligação do grupo N-(3,5-dinitrobenzoil)-4-amino-1,2,3,4-tetraidrofenantreno à sílica, utilizada na resolução de inúmeras classes de compostos e, como exemplo, na análise de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais^{26,30,31}.

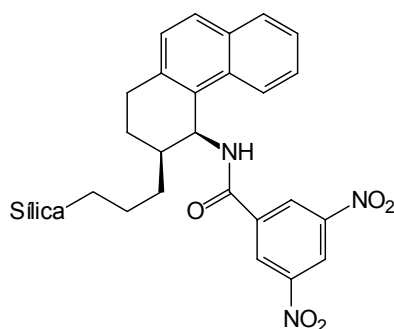


FIGURA 1.7. Representação da fase estacionária usada na coluna Whelk-O 1.

Originalmente desenvolvida para a resolução dos enantiômeros do naproxifeno, essa fase possui sistemas aromáticos π -ácidos (dinitrobenzoil) e π -básicos (naftil), podendo ser utilizada no modo normal e reverso de eluição³¹.

No modo normal são utilizadas fases móveis constituídas de hexano e seus modificadores orgânicos como etanol, isopropanol, t-butanol, e no modo reverso a fase móvel mais comumente usada é uma mistura de acetonitrila/água, sendo a acetonitrila, quando necessário, substituída por metanol ou tetrahidrofurano¹⁸.

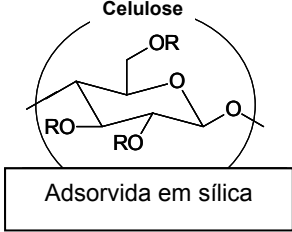
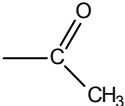
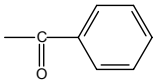
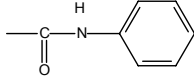
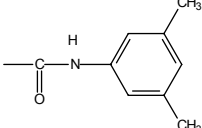
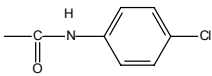
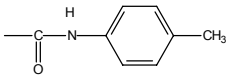
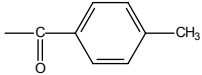
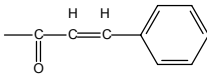
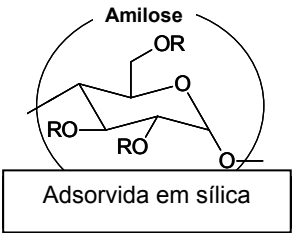
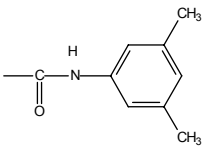
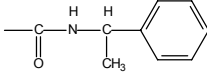
1.3.2. Fases Estacionárias Quirais Tipo II: Polissacarídeos

Nas fases estacionárias quirais Tipo II, o principal mecanismo para a formação do complexo diastereoisomérico é através de interações por ligação de hidrogênio, interação π - π , dipolo-dipolo e formação de complexos de inclusão, sendo este grupo formado pelas fases estacionárias baseadas em derivados de polissacarídeos (Tabela 1.2)²⁹.

Os polissacarídeos de maior aplicabilidade como fases estacionárias são a amilose e a celulose. A celulose é um polímero linear formado de anéis de D-glicose conectados por ligações β -1,4, enquanto que a amilose é formada pelas

mesmas unidades de açúcar, conectadas por ligações α -1,4, conferindo uma estrutura helicoidal.

TABELA 1.2. Algumas colunas quirais baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente.

Polímero Adsorvente	Substituinte (R)	Nome Comercial	Colunas recomendadas para alguns tipos de compostos					
			A	B	C	D	E	F
		Chiralcel OA			X		X	
		Chiralcel OB			X		X	
		Chiralcel OC						
		Chiralcel OD	X	X		X		X
		Chiralcel OF						X
		Chiralcel OG						X
		Chiralcel OJ						X
		Chiralcel OK						
		Chiralcel AD	X	X	X		X	
		Chiralcel AS	X	X	X			X

A= alifáticos; B= cicloalifáticos; C= cicloalifáticos, cicloalcanonas ou lactonas; D=aromáticos sem outros grupos funcionais; E= aromáticos e um éster; F=aromáticos com outros grupos funcionais¹⁹.

Nas últimas décadas, milhares de compostos têm sido enantiorresolvidos em colunas de polissacarídeos nos diversos modos de eluição, devido a sua estabilidade, eficiência e alta capacidade de discriminação quiral. Alterações nas enantioseparações e enantiorresoluções são conseguidas mediante variações na composição e no tipo das fases móveis utilizadas^{32,33,34}.

As primeiras fases estacionárias quirais obtidas a partir de polissacarídeos foram desenvolvidas por HESSE e HAGEL em 1973³⁵. Uma das fases desenvolvidas foi a triacetato de celulose, obtida através da acetilação da celulose microcristalina, que apresentava discriminação quiral para vários compostos aromáticos e apolares, provavelmente, por preservar a estrutura cristalina da celulose e permitir a inclusão nas cavidades quirais. No entanto, quando o triacetato de celulose era dissolvido em um solvente e re-precipitado verificava-se ausência de discriminação quiral.

OKAMOTO et al³⁶ realizaram a solubilização do triacetato de celulose e o adsorveram em sílica gel macroporosa (1000-4000 Å), de modo que a nova fase estacionária adsorvida mostrou-se mais eficiente e mais resistente quando comparada à fase não adsorvida.

A partir de 1984, OKAMOTO et al³⁶ descreveram a preparação de fases estacionárias quirais com tris-benzoatos, tris-fenilcarbamatos e tris-arilcarbamatos de polissacarídeos adsorvidos em sílica gel macroporosa. Os derivados de polissacarídeos são preparados por derivação dos grupos hidroxilas livres dos polissacarídeos, resultando em derivados como ésteres orgânicos, nitratos, carbamatos e éteres, sendo os carbamatos e ésteres os derivados que apresentam maior poder de discriminação quiral e são disponíveis comercialmente^{37,38}.

A capacidade de separação quiral destas fases, derivadas de polissacarídeos, está relacionada com as diferenças estruturais dos polímeros de celulose e amilose que afetam a geometria e o tamanho das cavidades quirais e, principalmente, com os seus diferentes grupos substituintes, que são responsáveis por mudanças na habilidade da fase quiral em formar ligações de hidrogênio e outras interações necessárias para a separação³⁹.

Triacetato de celulose microcristalina é o éster mais difundido e utilizado na separação de uma ampla variedade de enantiômeros pertencentes a diferentes classes de compostos orgânicos como hidrocarbonetos, oxiranos,

barbitúricos, compostos sulfurados, flavonas e lactonas, além ser aplicado em cromatografia preparativa ¹⁹. A resolução com derivados de ésteres de benzoato envolve interações dipolo-dipolo com os grupos carbonila e ligações de hidrogênio com compostos que possuem grupos hidroxila ou amino ²⁹.

Apesar de a celulose formar a base da maioria das fases estacionárias de polissacarídeos, colunas derivadas de amilose, em especial as fenilcarbamatos, apresentam, com freqüência, maior capacidade enantiosseletiva.

A unidade estrutural do carbamato tem sido considerada o sítio de adsorção mais importante dos derivados de fenilcarbamatos ⁴⁰. Racematos com grupos polares capazes de formar ligações de hidrogênio podem interagir com a porção carbonila e amina dos grupos carbamatos da fase estacionária. Em racematos apolares, a separação é promovida principalmente por interações π - π entre o grupo fenilcarbamato da fase quiral e um grupo aromático capaz de contribuir para o reconhecimento quiral (*Figura 1.8*)¹⁹.

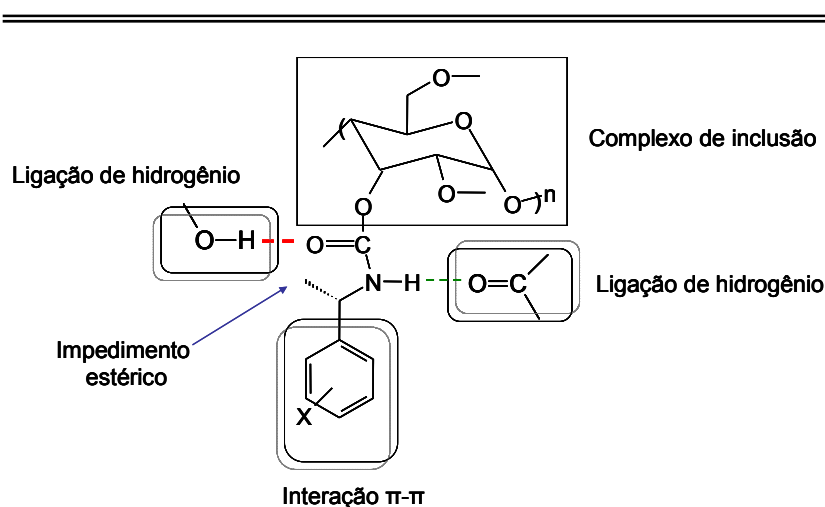


FIGURA 1.8. Representação das possíveis interações do carbamato com os compostos quirais. Como exemplo, temos a fase estacionária quiral de polissacarídeo tris-[1-(S)-fenil etilcarbamato] de amilose.

Apesar de terem sido originalmente desenvolvidas para operar no modo normal, as fases estacionárias derivadas de amilose e celulose também possuem alto poder de separação no modo reverso de eluição. Entretanto, algumas separações não são eficazes em meio aquoso estando presente, como uma alternativa, o modo polar-orgânico, onde se faz o uso de solventes como acetonitrila, metanol, etanol, isopropanol e suas misturas ^{41,42}.

Devido a parcial solubilidade dos carbamatos em solventes como tetrahidrofurano, dioxano, tolueno, acetato de etila e solventes clorados³⁹, o uso de solventes orgânicos apróticos fica limitado, em alguns casos, a pequenas quantidades (tetrahidrofurano 30%, diclorometano 10%, acetato de etila 10%) a fim de reduzir a competição entre a fase móvel e o analito pelos sítios de ligação de hidrogênio da fase estacionária, aumentando dessa forma a seletividade quiral⁴³.

CASS et al⁴⁴ realizaram um estudo onde uma mesma coluna quiral, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, foi avaliada em eluição multimodal, ou seja, nos três modos de eluição (normal, reverso e polar orgânico), constatando que uma mesma coluna de polissacarídeo pode ser usada nos diferentes modos de eluição sem que a mesma perca a sua performance de separação.

Devido a sua grande versatilidade e aplicabilidade as fases estacionárias de tris-carbamatos de polissacarídeos continuam sendo estudadas por inúmeros grupos de pesquisas desde a sua introdução pelo grupo de OKAMOTO, uma vez que essas fases apresentam alto poder de discriminação quiral, reprodutibilidade e resistência tanto no modo analítico quanto preparativo^{26, 34,42,45-48}.

Estas fases estão sendo empregadas no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação da pureza enantiomérica em formulações farmacêuticas, como no caso do antidepressivo citalopram⁴⁹. Na quantificação de fármacos quirais em fluídos biológicos, como exemplo, para a fluoxetina e norfluoxetina⁵⁰, bem como no desenvolvimento de métodos de quantificação enantiomérica por cromatografia multidimensional, neste exemplo, para o omeprazol⁵¹.

1.3.3. Fases Estacionárias Quirais Tipo III

As ciclodextrinas e os polímeros sintéticos constituem esta classe de fase estacionária quiral, cujo mecanismo de separação está baseado na inclusão do soluto na cavidade quiral.

O grupo dos polímeros sintéticos é representado pela família do polivinil de estrutura helicoidal, sendo a separação realizada pelo um processo de inclusão nas cavidades da hélice e a uma variedade de mecanismos de interação, entre eles, ligações de hidrogênio⁵².

As ciclodextrinas são moléculas macrocíclicas que podem ser obtidas contendo de seis a doze unidades de glicose, mas somente as que contêm seis (α), sete (β) ou oito (γ) unidades são comercialmente disponíveis⁵³. As ligações α (1,4)-glicosídicas entre as subunidades de açúcar conferem uma estrutura cilíndrica à molécula com uma cavidade hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica. As β e γ -ciclodextrinas possuem estruturas mais rígidas e estáveis em diferentes solventes podendo acomodar compostos com vários anéis aromáticos. Já a α -ciclodextrina possui a estrutura menos rígida, que possibilita o aumento de seu diâmetro interno na presença de alguns solventes, mas normalmente não acomoda compostos com mais de um anel.

Inicialmente, a ciclodextrina foi utilizada como fase estacionária sem nenhuma derivação, no entanto, derivados como ésteres, éteres e carbamatos ligados em sílica estão sendo empregados na resolução de uma variedade de compostos e na determinação de excesso enantiomérico de produtos obtidos em síntese assimétrica²⁶.

Estas fases estacionárias podem ser utilizadas nos três modos de eluição, modo normal, modo reverso e polar-orgânico, visto que, o termo modo polar-orgânico foi introduzido por ARMSTRONG ao empregar misturas de solventes polares não aquosos na resolução enantiomérica utilizando estas fases de ciclodextrinas⁵⁴.

Uma grande variedade de compostos solúveis e insolúveis em água podem se encaixar na cavidade quiral hidrofóbica, formando complexos com diferentes estabilidades, levando à separação enantiomérica. Estas colunas são geralmente utilizadas no modo reverso de eluição, na qual a utilização de tampão fosfato ou acetato melhora a eficiência das fases e diminui o tempo de retenção dos solutos aniônicos e catiônicos. Assim, o ajuste do pH da fase móvel torna-se um importante parâmetro utilizado para controlar a retenção e seletividade¹⁹.

O tamanho e a forma molecular do soluto, além de sua capacidade de formar ligações de hidrogênio, são elementos determinantes no processo de separação. A presença de um anel aromático ou cicloalquil e de substituintes capazes de interagir com grupos hidroxila do centro quiral e próximo deste, aumentam o poder de resolução das ciclodextrinas.

1.3.4. Fases Estacionárias Quirais Tipo IV

Também conhecidas como fases estacionárias por troca de ligante, estas são constituídas por materiais contendo um aminoácido específico, mais comumente prolina, hidroxiprolina ou valina, ligados à sílica ou a um suporte polimérico. A presença de um íon metálico, geralmente cobre, na fase móvel favorece a formação de um complexo diastereoisomérico reversível entre o aminoácido da fase estacionária e o analito. A resolução enantiomérica é influenciada pelo pH, temperatura e pela composição e concentração do íon metálico na fase móvel ⁵⁵.

Essas colunas são conhecidas desde 1970, mas possuem aplicação limitada, uma vez que separaram somente aminoácidos e compostos capazes de coordenarem com íons metálicos ^{55,56}.

1.3.5. Fases Estacionárias Quirais Tipo V

Proteínas, biopolímeros de alta massa molecular com estruturas tridimensionais complexas constituídas de L-enantiômeros de diversos aminoácidos, são as constituintes das fases estacionárias Tipo V.

As proteínas soro albumina bovina e humana, as glicoproteínas, α 1-glicoprotéina ácida, ovomucóide e as enzimas celobiohidrolase I e pepsina são as proteínas mais aplicadas na preparação de fases estacionárias quirais ^{1,57}. A presença de alta concentração de carboidratos na estrutura de algumas proteínas pode ser responsável pela alta enantiosseletividade exibida por esses materiais ^{1,3}.

A formação do complexo diastereoisomérico intermediário ocorre pela combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, de sítios de ligação muito específicos, com ligações de hidrogênio e de transferência de carga. As interações hidrofóbicas são afetadas principalmente pela porcentagem do solvente orgânico na fase móvel, enquanto que as forças eletrostáticas estão relacionadas com o pH da fase móvel que controla as cargas da proteína e do analito ¹⁹. Os valores de pH são ajustados de acordo com o ponto isoelétrico da proteína e o pK_a do analito, a fim de que estes apresentem cargas opostas aumentando a seletividade quiral ¹.

Albumina sérica bovina (BSA), proteína globular de caráter ácido e com diversos sítios de ligação hidrofóbica, foi a primeira proteína empregada na

fabricação de colunas quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. As fases estacionárias de BSA permitem a enantioseparação de uma variedade de misturas racêmicas incluindo aminoácidos aromáticos, sulfóxidos aromáticos, ácidos arilpropiônicos, benzodiazepinas, cumarinas, entre outras. A presença de grupos aromáticos e/ou polares nos enantiômeros, aparentemente, pode ser um pré-requisito para a discriminação ^{1,57}.

A proteína albumina sérica humana (HSA) é estruturalmente bastante semelhante à BSA, não apresentando também, carboidratos em sua estrutura. A sua fixação covalente a grupos dióis da sílica modificada confere uma seletividade diferenciada, para muitos analitos, frente à proteína sérica bovina. Estas fases estacionárias são conhecidas pela habilidade de resolverem fármacos quirais como a warfarina, benzodiazepinas e derivados do ácido 2-arilpropiônico ^{1,57}.

Ovomucóide (OVM) é uma glicoproteína obtida da clara de ovo de galinha. Solutos aromáticos hidrofóbicos apresentam fortes interações com a fase estacionária, a qual se mostra eficiente na resolução de enantiômeros ácidos, básicos e neutros em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos ⁵⁷.

Celobiodrolase (CBH), uma enzima produzida pelo fungo *Trichoderma reesei*, é covalentemente ligada a grupos dióis de sílica modificada apresentando aplicabilidade na resolução de compostos ácidos e neutros, destacando-se na separação agentes β -bloqueadores, como o propanolol ^{1,3,57}.

Geralmente, as fases de proteínas são usadas no modo reverso de eluição utilizando tampão fosfato com a adição de modificador orgânico, tornando-as muito úteis em cromatografia analítica, mas não em preparativa, devido ao seu pequeno limite de carga e ao alto custo da coluna ¹.

As fases quirais derivadas de antibiótico macrocíclicos, desenvolvidas por ARMSTRONG et al ⁵⁸, apresentam muitas propriedades favoráveis a enantioseletividade, como as apresentadas pelas proteínas e outros seletores quirais poliméricos, sem seus inerentes problemas de instabilidade e baixa capacidade de carga. Compreendem uma variedade de tipos estruturais, incluindo glicopeptídeos macrocíclicos, peptídeos heterocíclicos conjugados, entre outros.

Em geral estes compostos apresentam massa molar entre 600 e 2200 g/mol e são do tipo ácidos, básicos ou neutros. Os antibióticos mais empregados como seletores quirais são: vancomicina, teicoplanina, tiostreptona, rifamicina B, avoparcina, canamicina, estreptomina, fradiomicina e ristocetina A ⁵⁹.

O mecanismo de reconhecimento quiral das fases de antibióticos macrocíclicos envolve interações do tipo π - π , ligação de hidrogênio, complexação por inclusão, dipolo-dipolo, interações estéricas e ligações aniônicas-catiônicas. Uma vez que estas fases possuem peptídeos, carboidratos e outros grupos ionizáveis em sua estrutura, não é surpresa que a seletividade seja diferente em cada um dos três modos de eluição, possibilitando a separação de uma grande variedade de compostos^{58,59}.

1.4. Resolução Enantiomérica por Cromatografia Quiral: Tentativas e Erros

Dentro deste universo formado por inúmeras fases estacionárias quirais disponíveis e em desenvolvimento, modos de eluição, composições de fases móveis para avaliação e otimização e, principalmente, pela presença de uma ampla variedade de compostos a serem resolvidos e quantificados, nas mais diversas matrizes e condições, a resolução enantiomérica apresenta-se como um grande mistério a desvendar (*Figura 1.9*).

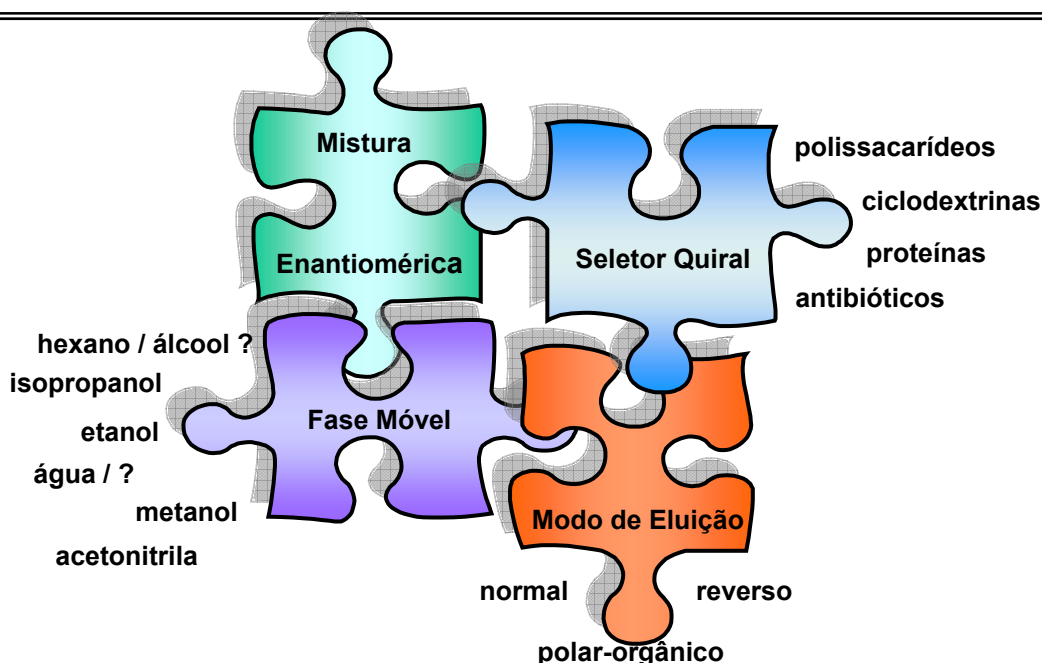


FIGURA 1.9. Representação da problemática envolvida na cromatografia quiral diante da presença de vários seletores quirais, modos de eluição e composição de fases móveis.

Embora os métodos de planejamentos desenvolvidos sejam utilizados com o intuito de minimizar o número de experimentos e com a vantagem de incluir sistematização, as ótimas condições de eluição não são determinadas trivialmente. Verifica-se uma contínua mudança de fase estacionária, modos de eluição e composição do eluente, até se obter a separação desejada. Tal fato faz com que o tempo gasto seja elevado e que o desenvolvimento de métodos experimentais para a separação enantiomérica seja realizado, em geral, através de tentativas e erros^{13,60}.

O desenvolvimento de um modelo preditivo que possibilitaria tornar o processo de resolução mais direto, no âmbito das condições de separação, está ancorado à descrição qualitativa e quantitativa do experimento. Segundo TAKUR⁶¹, um modelo preditivo deve ser consistente com o comportamento observado experimentalmente, a fim de ser usado para predições futuras do comportamento do sistema. Desta forma, a associação de análises sistematizadas experimentais e teóricas contribui de forma positiva para a formação de um modelo preditivo.

Os processos de reconhecimento quirais⁶²⁻⁶⁴ são múltiplos tornando-se necessário recorrer ao conhecimento da interação flexível entre o seletor quiral e o analito quiral, mediados pelo efeito da fase móvel^{65,66}. Não obstante, duas condições precisam ser estabelecidas para que os enantiômeros sejam resolvidos: i. cada enantiômero deve formar um complexo diastereoisomérico analito-FEQ (fase estacionária quiral) temporário e ii. cada diastereoisômero deve ser diferente do outro em termos de estabilidade termodinâmica. Os modelos idealizados não contemplam uma formulação precisa da formação do complexo diastereoisomérico, ressaltando a complexidade do processo de reconhecimento quiral.

Considerando que os princípios físico-químicos que conduzem a separação cromatográfica quiral (ligação de hidrogênio, interação π - π , dipolo-dipolo, estereoquímica) condizem com os que regem o processo de interação do fármaco no organismo, podemos assim, inferir o desenvolvimento de um modelo preditivo de resolução para a cromatografia quiral.

1.5. Fármacos no Organismo

A administração de um fármaco compreende as fases farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica. A fase farmacêutica refere-se à forma de administração do fármaco (comprimidos revestidos, xarope, injetável), a fase farmacocinética aos processos de absorção, transporte, metabolismo, excreção, ou seja, todo caminho percorrido pelo fármaco no organismo, e a fase farmacodinâmica à resposta biológica ¹¹.

O processo de absorção do fármaco corresponde a sua passagem, através das membranas biológicas, do local que foi administrado para a circulação sistêmica. Através de caminhos aleatórios hidrofílicos e hidrofóbicos a substância bioativa é transportada até o sítio de ação, onde se obtêm a atividade biológica ^{67,68}. Este processo pode ser descrito através da equação:

$$\text{Resposta Biológica (RB)} = f(\text{transporte} + \text{interação ligante-receptor})$$

O transporte e distribuição do fármaco em sistemas biológicos estão vinculados aos processos de dissociação/ionização e a lipofilia dos ligantes. As propriedades moleculares lipofílicas indicam possíveis interações hidrofóbicas que podem ser descritas através do coeficiente de partição, $\log P$, que é a medida da propensão de um composto em transportar-se de um sistema aquoso para um não-aquoso ⁶⁹.

A obtenção de valores de $\log P$ traduz-se como método importante para a inferência de processos biológicos de permeação, uma vez que a lipofilia representa um parâmetro fundamental para o transporte através das membranas.

O processo de permeação é influenciado pelas propriedades físico-químicas, pelo tamanho e volume da molécula, pela sua solubilidade, capacidade de ionização, estereoquímica e pela via pela qual o fármaco foi administrado ⁶⁹. Tais fatores são também muito relevantes no âmbito da separação cromatográfica quiral, onde se tem a coluna quiral como sistema de interesse.

1.6. Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição de uma determinada espécie química é definido como sendo a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa podendo ser expressa pela equação^{67,69}:

$$P = \frac{[\text{fase orgânica}]}{[\text{fase aquosa}]}$$

Considerando que o coeficiente de partição é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados em estudos de QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships)⁵⁸ e que sua determinação é frequentemente necessária, especialistas optaram por definir o sistema de solventes 1-octanol/tampão fosfato pH 7,4 como sendo o preferencial para a sua determinação⁶⁷.

As principais vantagens do uso do 1-octanol como fase orgânica são: possui ampla capacidade de dissolução frente a diferentes compostos químicos, seu grupo hidroxila pode formar ligações de hidrogênio e, embora imiscível em água tem capacidade para dissolver até 2,3 M de água sob condições de equilíbrio. Não é volátil em temperatura ambiente, é adequado para a medição direta na região do ultra-violeta e está disponível comercialmente⁶⁷.

Um método muito empregado para a determinação de coeficientes de partição é o método de “shake-flask” que, em princípio, fundamenta-se na dissolução de um composto químico em sistema bifásico formado por um solvente polar e um solvente apolar.

A cromatografia a líquido em fase reversa está sendo empregada como uma ferramenta na determinação do coeficiente de partição, a fim de viabilizar a sua medida e possibilitar certos graus de impurezas no soluto. Neste caso, a fase estacionária, geralmente colunas do tipo C₈, C₁₈ e de membranas imobilizadas, atua como fase orgânica e a fase móvel como o meio aquoso^{70,71}.

A partição cromatográfica pode ser definida como a razão do analito entre a fase móvel e a fase estacionária e o seu coeficiente descrito como log K_w⁶⁹.

A retenção cromatográfica em 100% de água (K_w) é considerada como o melhor fator de retenção quando usado para estimar a lipofilia no modo reverso de

eluição, uma vez que não apresenta os efeitos do agente modificador e estabelece a melhor relação de partição polar/não-polar que é modelada no modo reverso de eluição.

Os elevados tempos de retenção para a maioria dos analitos, quando se utiliza 100% de água como fase móvel, inviabilizam as medidas. Por esta razão faz-se o uso de co-solventes, como metanol. O uso de metanol como agente modificador é devido a capacidade de suas moléculas mimetizarem as moléculas de água^{72,73}.

A medida do fator de retenção resulta no coeficiente cromatográfico de partição $\log k_w$ que é obtido pela extrapolação dos valores isocráticos de $\log k$ para 100% de água (Figura 1.10). Os valores de $\log k_w$ são obtidos através do modelo linear de força do solvente (LSS) de Snyder, $\log k = -S\phi + \log k_w$, onde S é o coeficiente angular que é dependente do analito e do sistema^{74,75}. O fator de retenção k é calculado através da equação $k = t_r - t_0/t_0$, onde t_r e t_0 são os tempos de retenção do analito e do solvente.

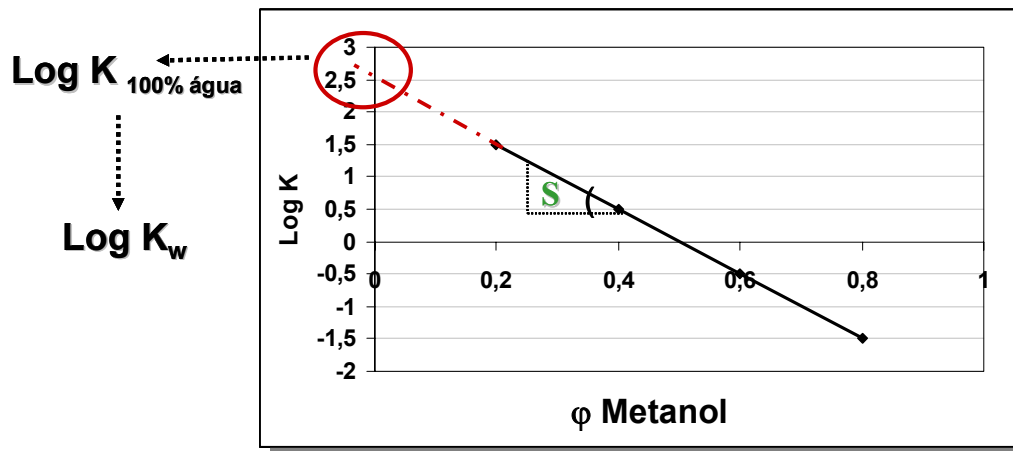


FIGURA 1.10. Representação do processo de extrapolação a 100% de água para a obtenção do coeficiente cromatográfico de partição. Variação do modificador orgânico $0,2 < \phi < 0,8$ ⁷⁶.

A concentração do agente modificador em composições extremas resulta na falta de linearidade da equação de Snyder⁷⁶, portanto a composição da fase móvel é limitada a 20-80% do agente modificador (0,2-0,8φ).

1.7. Inibidores da Bomba de Prótons (PPIs)

Os fármacos mais efetivos na supressão da secreção ácido-gástrica são os que compõem a classe dos inibidores da bomba H^+,K^+ -ATPase (*Proton-Pump Inhibitors* - PPIs), amplamente utilizados na terapêutica das desordens gastro-esofágicas que incluem, entre outras, o refluxo gastro-esofágico (*Gastroesophageal Reflux Disease* – GERD) (Figura 1.11) ⁷⁷.

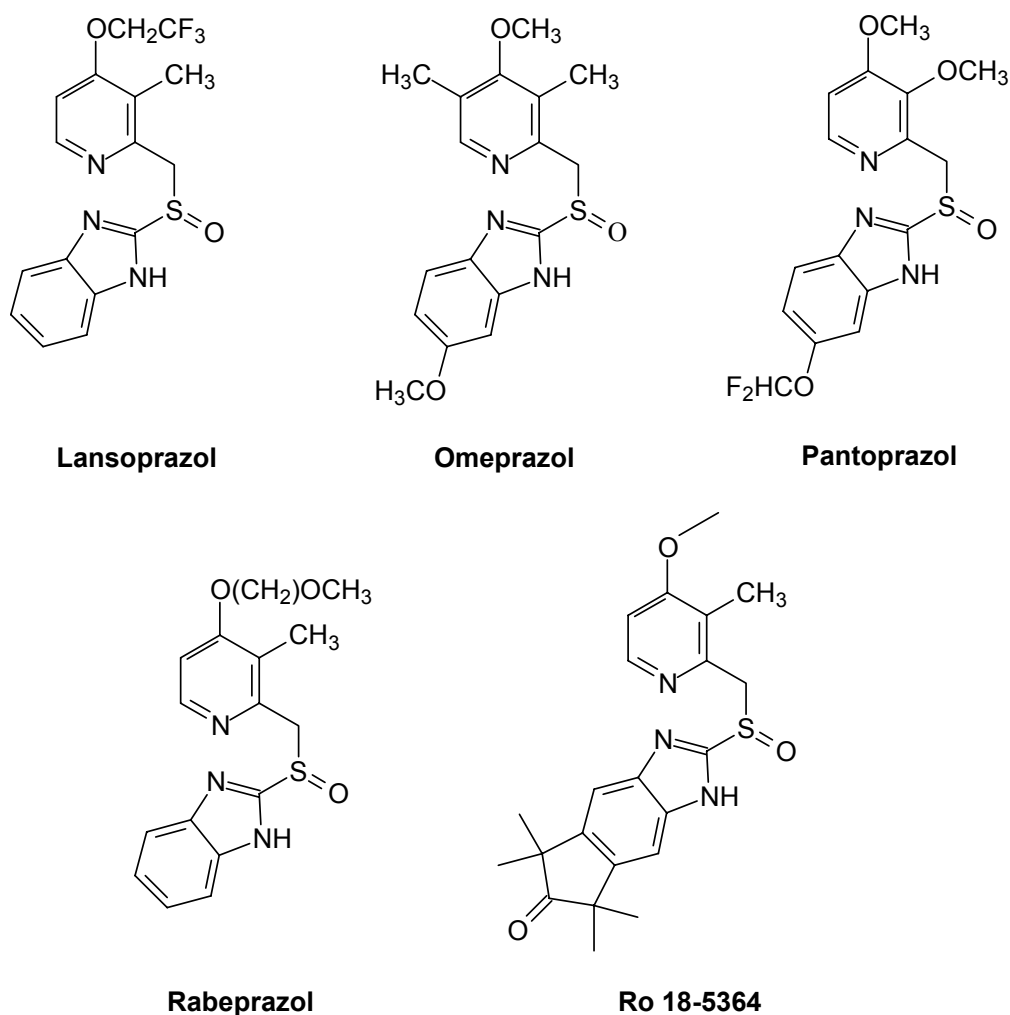


FIGURA 1.11. Representação estrutural de inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase.

O omeprazol, lançado em 1988 na Europa sob o nome de Losec[®] (AstraZeneca) e em 1990 como Prilosec[®] nos Estados Unidos, foi o primeiro inibidor de bomba protônica gástrica utilizado na terapêutica destas desordens ⁷⁸. Desde

então, outros PPIs foram desenvolvidos e lançados no mercado: lansoprazol (Privacid[®], TAP Pharm, 1995), pantoprazol (Protonix[®], Wyeth-Ayerst, 1997), rabeprazol (Aciphex[®], Eisai/Janssen, 1999) e esomeprazol (Nexium[®], AstraZeneca, 2001) ⁷⁷. Um outro inibidor sintetizado e testado pela F. Hoffman-La Roche & Co. LTd. em 1987 foi o Ro 18-5364 ⁷⁹.

Um aspecto muito importante com relação aos inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase é que, a exemplo de outros fármacos, eles são misturas racêmicas, com exceção do esomeprazol que é o enantiômero (S) do omeprazol e, como consequência, a metabolização estereosseletiva destes fármacos deve ser considerada ⁵¹.

A quiralidade nestes fármacos está relacionada ao átomo de enxofre na forma de sulfóxidos, com a presença de um par de elétrons livres, apresentando geometria molecular pirâmide trigonal. Segundo o Modelo de Repulsão dos Pares Eletrônicos da Camada de Valência (RPEV) a estrutura eletrônica está baseada em ângulos tetraédricos.

Inúmeros trabalhos podem ser encontrados relacionados aos inibidores da bomba de prótons, os quais estão vinculados a estudos de enantioseparação, a validação de métodos para quantificação dos enantiômeros em fluídos biológicos e, em formulações farmacêuticas.

CASS et al. ³² estudaram a enantioseparação do lansoprazol, omeprazol e pantoprazol, em quatro diferentes colunas quirais de polissacarídeos (amilose e celulose) valendo-se da eluição multimodal. Mudanças no modo de eluição, na composição da fase móvel e no tipo de seletor quiral alteraram dramaticamente a enantiosseletividade e/ou a enantiorresolução destes compostos.

Recentemente foi realizado um estudo comparativo entre a enantiorresolução dos enantiômeros do omeprazol, lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol por cromatografia líquida de alta eficiência e por fluído supercrítico utilizando uma coluna quiral de polissacarídeo (tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose) ⁸⁰. A determinação dos produtos de degradação destes fármacos também foi realizada valendo-se da cromatografia líquida em fase reversa ⁸¹.

Os enantiômeros e os metabólitos do lansoprazol ⁸² e do rabeprazol ⁸³ foram determinados em plasma humano, por cromatografia líquida, utilizando a extração em fase sólida como método de pré-tratamento da amostra. Para os enantiômeros do omeprazol ⁵¹ e pantoprazol ³³ foi empregada a cromatografia

multidimensional, ou seja, a injeção direta da amostra no sistema cromatográfico. A injeção direta também foi utilizada para a determinação dos enantiômeros do rabeprazol e de seus metabólitos, em plasma humano, e sua aplicação em estudos farmacocinéticos ⁸⁴.

Trabalhos sobre a determinação dos enantiômeros em formulações farmacêuticas também são relatados, como é o caso do omeprazol por eletroforese capilar ⁸⁵.

Uma série de 23 sulfóxidos quirais, dentre eles o omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, foi avaliada em três fases estacionárias quirais de polissacarídeos, sendo os processos de enantioseparação analisados por campos moleculares de interação (Molecular Interaction Fields - MIF), a fim de identificar as razões da interação analito-fase estacionária quiral e possibilitar a escolha do seletor quiral adequado para a enantiorresolução ^{86,87}.

*“Um problema só surge quando estão presentes
todas as condições para solucioná-lo”.*

Karl Marx

*“Enfrente seu problema como se fosse oportunidade.
A solução dele pode ser a chave do seu sucesso”.*

J. F. De Lucca

Objetivos

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos:

1. A determinação do coeficiente cromatográfico de partição, $\log k_w$, de inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase, em três fases estacionárias quirais de polissacarídeos, tendo etanol como modificador orgânico, a fim de elaborar um modelo preditivo para separação quiral;
2. Realizar uma análise sistemática do perfil de retenção e da separação enantiosseletiva dos benzimidazóis, no modo reverso e normal de eluição, em três fases estacionárias de polissacarídeos, mediante variação da concentração de etanol na fase móvel;
3. Separar os enantiômeros dos benzimidazóis em escala multi-miligrama e determinar a ordem de eluição nos três modos de eluição.

“ Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez cem vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas, na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que consegui este feito, mas todas as outras que vieram antes ”.

Jacob Riis

Resultados e Discussões

3. Resultados e Discussões

3.1. Fases estacionárias quirais

A partir da comprovação que diferenças enantioméricas resultam em diferentes respostas biológicas, para a aprovação do registro de novos fármacos quirais, os enantiômeros devem ser testados separadamente.

Estudos de farmacocinética, farmacodinâmica e toxicologia, de ambos enantiômeros, são etapas indispensáveis a serem realizadas antes que o fármaco quiral passe a ser comercializado. Neste contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência, em especial a cromatografia quiral, se tornou uma ferramenta essencial para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos quirais.

Inúmeros compostos quirais estão sendo eficientemente resolvidos em colunas de polissacarídeos, de modo que a escolha da fase estacionária e da fase móvel apropriadas, para a separação de enantiômeros, envolve uma triagem de erros e acertos até se alcançar o objetivo almejado.

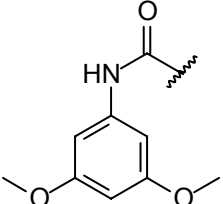
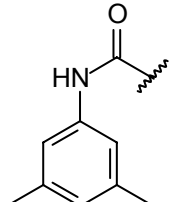
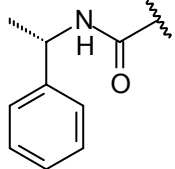
A construção de um modelo matemático preditivo de separação quiral, baseado em dados experimentais, se tornou fundamental, a fim de viabilizar a obtenção das condições ótimas de enantiorresolução.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram selecionadas colunas quirais de polissacarídeo, em especial de amilose, devido a sua grande versatilidade e excelente poder de discriminação quiral para uma vasta classe de compostos, entre eles: aminas axiais quirais⁸⁸, hidrocarbonetos, cetonas, aminas, álcoois, organo-fósforos e compostos de enxofre^{32,34,38}. Trabalhos envolvendo a enantiorresolução de sulfóxidos quirais, incluindo alguns inibidores da bomba de prótons³², e seu estudo através de relações quantitativas entre estrutura e retenção enantiosseletivas⁸⁹, também contribuíram para a escolha destas fases estacionárias.

As fases estacionárias foram preparadas, em nosso grupo de pesquisa, segundo a literatura⁹⁰.

Das quatro colunas analíticas avaliadas (*Tabela 3.1*), três já estavam disponíveis no grupo, exceto a coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7µm) (20% g/g) (CSP-1), que foi então preparada.

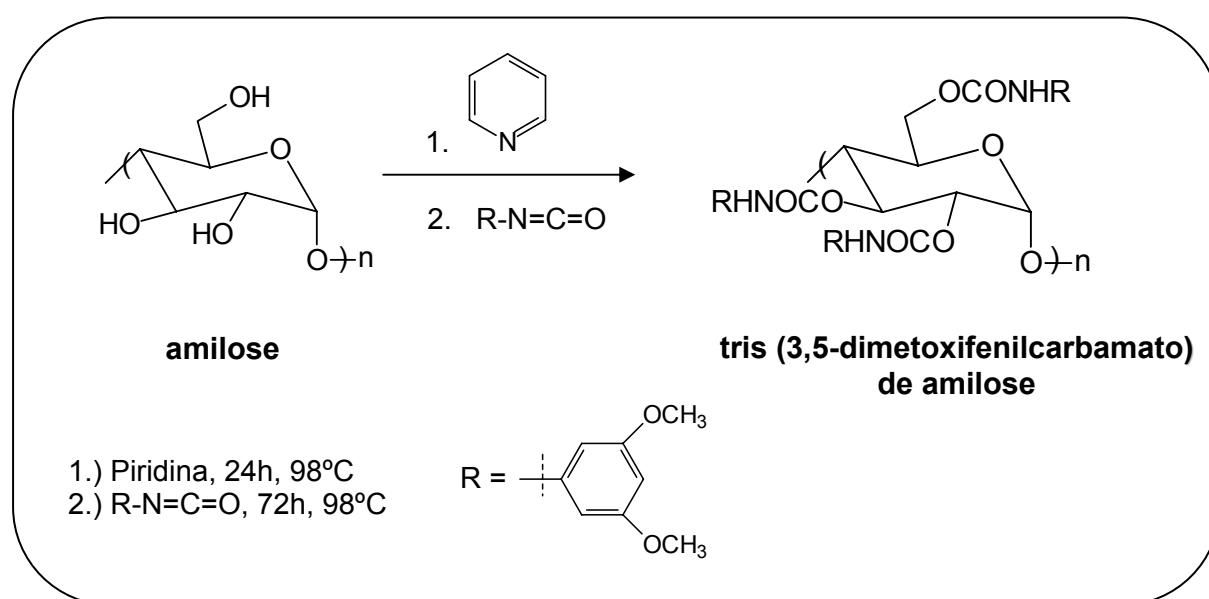
TABELA 3.1. Dados referentes às colunas analíticas empregadas neste trabalho.

Estruturas	Fase Estacionária	Especificações	Código
	Tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (15 x 0,46 cm)	CSP-1
	Tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (15 x 0,46 cm)	CSP-2
	Tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (15 x 0,46 cm)	CSP-3 CSP-3.1

3.1.1. Síntese, caracterização e avaliação da fase tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil

A síntese do carbamato tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose foi realizada através da reação da amilose com o 3,5-dimetoxifenilisocianato, como mostra o *Esquema 3.1*.

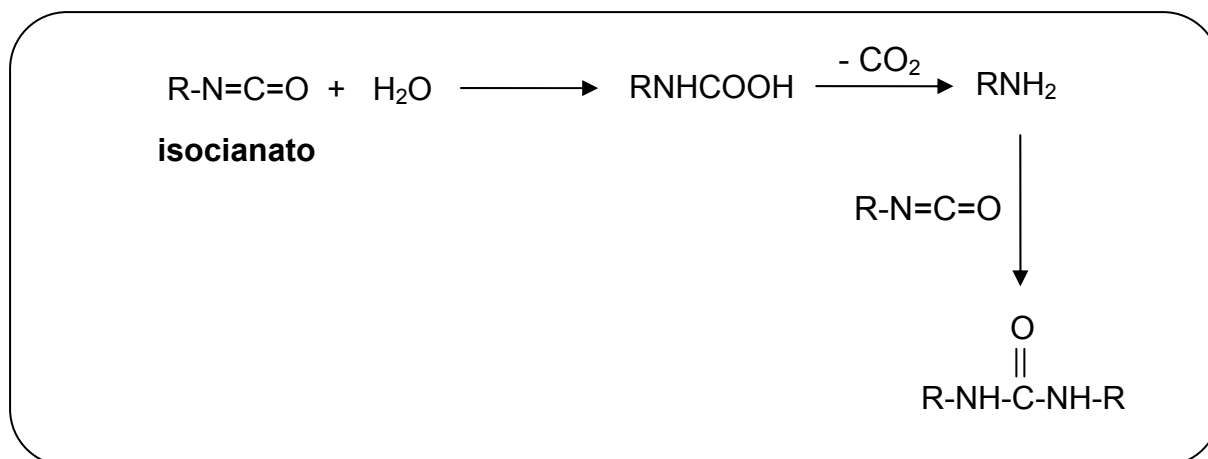
Na reação do isocianato com o polissacarídeo, ocorre um ataque nucleofílico do par de elétrons livres do oxigênio da hidroxila da amilose a carbonila do isocianato, resultando na formação do carbamato desejado ⁹⁰.



ESQUEMA 3.1. Síntese do tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose.

As reações são realizadas sob um rígido controle da temperatura, pois temperaturas superiores às indicadas podem provocar a caramelização do produto, o tornando inadequado para o uso.

É importante trabalhar em condições anidras, devido a alta reatividade do isocianato, que em presença de água, reage resultando na formação do ácido carbâmico. Este, por sua vez, perde espontaneamente CO₂ levando à formação de uma amina primária que reage com o isocianato, formando em um derivado de uréia (*Esquema 3.2*).



ESQUEMA 3.2. Reação do isocianato com a água.

Com a formação de grandes quantidades dos derivados de uréia, a síntese do carbamato é realizada em baixo rendimento. Co-precipitação destes derivados com o carbamato e solubilização durante a etapa de condicionamento, deixam a coluna inadequada para o uso. Aumento da pressão da coluna e diminuição brusca do poder de enantiorresolução de compostos padrões são outros inconvenientes relatados em trabalhos descritos no nosso grupo⁹¹. Desta forma, o procedimento de secagem do polissacarídeo antes da sua derivação, assim como o tratamento dos solventes utilizados na reação, são etapas importantes a serem realizadas. O carbamato sintetizado foi caracterizado por infravermelho (IV) (Figura 3.1) e análise elementar (Tabela 3.2).

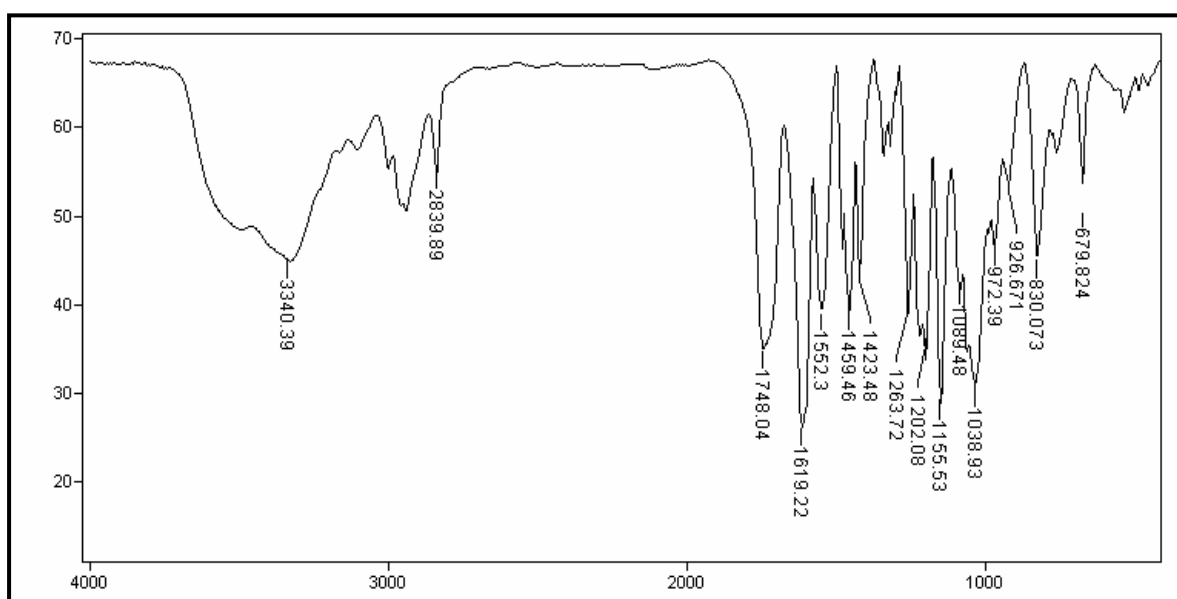


FIGURA 3.1. Espectro no IV da fase tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose.

O espectro no infravermelho apresenta uma absorção intensa e característica em 1748 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O e em 3340 cm^{-1} correspondente à deformação axial do grupo N-H.

TABELA 3.2. Análise elementar da fase tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose.

Elementos	Valores teóricos (%)	Valores experimentais(%)
C	56,65	54,82
H	5,29	5,49
N	6,00	5,95

A síntese do carbamato apresentou 83% de rendimento e, através da análise elementar, foi constatado um excelente percentual de derivação do polissacarídeo de 97%. A estrutura do hexâmero formado está representada na *Figura 3.2*.

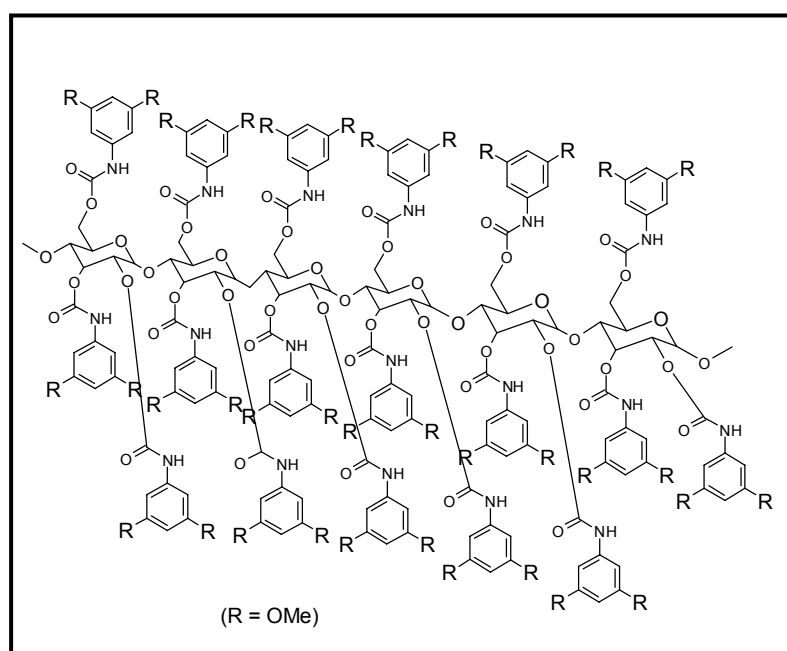


FIGURA 3.2. Representação da estrutura de um hexâmero tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose.

A 3-aminopropilsilica (APS) é considerada o suporte ideal para os derivados de polissacarídeos em decorrência de seus grupos amino serem de natureza similar aos grupos polares do carbamato, por apresentar menor polaridade em relação à sílica não derivada e por aumentar a estabilidade da fase mediante interações de ligações de hidrogênio com o carbamato usado na cobertura do suporte⁹².

O suporte APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm), preparado em nosso grupo de pesquisa a partir de sílica Nucleosil, foi recoberto a 20% g/g com o carbamato sintetizado. A fase estacionária obtida foi empacotada e, posteriormente, condicionada por 24 horas em hexano:isopropanol (95:05 v/v), numa vazão de 0,5 mL.min⁻¹.

Na avaliação, a coluna apresentou bandas simétricas e excelentes valores de enantioseparação ($\alpha=1,62$) e enantiorresolução ($R_s=3,52$) para o composto padrão racêmico, óxido de trans-estilbeno, sendo incluída no grupo de colunas quirais usadas neste projeto.

3.2. Análise sistemática no modo reverso de eluição

É bem conhecido que o coeficiente cromatográfico de partição assemelha-se ao coeficiente de partição obtido do sistema octanol-água somente no intervalo de 20-80% da fração de agente modificador na fase móvel^{70, 71, 87, 93}.

Neste trabalho, inicialmente, as determinações de $\log k_w$ foram realizadas no intervalo 35-80% etanol-água (com medidas em 35, 50, 65 e 80%). Os valores de $\log k_w$ foram então extrapolados a partir das relações entre $\log k$ e fração de etanol (φ_{EtOH}) usando dois sistemas distintos de análise dos dados. No primeiro sistema, foi considerada uma dependência linear da equação de Snyder que resultou em um coeficiente de ajuste médio de $r^2 = 0,947$. Entretanto, uma análise gráfica suscitou a possibilidade de ser o modelo descrito de forma não-linear. Também é notório que o coeficiente de partição tem uma dependência não-linear da equação de Snyder e que isso é dependente, dentre outras características, da composição do agente modificador na fase móvel^{86, 87, 93}. Os coeficientes de ajuste para a equação de Snyder, operando em condições não-lineares, resultaram na média de $r^2 = 0,992$. Isto sugere, claramente, que nesse intervalo o modo de retenção em fase reversa superestima os valores de $\log k_w$.

Com o objetivo de melhor compreender esses resultados, foi realizada uma análise sistematizada dos fatores de retenção desta série de compostos, com as colunas quirais selecionadas, frente à variação da concentração de modificador orgânico no modo reverso de eluição.

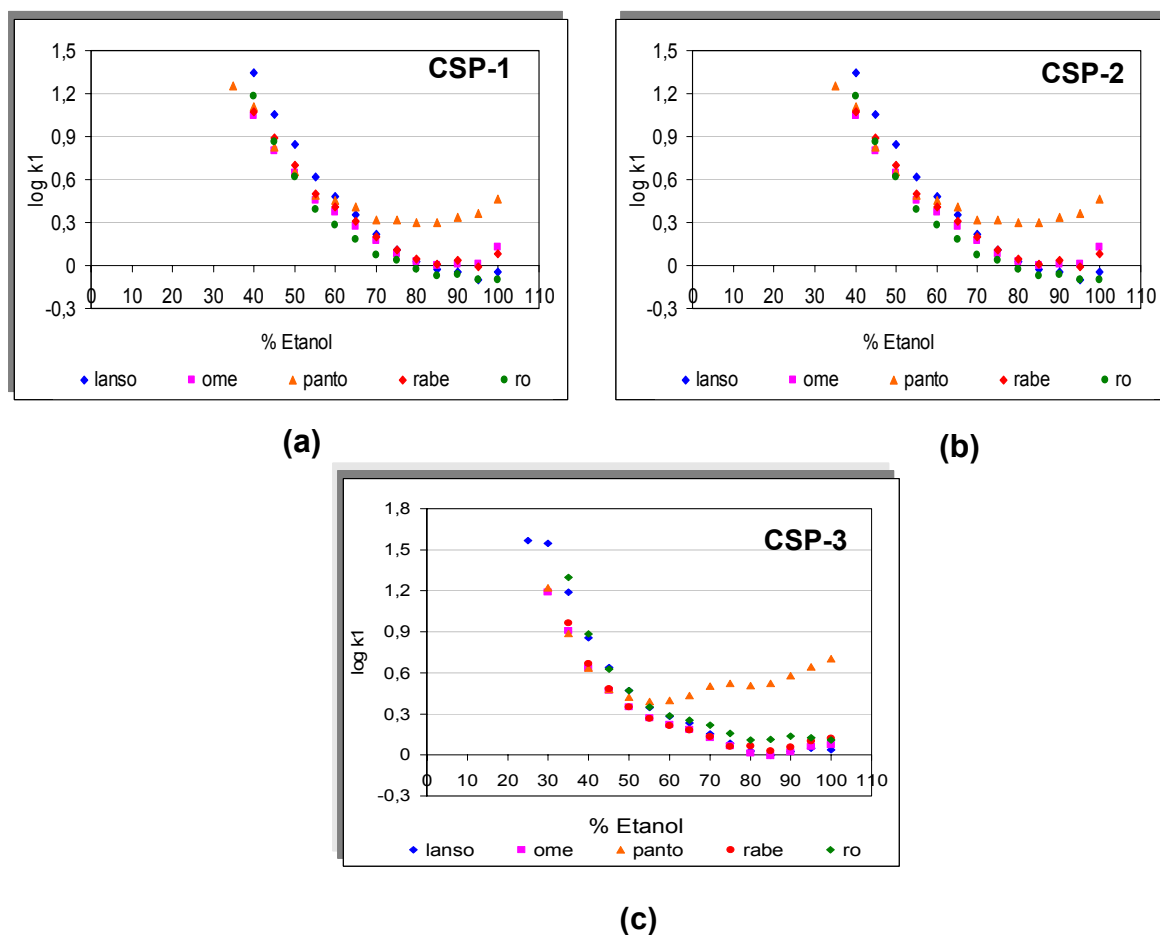
A composição da fase móvel variou de 0%, 0,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% e 75% de água em etanol. O tempo máximo estabelecido para as análises foi de 200 minutos. Desta forma, não foi possível determinar os parâmetros cromatográficos em concentrações elevadas de água (70% e 75%) para alguns compostos devido aos altos fatores de retenção.

O princípio da retenção cromatográfica, no modo reverso de eluição, é a hidrofobia. As interações repulsivas entre a parte apolar do analito e as moléculas de água resultam numa interação mais efetiva entre o analito e a fase estacionária¹⁸.

Durante uma análise, no modo reverso, o comportamento esperado é que em paralelo ao aumento da concentração do modificador orgânico ocorra a

diminuição dos fatores de retenção dos solutos de uma amostra. Em contrapartida, quanto maior a concentração de água maior os fatores de retenção.

O perfil de retenção das colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 para série de compostos avaliados são apresentados nos *Gráficos 3.1 a, b e c*, onde são relacionados os valores de $\log k_1$ versus a concentração de etanol.



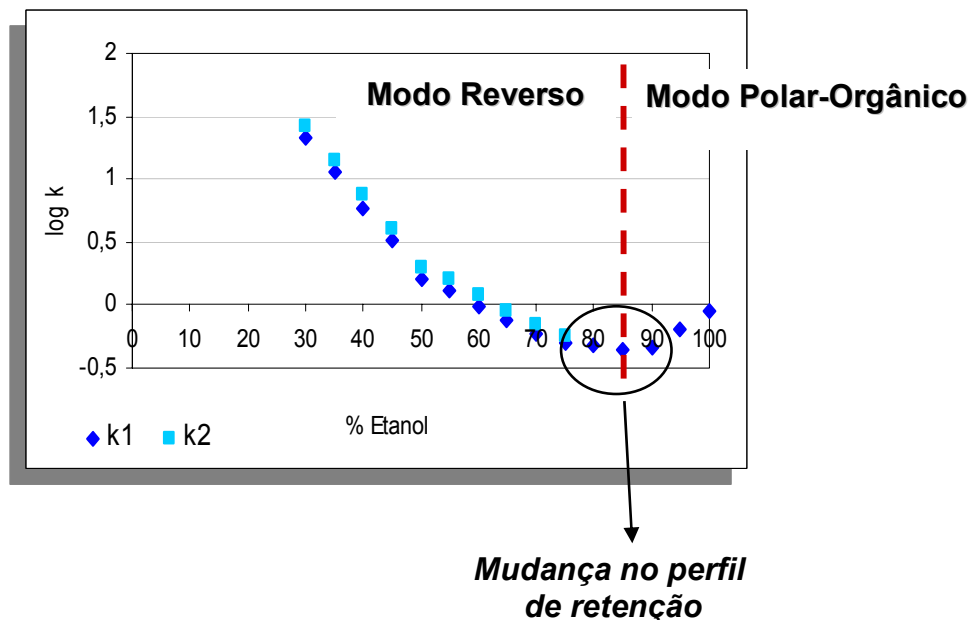
GRÁFICOS 3.1. Relação entre o $\log k_1$ dos benzimidazóis avaliados versus porcentagem de etanol nas três colunas quirais avaliadas sob condições de modo reverso de eluição: (a) CSP-1; (b) CSP-2 e (c) CSP-3.

À medida que a concentração de etanol aumenta a diminuição dos fatores de retenção, expresso em logaritmo, é observada. Após certa concentração de etanol, entretanto, os fatores de retenção aumentam, e esse comportamento se mantém até atingir o modo polar-orgânico, em 100% de etanol.

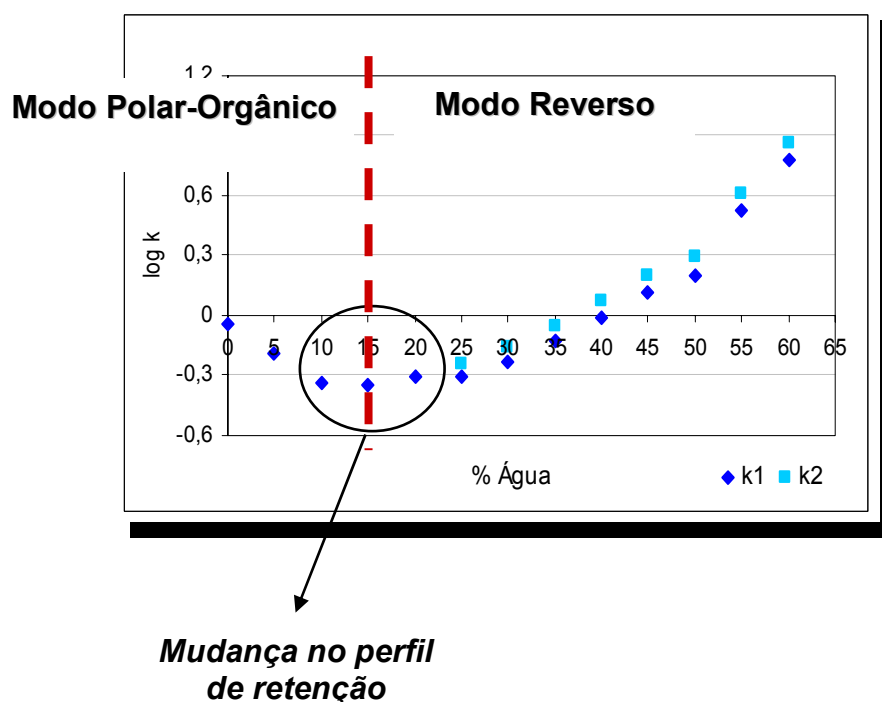
Os *Gráficos 3.2 a e b* mostram as mudanças nos fatores de retenção, para o composto rabeprazol, mediante variação da concentração de etanol. É válido

salientar, que este aumento de retenção foi observado na análise dos cinco compostos da série, com as três colunas quirais selecionadas.

(a)



(b)



GRÁFICOS 3.2. Perfis de retenção do rabeprazol na CSP-1. (a) $\log k$ versus concentração de etanol, (b) $\log k$ versus concentração de água.

Os perfis dos fatores de retenção obtidos podem ser interpretados de duas formas distintas. Os *Gráficos 3.2 a e b exemplificam essas análises*.

Considerando-se inicialmente elevada concentração de água, à medida que a concentração de etanol aumenta, os fatores de retenção dos analitos diminuem. Deve-se isso, à diminuição das interações hidrofóbicas que predominam no processo de retenção, no modo reverso de eluição, e as colunas quirais por apresentarem comportamento típico de fases estacionárias reversas. Todavia, após certa concentração de etanol (próximo a 90% v/v, no caso do rabeprazol), começam a predominar as interações de ligação de hidrogênio, atribuídas, como interações predominantes no modo polar orgânico^{32,34,94}.

Não obstante, avaliando os resultados apresentados no *Gráfico 3.2 b*, quando a eluição é iniciada no modo polar-orgânico, com 100% de etanol, à medida que há adição de baixos percentuais de água, na fase móvel, as colunas quirais continuam se comportando como se estivessem no modo polar-orgânico de eluição. Em baixas concentrações de água, as interações hidrofóbicas não prevalecem sobre as interações de ligações de hidrogênio e o aumento do fator de retenção, típico da eluição no modo reverso, não ocorre. Pelo contrário, em baixas concentrações de água, as associações das moléculas de água com as moléculas de etanol favorecem a maior afinidade dos analitos pela fase móvel, quando comparada com a fase móvel constituída somente por etanol.

Tal fato pode estar relacionado ao equilíbrio adsorção-dessorção que é estabelecido no processo de interação entre o enantiômero e a fase estacionária²⁵. Inicialmente os analitos encontram-se solvatados e a fase estacionária adsorvida pelas moléculas do eluente, de modo que a interação analito-CSP só ocorre mediante o deslocamento das moléculas de solvatação/adsorção. Assim, dependendo da composição da fase móvel o processo de solvatação/adsorção é mais ou menos efetivo, ocasionando mudanças na retenção dos analitos.

A diminuição dos fatores de retenção, com a adição de água ocorre até certa concentração deste solvente, pois após esta, as interações decorrentes da hidrofobia começam a vigorar e, conseqüentemente, ocorre o aumento do fator de retenção. As fases quirais de polissacarídeos, não apresentam o comportamento de modo reverso, regido pela hidrofobia, em pequenas concentrações de água.

Para um melhor entendimento do modo de eluição, nessas fases quirais, em presença de baixas concentrações de água (ou altas de etanol) na fase móvel, talvez necessário recorrer a um tratamento matemático dos dados obtidos, valendo-se possivelmente de programas de modelagem molecular.

No entanto, a mudança do perfil dos fatores de retenção, a certa concentração de modificador orgânico, está claramente evidenciada. Esta alteração foi observada nas três fases quirais, para ambos enantiômeros, dos compostos da série, nos casos onde houve resolução enantiomérica.

A concentração de modificador orgânico necessária para interceptar a mudança entre os dois tipos de retenção, modo reverso e modo polar-orgânico, foi determinada para todos os compostos em todas as fases quirais.

Foram obtidas as equações de segundo grau, considerando as duas formas de análise: iniciando a análise pelo modo polar-orgânico (100% de etanol) e através do modo reverso de eluição com elevada concentração de água (baixas concentrações de etanol). As equações foram obtidas considerando o $\log k$ versus a porcentagem do solvente em estudo (água ou etanol).

Os parâmetros avaliados foram: n número de variáveis, r^2 coeficiente de ajuste da reta, s desvio padrão, F teste de Fisher, Q^2 capacidade de predição do modelo quando um composto é excluído do modelo original e $\log k_w$.

A porcentagem do solvente de interesse na fase móvel, etanol ou água, responsável pela interceptação dos dois tipos de retenção, considerando o intervalo de variação, foi expressa pelo *ponto mínimo da reta*.

TABELA 3.3. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-1, para os cinco compostos quirais, tendo como ponto inicial de estudo o modo reverso de eluição.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	log k _w	Ponto mínimo φ _{EtOH}	Ponto. mín.exp. φ _{EtOH}
lansoprazol	$\log k = 6,41 \times 10^{-4} (\pm 6,3 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 1,11 \times 10^{-1} (\pm 8,2 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 4,35 (\pm 0,25)$	15	1539	0,046	0,996	0,993	4,35	86,8 (84,7/89,4)	90
omeprazol	$\log k = 5,64 \times 10^{-4} (\pm 6,8 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 9,79 \times 10^{-2} (\pm 9,2 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 4,21 (\pm 0,29)$	14	942	0,042	0,994	0,989	4,21	86,7 (84,4/89,6)	85
pantoprazol	$\log k = 6,75 \times 10^{-4} (\pm 5,5 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 1,09 \times 10^{-1} (\pm 7,2 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 4,25 (\pm 0,22)$	15	1329	0,041	0,996	0,993	4,25	80,9 (79,5/82,5)	85
	$\log k = 6,53 \times 10^{-4} (\pm 6,1 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 1,07 \times 10^{-1} (\pm 6,5 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 4,33 (\pm 0,162)$	10	1109	0,035	0,997	0,994	4,33	81,3 (76,2/85,5)	75
rabeprazol	$\log k = 6,45 \times 10^{-4} (\pm 5,5 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 1,04 \times 10^{-1} (\pm 7,3 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 3,89 (\pm 0,22)$	15	1198	0,041	0,996	0,992	3,89	80,9 (79,4/82,6)	85
	$\log k = 6,37 \times 10^{-4} (\pm 1,6 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 1,04 \times 10^{-1} (\pm 1,7 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 3,98 (\pm 0,42)$	10	980	0,039	0,996	0,993	3,98	81,6 (75,6/91,5)	75
Ro 18-5364	$\log k = 7,36 \times 10^{-4} (\pm 8,7 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 1,23 \times 10^{-1} (\pm 1,2 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{EtOH}} + 4,75 (\pm 0,38)$	14	718	0,054	0,996	0,988	4,75	83,4 (81,5/85,9)	85

TABELA 3.4. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-2, para os cinco compostos quirais, tendo como ponto inicial de estudo o modo reverso de eluição.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	log k _w	Ponto mínimo φ _{EtOH}	Pt. mín. exp φ _{EtOH}
lansoprazol	$\log k = 4,8 \times 10^{-4} (\pm 4,3 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 8,93 \times 10^{-2} (\pm 6,0 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 4,12 (\pm 0,20)$	13	2885	0,031	0,998	0,996	4,12	93,9 (91,8/96,3)	95
omeprazol	$\log k = 4,5 \times 10^{-4} (\pm 5,1 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 7,90 \times 10^{-2} (\pm 7,2 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 3,46 (\pm 0,24)$	13	1047	0,026	0,996	0,989	3,46	87,3 (85,4/89,8)	85
	$\log k = 4,8 \times 10^{-4} (\pm 4,4 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 8,60 \times 10^{-2} (\pm 6,2 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 4,04 (\pm 0,21)$	13	2057	0,222	0,998	0,995	4,04	90,2 (88,4/92,4)	95
pantoprazol	$\log k = 4,8 \times 10^{-4} (\pm 6,7 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 7,76 \times 10^{-2} (\pm 9,1 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 3,37 (\pm 0,29)$	14	364	0,041	0,986	0,977	3,37	79,5 (77,7/81,8)	85
rabeprazol	$\log k = 4,25 \times 10^{-4} (\pm 4,3 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 7,65 \times 10^{-2} (\pm 6,1 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 3,46 (\pm 0,20)$	13	1650	0,022	0,996	0,994	3,46	90,0 (88,0/92,4)	95
Ro 18-5364	$\log k = 5,08 \times 10^{-4} (\pm 1,0 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 9,03 \times 10^{-2} (\pm 1,4 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 3,90 (\pm 0,47)$	13	391,3	0,050	0,988	0,969	3,90	88,8 (85,4/93,8)	95

TABELA 3.5. Equações pertinentes ao estudo perfil de retenção na CSP-3, para os cinco compostos quirais, tendo como ponto inicial de estudo o modo reverso de eluição.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	log k _w	Ponto mínimo φ _{EtOH}	Pt. mín. exp φ _{EtOH}
lansoprazol	$\log k = 4,55 \times 10^{-4} (\pm 8,5 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 7,74 \times 10^{-2} (\pm 1,1 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{EtOH}} + 3,30 (\pm 0,31)$	16	386	0,075	0,984	0,971	3,30	85,1 (81,1/90,7)	85
omeprazol	$\log k = 3,88 \times 10^{-4} (\pm 8,0 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 6,44 \times 10^{-2} (\pm 1,1 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{EtOH}} + 2,67 (\pm 0,32)$	15	250	0,059	0,976	0,953	2,67	82,9 (79,3/88,0)	85
pantoprazol	$\log k = 4,22 \times 10^{-4} (\pm 1,5 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 5,81 \times 10^{-2} (\pm 1,9 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{EtOH}} + 2,39 (\pm 0,58)$	15	231	0,107	0,793	0,570	2,39	68,9 (65,6/73,3)	55
pantoprazol	$\log k = 4,62 \times 10^{-4} (\pm 1,5 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 6,40 \times 10^{-2} (\pm 1,9 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{EtOH}} + 2,64 (\pm 0,58)$	15	283	0,108	0,826	0,643	2,64	69,3 (66,2/73,3)	55
rabeprazol	$\log k = 3,76 \times 10^{-4} (\pm 8,1 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 6,17 \times 10^{-2} (\pm 1,1 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{EtOH}} + 2,56 (\pm 0,35)$	14	191	0,050	0,972	0,932	2,56	82,0 (78,9/86,5)	85
rabeprazol	$\log k = 3,98 \times 10^{-4} (\pm 4,5 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 6,46 \times 10^{-2} (\pm 6,05 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 2,71 (\pm 0,19)$	10	183	0,057	0,969	0,851	2,712	83,8 (76,2/88,1)	75
Ro 18-5364	$\log k = 4,54 \times 10^{-4} (\pm 1,4 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 7,55 \times 10^{-2} (\pm 1,9 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{EtOH}} + 3,21 (\pm 0,61)$	14	103	0,086	0,948	0,871	3,21	83,1 (78,7/90,8)	80

TABELA 3.6. Equações pertinentes ao estudo perfil de retenção na CSP-1, para os cinco compostos quirais, tendo como ponto inicial de estudo o modo polar-orgânico.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	Ponto mínimo Φ _{água}	Pt. mín. exp. Φ _{água}
lansoprazol	$\log k = 6,41 \times 10^{-4} (\pm 6,3 \times 10^{-5}) \Phi_{\text{água}}^2 - 1,69 \times 10^{-2}$ $(\pm 4,5 \times 10^{-3}) \Phi_{\text{água}} - 0,37 (\pm 0,07)$	15	1539	0,046	0,996	0,993	13,2 (10,6/15,3)	10
omeprazol	$\log k = 5,66 \times 10^{-4} (\pm 6,8 \times 10^{-5}) \Phi_{\text{água}}^2 - 1,50 \times 10^{-2}$ $(\pm 4,6 \times 10^{-3}) \Phi_{\text{água}} + 6,24 \times 10^{-2} (\pm 6,0 \times 10^{-2})$	14	931	0,042	0,994	0,989	13,3 (10,4/15,6)	15
pantoprazol	$\log k = 6,75 \times 10^{-4} (\pm 5,5 \times 10^{-5}) \Phi_{\text{água}}^2 - 2,58 \times 10^{-2}$ $(\pm 4,0 \times 10^{-3}) \Phi_{\text{água}} + 8,14 \times 10^{-2} (\pm 6,0 \times 10^{-2})$	15	1329	0,041	0,996	0,993	19,1 (17,5/20,5)	15
	$\log k = 6,53 \times 10^{-4} (\pm 6,1 \times 10^{-5}) \Phi_{\text{água}}^2 - 2,30 \times 10^{-2}$ $(\pm 5,9 \times 10^{-3}) \Phi_{\text{água}} + 9,30 \times 10^{-2} (\pm 1,3 \times 10^{-1})$	10	1109	0,352	0,997	0,994	18,7 (14,5/23,8)	25
rabeprazol	$\log k = 6,45 \times 10^{-4} (\pm 5,5 \times 10^{-5}) \Phi_{\text{água}}^2 - 2,47 \times 10^{-2}$ $(\pm 4,0 \times 10^{-3}) \Phi_{\text{água}} - 8,62 \times 10^{-2} (\pm 6,1 \times 10^{-2})$	15	1198	0,041	0,996	0,992	19,1 (17,4/20,6)	15
	$\log k = 6,45 \times 10^{-4} (\pm 6,5 \times 10^{-5}) \Phi_{\text{água}}^2 - 2,43 \times 10^{-2}$ $(\pm 6,2 \times 10^{-3}) \Phi_{\text{água}} - 1,62 \times 10^{-2} (\pm 1,4 \times 10^{-1})$	10	982	0,034	0,998	0,993	18,4 (13,6/29,5)	25
Ro 18-5364	$\log k = 7,36 \times 10^{-4} (\pm 8,7 \times 10^{-4}) \Phi_{\text{água}}^2 - 2,44 \times 10^{-2}$ $(\pm 5,9 \times 10^{-3}) \Phi_{\text{água}} - 0,176 (\pm 0,082)$	14	418	0,054	0,992	0,988	16,6 (14,1/18,5)	15

TABELA 3.7. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-2, para os cinco compostos quirais, tendo como ponto inicial de estudo o modo polar-orgânico.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	Ponto mínimo Φ _{água}	Pt. mín. exp. Φ _{água}
lansoprazol	$\log k = 4,73 \times 10^{-4} (\pm 4,2 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{água}}^2 - 5,66 \times 10^{-3}$ $(\pm 2,6 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} - 5,02 \times 10^{-2} (\pm 3,4 \times 10^{-2})$	13	2958	0,021	0,998	0,996	5,98 (3,52/8,06)	05
omeprazol	$\log k = 4,51 \times 10^{-4} (\pm 5,1 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{água}}^2 - 1,14 \times 10^{-2}$ $(\pm 3,2 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} + 8,87 \times 10^{-2} (\pm 4,1 \times 10^{-2})$	13	1028	0,026	0,996	0,989	12,7 (10,2/14,6)	15
omeprazol	$\log k = 4,77 \times 10^{-4} (\pm 4,4 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{água}}^2 - 9,33 \times 10^{-3}$ $(\pm 2,7 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} + 2,08 \times 10^{-1} (\pm 3,5 \times 10^{-2})$	13	2058	0,022	0,998	0,995	9,78 (7,59/11,6)	05
pantoprazol	$\log k = 5,21 \times 10^{-4} (\pm 1,1 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{água}}^2 - 1,75 \times 10^{-2}$ $(\pm 6,1 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} - 4,27 \times 10^{-1} (\pm 6,6 \times 10^{-2})$	14	143	0,049	0,966	0,919	16,8 (13,7/19,0)	15
rabeprazol	$\log k = 4,21 \times 10^{-4} (\pm 4,6 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{água}}^2 - 8,23 \times 10^{-3}$ $(\pm 2,9 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} + 5,67 \times 10^{-2} (\pm 3,7 \times 10^{-2})$	13	1411	0,023	0,996	0,993	9,79 (7,10/12,0)	05
Ro 18-5364	$\log k = 5,08 \times 10^{-4} (\pm 1,0 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{água}}^2 - 1,14 \times 10^{-2}$ $(\pm 6,2 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} - 4,35 \times 10^{-2} (\pm 8,1 \times 10^{-2})$	13	391	0,050	0,988	0,969	11,2 (6,21/14,6)	05

TABELA 3.8. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-3, para os cinco compostos quirais, tendo como ponto inicial de estudo o modo polar-orgânico.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	Ponto mínimo φ _{água}	Pt. mín. exp. φ _{água}
lansoprazol	$\log k = 4,55 \times 10^{-4} (\pm 8,5 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{água}}^2 - 1,36 \times 10^{-2} (\pm 6,6 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} + 9,78 \times 10^{-2} (\pm 1,1 \times 10^{-1})$	16	387	0,075	0,984	0,971	14,9 (9,31/18,9)	15
omeprazol	$\log k = 3,88 \times 10^{-4} (\pm 8,8 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{água}}^2 - 1,33 \times 10^{-2} (\pm 5,8 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} + 1,14 \times 10^{-1} (\pm 8,8 \times 10^{-2})$	15	250	0,059	0,976	0,953	17,1 (12,0/20,7)	15
pantoprazol	$\log k = 4,22 \times 10^{-4} (\pm 1,5 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{água}}^2 - 2,62 \times 10^{-2} (\pm 1,1 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{água}} + 7,95 \times 10^{-1} (\pm 1,6 \times 10^{-1})$	15	23	0,107	0,793	0,570	31,1 (26,7/34,4)	45
	$\log k = 4,62 \times 10^{-4} (\pm 1,5 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{água}}^2 - 2,84 \times 10^{-2} (\pm 1,1 \times 10^{-2}) \varphi_{\text{água}} + 8,62 \times 10^{-1} (\pm 1,6 \times 10^{-1})$	15	28	0,108	0,826	0,643	30,7 (26,7/33,8)	45
rabeprazol	$\log k = 3,76 \times 10^{-4} (\pm 8,1 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{água}}^2 - 1,35 \times 10^{-2} (\pm 5,4 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} + 1,54 \times 10^{-1} (\pm 7,6 \times 10^{-2})$	14	191	0,050	0,972	0,932	18,0 (13,5/21,1)	15
	$\log k = 3,98 \times 10^{-4} (\pm 4,5 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{água}}^2 - 1,5 \times 10^{-2} (\pm 3,19 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} + 2,3 \times 10^{-1} (\pm 5,5 \times 10^{-2})$	10	183	0,057	0,969	0,851	16,2 (11,9/23,8)	25
Ro 18-5364	$\log k = 4,54 \times 10^{-4} (\pm 1,4 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{água}}^2 - 1,53 \times 10^{-2} (\pm 9,4 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{água}} + 2,01 \times 10^{-1} (\pm 1,3 \times 10^{-1})$	14	103	0,086	0,948	0,871	16,9 (9,16/21,3)	20

Para uma melhor visualização os dados teóricos e experimentais referentes à concentração de etanol e água, que intercepta a mudança do modo de retenção nas colunas quirais, estão dispostos nas tabelas a seguir (*Tabela 3.9.* e *Tabela 3.10*).

TABELA 3.9. Dados teóricos e experimentais referentes à porcentagem de etanol que intercepta a mudança do modo de retenção, para os cinco compostos, nas três fases quirais sob condições de modo reverso.

Compostos	CSP-1		CSP-2		CSP-3	
	<i>Ponto mín.teórico (Φ_{EtOH})(%)</i>	<i>Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH})(%)</i>	<i>Ponto mín.teórico (Φ_{EtOH})(%)</i>	<i>Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH})(%)</i>	<i>Ponto mín.teórico (Φ_{EtOH})(%)</i>	<i>Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH})(%)</i>
lansoprazol	86,8 (84,7/89,4)	90	93,9 (91,8/96,3)	95	85,1 (81,1/90,7)	85
omeprazol	86,7 (84,4/89,6)	85	87,3 (85,4/89,8) 90,2 (88,4/92,4)	85 95	82,9 (79,3/88,0)	85
pantoprazol	80,9 (79,5/82,5) 81,3 (76,2/85,5)	85 75	79,5 (77,7/81,8)	85	68,9 (65,6/73,3) 69,3 (66,2/73,3)	55 55
rabeprazol	80,9 (79,4/82,6) 81,6 (75,6/91,5)	85 75	90,0 (88,0/92,4)	95	82,0 (78,9/86,5) 83,8 (76,2/88,1)	85 75
Ro 18-5364	83,4 (81,5/85,9)	85	88,8 (85,4/93,8)	95	83,1 (78,7/90,8)	80

TABELA 3.10. Dados teóricos e experimentais referentes à porcentagem de água que intercepta a mudança do modo de retenção, para os cinco compostos, nas três fases quirais sob condições de modo reverso.

Compostos	CSP-1		CSP-2		CSP-3	
	<i>Ponto</i>	<i>Ponto</i>	<i>Ponto</i>	<i>Ponto</i>	<i>Ponto</i>	<i>Ponto</i>
	<i>min.teórico</i>	<i>mín.exp.</i>	<i>min.teórico</i>	<i>mín.exp.</i>	<i>min.teórico</i>	<i>mín.exp.</i>
	($\Phi_{\text{água}}$) (%)	($\Phi_{\text{água}}$) (%)	($\Phi_{\text{água}}$) (%)	($\Phi_{\text{água}}$) (%)	($\Phi_{\text{água}}$) (%)	($\Phi_{\text{água}}$) (%)
lansoprazol	13,2 (10,6/15,3)	10	5,98 (3,52/8,06)	05	14,9 (9,31/18,9)	15
omeprazol	13,3 (10,4/15,6)	15	12,7 (10,2/14,6)	15	17,1 (12,0/20,7)	15
			9,78 (7,59/11,6)	05		
pantoprazol	19,1 (17,5/20,5)	15	16,8 (13,7/19,0)	15	31,1 (26,7/34,4)	45
					18,7 (14,5/23,8)	25
rabeprazol	19,1 (17,4/20,6)	15	9,79 (7,10/12,0)	05	18,0 (13,5/21,1)	15
					18,4 (13,6/29,5)	25
Ro 18-5364	16,6 (14,1/18,5)	15	11,2 (6,21/14,6)	05	16,9 (9,16/21,3)	20

Os resultados experimentais, considerando o intervalo de confiança, estão em concordância com os obtidos pelas equações. A diferença constatada foi em relação à concentração do modificador orgânico necessária para a mudança no modo de retenção nas diferentes fases estacionárias quirais.

Os dois modos de retenção são interceptados quando a CSP-1 é usada como coluna tendo aproximadamente 85% de etanol como modificador orgânico. Abaixo deste valor a retenção cromatográfica é regida pelo princípio da hidrofobia e acima deste percentual o sistema começa a responder como se estivesse no modo polar-orgânico. Iniciando pelo modo polar-orgânico, a mudança de retenção ocorre com aproximadamente 15% de água.

Com a CSP-2 o modo polar-orgânico de eluição manifesta-se com aproximadamente 95% de etanol, ou seja, o modo reverso de eluição mantém-se mesmo com altas concentrações do modificador orgânico. De outra forma, o sistema acima de 5% de água já responde as interações cabíveis ao modo reverso de eluição.

Para a CSP-3 esta alteração acontece em aproximadamente 80% de etanol ou em 20% de água. A concentração de etanol necessária para a mudança de retenção é menor, enquanto que a passagem do modo polar-orgânico para o reverso requer uma concentração maior de água na fase móvel, quando comparado com as demais colunas quirais.

Considerando como ponto inicial de estudo o modo reverso, com elevada porcentagem de água, a mudança de modo de retenção ocorre na seguinte ordem das colunas usadas: CSP-3, > CSP-1 > CSP-2.

Com a obtenção das equações de segundo grau foi possível determinar o coeficiente cromatográfico de partição, $\log k_w$, para os inibidores da bomba de prótons, considerando o sistema como não-linear (*Tabelas 3.3, 3.4, 3.5*). Nas equações, onde $y = \log k$ e $x = \varphi_{\text{EtOH}}$, considerando $x=0$ obtem-se os valores de $\log k$ que corresponderam aos logaritmos dos coeficientes de partição em 100% de água.

TABELA 3.11. Valores do coeficiente cromatográfico de partição dos inibidores da bomba de prótons obtidos pelas equações de segundo grau e a comparação com os valores de $\log P$ ⁸⁶.

Sulfóxidos	$\log P^*$	CSP-1	CSP-2	CSP-3
		$\log k_{w1}$	$\log k_{w1}$	$\log k_{w1}$
omeprazol	1,57-2,42	4,21 ($\pm 0,29$)	3,46 ($\pm 0,24$)	2,67 ($\pm 0,32$)
lansoprazol	2,58-3,03	4,35 ($\pm 0,25$)	4,12 ($\pm 0,20$)	3,29 ($\pm 0,31$)
lantoprazol	2,05	4,25 ($\pm 0,22$)	3,37 ($\pm 0,29$)	2,39 ($\pm 0,58$)
rabeprazol	1,18-2,33	3,89 ($\pm 0,22$)	3,46 ($\pm 0,20$)	2,56 ($\pm 0,35$)
Ro 18-5364	1,51 ^{**}	4,75 ($\pm 0,38$)	3,90($\pm 0,47$)	3,21 ($\pm 0,61$)

* $\log P_{oct}$ pH 7,4 ** obtido pelo programa XlogP

Apesar dos valores serem subestimados para todas as colunas em estudo, pode-se observar que para a coluna CSP-3 os valores de $\log k_w$ aproximam-se dos valores dos limites superiores de $\log P$ determinados para os benzimidazóis no sistema octanol-água.

Esses resultados estão em acordo com o trabalho de B. Chankvetadze e colaboradores⁹⁴ que observaram que as colunas de polissacarídeos nem sempre apresentam retenções típicas de modo reverso. Talvez, por influência de interações resultantes de ligações de hidrogênio com os derivados de polissacarídeos, racionalizam os autores.

3.3.1. Efeitos da fase estacionária e da composição da fase móvel no reconhecimento quiral sob condições de modo reverso de eluição

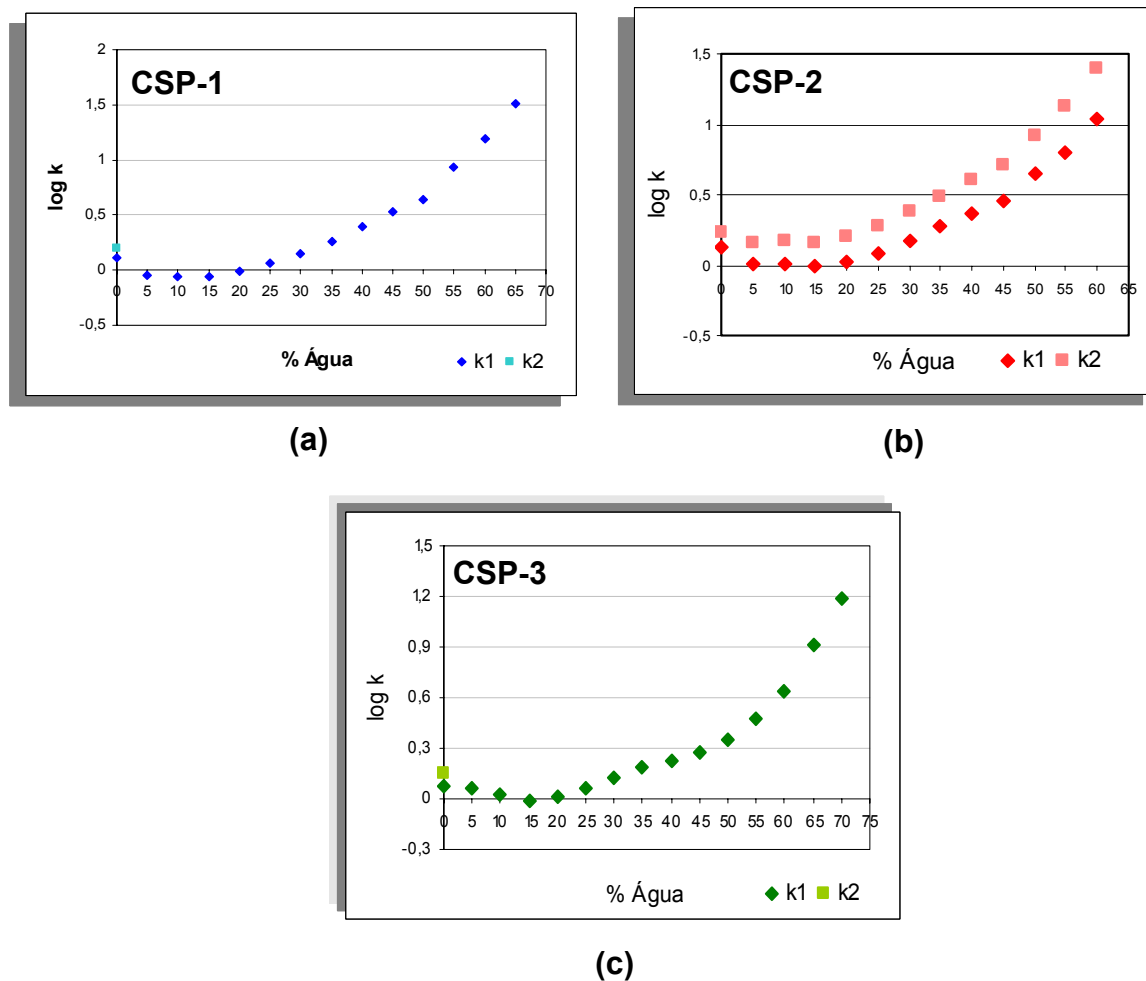
A retenção cromatográfica se refere à interação existente entre o analito e a fase estacionária sem considerar a estereoquímica das moléculas, neste caso, os enantiômeros podem apresentar a mesma retenção cromatográfica e conseqüentemente não apresentar a separação quiral.

Em cromatografia quiral, no entanto, para a discriminação enantiomérica além das inúmeras interações (ligação de hidrogênio, interação π - π , dipolo-dipolo), entre o analito e a fase estacionária e a fase móvel, é considerada a estereoquímica das moléculas e o tipo de seletor quiral utilizado. Diferentes grupos substituintes são responsáveis por mudanças na habilidade da fase quiral em formar ligações de hidrogênio além de outras interações necessárias para a separação³⁹.

Para a obtenção de condições de enantioseparações por cromatografia quiral é necessário, frequentemente, controlar a retenção dos analitos através de alterações nas variáveis experimentais, como vazão, força da fase móvel, temperatura e pH. A otimização da separação pode ser conseguida pela especificidade do derivado de polissacarídeo e do tipo de composição da fase móvel³².

Durante a realização da análise sistemática, no modo reverso de eluição, foi observado que enquanto o comportamento de retenção foi similar em todas as fases quirais, o poder de discriminação quiral foi distinto (*Gráficos 3.3 a, b e c*).

Para estas fases derivadas de polissacarídeos, CSP-1, CSP-2 e CSP-3, a capacidade de separação quiral está relacionada com a estrutura do polímero amilose, que possibilita a formação de complexos de inclusão em suas cavidades e, principalmente, com os diferentes grupos substituintes do carbamato formado³⁹.



GRÁFICOS 3.3. Relação entre $\log k_1$ e $\log k_2$ dos enantiômeros do omeprazol versus porcentagem de água nas três fases estacionárias de polissacarídeos: (a) CSP-1, (b) CSP-2 e (c) CSP-3.

Foram calculados os parâmetros cromatográficos de todas as análises e estes estão dispostos nas tabelas a seguir (*Tabela 3.12 – 3.16*).

TABELA 3.12. Parâmetros cromatográficos das análises do lansoprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso

% Água	CSP-1						CSP-2						CSP-3					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
0	0,48	-0,32	-	-	1,00	-	0,91	-0,04	-	-	1,00	-	1,09	0,04	1,32	0,121	1,21	1,12
5	0,35	-0,46	-	-	1,00	-	0,80	-0,10	-	-	1,00	-	1,12	0,05	-	-	1,00	-
10	0,29	-0,54	-	-	1,00	-	0,91	-0,04	-	-	1,00	-	1,06	0,02	-	-	1,00	-
15	0,31	-0,51	-	-	1,00	-	0,93	-0,03	-	-	1,00	-	0,99	-0,004	-	-	1,00	-
20	0,36	-0,44	-	-	1,00	-	1,06	0,02	-	-	1,00	-	1,07	0,03	-	-	1,00	-
25	0,45	-0,35	-	-	1,00	-	1,28	0,11	-	-	1,00	-	1,22	0,08	-	-	1,00	-
30	0,52	-0,28	0,60	-0,22	1,15	RP	1,66	0,22	-	-	1,00	-	1,43	0,15	-	-	1,00	-
35	0,70	-0,15	0,84	-0,08	1,20	RP	2,25	0,35	-	-	1,00	-	1,72	0,24	-	-	1,00	-
40	1,00	0,000	1,21	0,08	1,21	RP	3,04	0,48	-	-	1,00	-	1,91	0,28	-	-	1,00	-
45	1,48	0,17	1,82	0,26	1,23	0,80	4,14	0,62	-	-	1,00	-	2,22	0,35	-	-	1,00	-
50	1,97	0,29	2,47	0,39	1,25	0,83	6,96	0,84	-	-	1,00	-	2,96	0,47	-	-	1,00	-
55	4,50	0,65	5,63	0,75	1,25	0,92	11,3	1,05	-	-	1,00	-	4,37	0,64	-	-	1,00	-
60	8,77	0,94	11,0	1,04	1,25	0,97	22,0	1,34	-	-	1,00	-	7,19	0,86	-	-	1,00	-
65	20,0	1,30	25,0	1,40	1,25	1,05	-	-	-	-	-	-	15,5	1,19	-	-	1,00	-
70	35,4	1,55	46,2	1,66	1,31	1,10	-	-	-	-	-	-	35,3	1,55	-	-	1,00	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36,9	1,57	-	-	1,00	-

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

TABELA 3.13. Parâmetros cromatográficos das análises do omeprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso.

% Água	CSP-1						CSP-2						CSP-3					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
0	1,30	0,11	1,60	0,20	1,23	RP	1,34	0,13	1,68	0,22	1,25	0,90	1,18	0,07	1,41	0,149	1,19	RP
5	0,89	-0,05	-	-	1,00	-	1,02	0,01	1,42	0,15	1,39	1,15	1,15	0,06	-	-	1,00	-
10	0,88	-0,06	-	-	1,00	-	1,03	0,01	1,46	0,16	1,42	1,26	1,05	0,02	-	-	1,00	-
15	0,87	-0,06	-	-	1,00	-	1,00	0,00	1,45	0,16	1,45	1,31	0,98	-0,01	-	-	1,00	-
20	0,98	-0,01	-	-	1,00	-	1,07	0,03	1,61	0,21	1,50	1,68	1,03	0,01	-	-	1,00	-
25	1,15	0,06	-	-	1,00	-	1,22	0,09	1,90	0,28	1,56	1,66	1,16	0,06	-	-	1,00	-
30	1,42	0,15	-	-	1,00	-	1,49	0,17	2,39	0,38	1,60	1,75	1,33	0,12	-	-	1,00	-
35	1,84	0,26	-	-	1,00	-	1,88	0,27	3,10	0,49	1,65	2,21	1,54	0,19	-	-	1,00	-
40	2,48	0,39	-	-	1,00	-	2,34	0,37	4,07	0,61	1,74	2,29	1,66	0,22	-	-	1,00	-
45	3,40	0,53	-	-	1,00	-	2,87	0,46	5,20	0,71	1,81	2,41	1,86	0,27	-	-	1,00	-
50	4,34	0,64	-	-	1,00	-	4,46	0,65	8,32	0,92	1,87	2,41	2,24	0,35	-	-	1,00	-
55	8,64	0,94	-	-	1,00	-	6,34	0,80	13,2	1,12	2,08	2,84	2,97	0,47	-	-	1,00	-
60	15,5	1,19	-	-	1,00	-	11,0	1,04	24,6	1,39	2,24	3,46	4,33	0,64	-	-	1,00	-
65	32,5	1,51	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	8,13	0,91	-	-	1,00	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,5	1,19	-	-	1,00	-

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

TABELA 3.14. Parâmetros cromatográficos das análises do pantoprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso.

% Água	CSP-1						CSP-2						CSP-3					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
0	1,33	0,12	-	-	1,00	-	2,93	0,47	-	-	1,00	-	5,05	0,70	5,88	0,77	1,16	1,70
5	0,96	-0,02	-	-	1,00	-	2,29	0,36	-	-	1,00	-	4,40	0,64	5,01	0,70	1,14	0,90
10	0,65	-0,19	-	-	1,00	-	2,16	0,33	-	-	1,00	-	3,78	0,58	4,23	0,63	1,12	0,83
15	0,65	-0,19	-	-	1,00	-	1,99	0,30	-	-	1,00	-	3,32	0,52	3,69	0,57	1,11	0,83
20	0,72	-0,14	-	-	1,00	-	2,00	0,30	-	-	1,00	-	3,22	0,51	3,55	0,55	1,10	0,80
25	0,72	-0,14	0,82	-0,09	1,00	RP	2,09	0,32	-	-	1,00	-	3,34	0,52	3,71	0,57	1,11	0,80
30	0,85	-0,07	1,00	0,00	1,00	RP	2,07	0,32	-	-	1,00	-	3,19	0,50	3,51	0,54	1,10	RP
35	1,07	0,03	1,28	0,11	1,00	RP	2,59	0,41	-	-	1,00	-	2,73	0,44	2,97	0,47	1,09	RP
40	1,43	0,15	1,74	0,24	1,00	RP	2,82	0,45	-	-	1,00	-	2,51	0,40	2,76	0,44	1,10	RP
45	2,00	0,30	2,45	0,39	1,00	RP	3,10	0,49	-	-	1,00	-	2,45	0,39	2,75	0,44	1,12	RP
50	2,48	0,39	3,13	0,50	1,00	RP	4,53	0,66	-	-	1,00	-	2,64	0,42	3,03	0,48	1,15	RP
55	5,29	0,72	6,66	0,82	1,26	0,90	6,67	0,82	-	-	1,00	-	3,00	0,48	3,48	0,54	1,16	RP
60	9,79	0,99	12,5	1,10	1,28	0,93	12,8	1,11	-	-	1,00	-	4,31	0,63	5,31	0,72	1,23	RP
65	17,8	1,25	23,0	1,36	1,29	0,94	17,8	1,25	-	-	1,00	-	7,73	0,89	9,86	1,00	1,28	RP
70	37,0	1,57	47,8	1,68	1,29	0,95	-	-	-	-	-	-	16,7	1,22	21,4	1,33	1,28	RP

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

TABELA 3.15. Parâmetros cromatográficos das análises do rabeprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso.

% Água	CSP-1						CSP-2						CSP-3					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
0	0,91	-0,04	-	-	1,00	-	1,21	0,08	-	-	1,00	-	1,32	0,12	1,65	0,21	1,25	0,90
5	0,65	-0,19	-	-	1,00	-	0,98	-0,01	-	-	1,00	-	1,26	0,10	-	-	1,00	-
10	0,46	-0,34	-	-	1,00	-	1,09	0,04	-	-	1,00	-	1,14	0,06	-	-	1,00	-
15	0,45	-0,35	-	-	1,00	-	1,03	0,01	-	-	1,00	-	1,07	0,03	-	-	1,00	-
20	0,49	-0,31	-	-	1,00	-	1,12	0,05	-	-	1,00	-	1,16	0,06	-	-	1,00	-
25	0,50	-0,30	0,57	-0,24	1,14	RP	1,28	0,11	-	-	1,00	-	1,15	0,06	1,30	0,11	1,13	RP
30	0,59	-0,23	0,69	-0,16	1,17	RP	1,58	0,20	-	-	1,00	-	1,36	0,13	1,55	0,19	1,14	RP
35	0,75	-0,12	0,89	-0,05	1,19	RP	2,02	0,30	-	-	1,00	-	1,52	0,18	1,74	0,24	1,14	RP
40	0,98	-0,01	1,18	0,07	1,20	RP	2,55	0,41	-	-	1,00	-	1,64	0,21	1,87	0,27	1,14	RP
45	1,31	0,12	1,60	0,20	1,22	RP	3,19	0,50	-	-	1,00	-	1,85	0,27	2,13	0,33	1,15	RP
50	1,60	0,20	1,98	0,30	1,24	RP	5,00	0,70	-	-	1,00	-	2,25	0,35	2,63	0,42	1,17	RP
55	3,33	0,52	4,11	0,61	1,23	0,87	7,74	0,89	-	-	1,00	-	3,04	0,48	3,56	0,55	1,17	RP
60	5,94	0,77	7,38	0,87	1,24	0,90	11,8	1,07	12,7	1,10	1,08	RP	4,67	0,67	5,40	0,73	1,16	RP
65	11,3	1,05	14,2	1,15	1,26	0,90	-	-	-	-	-	-	9,20	0,96	10,7	1,03	1,16	RP
70	21,1	1,32	26,7	1,43	1,27	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RP: resolução pobre: $R_s < 0,8$

TABELA 3.16. Parâmetros cromatográficos das análises do Ro 18-5364 nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3 no modo reverso.

% Água	CSP-1						CSP-2						CSP-3					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
0	0,75	-0,12	-	-	1,00	-	0,80	-0,10	-	-	1,00	-	1,29	0,11	1,59	-	1,23	RP
5	0,53	-0,28	-	-	1,00	-	0,79	-0,10	-	-	1,00	-	1,33	0,12	1,47	-	1,11	RP
10	0,37	-0,43	-	-	1,00	-	0,86	-0,07	-	-	1,00	-	1,37	0,14	-	-	1,00	-
15	0,37	-0,43	-	-	1,00	-	0,85	-0,07	-	-	1,00	-	1,3	0,11	-	-	1,00	-
20	0,43	-0,37	-	-	1,00	-	0,93	-0,03	-	-	1,00	-	1,29	0,11	1,40	0,15	1,09	RP
25	0,52	-0,28	-	-	1,00	-	1,08	0,03	-	-	1,00	-	1,44	0,16	1,60	0,20	1,11	RP
30	0,67	-0,17	-	-	1,00	-	1,19	0,08	-	-	1,00	-	1,65	0,22	1,84	0,26	1,12	RP
35	0,79	-0,10	0,92	-0,04	1,00	-	1,52	0,18	1,76	0,25	1,16	RP	1,79	0,25	1,93	0,29	1,08	RP
40	1,10	0,04	1,34	0,13	1,22	RP	1,92	0,28	2,32	0,36	1,21	RP	1,93	0,29	-	-	1,00	-
45	1,62	0,21	2,01	0,30	1,24	0,80	2,44	0,39	3,03	0,48	1,24	RP	2,25	0,35	-	-	1,00	-
50	2,21	0,34	2,81	0,45	1,27	0,83	4,17	0,62	5,19	0,71	1,24	RP	2,95	0,47	-	-	1,00	-
55	5,19	0,71	6,61	0,82	1,27	0,90	7,25	0,86	9,16	0,96	1,26	RP	4,23	0,63	-	-	1,00	-
60	10,7	1,03	16,0	1,20	1,50	0,91	15,3	1,18	19,1	1,28	1,25	RP	7,64	0,88	-	-	1,00	-
65	23,0	1,36	30,0	1,48	1,30	0,90	-	-	-	-	-	-	19,8	1,30	-	-	1,00	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

Ausência de discriminação quiral para os enantiômeros do lansoprazol foi verificada nas fases CSP-2 e CSP-3, em contrapartida, a CSP-1 apresentou indícios de separação com o aumento da concentração de água a partir de 30% ($0,8 \leq R_s \leq 1,10$ e $1,15 \leq \alpha \leq 1,31$). Os valores para o fator de retenção na CSP-3 foram superiores aos das demais fases, ressaltando a maior intensidade nas interações entre o analito e a fase quiral. No entanto, acima de 75% de água somente as fases CSP-1 e CSP-2 apresentaram maior interação com o analito, uma vez que não foi possível determinar os parâmetros cromatográficos devido ao tempo de análise ter sido superior a 200 minutos (*Tabela 3.12*).

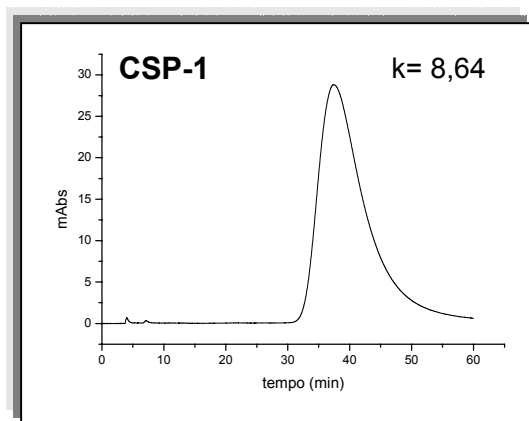
Através dos *Gráficos 3.3* e pela *Tabela 3.13*, constatou-se que a CSP-2 apresenta poder de discriminação quiral para os enantiômeros do omeprazol em todas as proporções de fases móveis analisadas ($0,9 \leq R_s \leq 3,46$ e $1,25 \leq \alpha \leq 2,24$). À medida que a concentração de água aumenta, ocorre em paralelo o aumento da resolução enantiomérica e do fator de separação, verificados pelos valores de R_s e α respectivamente. As fases CSP-1 e CSP-3, no entanto, apresentaram indícios de separação somente no modo polar-orgânico ($R_s \leq 0,8$).

A CSP-3 mostrou indícios de discriminação quiral para os enantiômeros do pantoprazol em toda extensão de fase móvel analisada, no entanto, ao contrário do observado para o omeprazol, o poder de discriminação diminuiu com o aumento da concentração de água ($0,8 \leq R_s \leq 1,70$ e $\alpha \leq 1,28$). Na CSP-1, baixos valores de resolução tiveram início com 25% de água e se estenderam até 70% ($0,8 \leq R_s \leq 0,95$ e $\alpha \leq 1,29$), enquanto que na CSP-2 não foi verificado nenhuma separação para os enantiômeros do pantoprazol (*Tabela 3.14*).

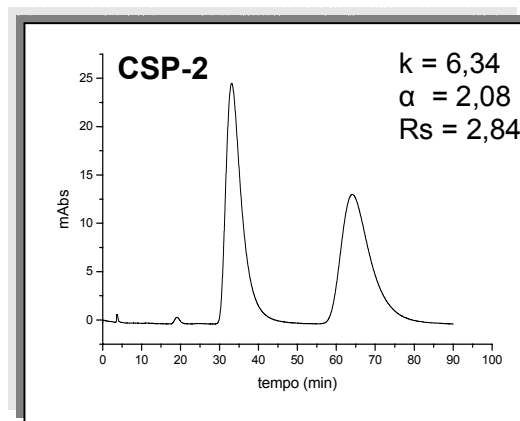
Baixa capacidade de resolução para os enantiômeros do rabeprazol foi verificada a partir de 25% de água nas fases CSP-1 e CSP-3 ($R_s \leq 0,90$ e $\alpha \leq 1,27$) e com 60% deste solvente na CSP-2 ($0,8 \leq R_s$). No modo polar-orgânico somente a CSP-3 apresentou baixo poder de resolução ($R_s = 0,90$ e $\alpha = 1,25$) (*Tabela 3.15*).

No intervalo de 35-60% de água na CSP-2 e a partir de 40% na CSP-1 foram verificados apenas indícios de separação para os enantiômeros do Ro 18-5364 ($R_s \leq 0,91$ e $\alpha \leq 1,48$). Indicativos de discriminação quiral na CSP-3 ($R_s \leq 0,8$ e $\alpha \leq 1,23$), tiveram início no modo polar-orgânico e ocorreram até a adição de 5% de água, sendo verificados novamente no intervalo de 20%-35%, pois acima desta concentração a fase quiral perdeu o poder de resolução desses enantiômeros, nesta composição de fase móvel (*Tabela 3.16*).

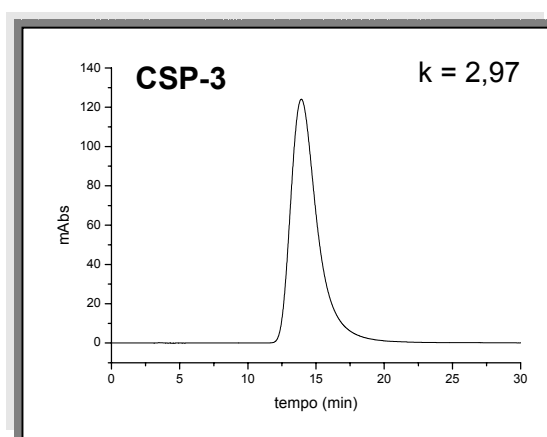
O poder de discriminação diferenciado das fases estacionárias de polissacarídeos pode ser visualizado através dos cromatogramas para a enantiorresolução do omeprazol (Cromatogramas 3.1 a, b e c) e rabeprazol (Cromatogramas 3.2 a, b e c) no modo reverso de eluição.



(a)



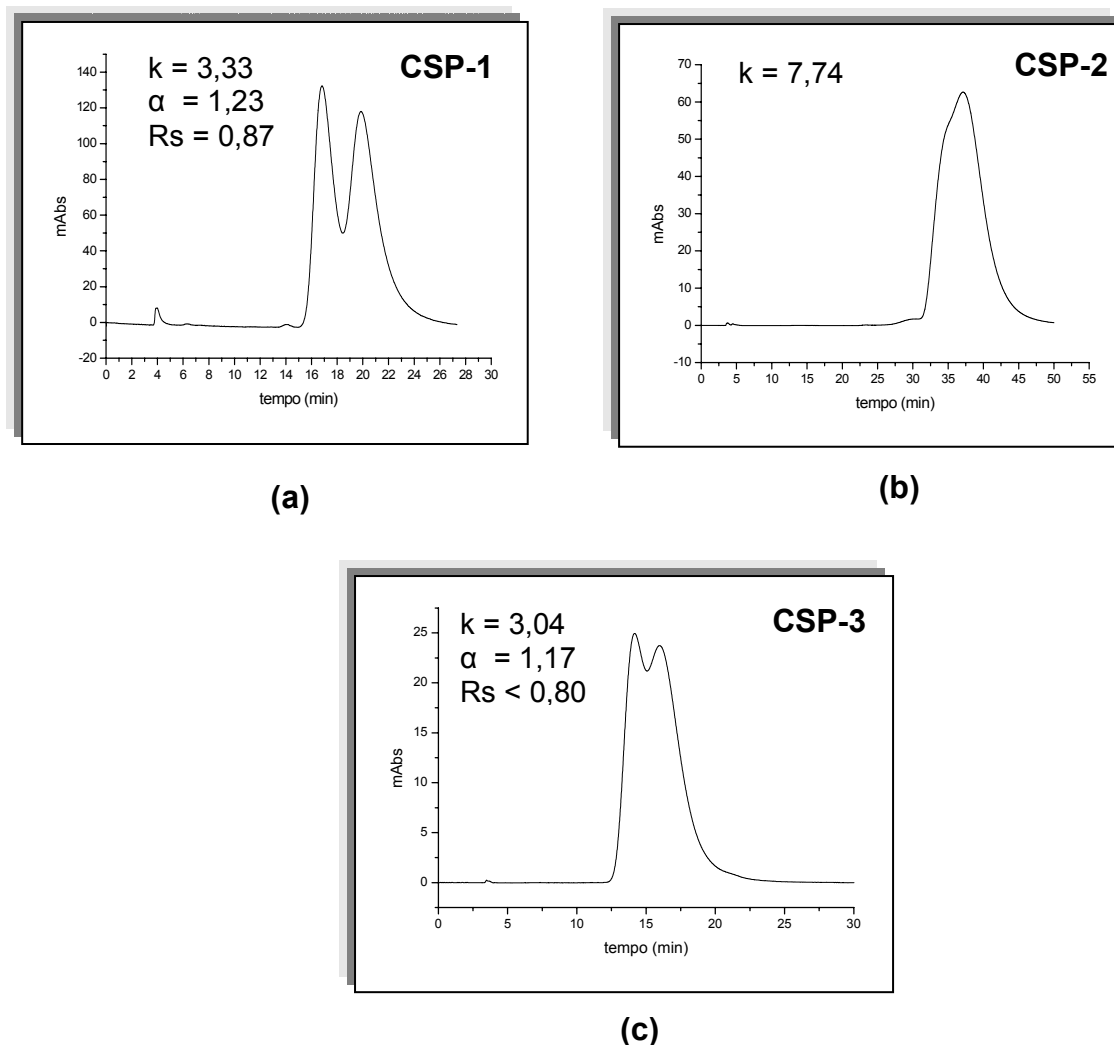
(b)



(c)

CROMATOGRAMAS 3.1. Análises da mistura racêmica do omeprazol: (a) Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1); (b) Coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2); (c) Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3); em APS-Nucleosil (500 Å, 7 μm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Fase Móvel: etanol/água (45:55 v/v); Vazão: 0,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 μL e λ :302 nm.

Como observado, a CSP-2 mostrou excelente poder de discriminação para os enantiômeros do omeprazol, enquanto que as fases CSP-1 e CSP-2 não apresentaram nenhuma capacidade de resolução. Banda cromatográfica larga foi observada na CSP-1 e CSP-2.



CROMATOGRAMAS 3.2. Análises da mistura racêmica do rabeprazol: (a) Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1); (b) Coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2); (c) Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3) ; em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Fase Móvel: etanol/água (45:55 v/v); Vazão: 0,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm.

Ao analisar os cromatogramas da enantiorresolução do omeprazol e do rabeprazol verifica-se que o poder de discriminação quiral depende do tipo de seletor e do composto quiral a ser resolvido. A excelente resolução enantiomérica do

omeprazol na CSP-2 contrapõe a ausência de discriminação para os enantiômeros do rabeprazol com a mesma composição de fase móvel.

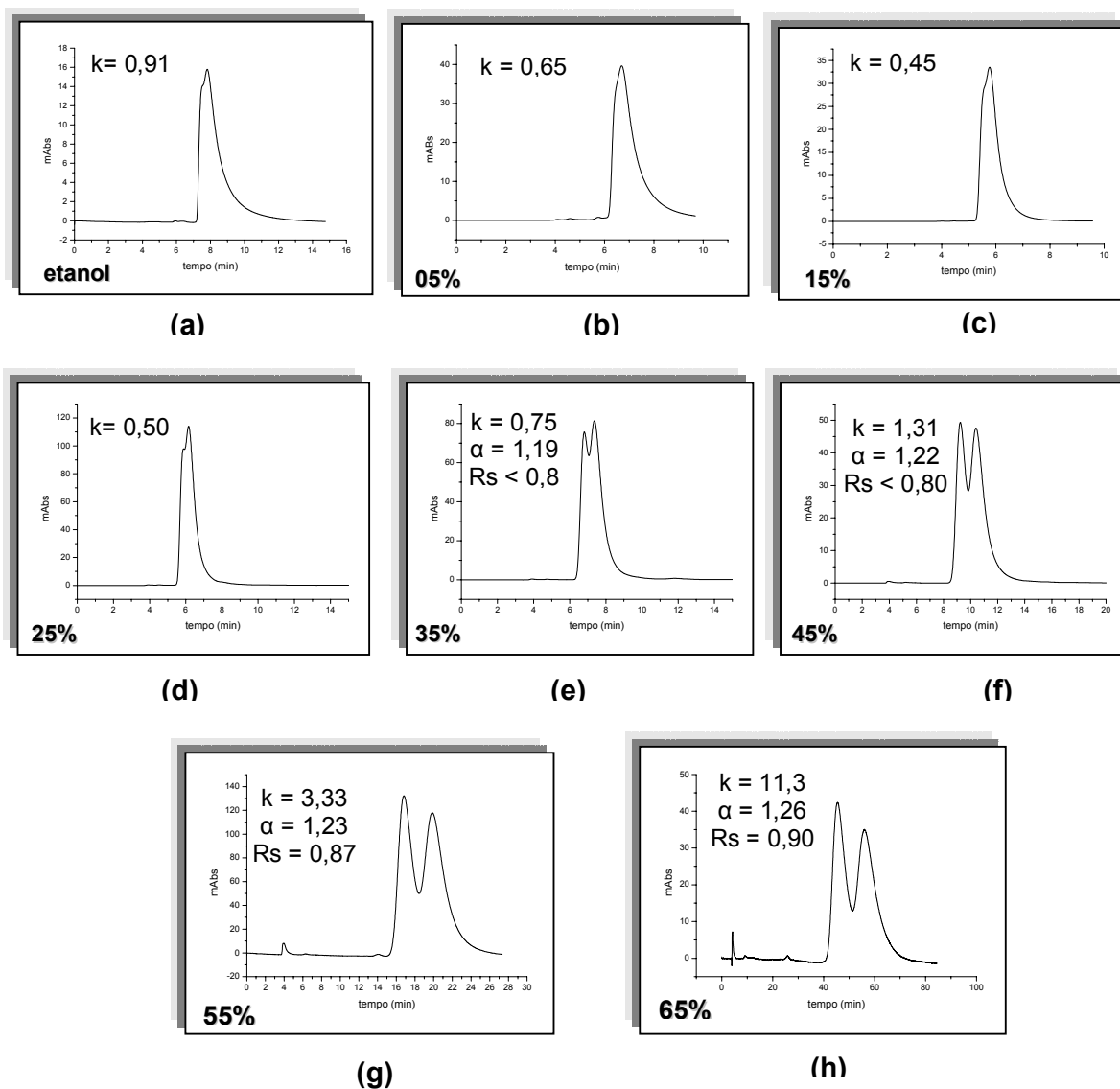
Os indícios de separação para os enantiômeros do rabeprazol na CSP-1 e CSP-2 e a ausência de resolução para os enantiômeros do omeprazol, nestas fases, também reafirmam a importância do tipo de seletor escolhido para a enantiorresolução.

Através da realização do estudo sistematizado, no modo reverso de eluição, mediante variação da concentração do modificador orgânico, etanol, verifica-se pelos valores dos parâmetros cromatográficos que o tipo de seletor quiral e a composição da fase móvel influenciam na resolução enantiomérica. De modo que, alterações nas enantiosseparações e enantiorresoluções também são conseguidas pelas variações na composição e no tipo das fases móveis utilizadas^{32,34}. No caso deste estudo, houve a variação sistemática somente da concentração de etanol, não sendo possível avaliar a influência de outros modificadores na capacidade de resolução destas fases quirais para estes compostos.

Enquanto a CSP-1 apresentou baixo poder de discriminação quiral dos enantiômeros do pantoprazol tendo etanol/água como fase móvel no intervalo de 25-70% de etanol ($0,8 \leq R_s \leq 0,91$ e $\alpha \leq 1,29$), num trabalho realizado em nosso grupo, esta mesma fase estacionária mostrou excelente capacidade de resolução destes enantiômeros com fase móvel composta de metanol/água (50:50 v/v) ($R_s = 3,85$ e $\alpha = 1,58$)³². Tal fato enfatiza a importância do eluente no processo de discriminação quiral.

O comportamento da capacidade de discriminação quiral frente à variação da composição da fase móvel pode ser visualizado pelos *Cromatogramas 3.3 a-h*. Estes cromatogramas ilustram o discreto aparecimento da discriminação quiral dos enantiômeros do rabeprazol na CSP-1, a partir de 35% de água. Com o aumento da concentração de água o fator de separação passou de 1,19 para 1,26 e fator de resolução de $R_s < 0,8$ para 0,90.

Um outro ponto a ser considerado na análise destes gráficos é a diminuição do fator de retenção, ao ser iniciado o modo reverso de eluição. Esta diminuição ocorre até a adição de 15% de água no sistema, havendo mudança de retenção no intervalo de 15-25% onde as interações hidrofóbicas começam a reger o processo de retenção cromatográfica.



CROMATOGRAMAS 3.3. Análises da mistura racêmica do rabeprazol: Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1) em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Vazão: 0,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL ; λ:289 nm; Fase Móvel: etanol/água: (a) etanol, (b) 05% água, (c) 15% água, (d) 25% água, (e) 35% água, (f) 45% água, (g) 55% água e (h) 65% água.

3.3. Análise sistemática no modo normal de eluição

A fase móvel em cromatografia quiral tem um papel crucial nos processos de interação, de modo que alterações na sua composição afetam os tempos de retenção, a enantiosseletividade e enantiorresolução das fases quirais tanto em escala analítica quanto em preparativa^{32,34,95}.

No que diz respeito às separações em escala preparativa, a composição da fase móvel afeta não somente os parâmetros cromatográficos, mas também a solubilidade dos racematos. Enquanto que em cromatografia analítica, o modo reverso de eluição é o mais explorado, uma vez que permite a separação de uma grande variedade de solutos e o uso de fases móveis aquosas. Em cromatografia preparativa, o modo normal é o mais usado devido a melhor solubilidade dos racematos nas fases móveis que compõem este modo de eluição¹⁸. O modo polar-orgânico também é muito empregado em separações preparativas.

Em condições de modo normal a fase móvel é comumente constituída por misturas de solventes orgânicos, sem adição de água¹⁸, em geral, uma mistura de álcool e alcano. A redução do tempo de retenção ocorre com o aumento da concentração do modificador orgânico polar, devido ao maior número de ligações de hidrogênio possíveis entre o analito e a fase móvel⁴². Alcoois como metanol, etanol e isopropanol são os modificadores polares mais frequentemente aplicados nas análises cromatográficas no modo normal, em especial, nas fases de polissacarídeos, enquanto que diclorometano, acetato de etila e dioxano também são empregados nas fases quirais que toleram estes solventes⁹⁵.

O grande número de racematos enantiorresolvidos em colunas de polissacarídeos, no modo normal de eluição^{32,34,80,96}, e sua aplicação em cromatografia preparativa^{46,47,97} enfatizam a importância de se realizar uma análise sistemática do comportamento de retenção neste modo de eluição.

O estudo sistematizado foi realizado pela variação da composição da fase móvel de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% a 100% v/v de etanol em hexano.

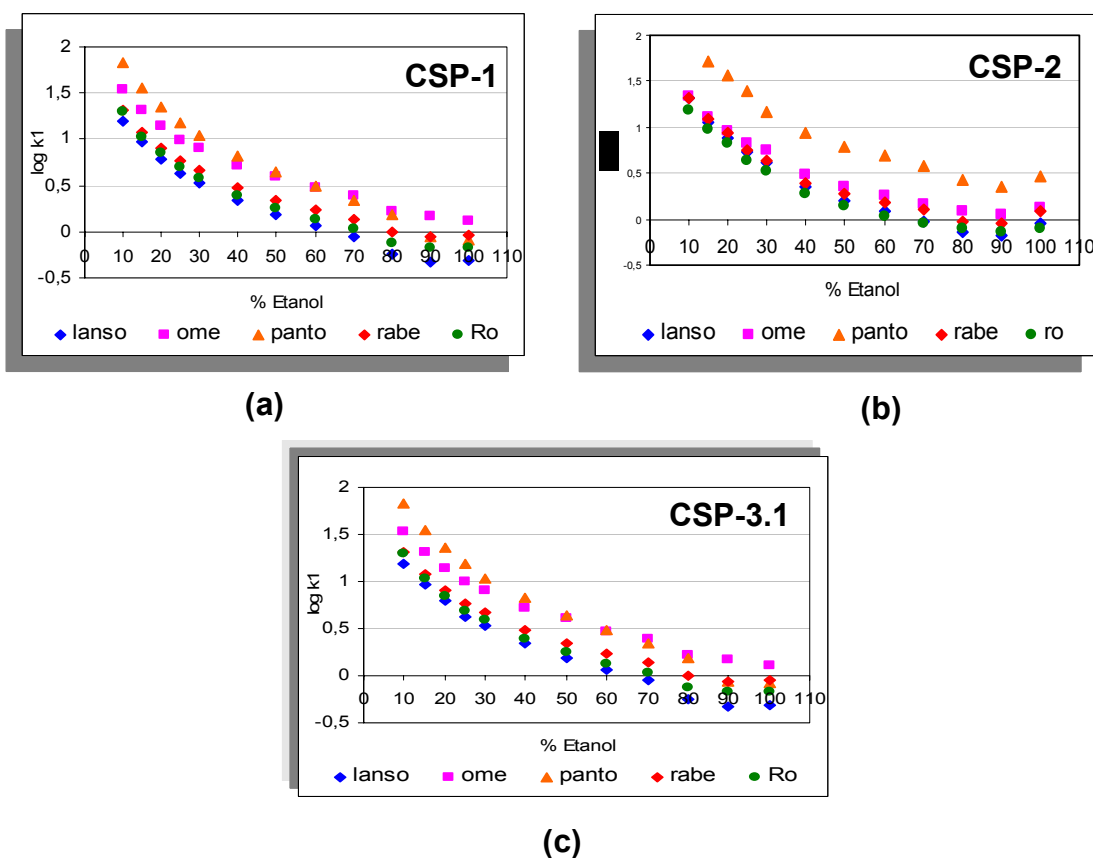
A série homóloga dos inibidores da bomba de prótons (*Figura 1.11*) também foi empregada neste estudo, pois através dos resultados obtidos, seria

possível realizar um estudo comparativo da capacidade de discriminação quiral destas fases de polissacarídeos nos três modos de eluição.

Foi realizado em nosso grupo de pesquisa um trabalho envolvendo os compostos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, em colunas de polissacarídeos, sob eluição multimodal ³². Através dos valores obtidos para o fator de retenção na fase móvel hexano/etanol (70:30 v/v), no referido trabalho, foi selecionada a vazão de 1 mL.min⁻¹, a fim de tornar possível a determinação dos parâmetros cromatográficos em todas as proporções da fase móvel neste estudo sistemático.

A CSP-3 empregada no estudo sistemático no modo reverso foi substituída pela CSP-3.1, pois apresentava pressão elevada, fato que poderia comprometer os futuros resultados.

Os fatores de retenção para a série de compostos avaliados, nas fases quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1, podem ser verificados pela análise dos *Gráficos 3.4 a, b e c*, onde os valores de $\log k_1$ versus a concentração de etanol são apresentados.

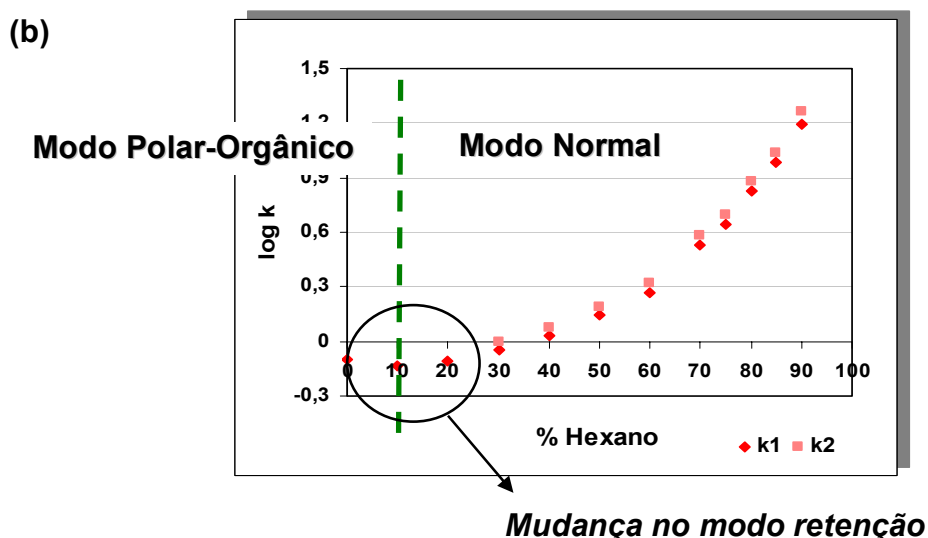
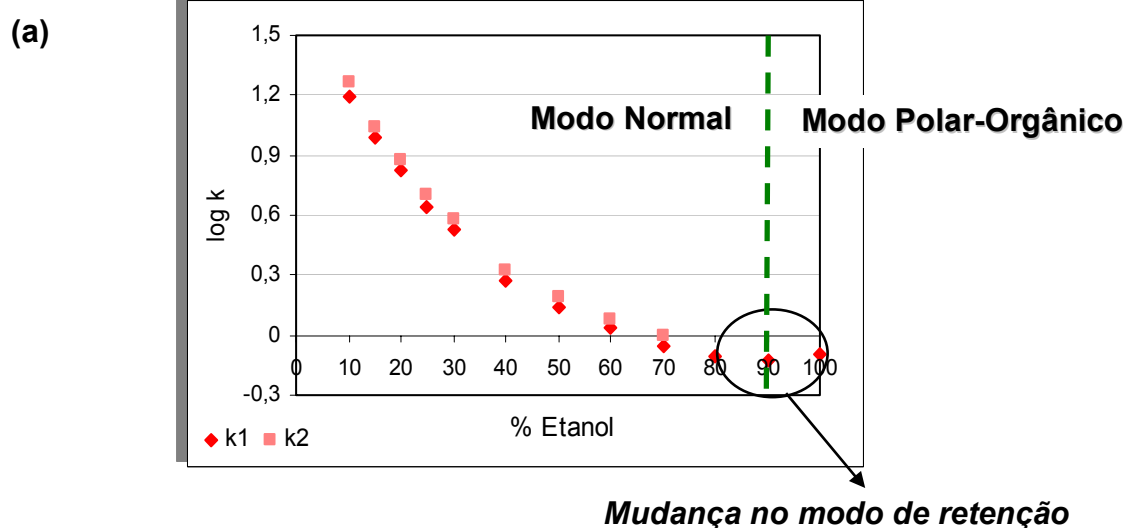


GRÁFICOS 3.4. Relação entre $\log k_1$ versus porcentagem de etanol nas colunas quirais sob condições de modo normal de eluição: (a) CSP-1; (B) CSP-2 e (c) CSP-3.1.

Pelos *Gráficos 3.4 a, b e c*, verifica-se que o comportamento de retenção é similar, para a séria homóloga analisada, nas três fases estacionárias quirais de polissacarídeos.

Com o aumento da concentração de etanol na fase móvel, verifica-se a diminuição do fator de retenção expresso em logaritmo. Ao se aproximar do modo polar-orgânico (baixas concentração de hexano), a certa concentração de etanol, o tempo de retenção volta a aumentar até atingir 100% de etanol.

Os *Gráficos 3.5 a e b* ilustram a mudança no perfil de retenção durante a variação da concentração de etanol para o composto Ro 18-5364.



GRÁFICOS 3.5. Perfil de retenção para o Ro 18-5364 na CSP-2 sob condições de modo normal de eluição: (a) $\log k$ versus concentração de etanol, (b) $\log k$ versus concentração de hexano, onde k_1 = 1º enantiômero e k_2 = 2º enantiômero.

Iniciando a análise com fase móvel composta por 90% de hexano, à medida que a concentração de etanol aumenta ocorre diminuição das interações repulsivas entre a parte polar do analito e as moléculas de hexano, havendo uma maior afinidade do analito com a fase móvel e, conseqüente diminuição do fator de retenção. Esta diminuição ocorre até certa concentração de etanol, pois após esta, a retenção deixa de apresentar perfil de modo normal, aumentando a retenção do analito (*Gráfico 3.5 a*).

Estando inicialmente no modo polar-orgânico, com 100% de etanol, com a adição de hexano na fase móvel era de se esperar o aumento do tempo de retenção em decorrência do enfraquecimento da fase móvel e pela presença de interações repulsivas entre o analito e o hexano. No entanto, em baixas concentrações de hexano se observa somente uma diminuição discreta dos fatores de retenção. Isto acontece até determinada porcentagem de hexano a partir do qual a retenção adquire perfil de modo normal (*Gráfico 3.5 b*).

Pelos *Gráficos 3.4 a, b e c* é possível observar que a mudança de retenção é mais evidente nas fases CSP-1 e CSP-2, onde mesmo sob condições de modo normal apresenta retenção de modo polar-orgânico. Em contrapartida, na CSP-3.1 esta mudança ocorre mais próxima a uma composição de fase móvel polar-orgânica.

A concentração de modificador orgânico necessária para interceptar a mudança entre os dois tipos de retenção, modo normal e modo polar-orgânico, sob condições de modo normal de eluição foi determinada para todos os compostos em todas as fases quirais.

Foram obtidas as equações de segundo grau considerando a variação da concentração de etanol. Os parâmetros avaliados foram: n número de variáveis, r^2 coeficiente de ajuste da reta, s desvio padrão, F teste de Fisher e Q^2 capacidade de predição do modelo quando um composto é excluído do modelo original.

A porcentagem de etanol na fase móvel responsável pela interceptação dos dois tipos de comportamentos de retenção, considerando o intervalo de variação, foi expressa pelo *ponto mínimo da reta*.

TABELA 3.17. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-1, para os cinco compostos quirais, sob condições de modo normal de eluição.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	Ponto mínimo Φ _{EIOH}	Pt. mín. exp Φ _{EIOH}
lansoprazol	$\log k = 1,52 \times 10^{-4} (\pm 5,0 \times 10^{-4}) \Phi_{EIOH}^2 - 3,26 \times 10^{-2} (\pm 5,5 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 1,42 (\pm 0,12)$	12	514	0,053	0,992	0,984	107 (93,7/134)	90
omeprazol	$\log k = 2,0 \times 10^{-4} (\pm 3,6 \times 10^{-5}) \Phi_{EIOH}^2 - 3,58 \times 10^{-2} (\pm 3,9 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 1,81 (\pm 8,6 \times 10^{-2})$	12	816	0,038	0,994	0,989	89,6 (83,8/97,8)	100
	$\log k = 1,52 \times 10^{-4} (\pm 4,7 \times 10^{-5}) \Phi_{EIOH}^2 - 3,07 \times 10^{-2} (\pm 5,2 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 1,78 (\pm 0,11)$	12	452	0,050	0,990	0,978	101 (89,3/123)	100
pantoprazol	$\log k = 1,44 \times 10^{-4} (\pm 6,7 \times 10^{-5}) \Phi_{EIOH}^2 - 3,55 \times 10^{-2} (\pm 7,4 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 2,05 (\pm 0,16)$	12	421	0,071	0,990	0,979	124 (101/186)	100
	$\log k = 1,54 \times 10^{-4} (\pm 9,6 \times 10^{-5}) \Phi_{EIOH}^2 - 3,66 \times 10^{-2} (\pm 9,6 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 2,12 (\pm 0,19)$	11	306	0,076	0,988	0,957	119 (91,4/135)	90
rabeprazol	$\log k = 1,71 \times 10^{-4} (\pm 4,7 \times 10^{-5}) \Phi_{EIOH}^2 - 3,28 \times 10^{-2} (\pm 5,2 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 1,54 (\pm 0,11)$	12	468	0,050	0,990	0,981	96,1 (86,5/113)	90
	$\log k = 1,77 \times 10^{-4} (\pm 6,7 \times 10^{-5}) \Phi_{EIOH}^2 - 3,34 \times 10^{-2} (\pm 6,7 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 1,59 (\pm 0,13)$	11	369	0,053	0,990	0,974	94,6 (81,6/123)	90
Ro 18-5364	$\log k = 1,81 \times 10^{-4} (\pm 5,2 \times 10^{-4}) \Phi_{EIOH}^2 - 3,48 \times 10^{-2} (\pm 5,7 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 1,52 (\pm 0,13)$	12	431	0,055	0,990	0,978	96,2 (86,2/114)	100
	$\log k = 2,22 \times 10^{-4} (\pm 6,4 \times 10^{-4}) \Phi_{EIOH}^2 - 4,03 \times 10^{-2} (\pm 7,3 \times 10^{-3}) \Phi_{EIOH} + 2,25 (\pm 0,17)$	11	335	0,058	0,988	0,978	90,8 (82,5/105)	90

TABELA 3.18. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-2, para os cinco compostos quirais, sob condições de modo normal de eluição.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	Ponto mínimo φ _{EtOH}	Pt. mín. exp φ _{EtOH}
lansoprazol	$\log k = 2,47 \times 10^{-4} (\pm 4,2 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 4,19 \times 10^{-2} (\pm 4,6 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 1,65 (\pm 0,10)$	12	706	0,045	0,994	0,986	84,9 (80,0/91,7)	90
omeprazol	$\log k = 2,10 \times 10^{-4} (\pm 3,3 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 3,60 \times 10^{-2} (\pm 3,6 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 1,62 (\pm 0,08)$	12	869	0,035	0,994	0,990	85,8 (81,1/92,2)	90
	$\log k = 2,0 \times 10^{-4} (\pm 3,6 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 3,58 \times 10^{-2} (\pm 3,9 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 1,81 (\pm 0,08)$	12	816	0,038	0,994	0,989	89,6 (83,8/97,8)	90
pantoprazol	$\log k = 2,22 \times 10^{-4} (\pm 6,4 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 4,03 \times 10^{-2} (\pm 7,3 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 2,25 (\pm 0,21)$	11	335	0,058	0,988	0,978	90,8 (82,5/105)	90
rabeprazol	$\log k = 2,37 \times 10^{-4} (\pm 4,1 \times 10^{-5}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 3,94 \times 10^{-2} (\pm 4,5 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 1,63 (\pm 0,10)$	12	610	0,044	0,992	0,987	83,0 (78,3/89,6)	90
Ro 18-5364	$\log k = 2,34 \times 10^{-4} (\pm 3,1 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 3,93 \times 10^{-2} (\pm 3,4 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 1,52 (\pm 0,07)$	12	1127	0,033	0,996	0,992	84,0 (80,2/88,9)	90
	$\log k = 3,20 \times 10^{-4} (\pm 5,3 \times 10^{-4}) \varphi_{\text{EtOH}}^2 - 4,60 \times 10^{-2} (\pm 4,2 \times 10^{-3}) \varphi_{\text{EtOH}} + 1,67 (\pm 0,07)$	9	1867	0,021	0,998	0,993	72,0 (67,2/78,5)	70

TABELA 3.19. Equações pertinentes ao estudo do perfil de retenção na CSP-3.1, para os cinco compostos quirais, sob condições de modo normal de eluição.

Composto	Equação	n	F	s	r ²	Q ²	Ponto mínimo φ _{EiOH}	Pt. mín. exp φ _{EiOH}
lansoprazol	$\log k = 1,68 \times 10^{-4} (\pm 6,5 \times 10^{-5}) \varphi_{EiOH}^2 - 3,19 \times 10^{-2} (\pm 7,1 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,06 (\pm 0,16)$	12	228	0,069	0,980	0,949	95,1 (82,9/122)	100
	$\log k = 1,92 \times 10^{-4} (\pm 7,1 \times 10^{-4}) \varphi_{EiOH}^2 - 3,60 \times 10^{-2} (\pm 7,8 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,51 (\pm 0,17)$	12	234	0,075	0,982	0,950	93,6 (82,2/118)	100
omeprazol	$\log k = 6,3 \times 10^{-4} (\pm 4,8 \times 10^{-5}) \varphi_{EiOH}^2 - 2,89 \times 10^{-2} (\pm 5,3 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,09 (\pm 0,12)$	12	289	0,051	0,984	0,963	88,7 (80,1/104)	100
	$\log k = 1,69 \times 10^{-4} (\pm 4,6 \times 10^{-5}) \varphi_{EiOH}^2 - 2,99 \times 10^{-2} (\pm 5,1 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,25 (\pm 0,11)$	12	336	0,049	0,986	0,969	88,6 (80,6/102)	100
pantoprazol	$\log k = 1,96 \times 10^{-4} (\pm 6,0 \times 10^{-5}) \varphi_{EiOH}^2 - 3,67 \times 10^{-2} (\pm 6,6 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,56 (\pm 0,15)$	12	340	0,064	0,986	0,966	93,8 (83,8/112)	100
	$\log k = 1,89 (\pm 5,7 \times 10^{-5}) \varphi_{EiOH}^2 - 3,63 \times 10^{-2} (\pm 6,2 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,89 (\pm 0,14)$	12	396	0,060	0,988	0,973	96,1 (85,8/115)	100
rabeprazol	$\log k = 1,59 \times 10^{-4} (\pm 6,0 \times 10^{-5}) \varphi_{EiOH}^2 - 2,85 \times 10^{-2} (\pm 6,6 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,05 (\pm 0,15)$	12	183	0,064	0,976	0,940	89,7 (79,0/113)	100
	$\log k = 1,78 \times 10^{-4} (\pm 5,6 \times 10^{-5}) \varphi_{EiOH}^2 - 3,13 \times 10^{-2} (\pm 6,1 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,37 (\pm 0,13)$	12	249	0,059	0,982	0,954	87,9 (79,2/104)	100
Ro 18-5364	$\log k = 1,85 \times 10^{-4} (\pm 6,0 \times 10^{-4}) \varphi_{EiOH}^2 - 3,19 \times 10^{-2} (\pm 6,6 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,03 (\pm 0,14)$	12	213	0,063	0,980	0,946	86,3 (77,7/103)	100
	$\log k = 1,93 \times 10^{-4} (\pm 5,4 \times 10^{-4}) \varphi_{EiOH}^2 - 3,32 \times 10^{-2} (\pm 5,9 \times 10^{-3}) \varphi_{EiOH} + 1,25 (\pm 0,13)$	12	277	0,057	0,992	0,960	85,9 (78,2/99,0)	100

Os resultados teóricos e experimentais referentes à concentração de etanol necessária para interceptar a mudança de retenção nas colunas quirais sob condições de modo normal, estão dispostos na *Tabela 3.20*.

TABELA 3.20. Dados teóricos e experimentais referentes à porcentagem de etanol que intercepta a mudança do modo de retenção, para os cinco compostos, nas três fases estacionárias sob condições de modo normal.

Compostos	CSP-1		CSP-2		CSP-3.1	
	Ponto mínimo (Φ_{EtOH})(%)	Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH})(%)	Ponto mínimo (Φ_{EtOH})(%)	Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH})(%)	Ponto mínimo (Φ_{EtOH})(%)	Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH})(%)
lansoprazol	107 (93,7/134)	90	84,9 (80,0/91,7)	90	95,1 (82,9/122)	100
					93,6 (82,2/118)	100
omeprazol	89,6 (83,8/97,8)	100	85,8 (81,1/92,2)	90	88,7 (80,1/104)	100
	101 (89,3/123)	100	89,6 (83,8/97,8)	90	88,6 (80,6/102)	100
pantoprazol	124 (101/186)	100	90,8 (82,5/105)	90	93,8 (83,8/112)	100
	119 (91,4/135)	90			96,1 (85,8/115)	100
rabeprazol	96,1 (86,5/113)	90	83,0 (78,3/89,6)	90	89,7 (79,0/113)	100
	94,6 (81,6/123)	90			87,9 (79,2/104)	100
Ro 18-5364	96,2 (86,2/114)	100	84,0 (80,2/88,9)	90	86,3 (77,7/103)	100
	90,8 (82,5/105)	90	72,0 (67,2/78,5)	70	85,9 (78,2/99,0)	100

Os resultados experimentais, considerando o intervalo de confiança, estão em concordância com os obtidos pelas equações. As diferenças observadas,

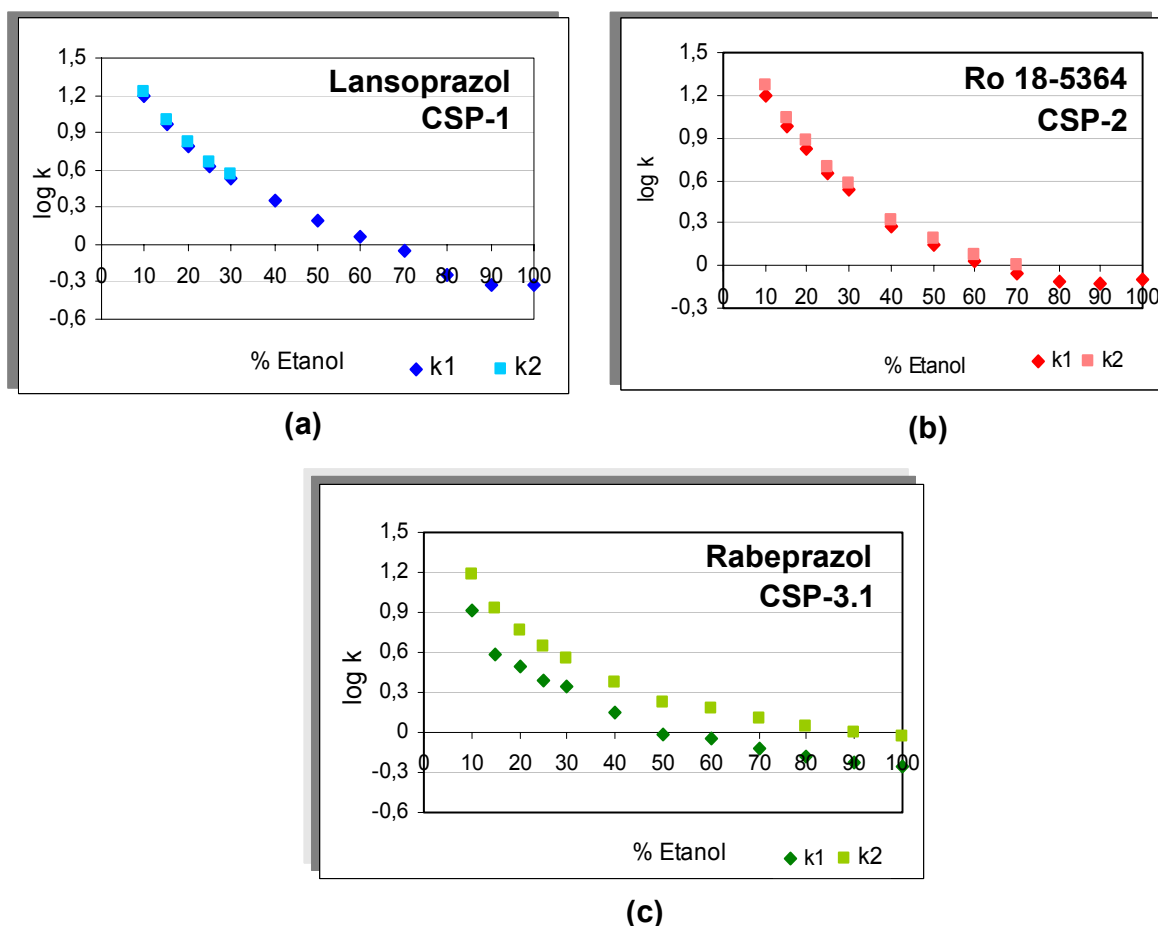
entre as concentrações de etanol, foram aquelas decorrentes, da alteração de retenção dos analitos nas diferentes fases quirais.

No intervalo experimental entre 90-100% de etanol na CSP-1 os dois modos de retenção são interceptados. Abaixo deste valor a retenção cromatográfica é regida pelo modo normal e acima a retenção apresenta perfil de polar-orgânico. É possível observar que o intervalo de confiança considerado para a maioria dos enantiômeros ou mistura racêmica é amplo, ressaltando as elevadas concentrações de etanol necessárias para alterar o modo de eluição, e inferindo, talvez, na incapacidade da CSP-1 em discriminar as pequenas mudanças na composição da fase móvel.

Com a CSP-2 retenções de modo polar-orgânico ocorrem com aproximadamente 90% de etanol, para os cinco compostos, segundo análise dos dados teóricos e experimentais. Das três fases avaliadas a CSP-2 foi a que melhor ilustrou a alteração deste comportamento de retenção.

Segundo os dados teóricos, com a CSP-3.1 as alterações de comportamento ocorrem no intervalo entre 90-95% de etanol. O intervalo de confiança também se mostra amplo, mas os valores extremos de etanol necessários para a mudança de modos de retenção são menores quando comparados aos obtidos na CSP-1. Considerando os resultados experimentais, entretanto, com essa fase quiral não há mudança de perfil de retenção até 100% de etanol.

Os *Gráficos 3.6 a, b e c* exemplificam a mudança no comportamento de retenção da série de analitos, sob condições de modo normal, nas três fases quirais.



GRÁFICOS 3.6. Mudança no modo de retenção sob condições de modo normal de eluição: (a) CSP-1 para o lansoprazol, (b) CSP-2 para o Ro 18-5364 e (c) CSP-3.1 para o rabeprazol, onde k_1 = 1º enantiômero e k_2 = 2º enantiômero.

Considerando os resultados teóricos e intervalo de confiança, a mudança no modo de retenção é mais definida na seguinte ordem CSP-2, >CSP-3.1 >CSP-1 (*Tabela 3.21*).

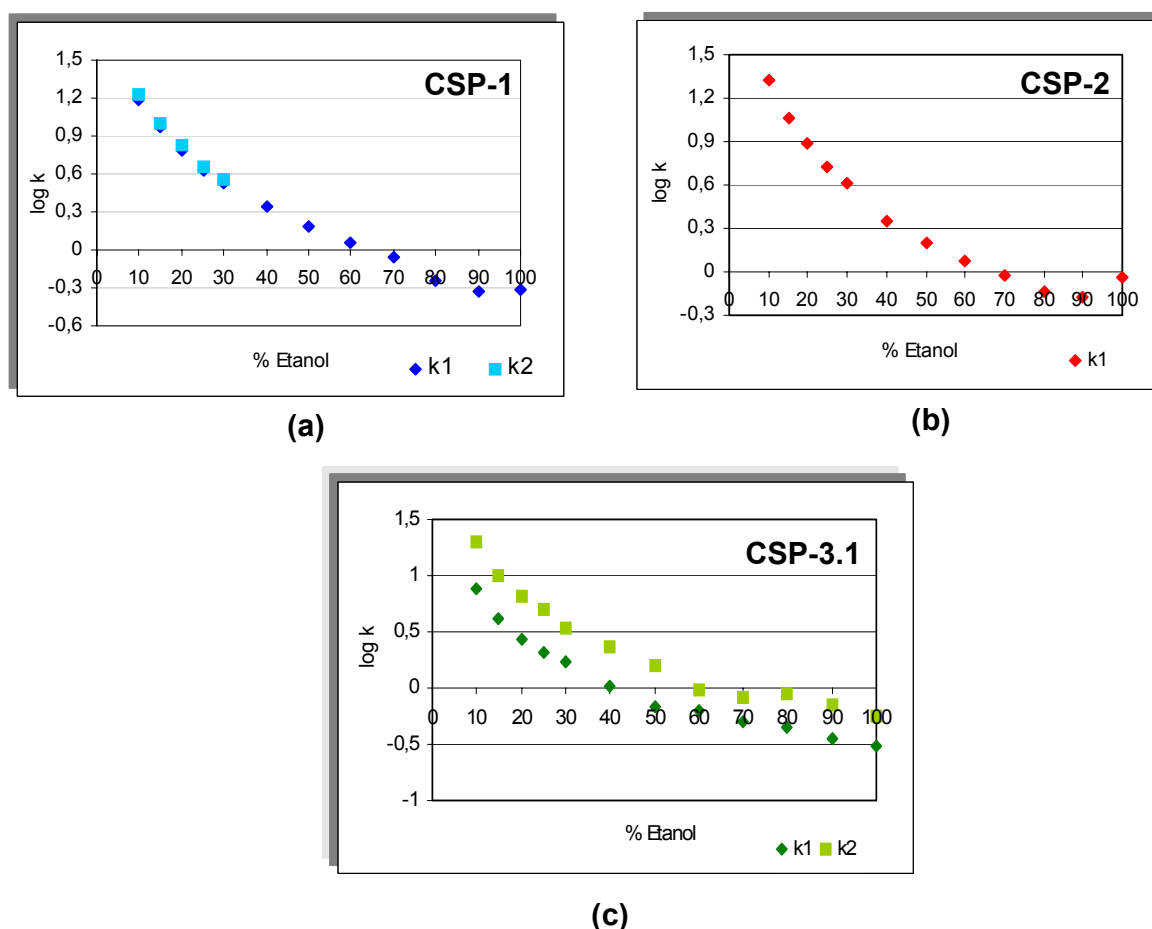
No entanto, ao serem considerados os resultados experimentais estas alterações de modo de retenção se tornam mais evidentes com a CSP-2, ocorrendo em aproximadamente 90% de etanol como modificador para os cinco compostos. Na CSP-1, a mudança de modo de eluição ocorre no intervalo de 90-100% de etanol, enquanto que na CSP-3.1 o modo de retenção não apresenta mudanças significativas até atingir 100% de etanol (*Tabela 3.21 e Gráficos 3.6 a, b e c*).

Esses efeitos causados pela adição (baixas concentrações) de hexano a álcoois (e vice-versa) têm sido relatados por outros autores⁴² e indicam que os

mecanismos de retenção/separação, que operam nos modos normal e polar orgânico, não diferem. Em ambos os modos de eluição, as interações decorrentes de ligações de hidrogênio são as predominantes. A capacidade da fase estacionária de polissacarídeo em formar ligações de hidrogênio com o analito e/ou fase móvel racionaliza as diferenças de retenção das fases quirais avaliadas⁹⁴.

3.4.1. Efeitos da fase estacionária e da composição da fase móvel no reconhecimento quiral sob condições de modo normal de eluição

Durante a realização da análise sistemática no modo normal de eluição, da mesma forma que foi observado para o modo reverso, o poder de discriminação quiral se mostrou distinto com estes seletores quirais. Os Gráficos 3.7 a, b e c, ilustram as diferentes capacidades de discriminação quiral destes seletores para a mistura racêmica do lansoprazol.



GRÁFICOS 3.7. Relação entre $\log k_1$ e $\log k_2$ dos enantiômeros do lansoprazol *versus* porcentagem de água nas três fases estacionárias de polissacarídeos: (a) CSP-1, (b) CSP-2 e (c) CSP-3.1.

Foram calculados os parâmetros cromatográficos de todas as análises e estes estão dispostos nas tabelas a seguir (*Tabela 3.21 – 3.25*).

TABELA 3.21. Parâmetros cromatográficos das análises do lansoprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição.

% Etanol	CSP-1						CSP-2						CSP-3.1					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
10	15,5	1,19	16,9	1,23	1,09	RP	21,2	1,33	-	-	1,00	-	7,57	0,88	19,7	1,29	2,60	7,06
15	9,36	0,97	10,0	1,00	1,07	RP	11,4	1,06	-	-	1,00	-	4,11	0,61	9,9	0,99	2,41	3,35
20	6,18	0,79	6,64	0,82	1,07	RP	7,72	0,89	-	-	1,00	-	2,67	0,43	6,66	0,82	2,49	3,26
25	4,26	0,63	4,57	0,66	1,07	RP	5,37	0,73	-	-	1,00	-	2,04	0,31	4,97	0,70	2,44	2,89
30	3,38	0,53	3,61	0,56	1,07	RP	4,06	0,61	-	-	1,00	-	1,69	0,23	3,38	0,53	2,00	2,84
40	2,22	0,35	-	-	1,00	-	2,21	0,34	-	-	1,00	-	1,04	0,02	2,37	0,37	2,28	2,44
50	1,54	0,19	-	-	1,00	-	1,58	0,20	-	-	1,00	-	0,69	-0,16	1,6	0,20	2,32	2,08
60	1,14	0,06	-	-	1,00	-	1,20	0,08	-	-	1,00	-	0,64	-0,19	0,97	-0,01	1,52	1,91
70	0,89	-0,05	-	-	1,00	-	0,94	-0,03	-	-	1,00	-	0,51	-0,29	1,05	0,02	2,06	1,59
80	0,57	-0,24	-	-	1,00	-	0,72	-0,14	-	-	1,00	-	0,45	-0,35	0,89	-0,05	1,98	1,49
90	0,47	-0,33	-	-	1,00	-	0,66	-0,18	-	-	1,00	-	0,36	-0,44	0,71	-0,15	1,97	1,35
100	0,48	-0,32	-	-	1,00	-	0,92	-0,04	-	-	1,00	-	0,3	-0,52	0,56	-0,25	1,87	1,12

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

TABELA 3.22. Parâmetros cromatográficos das análises do omeprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição.

% Etanol	CSP-1						CSP-2						CSP-3.1					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
10	34,5	1,54	38,4	1,58	1,11	RP	21,8	1,34	34,9	1,54	1,60	2,39	8,18	0,91	11,6	1,06	1,42	2,00
15	20,5	1,31	22,1	1,34	1,08	RP	13,0	1,11	20,2	1,30	1,55	1,77	4,84	0,68	6,8	0,83	1,40	1,99
20	13,8	1,14	15,7	1,20	1,14	RP	9,06	0,96	13,9	1,14	1,53	1,68	3,27	0,51	4,59	0,66	1,40	1,74
25	9,92	1,00	11,1	1,04	1,12	RP	6,62	0,82	10,1	1,00	1,53	1,70	2,58	0,41	3,59	0,55	1,39	1,61
30	8,10	0,91	9,00	0,95	1,11	RP	5,68	0,75	8,40	0,92	1,48	1,51	2,29	0,36	3,12	0,49	1,36	1,57
40	5,28	0,72	5,95	0,77	1,13	RP	3,00	0,48	4,55	0,66	1,52	1,51	1,48	0,17	2,02	0,30	1,36	1,14
50	4,02	0,60	4,35	0,64	1,08	RP	2,26	0,35	3,40	0,53	1,50	1,32	1,07	0,03	1,46	0,16	1,36	1,08
60	2,98	0,47	3,37	0,53	1,13	RP	1,80	0,25	2,65	0,42	1,47	1,26	0,98	-0,01	1,3	0,11	1,33	0,97
70	2,47	0,39	2,73	0,44	1,11	RP	1,46	0,16	2,11	0,32	1,45	1,22	0,78	-0,11	1,03	0,01	1,32	0,9
80	1,65	0,22	1,96	0,29	1,19	RP	1,20	0,08	1,69	0,23	1,41	0,97	0,71	-0,15	0,93	-0,03	1,31	0,83
90	1,47	0,17	1,77	0,25	1,20	RP	1,12	0,05	1,53	0,18	1,37	0,95	0,64	-0,19	0,83	-0,08	1,30	0,8
100	1,30	0,11	1,60	0,20	1,23	RP	1,34	0,13	1,68	0,22	1,25	0,90	0,61	-0,21	0,82	-0,09	1,34	RP

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

TABELA 3.23. Parâmetros cromatográficos das análises do pantoprazol nas colunas quirais CSP-1, CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição.

% Etanol	CSP-1						CSP-2						CSP-3.1					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
10	67,3	1,83	76,7	1,88	1,14	RP	-	-	-	-	-	-	21,7	1,34	45,9	1,66	2,12	3,82
15	35,6	1,55	40,0	1,60	1,12	RP	51,8	1,71	-	-	1,00	-	11,1	1,04	24,7	1,39	2,23	3,85
20	22,5	1,35	25,2	1,40	1,12	RP	36,9	1,57	39,9	1,60	1,08	RP	6,96	0,84	14,8	1,17	2,13	3,3
25	15,2	1,18	16,9	1,23	1,11	RP	25,0	1,40	26,9	1,43	1,08	RP	5,12	0,71	10,7	1,03	2,09	2,98
30	10,9	1,04	12,2	1,09	1,12	RP	14,7	1,17	15,8	1,20	1,07	0,81	3,95	0,60	9,04	0,96	2,29	2,29
40	6,67	0,82	7,41	0,87	1,11	RP	8,60	0,93	-	-	1,00	-	2,36	0,37	5,25	0,72	2,22	2,73
50	4,43	0,65	4,91	0,69	1,11	RP	6,01	0,78	-	-	1,00	-	1,57	0,20	3,44	0,54	2,19	2,48
60	3,09	0,49	3,42	0,53	1,11	RP	5,00	0,70	-	-	1,00	-	1,30	0,11	2,74	0,44	2,11	2,10
70	2,17	0,34	2,37	0,37	1,09	RP	3,86	0,59	-	-	1,00	-	1,01	0,004	2,10	0,32	2,08	2,04
80	1,55	0,19	1,69	0,23	1,09	RP	2,64	0,42	-	-	1,00	-	0,84	-0,08	1,72	0,24	2,05	1,85
90	0,87	-0,06	0,95	-0,02	1,09	RP	2,23	0,35	-	-	1,00	-	0,71	-0,15	1,43	0,15	2,01	1,75
100	1,33	0,12	0	-	1,00	-	2,93	0,47	-	-	1,00	-	0,61	-0,21	1,26	0,10	2,07	1,68

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

TABELA 3.24. Parâmetros cromatográficos das análises do rabeprazol nas colunas quirais CSP-1 CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição.

% Etanol	CSP-1						CSP-2						CSP-3.1					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
10	20,9	1,32	23,4	1,37	1,12	RP	20,4	1,31	-	-	1,00	-	8,28	0,92	15,5	1,19	1,87	3,52
15	12,1	1,08	13,4	1,13	1,11	RP	12,5	1,10	-	-	1,00	-	3,82	0,58	8,50	0,93	2,23	2,86
20	8,15	0,91	9,03	0,96	1,11	RP	8,76	0,94	-	-	1,00	-	3,15	0,50	5,75	0,76	1,83	2,83
25	5,82	0,76	6,47	0,81	1,11	RP	5,61	0,75	-	-	1,00	-	2,46	0,39	4,47	0,65	1,82	2,81
30	4,65	0,67	5,15	0,71	1,11	RP	4,34	0,64	-	-	1,00	-	2,23	0,35	3,59	0,55	1,61	2,03
40	3,05	0,48	3,38	0,53	1,11	RP	2,48	0,39	-	-	1,00	-	1,39	0,14	2,37	0,37	1,71	1,91
50	2,22	0,35	2,45	0,39	1,10	RP	1,86	0,27	-	-	1,00	-	0,98	-0,01	1,70	0,23	1,73	1,89
60	1,70	0,23	1,88	0,27	1,11	RP	1,49	0,17	-	-	1,00	-	0,91	-0,04	1,53	0,18	1,68	1,60
70	1,37	0,14	1,50	0,18	1,09	RP	1,26	0,10	-	-	1,00	-	0,75	-0,12	1,26	0,10	1,68	1,48
80	0,99	-0,004	1,08	0,03	1,09	RP	0,96	-0,02	-	-	1,00	-	0,66	-0,18	1,11	0,04	1,68	1,45
90	0,87	-0,06	0,97	-0,01	1,11	RP	0,90	-0,05	-	-	1,00	-	0,59	-0,23	1,01	0,004	1,71	1,28
100	0,91	-0,04	-	-	1,00		1,21	0,08	-	-	1,00	-	0,56	-0,25	0,92	-0,04	1,64	1,32

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

TABELA 3.25. Parâmetros cromatográficos das análises do Ro 18-5364 nas colunas quirais CSP-1 CSP-2 e CSP-3.1 no modo normal de eluição.

% Etanol	CSP-1						CSP-2						CSP-3.1					
	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s	k_1	$\log k_1$	k_2	$\log k_2$	α	R_s
10	19,5	1,29	22,9	1,36	1,17	RP	15,6	1,19	18,3	1,26	1,17	RP	7,02	0,85	11,1	1,04	1,58	2,08
15	10,6	1,02	12,3	1,09	1,16	RP	9,65	0,98	10,9	1,04	1,13	RP	3,85	0,58	6,04	0,78	1,57	1,98
20	7,00	0,84	8,12	0,91	1,16	RP	6,75	0,83	7,57	0,88	1,12	RP	2,50	0,40	3,95	0,60	1,58	1,71
25	4,91	0,69	5,67	0,75	1,15	RP	4,40	0,64	5,00	0,70	1,14	RP	1,93	0,29	3,00	0,48	1,55	1,60
30	3,86	0,59	4,43	0,65	1,15	RP	3,38	0,53	3,81	0,58	1,13	RP	1,65	0,22	2,59	0,41	1,57	1,57
40	2,47	0,39	2,83	0,45	1,15	RP	1,87	0,27	2,11	0,32	1,13	RP	1,04	0,02	1,60	0,20	1,54	1,18
50	1,77	0,25	2,01	0,30	1,14	RP	1,39	0,14	1,55	0,19	1,12	RP	0,73	-0,14	1,12	0,05	1,53	1,07
60	1,34	0,13	1,52	0,18	1,13	RP	1,08	0,03	1,20	0,08	1,11	RP	0,68	-0,17	1,00	0,00	1,47	0,90
70	1,06	0,02	1,18	0,07	1,11	RP	0,89	-0,05	0,99	-0,004	1,11	RP	0,56	-0,25	0,82	-0,09	1,46	0,83
80	0,74	-0,13	0,85	-0,07	1,15	RP	0,78	-0,11	-	-	1,00	-	0,51	-0,29	0,74	-0,13	1,45	RP
90	0,68	-0,17	0,76	-0,12	1,12	RP	0,74	-0,13	-	-	1,00	-	0,46	-0,34	0,67	-0,17	1,46	RP
100	0,75	-0,12	-	-	1,00	-	0,80	-0,10	-	-	1,00	-	0,42	-0,38	0,65	-0,19	1,55	RP

RP: resolução pobre: $R_s < 0,80$

Através dos *Gráficos 3.7 a, b e c* e pela *Tabela 3.21* observa-se ausência de discriminação quiral na CSP-2 para os enantiômeros do lansoprazol, enquanto que a CSP-1 apresentou indícios de separação, com o aumento da concentração de etanol no intervalo 10-30% ($R_s \leq 0,8$ e $\alpha \leq 1,09$). Excelente capacidade de resolução foi apresentada pela CSP-3.1 em toda extensão da análise, havendo diminuição do fator de separação ($1,87 \leq \alpha \leq 2,60$) e resolução ($1,12 \leq R_s \leq 7,06$) com o aumento da porcentagem de etanol.

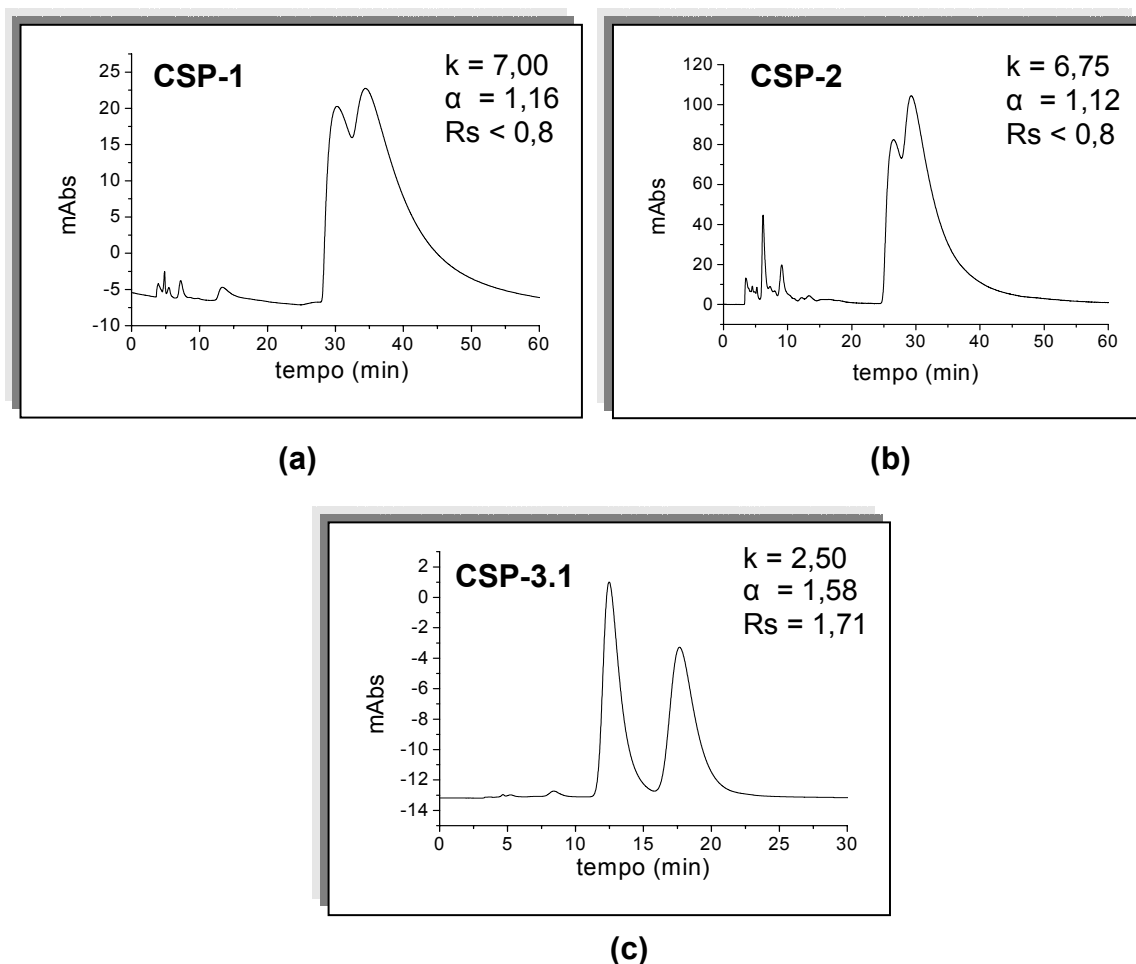
Os enantiômeros do omeprazol foram resolvidos ou parcialmente resolvidos nas três fases estacionárias avaliadas (*Tabela 3.22*). Baixo poder de discriminação quiral destes enantiômeros foi apresentado pela CSP-1 em todas as composições de fase móvel ($R_s \leq 0,8$), verificando um pequeno aumento no fator de separação ao se aproximar do modo polar-orgânico, com 80% de etanol ($1,08 \leq \alpha \leq 1,23$). A CSP-2 mostrou elevado poder de discriminação quiral, em baixas concentrações de etanol, pois com o aumento da concentração deste houve diminuição do fator de separação ($1,25 \leq \alpha \leq 1,60$) e resolução ($0,90 \leq R_s \leq 2,39$) até atingir 100% do modificador. Tal comportamento também foi verificado com a CSP-3.1, que apresentou considerado poder de resolução para os enantiômeros do omeprazol ($0,80 \leq R_s \leq 2,00$ e $1,30 \leq \alpha \leq 1,42$).

Pela *Tabela 3.23*, constatou-se que a CSP-1 apresenta baixo poder de discriminação quiral para os enantiômeros do pantoprazol no intervalo de 10-90% de etanol e, ausência no modo polar-orgânico ($R_s \leq 0,8$ e $\alpha \leq 1,14$). Na CSP-2 não foi possível determinar os parâmetros cromatográficos com fase móvel composta por 90% de hexano, pois o tempo da análise foi superior a 200 minutos. Indícios de separação foram verificados para esta fase no intervalo de 20-30% de etanol ($R_s \leq 0,81$ e $\alpha \leq 1,08$). Em contrapartida, A CSP-3.1 mostrou excelente poder de enantiosseparação ($2,01 \leq \alpha \leq 2,23$) e enantiorresolução ($1,68 \leq R_s \leq 3,85$) para estes enantiômeros em toda extensão de análise.

Indicativos de discriminação quiral na CSP-1 ($R_s \leq 0,8$ e $\alpha \leq 1,12$) para os enantiômeros do rabeprazol foram verificados até 90% de etanol, enquanto que para a CSP-2 a ausência de capacidade de resolução permaneceu durante todas as variações da porcentagem do modificador. Assim como observado para as demais misturas racêmicas, a CSP-3.1 mostrou ótima capacidade de resolução para os enantiômeros do rabeprazol em toda faixa de modificador analisada ($1,28 \leq R_s \leq 3,52$ e $1,61 \leq \alpha \leq 2,23$) (*Tabela 3.24*).

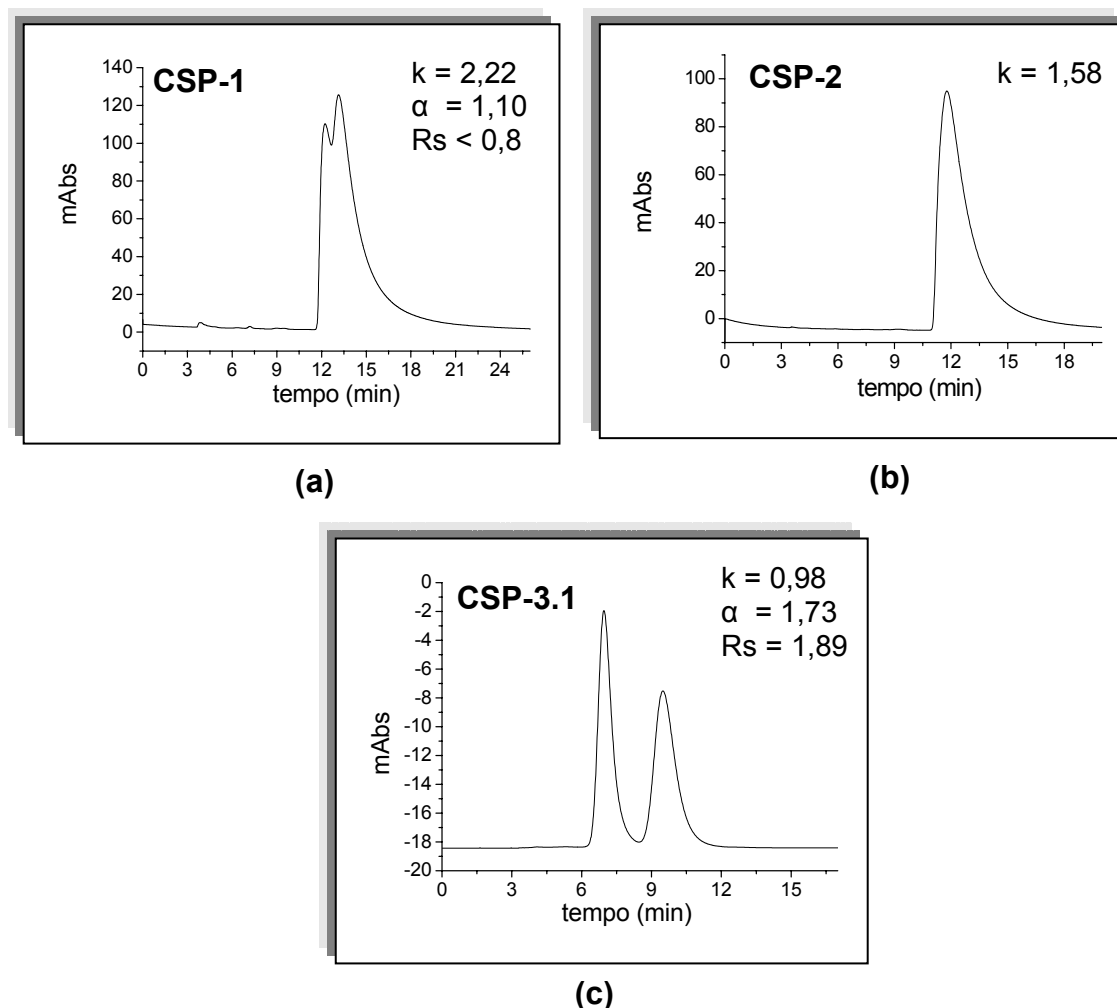
Nos intervalos de 10-90% de etanol na CSP-1 e de 10-70% na CSP-2 foram verificados apenas indícios de separação para os enantiômeros do Ro 18-5364 ($R_s \leq 0,8$ e $\alpha \leq 1,17$). A CSP-3.1, por sua vez, mostrou poder de resolução para estes enantiômeros, no intervalo de 10-70% de etanol ($1,46 \leq \alpha \leq 1,58$ e $0,83 \leq R_s \leq 2,08$). Após esta concentração, apenas indícios de resolução foram verificados (Tabela 3.25).

O poder de discriminação quiral diferenciado dos três diferentes tris-carbamatos de amilose pode ser visualizado através dos cromatogramas para a enantiorresolução do Ro 18-5364 (Cromatogramas 3.4 a, b e c) e rabeprazol (Cromatogramas 3.5 a, b e c) no modo normal de eluição.



CROMATOGRAMAS 3.4. Análises da mistura racêmica do Ro 18-6354: (a) Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1); (b) Coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2); (c) Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3.1); em APS-Nucleosil (500 Å, 7 μ m) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Fase Móvel: hexano/etanol (80:20 v/v); Vazão: 1,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 μ L e λ :289 nm.

Como observado, a CSP-3.1 mostrou excelente poder de discriminação para os enantiômeros do Ro 18-5364, enquanto que as fases CSP-1 e CSP-2 apresentaram apenas indícios de resolução. Baixas resoluções, com bandas largas, foram observadas na CSP-1 e na CSP-2, nesta composição de fase móvel.



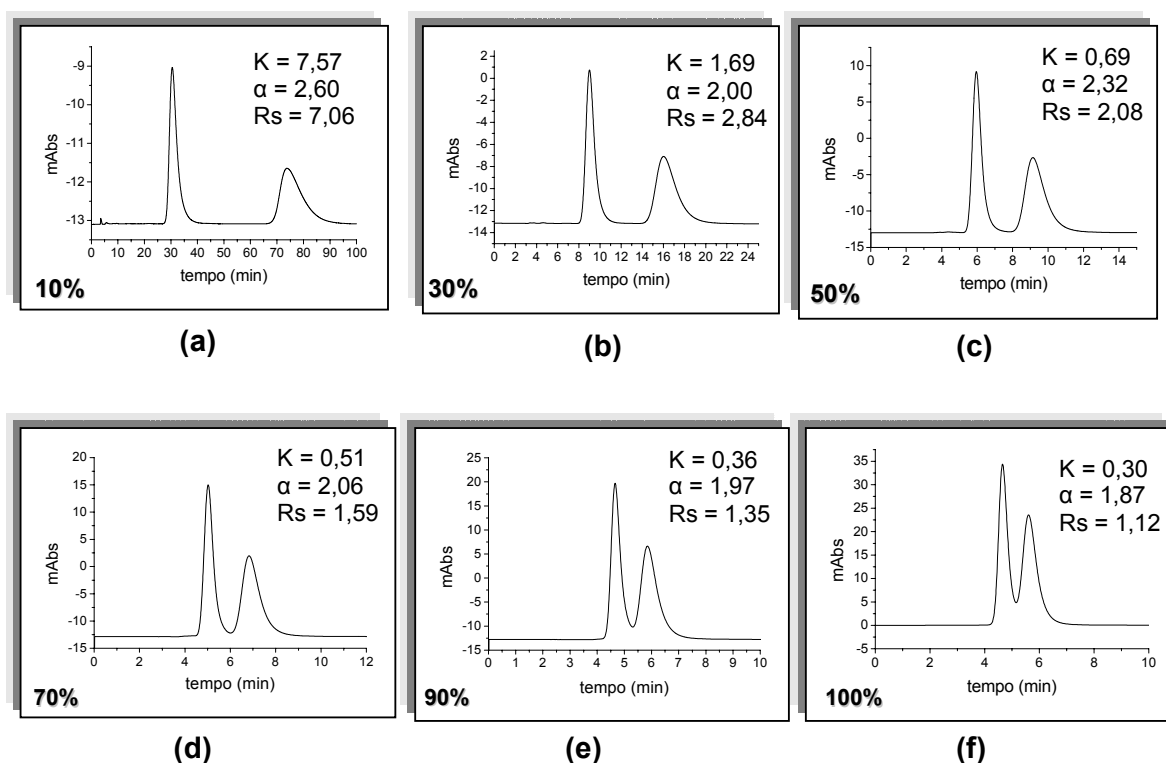
CROMATOGRAMAS 3.5. Análises da mistura racêmica do rabeprazol: (a) Coluna tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1); (b) Coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2); (c) Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3); em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Fase Móvel: hexano/etanol (50:50 v/v); Vazão: 1,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm.

Pelos *Cromatogramas 3.5 a, b e c*, da enantiorresolução do rabeprazol, verifica-se que o poder de discriminação quiral depende do tris-carbamato de amilose e da composição da fase móvel. Enquanto a CSP-1 mostra pequenos

indícios de separação a CSP-3.1 apresenta elevada capacidade de resolução destes enantiômeros.

A ausência de discriminação quiral apresentada pela CSP-2 para os enantiômeros do rabeprazol, e o elevado poder de resolução desta mesma fase para os enantiômeros do omeprazol, em toda extensão de fase móvel avaliada (*Tabela 3.29*), confirmam a ampla influência do seletor quiral.

Para uma melhor ilustrar o efeito da fase móvel no poder de resolução das fases estacionárias quirais, os *Cromatogramas 3.6 a-f* mostram a diminuição do poder de enantiorresolução e enantioseparação, com o aumento da concentração de etanol, na CSP-3.1 para os enantiômeros do lansoprazol.



CROMATOGRAMAS 3.6. Análises da mistura racêmica do lansoprazol: Coluna tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3.1) em APS-Nucleosil (500 Å, 7 μ m) (20%g/g) (15 x 0,46 cm); Vazão: 1,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 μ L ; λ :289 nm; Fase Móvel: hexano/etanol: (a) 10% etanol, (b) 30% etanol, (c) 50% etanol, (d) 70% etanol, (e) 90% etanol e (f) 100% etanol.

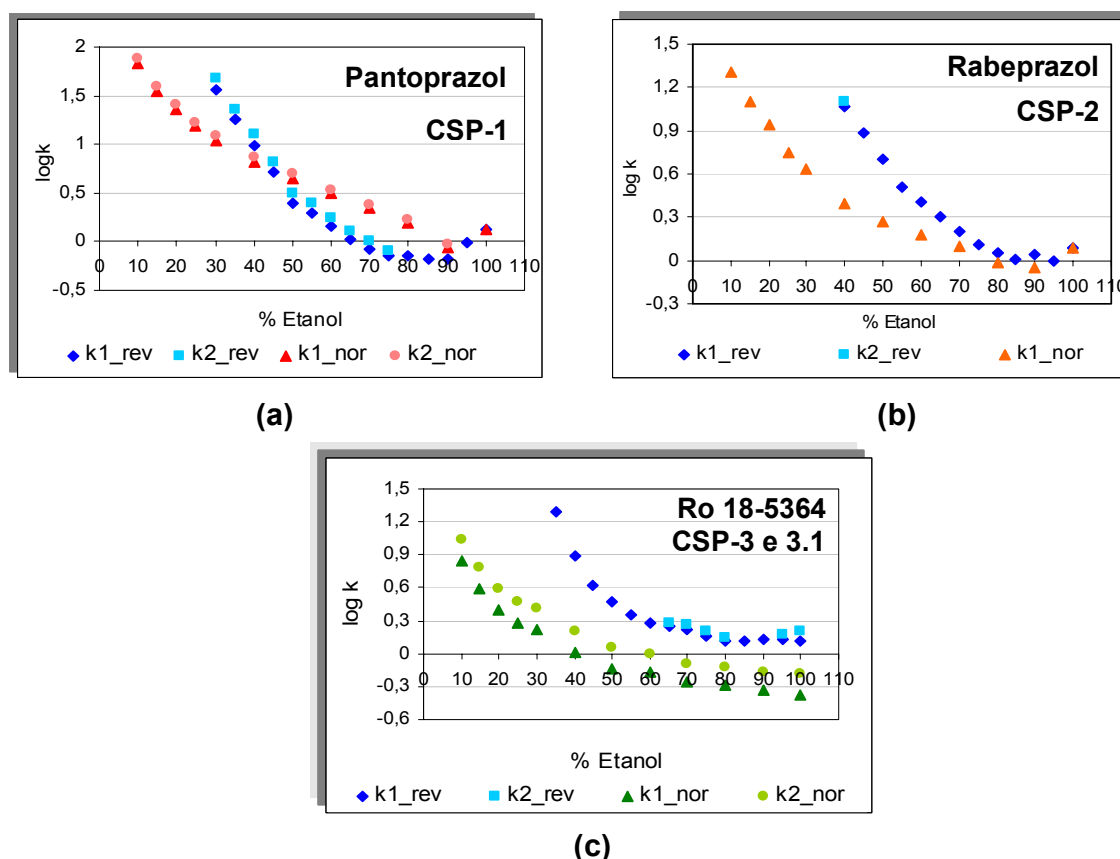
Com a realização deste estudo não foi possível avaliar a influência de forma sistemática de outros modificadores orgânicos na capacidade de resolução destas fases quirais, uma vez que, foi avaliado somente o uso etanol. Entretanto, a comparação dos resultados deste trabalho com outros desenvolvidos no grupo reafirmam a importância do tipo de modificador orgânico, tanto na eluição no modo normal quanto no modo polar-orgânico^{32,34}.

A CSP-3.1 mostrou excelente poder de discriminação quiral para todos os enantiômeros dos benzimidazóis analisados no modo normal tendo hexano/etanol como fase móvel. Quando se utiliza isopropanol como modificador orgânico (60:40 v/v) o poder de resolução desta fase diminuiu, uma vez que são verificados apenas indícios de separação para os enantiômeros do omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, como mostra o trabalho desenvolvido no grupo. Em contrapartida, a CSP-1 mostra baixo poder de resolução para os enantiômeros do omeprazol no modo polar-orgânico com etanol como eluente ($R_s < 0,80$), enquanto que com o uso de metanol a capacidade de enantiorresolução aumenta consideravelmente ($R_s = 2,35$)³².

3.4. Estudo comparativo entre o modo reverso e normal de eluição

3.4.1. Comportamento de retenção

Com o estudo sistematizado no modo reverso e normal de eluição, variando a concentração de etanol, foi possível verificar, como esperado, diminuição da retenção com o aumento da concentração do modificador orgânico. Entretanto, em altas concentrações de etanol, tanto no modo normal como no modo reverso, ou seja, na interface com o modo polar-orgânico, o processo de retenção é alterado e o sistema, não responde mais as interações pertinentes ao modo de eluição em vigor (normal ou reverso) (Gráficos 3.8 a, b e c).



GRÁFICOS 3.8. Estudo comparativo da retenção no modo normal e reverso de eluição nas colunas quirais de polissacarídeos: (a) CSP-1 para o pantoprazol, (b) CSP-2 para o rabeprazol e (c) CSP-3 e 3.1 para o Ro 18-5364, onde k_{1_rev} = 1º enantiômero no modo reverso, k_{2_rev} = 2º enantiômero no modo reverso, k_{1_nor} = 1º enantiômero no modo normal, k_{2_nor} = 2º enantiômero no modo normal.

Pelos gráficos mostrados na página 89, é possível verificar que há diminuição do fator de retenção à medida que aumenta a concentração de etanol nos dois modos de eluição.

A comparação entre os valores da porcentagem de etanol, necessária para interceptar a mudança de retenção para o modo polar orgânico, a partir dos modos normal e reverso de eluição, estão dispostos nas tabelas a seguir (*Tabela 3.26, 3.27, 3.28*).

TABELA 3.26. Comparação entre as porcentagens de etanol, com a CSP-1, necessárias para interceptar as mudanças de retenção do modo reverso e do normal para o polar orgânico.

Compostos	CSP-1 Modo Reverso		CSP-1 Modo Normal	
	Ponto mínimo (Φ_{EtOH})(%)	Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH})(%)	Ponto mínimo (Φ_{EtOH})(%)	Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH})(%)
lansoprazol	86,8 (84,7/89,4)	90	107 (93,7/134)	90
omeprazol	86,7 (84,4/89,6)	85	89,6 (83,8/97,8)	100
pantoprazol	80,9 (79,5/82,5)	85	101 (89,3/123)	100
rabeprazol	81,3 (76,2/85,5)	75	124 (101/186)	100
Ro 18-5364	80,9 (79,4/82,6)	85	119 (91,4/135)	90
	81,6 (75,6/91,5)	75	96,1 (86,5/113)	90
			94,6 (81,6/123)	100
			96,2 (86,2/114)	90
	83,4 (81,5/85,9)	85	90,8 (82,5/105)	

Com a CSP-1, a mudança de retenção do modo reverso para o polar orgânico ocorre com aproximadamente 85% de etanol na fase móvel, enquanto do modo normal para o polar orgânico a porcentagem de modificador compreende o intervalo de 90-100%, segundo os dados experimentais (*Tabela 3.26*). Ou seja, nesta fase quiral a porcentagem de etanol necessária para a mudança de modos de retenção, sob condições de modo reverso, é menor.

TABELA 3.27. Comparação entre as porcentagens de etanol, com a CSP-2, necessárias para interceptar as mudanças de retenção do modo reverso e do normal para o polar orgânico.

Compostos	CSP-2 Modo Reverso		CSP-2 Modo Normal	
	Ponto mínimo (Φ_{EtOH}) (%)	Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH}) (%)	Ponto mínimo (Φ_{EtOH}) (%)	Ponto mín.exp. (Φ_{EtOH}) (%)
lansoprazol	93,9 (91,8/96,3)	95	84,9 (80,0/91,7)	90
omeprazol	87,3 (85,4/89,8)	85	85,8 (81,1/92,2)	90
	90,2 (88,4/92,4)	95	89,6 (83,8/97,8)	90
pantoprazol	79,5 (77,7/81,8)	85	90,8 (82,5/105)	90
rabeprazol	90,0 (88,0/92,4)	95	83,0 (78,3/89,6)	90
Ro 18-5364	88,8 (85,4/93,8)	95	84,0 (80,2/88,9)	90
			72,0 (67,2/78,5)	70

A porcentagem de etanol necessária para alterar o perfil de retenção, quando a CSP-2 é utilizada como coluna, é de aproximadamente 95% no modo reverso e de 90% no modo normal de eluição (*Tabela 3.27*). Estes valores de porcentagens de etanol são mais próximos do que quando é empregada a CSP -1.

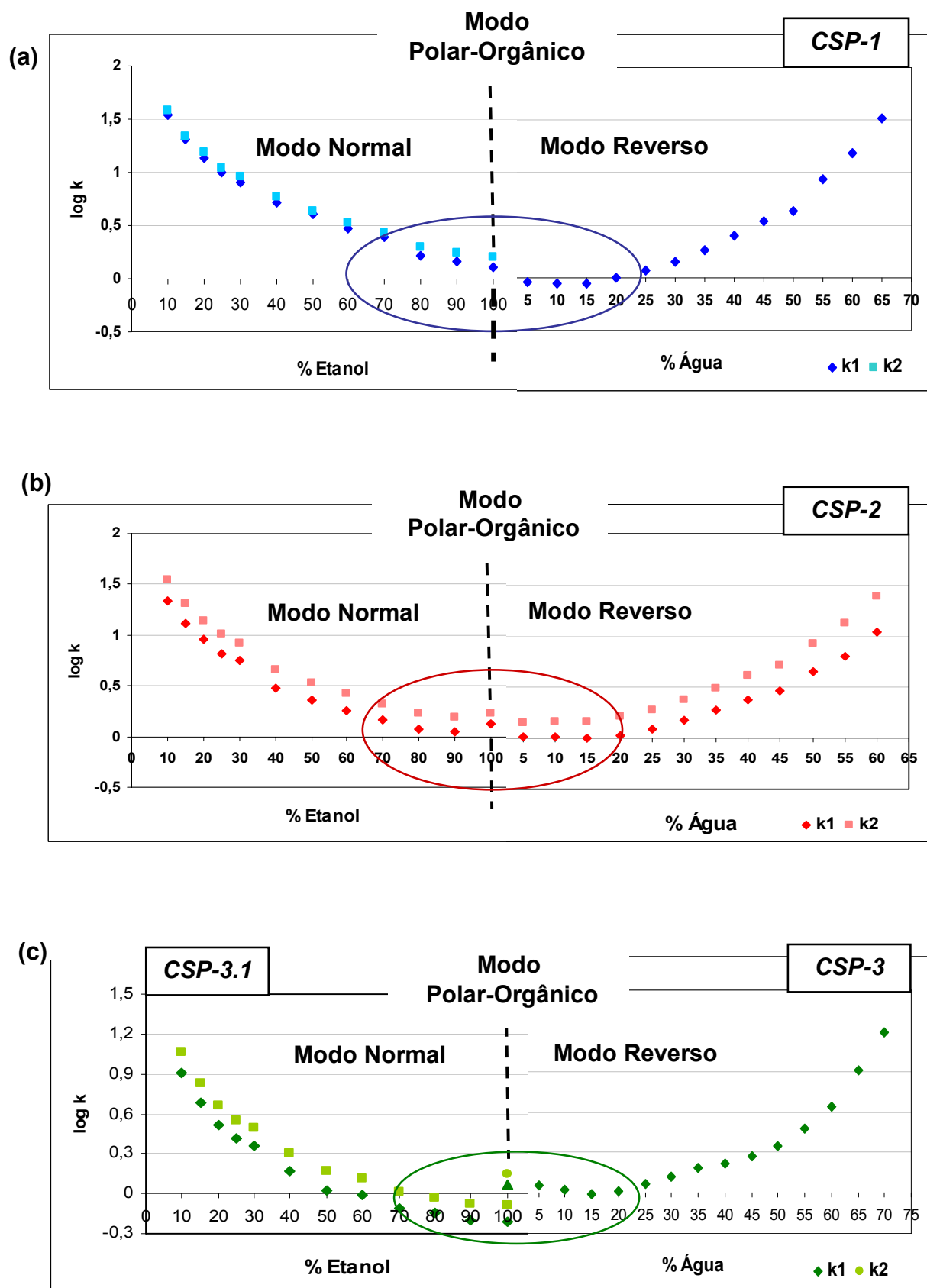
TABELA 3.28. Comparação entre as porcentagens de etanol, com a CSP-3 e 3.1, necessárias para interceptar as mudanças de retenção do modo reverso e do normal para o polar orgânico.

Compostos	CSP-3 Modo Reverso		CSP-3.1 Modo Normal	
	Ponto mínimo (φ_{EtOH}) (%)	Ponto mín.exp. (φ_{EtOH}) (%)	Ponto mínimo (φ_{EtOH}) (%)	Ponto mín.exp. (φ_{EtOH}) (%)
lansoprazol	85,1 (81,1/90,7)	85	95,1 (82,9/122)	100
			93,6 (82,2/118)	100
omeprazol	82,9 (79,3/88,0)	85	88,7 (80,1/104)	100
			88,6 (80,6/102)	100
pantoprazol	68,9 (65,6/73,3)	55	93,8 (83,8/112)	100
			96,1 (85,8/115)	100
rabeprazol	82,0 (78,9/86,5)	85	89,7 (79,0/113)	100
			87,9 (79,2/104)	100
Ro 18-5364	83,8 (76,2/88,1)	75	86,3 (77,7/103)	100
			83,1 (78,7/90,8)	80
			85,9 (78,2/99,0)	100

Mesmo com a utilização de colunas preparadas com fases estacionárias de sínteses diferentes pode-se verificar, pelos dados teóricos e

experimentais, que com a CSP-3 as mudanças de retenção para o modo polar orgânico ocorrem em uma menor porcentagem de etanol, no modo reverso, do que com o uso da CSP-3.1, no modo normal. Tal fato também é observado quando a CSP-1 é utilizada (*Tabela 3.28*).

Os perfis de retenção dos enantiômeros do omeprazol, nas fases estacionárias estudadas, estão ilustrados nos *Gráficos 3.9. a, b e c*, onde é possível visualizar a maior proximidade do modo normal ao polar-orgânico de eluição e a mais efetiva mudança de retenção sob condições de modo reverso de eluição.



GRÁFICOS 3.9. Perfis de retenção para o composto omeprazol nas fases estacionárias de polissacarídeos: (a) CSP-1, (b) CSP-2 e (c) CSP-3 e CSP-3.1, onde k_1 = 1º enantiômero, k_2 = 2º enantiômero.

Estando inicialmente no modo normal à medida que a concentração de etanol aumenta há diminuição do fator de retenção até certa concentração de etanol. Acima desta concentração o fator de retenção começa a aumentar até atingir o modo polar-orgânico com 100% de etanol. Com a adição de água na fase móvel, o fator de retenção volta a diminuir até certa porcentagem do solvente aquoso. Após esta porcentagem o perfil de modo reverso de eluição começa a prevalecer e, conseqüentemente, os fatores de retenção se elevam. Tal perfil está muito bem definido na CSP-1 (*Gráficos 3.9 a*) e também são observados na CSP-3 e 3.1 (*Gráficos 3.9 c*).

Com a CSP-2 a mudança de perfil de retenção ocorre nas proximidades do modo polar-orgânico nos dois modos de eluição, sendo verificada uma menor diminuição dos fatores de retenção com adição de pequenas concentrações de água (*Gráficos 3.9 b*).

Através dos resultados obtidos foi possível observar que, quando são utilizadas as colunas quirais avaliadas, as retenções características do modo polar orgânico de eluição se manifestam ainda em condições de modo reverso ou normal de eluição. No entanto, sob condições de modo normal de eluição, a porcentagem necessária de etanol, para que as retenções de modo polar-orgânico comecem a prevalecer, é muito maior. Estes resultados demonstram que as interações no modo normal são muito próximas ao do modo polar-orgânico, não sendo possível verificar grandes mudanças nos perfis de retenção. Os valores experimentais e teóricos obtidos demonstram que a mudança de modo de eluição do normal para o polar-orgânico é lenta.

Em contrapartida, a mudança de modo de eluição, sob condições de modo reverso, é mais efetiva, e uma porcentagem menor de etanol é necessária, quando comparado ao modo normal. Ao se aproximar do modo polar-orgânico, há diminuição das interações hidrofóbicas que prevalecem no modo reverso de eluição e, ainda com uma considerada porcentagem de água na fase móvel, as interações de ligações de hidrogênio, consideradas as interações predominantes no modo polar-orgânico⁹⁴, começam a vigorar e o fator de retenção aumenta. A passagem do modo reverso para o modo polar-orgânico de eluição é rápida.

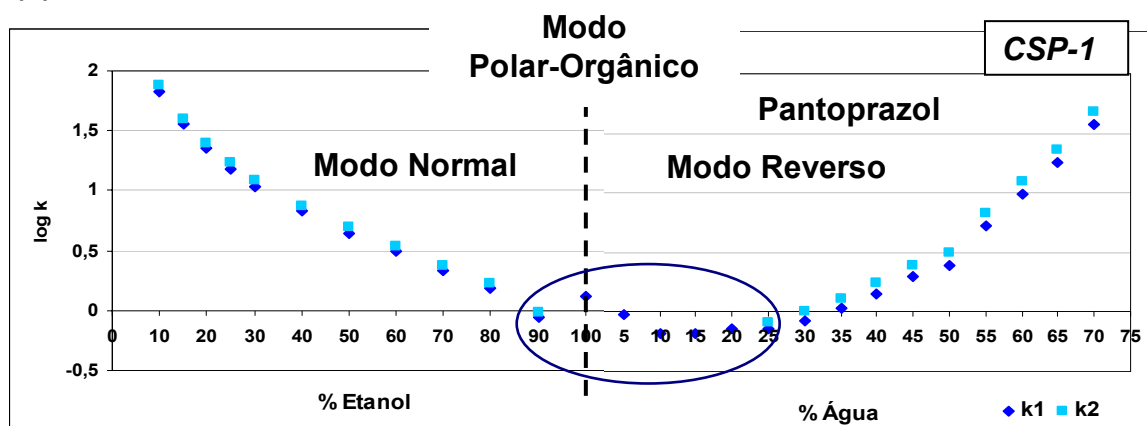
3.4.2. Discriminação quiral

A análise dos Gráficos 3.9 a, b e c, demonstra que o perfil de retenção do omeprazol é similar nas três fases estacionárias avaliadas, mas estas mostram diferenciada capacidade de discriminação quiral para estes enantiômeros.

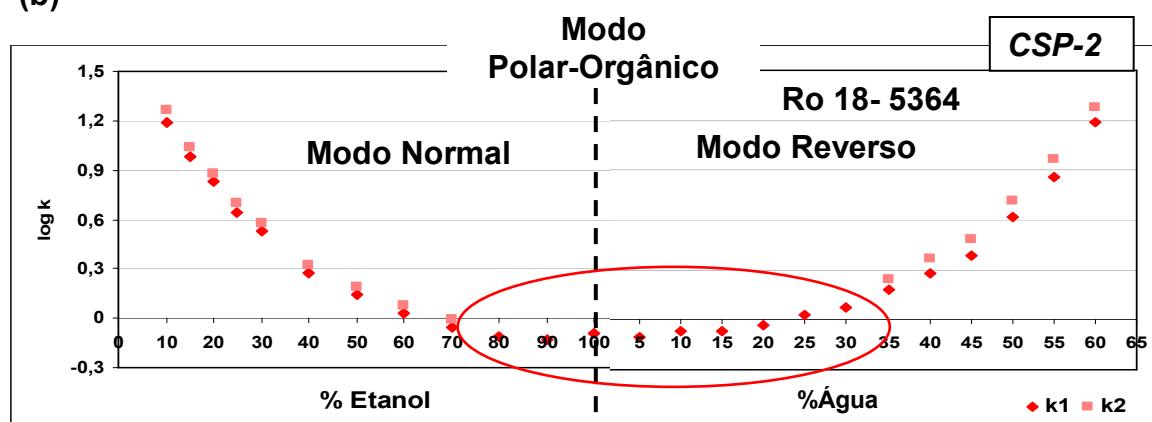
Enquanto as CSP-1 e CSP-3.1 apresentam poder de discriminação quiral no modo normal e polar-orgânico de eluição, para o omeprazol, a CSP-2 exibe excelente poder de resolução, para estes enantiômeros, nos três modos de eluição.

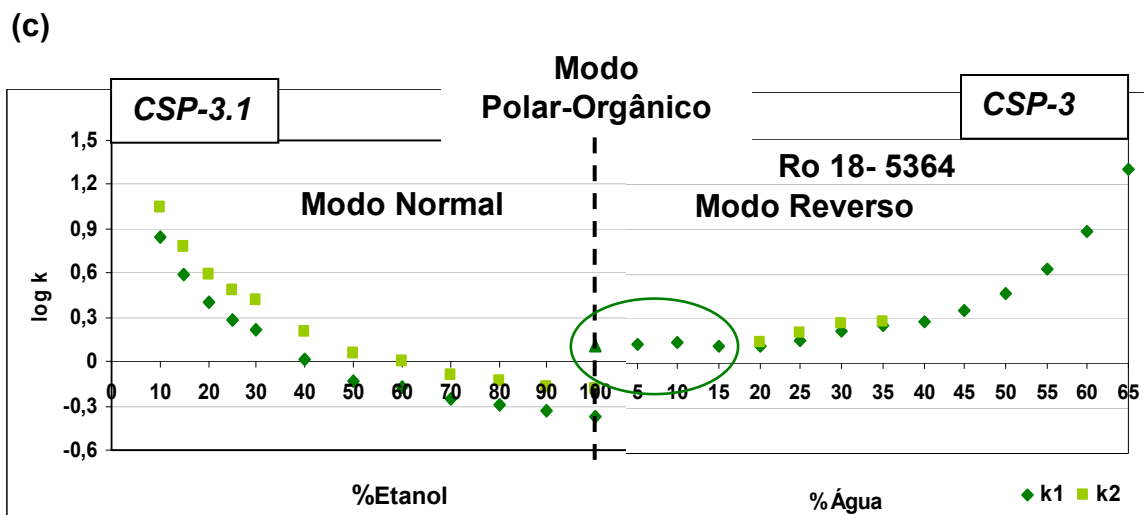
A influência do modo de eluição e da composição da fase móvel para a enantioseparação, do pantoprazol e Ro 18-5364, nas colunas quirais avaliadas pode ser visualizada nos Gráficos 3.10 a, b e c.

(a)



(b)





GRÁFICOS 3.10. Perfil de enantioseparação, de dois dos cinco PPI's, nas fases estacionárias de polissacarídeos (a) pantoprazol na CSP-1 (b) Ro 18-5364 na CSP-2 e (c) Ro 18-5364 nas CSP-3 e CSP-3.1. para o, onde k_1 = 1º enantiômero, k_2 = 2º enantiômero.

Numa análise geral dos parâmetros cromatográficos obtidos neste trabalho (*Tabelas 3.12 a 3.16 e 3.21 a 3.25*), verifica-se que a CSP-1 mostrou baixa capacidade de resolução dos enantiômeros do lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e Ro 18-5364 no modo reverso de eluição ($0,8 \leq R_s \leq 1,10$ e $1,14 \leq \alpha \leq 1,31$). No modo polar-orgânico, houve discriminação quiral somente para os enantiômeros do omeprazol ($R_s \leq 0,8$ e $\alpha = 1,23$). No modo normal, baixo poder de resolução foi verificado em todas as proporções de fase móvel para todos os enantiômeros da série homóloga ($R_s \leq 0,8$).

A CSP-2 apresentou elevado poder de enantiorresolução somente para os enantiômeros do omeprazol no modo reverso e polar-orgânico de eluição ($0,90 \leq R_s \leq 3,46$ e $1,25 \leq \alpha \leq 2,24$). No modo normal, esta fase não foi capaz de resolver os enantiômeros do lansoprazol e rabeprazol, mostrou baixo poder de resolução dos enantiômeros do pantoprazol e Ro 18-5364 ($R_s \leq 0,81$ e $1,07 \leq \alpha \leq 1,17$), mas apresentou ótima capacidade de resolução dos enantiômeros do omeprazol ($0,90 \leq R_s \leq 2,39$ e $1,25 \leq \alpha \leq 1,60$).

A CSP 3.1, por sua vez, mostrou excelente capacidade de discriminação quiral para os enantiômeros da série homóloga no modo normal ($0,80 \leq R_s \leq 7,06$ e $1,30 \leq \alpha \leq 2,60$) e no modo polar-orgânico ($0,80 \leq R_s \leq 1,68$ e $1,34 \leq \alpha \leq 2,07$). Em contrapartida, no modo reverso, esta fase não foi capaz de resolver os

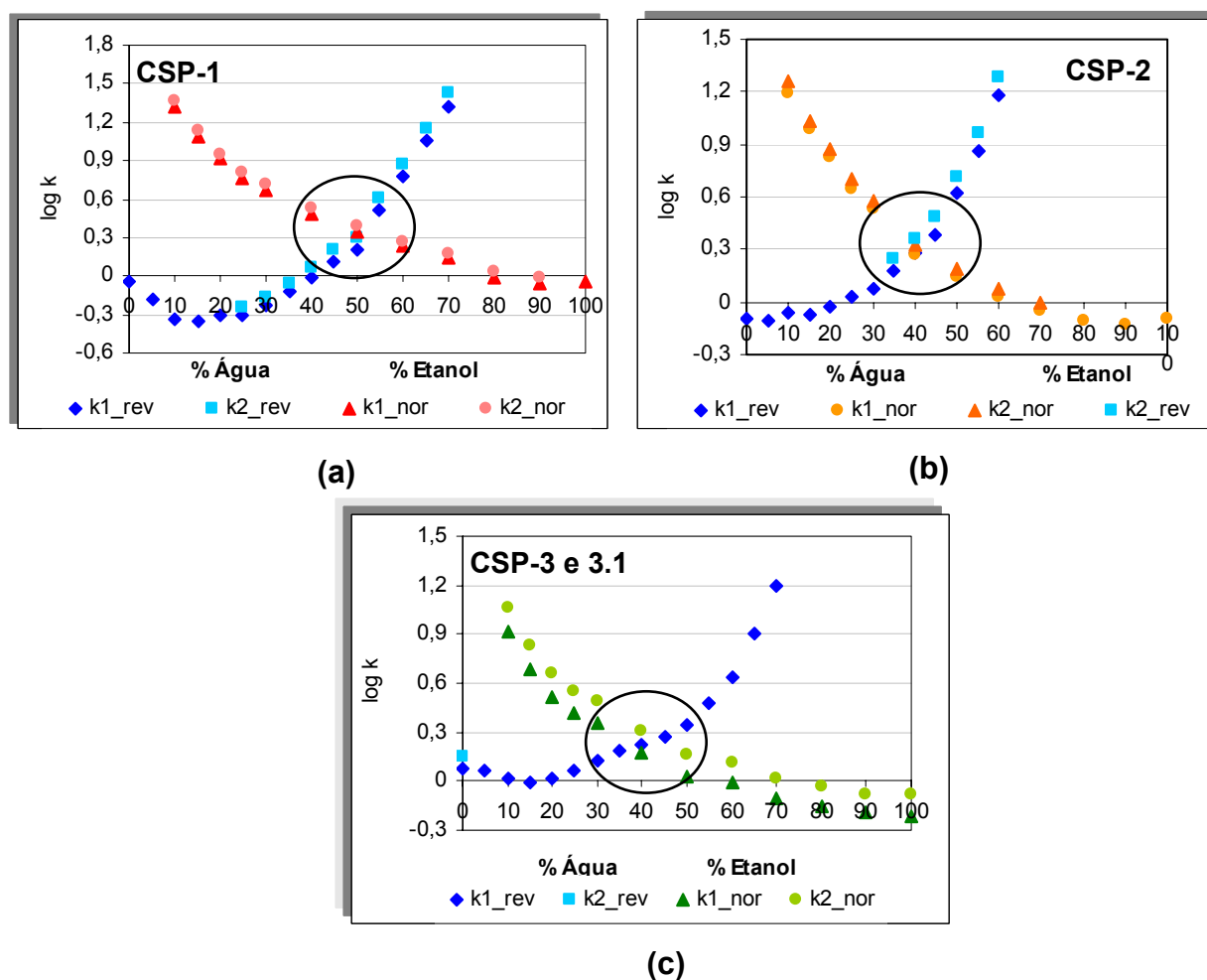
enantiômeros do lansoprazol e omeprazol e mostrou baixo poder de resolução para os demais enantiômeros da série ($R_s \leq 0,90$ e $\alpha \leq 1,28$).

Com os resultados obtidos, fica evidente a importância do tipo do tris-fenilcarbamato no processo de discriminação quiral, visto que, as fases estacionárias quirais avaliadas neste trabalho são constituídas com o mesmo polissacarídeo, a amilose, e, no entanto, apresentam capacidade de resolução enantiomérica diferenciada. Do mesmo modo, que o tipo de polissacarídeo utilizado afeta o processo de resolução enantiomérica quando se utiliza o mesmo tris-fenilcarbamato, o tipo de tris-fenilcarbamato utilizado também afeta a discriminação quiral quando as fases estacionárias são constituídas do mesmo polissacarídeo.

3.5. Ponto de isoeluição

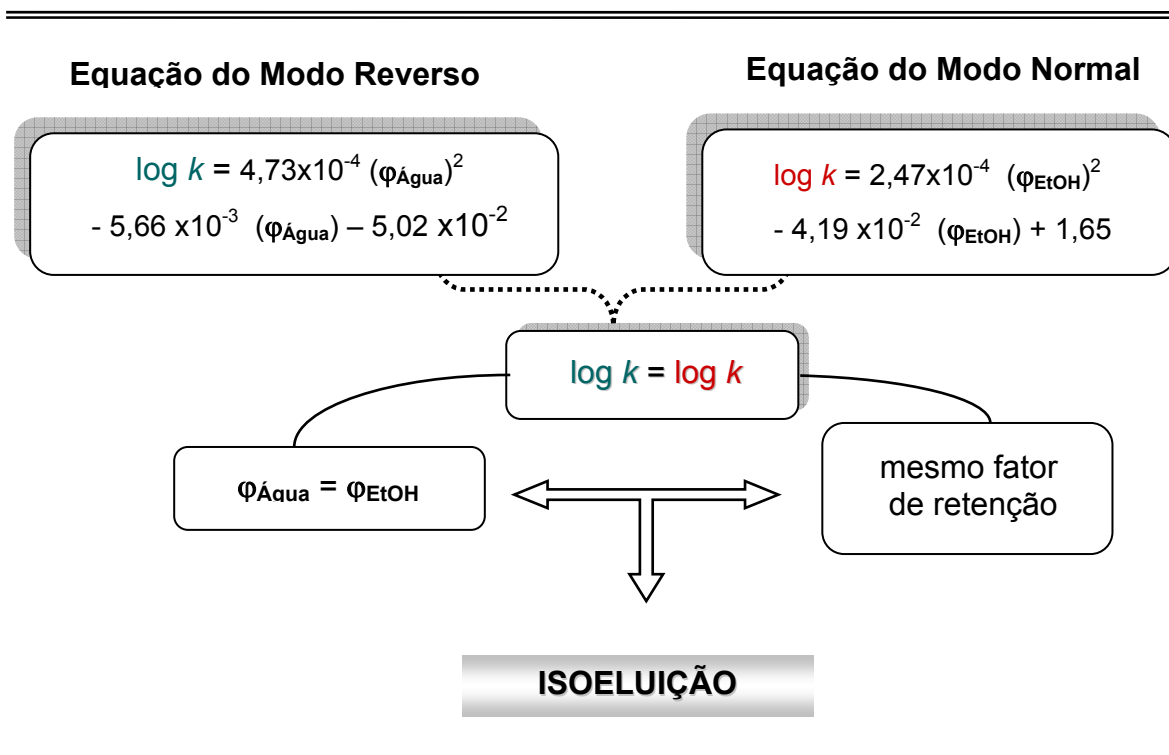
O estudo sistematizado no modo normal e reverso de eluição revelou que numa mesma porcentagem de etanol, no modo normal, e água, no modo reverso, as retenções são similares, resultando nos mesmo valores para os fatores de retenção. Tal fato, é aqui denominado de *ponto de isoeluição*.

Os Gráficos 3.11 a, b e c mostram o ponto onde os fatores de retenção dos dois modos de eluição, normal e reverso, coincidem.



GRÁFICOS 3.11. Ponto de isoeluição nas colunas quirais de polissacarídeos: (a) CSP-1 para o rabepazol, (b) CSP-2 para o Ro 18-5364 e (c) CSP-3 e CSP-3.1 para o omeprazol, onde k_{1_rev} = 1º enantiômero no modo reverso, k_{2_rev} = 2º enantiômero no modo reverso, k_{1_nor} = 1º enantiômero no modo normal, k_{2_nor} = 2º enantiômero no modo normal.

O cálculo do ponto de isoeluição, a partir dos resultados experimentais, para os cinco compostos estudados nas colunas quirais foi realizado valendo-se do *Esquema 3.3*.



ESQUEMA 3.3. Cálculo do ponto de isoeluição valendo-se das equações obtidas através do estudo sistematizado do modo normal e reverso de eluição.

Ao igualar as equações logarítmicas obtidas do modo normal e reverso, de um mesmo composto, determina-se a concentração equivalente de etanol e de água que resulta no logaritmo do fator de retenção do ponto de isoeluição.

Ressalta-se, que este ponto de isoeluição corresponde às interações retensivas similares, de um mesmo composto, numa mesma coluna nos dois modos de eluição. Este comportamento não é similar em relação à discriminação quiral.

Na *Tabela 3.29* encontram-se os valores percentuais do ponto de isoeluição, e a média ponderada, para os enantiômeros dos inibidores da bomba de prótons, e na *Tabela 3.30* estão os valores dos fatores de retenção correspondentes ao ponto de isoeluição determinados através das equações obtidas.

TABELA 3.29. Ponto de isoeluição (P.I) dos inibidores da bomba de prótons nas fases estacionárias de polissacarídeos.

Compostos	CSP-1		CSP-2		CSP-3 e 3.1	
	P.I (%) 1ºenant.	P.I (%) 2ºenant.	P.I (%) 1ºenant.	P.I (%) 2ºenant.	P.I (%) 1ºenant.	P.I (%) 2ºenant.
lansoprazol	46,5	46,5	38,4	38,4	34,1	38,8
omeprazol	46,6	48,2	43,7	42,1	39,7	43,5
pantoprazol	52,4	51,5	63,9	63,9	39,4	48,7
rabeprazol	50,6	49,7	40,0	40,0	38,4	43,9
Ro 18-5364	45,0	53,5	40,0	40,5	32,6	37,6
Média P.I	48,2	50,0	45,2	44,9	36,8	42,8

P.I = %água=%etanol

TABELA 3.30. Valores dos fatores de retenção no ponto de isoeluição para os inibidores da bomba de prótons nas fases estacionárias de polissacarídeos.

Compostos	CSP-1		CSP-2		CSP-3 e 3.1	
	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂
lansoprazol	1,69	1,69	2,69	2,69	1,45	1,80
omeprazol	3,76	4,50	2,83	4,57	1,57	1,86
pantoprazol	3,85	4,37	3,82	3,82	2,62	3,75
rabeprazol	2,10	2,34	2,51	2,51	1,55	2,18
Ro 18-5364	2,10	5,04	2,05	2,14	1,53	1,85

Na CSP-1 a retenção mostra-se similar nos dois modos de eluição em aproximadamente 50% de água no modo reverso e 50% de etanol no modo normal, enquanto que na CSP-2 o ponto de isoeluição está em aproximadamente 45% , ou seja, estando com 45% de água no modo reverso e 45% de etanol no modo normal as interações são semelhantes para os enantiômeros avaliados. Com a composição aproximada da fase móvel hexano/etanol (60:40 v/v) e etanol/água (60:40 v/v) com a CSP-3 e CSP-3.1, a retenção é similar para os enantiômeros da série homóloga.

Através deste estudo foi possível estabelecer uma relação entre a retenção nos dois modos de eluição. E pode-se assim, verificar, pela primeira vez, quando do uso das fases de polissacarídeos como seletores quirais, que mesmo sob condições de modos de eluição diferentes, os mesmos fatores de retenção foram obtidos para a série de PPIs.

3.6. Separações dos enantiômeros em escala multi-miligramas

A realização de qualquer separação preparativa requer o desenvolvimento e a otimização da separação em escala analítica. Nesta etapa, estão incluídas a escolha da fase estacionária e da composição da fase móvel.

A otimização do fator de retenção (k) pequeno possibilita que a separação seja obtida em um menor tempo e com menor consumo de solventes. Em contrapartida, valores máximos para o fator de separação (α) e resolução (R_s) permitem que maiores quantidades do composto seja injetado na coluna cromatográfica sem que haja prejuízo na separação.

A capacidade de carga das fases estacionárias quirais é um importante parâmetro a ser analisado frente ao desenvolvimento das separações preparativas. Por esta razão, só um número limitado de fases estacionárias são empregadas para este fim, destacando-se as fases estacionárias de polissacarídeos. As fases quirais de proteínas, ciclodextrinas, antibióticos também estão disponíveis, mas devido a baixa capacidade de carga e o elevado custo envolvido fazem com que estas sejam menos atrativas⁹⁵.

As fases estacionárias de polissacarídeos têm sido empregadas eficientemente em eluição multimodal, de modo que as condições de modo polar-orgânico apresentam-se como uma alternativa para o tradicional modo normal de eluição, onde muitos compostos farmacêuticos apresentam baixa solubilidade⁹⁷.

Para o desenvolvimento deste trabalho, as colunas quirais semi-preparativas de polissacarídeos foram preparadas, em nosso grupo, segundo a literatura⁹⁰ e estão dispostas na *Tabela 3.31*.

TABELA 3.31. Dados referentes às colunas semi-preparativas empregadas neste trabalho.

Estruturas	Fase Estacionária	Especificações	Código
	Tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose	APS-Hypersil (120 Å, 5 µm) (15% g/g) (25 x 0,8 cm)	CSP-4
	Tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (20 x 0,7 cm)	CSP-5
	Tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20 % g/g) (20 x 0,7 cm)	CSP-6

As condições cromatográficas de separação para os benzimidazóis, em escala semi-preparativa, foram selecionadas dos resultados obtidos nas análises sistemáticas realizadas neste trabalho.

As atribuições das configurações R e S para os enantiômeros isolados foram realizadas através da literatura^{51,98-101}, considerando-se as atividades ópticas dos enantiômeros isolados que foram obtidas através da determinação polarimétrica do α_D etanol, 25°C, neste trabalho.

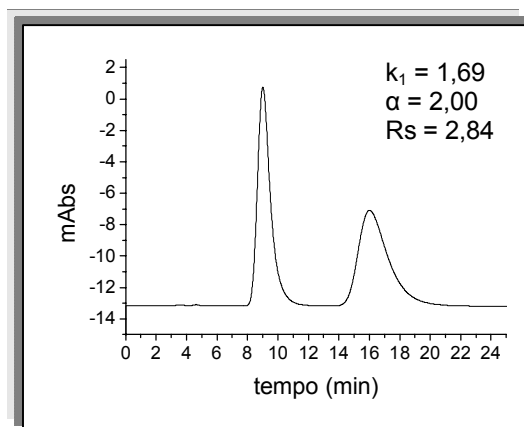
Contraopondo a conversão, o sinal do detector de dicroísmo circular estava com polaridade negativa, de modo que o (-)-enantiômero é representado pelo sinal positivo (para cima) e o (+)-enantiômeros pelo sinal negativo (para baixo).

É válido ressaltar que esta parte do trabalho foi desenvolvida em conjunto com a aluna de mestrado do nosso grupo de pesquisa, *Kátia Roberta Anacleto Belaz*.

3.6.1. Separação dos enantiômeros do lansoprazol

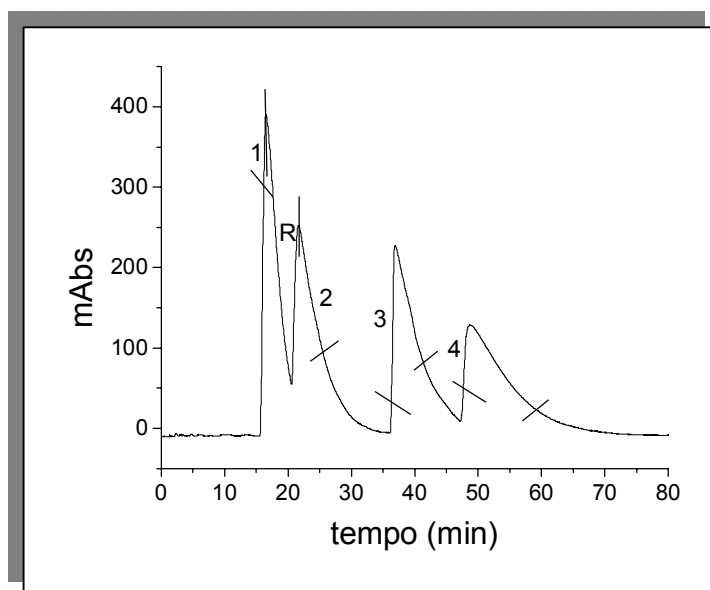
A condição analítica, selecionada para a enantiorresolução da mistura racêmica do lansoprazol foi obtida na coluna analítica tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g)(CSP 3.1) valendo-se do modo normal de eluição (*Cromatograma 3.7*).

Embora a acidez do suporte usado para os seletores quirais de polissacarídeos influenciem a enantiorresolução⁹², o elevado valor para o fator de resolução, obtido na condição analítica, permitiu a troca do suporte de sílica APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) para APS-Hypersil (120 Å, 50 µm)(15% g/g), uma vez que não havia uma coluna semi-preparativa com suporte APS-Nucleosil disponível naquela circunstância.



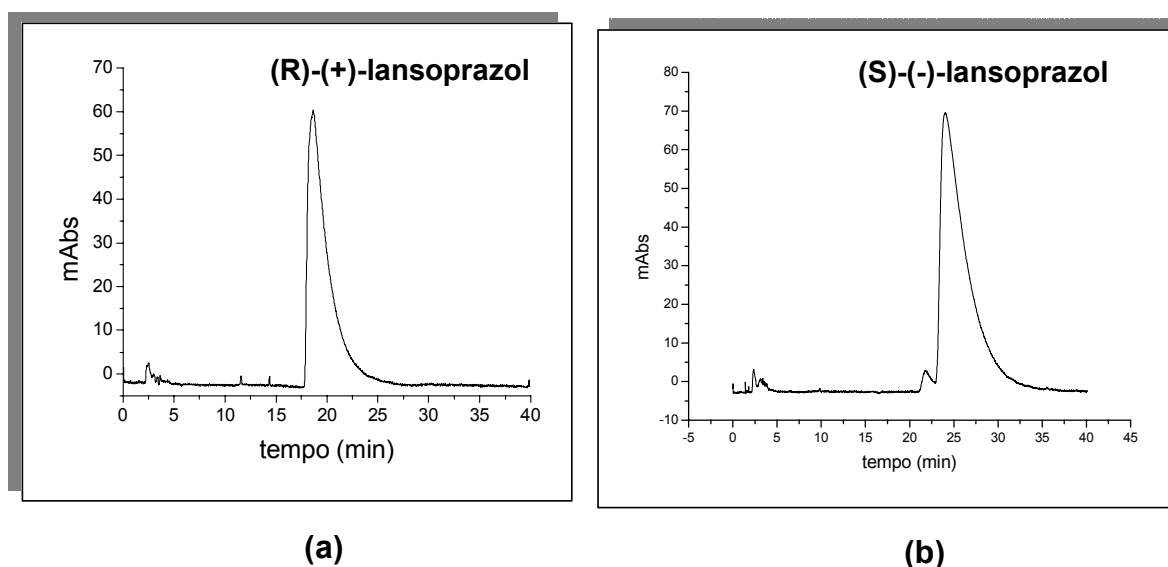
CROMATOGRAMA 3.7. Separação do enantiômeros do lansoprazol em escala analítica. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP 3.1); Fase móvel: hexano/etanol (70:30 v/v); Vazão: 0,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ :289 nm.

Os ciclos em separações semi-preparativas permitem que maiores quantidades de amostras sejam injetadas, uma vez que se realizam coletas entre os ciclos, levando a uma maior produtividade⁴⁷. O uso de ciclo foi, portanto, utilizado para a separação dos enantiômeros do lansoprazol através de 10 injeções (200 µL) de concentração 7,5 mg.mL⁻¹, totalizando 15 mg de mistura racêmica.



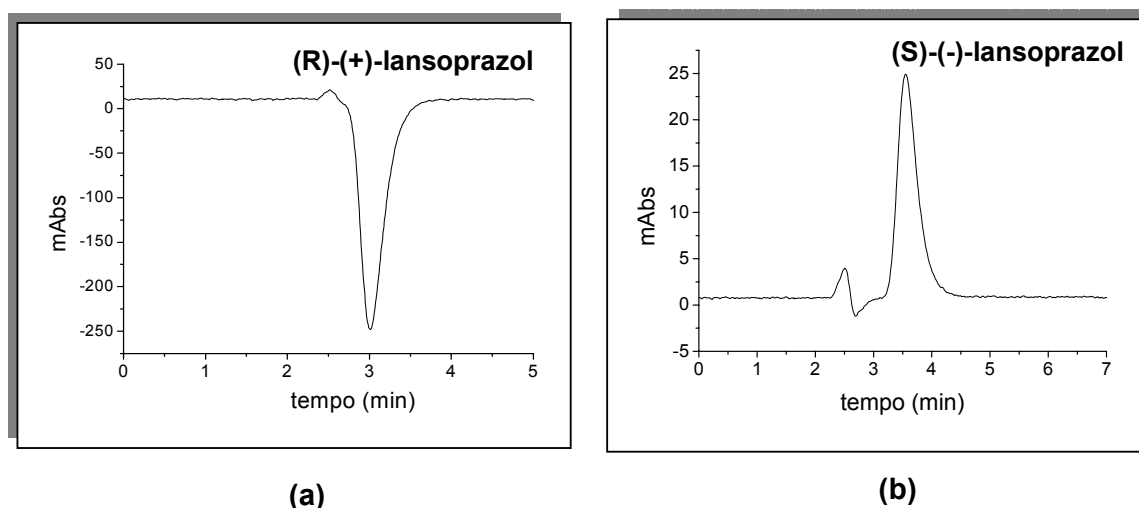
CROMATOGRAMA 3.8. Reciclos realizados na separação dos enantiômeros do lansoprazol. Coluna semi-preparativa: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Hypersil (120 Å, 5 µm) (20% g/g) (25 x 0,8 cm)(CSP-4); Fase móvel: hexano/etanol (70:30 v/v); Vazão: 2,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:289 nm.

A pureza enantiomérica foi determinada na coluna semi-preparativa (CSP-4) (Cromatogramas 3.9 a e b).



CROMATOGRAMAS 3.9. Determinação da pureza enantiomérica do lansoprazol. Coluna semi-preparativa: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Hypersil (120 Å, 5 µm) (20% g/g) (25 x 0,8 cm)(CSP-4); Fase móvel: hexano/etanol (70:30 v/v); Vazão: 2,5 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:289 nm. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-lansoprazol (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-lansoprazol^{98,99}.

As atividades ópticas dos enantiômeros isolados foram determinadas através da determinação polarimétrica do α_D etanol, 25°C e, também com o uso do detector de dicroísmo circular nas condições cromatográficas descritas na *Figuras 3.3 a e b*.



FIGURAS 3.3. Atividade óptica dos enantiômeros do lansoprazol através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 μ m) (20% g/g) (CSP 3.1); Fase móvel: etanol; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 μ L, λ :289 nm e polaridade negativa. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-lansoprazol, (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-lansoprazol.

Na *Tabela 3.32* encontram-se os dados referentes à separação dos enantiômeros do lansoprazol.

TABELA 3.32. Dados referentes à separação semi-preparativa dos enantiômeros do lansoprazol.

	1º enantiômero <i>(R)-(+)-lansoprazol</i>	2º enantiômero <i>(S)-(-)-lansoprazol</i>
Massa obtida (mg)	6,3	5,2
Pureza enantiomérica (%)	99,9	95,3
Rendimento (%)	84,0	69,3
Excesso enantiomérico (%)	99,8	90,6
α_D etanol, 25°C	+142,4°	-124,4°
Produtividade (mg.h ⁻¹)	0,54	0,44

Mesmo com os baixos rendimentos e a baixa produtividade relatada, o primeiro enantiômero ((R)-(+)-lansoprazol) foi obtido com elevada pureza enantiomérica (99,9%).

3.6.2. Separação dos enantiômeros do rabeprazol e Ro 18-5364

Para a realização da separação dos enantiômeros do rabeprazol e do Ro 18-5364 foi necessário realizar a otimização das condições semi-preparativas, uma vez que as bandas cromatográficas estavam assimétricas, o que dificultaria a obtenção dos enantiômeros com alto grau de pureza. Neste caso, foi adicionado á fase móvel, constituída inicialmente de hexano:etanol, ácido acético (HAc) (0,02%) e trietilamina (0,02%) (TEA). O uso de aditivos ácidos e básicos na fase móvel afeta a resolução de modo a favorecer a simetria das bandas cromatográficas e contribuir para uma separação enantiomérica mais efetiva ¹⁰².

Neste trabalho foi utilizada a coluna semi-preparativa tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-5), cujo suporte APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) correspondia ao suporte da coluna analítica (CSP-3.1). Desta forma, a separação semi-preparativa foi favorecida, uma vez que não foi necessária a realização de reciclos devido a ótica resolução destes enantiômeros nestas condições cromatográficas.

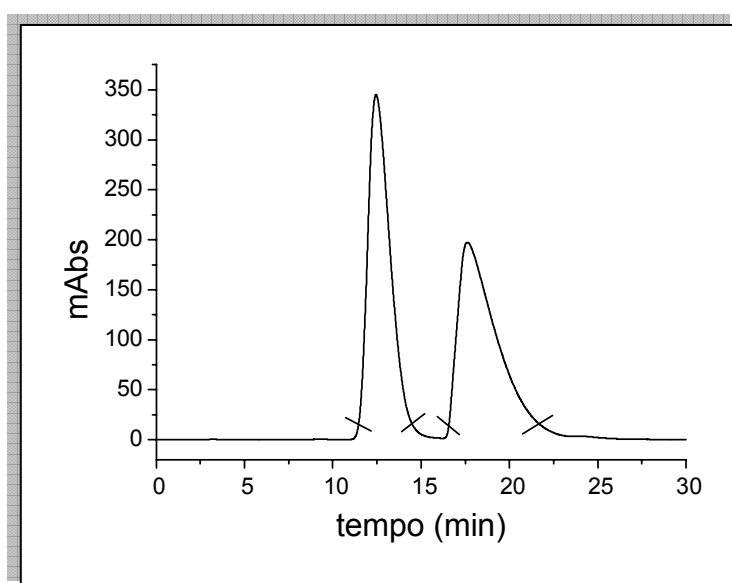
A pureza enantiomérica foi determinada na coluna analítica tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP 3.1), utilizando a mesma composição de fase móvel empregada na separação em escala multi-miligrama.

As medidas de atividade óptica e a obtenção do dicroísmo circular foram realizadas utilizando etanol como solvente.

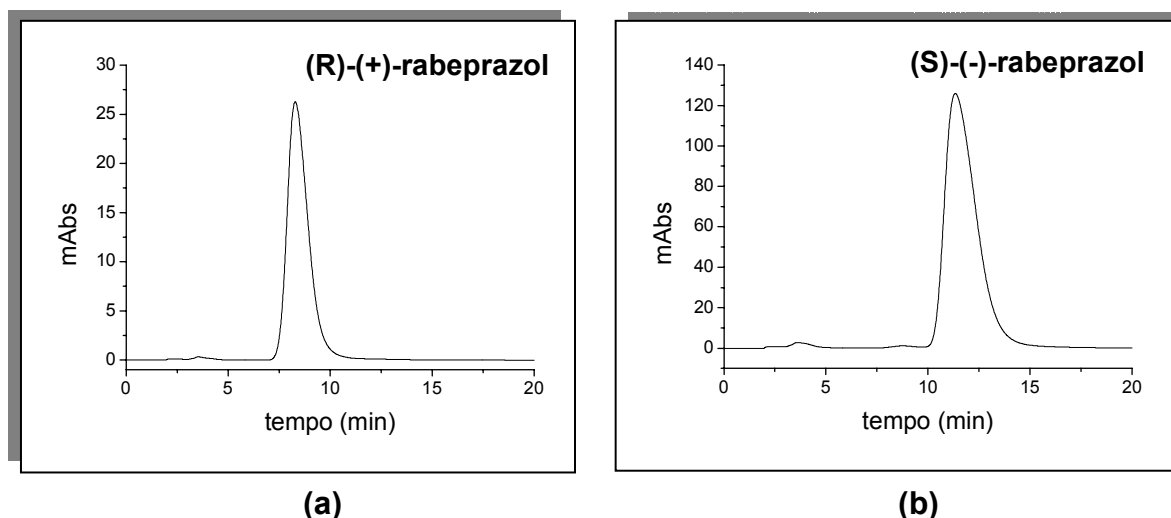
3.6.2.1. Separação dos enantiômeros do rabeprazol

O *Cromatograma 3.10* ilustra a separação semi-preparativa dos enantiômeros do rabeprazol, para a qual foram realizadas 10 injeções (200 μL) de 17,6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, totalizando 32,5 mg de racemato injetado.

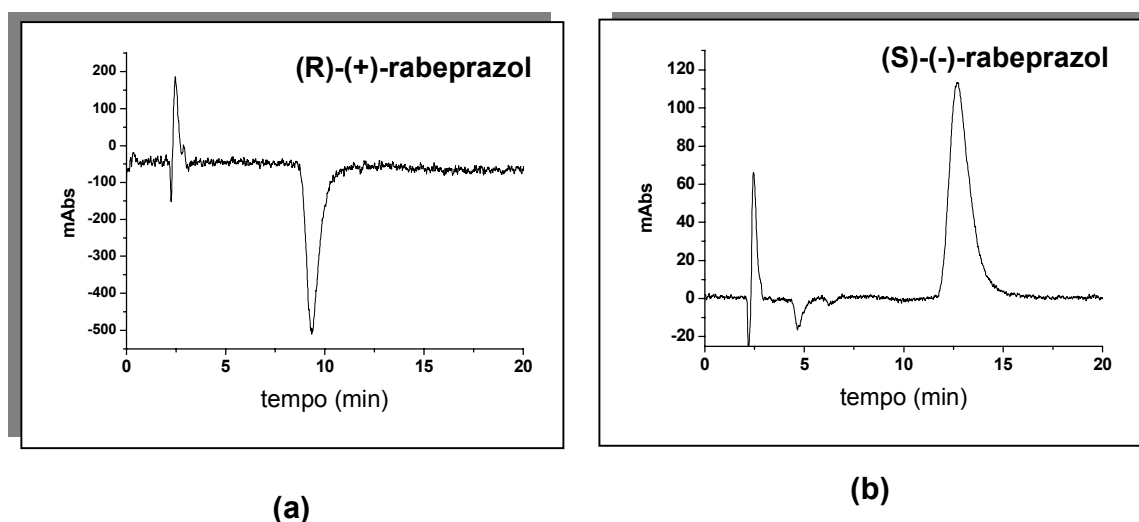
As purezas enantioméricas estão exemplificadas nos *Cromatogramas 3.11 a e b*. As *Figuras 3.4 a e b* também exemplificam a pureza dos enantiômeros do rabeprazol com os cromatogramas obtidos usando o dicroísmo circular como detector. A *Tabela 3.33* apresenta os dados referentes à separação em escala multi-miligrama.



CROMATOGRAMAS 3.10. Separação em escala semi-preparativa do enantiômeros do rabeprazol. Coluna semi-preparativa: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 μm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-5); Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v) + 0,02% HAc + 0,02% TEA; Vazão: 2,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; V.injeção: 200 μL e λ :289 nm.



CROMATOGRAMAS 3.11. Determinação da pureza enantiomérica do rabeprazol. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 μ m) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v) + 0,02% HAc + 0,02% TEA; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 μ L e λ :289 nm. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-rabeprazol, (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-rabeprazol¹⁰⁰.



FIGURAS 3.4. Atividade óptica dos enantiômeros do rabeprazol através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 μ m) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: etanol; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 μ L, λ :289 nm e polaridade negativa. (a) 1º enantiômero: (R)-(+)-rabeprazol, (b) 2º enantiômero: (S)-(-)-rabeprazol.

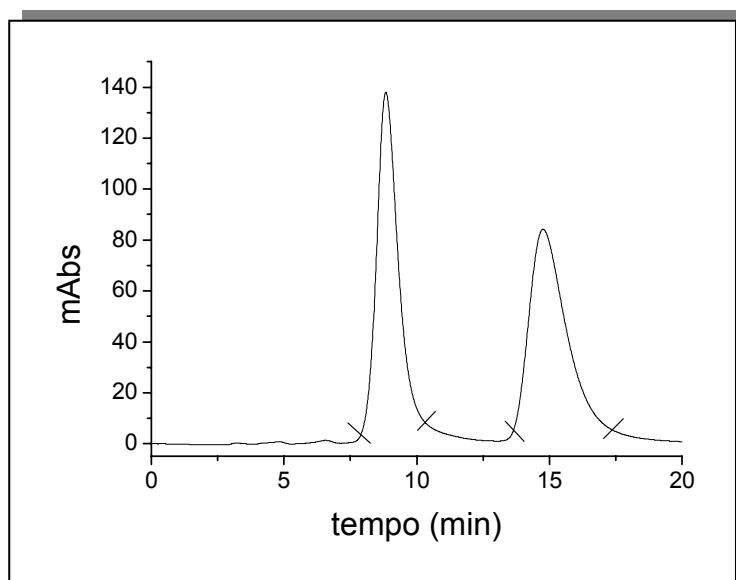
TABELA 3.33. Dados da separação semi-preparativa dos enantiômeros do rabeprazol.

	1º enantiômero <i>(R)-(+)-rabeprazol</i>	2º enantiômero <i>(S)-(-)-rabeprazol</i>
Massa obtida (mg)	16,1	15,7
Pureza enantiomérica (%)	99,9	99,6
Rendimento (%)	91,5	99,2
Excesso enantiomérico (%)	99,8	99,4
α_D etanol, 25°C	+74,7°	-73,4°
Produtividade (mg.h ⁻¹)	3,86	3,77

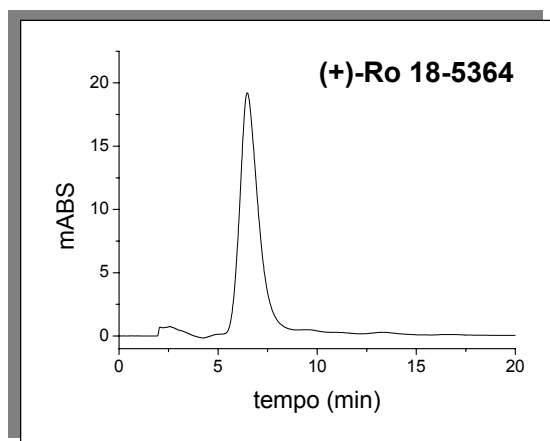
3.6.2.2. Separação dos enantiômeros do Ro 18-5364

Para a separação em escala multi-miligrama dos enantiômeros do Ro 18-5364 foram realizadas 8 injeções (200 μ L) de concentração 9,8 mg.mL⁻¹, correspondendo a 15 mg do racemato (*Cromatograma 3.12*).

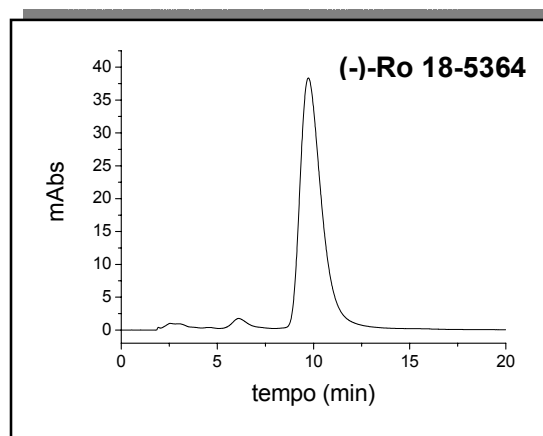
Os *Cromatogramas 3.13 a e b* se referem à determinação da pureza enantiomérica, as *Figuras 3.5 a e b* aos cromatogramas obtido através do uso do dicroísmo circular como detector. A *Tabela 3.34* apresenta os resultados referentes à separação multi-miligrama dos enantiômeros do Ro 18-5364.



CROMATOGRAMA 3.12. Separação em escala semi-preparativa do enantiômeros do Ro 18-5364. Coluna semi-preparativa: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-5); Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v) + 0,02% HAc + 0,02% TEA; Vazão: 2,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ:289 nm.



(a)



(b)

CROMATOGRAMAS 3.13. Atividade óptica dos enantiômeros do Ro 18-5364 através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: hexano/etanol (80:20 v/v) + 0,02% HAc + 0,02% TEA; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL e λ:289 nm. (a) 1º enantiômero: (+)-Ro 18-5364, (b) 2º enantiômero: (-)-Ro 18-5364.

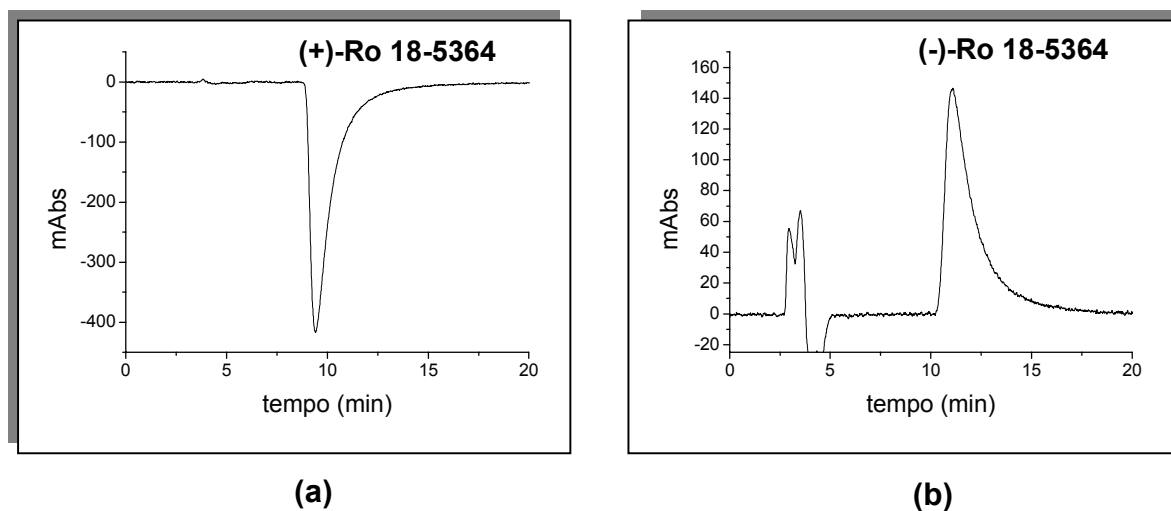


FIGURA 3.5. Atividade óptica dos enantiômeros do Ro 18-5364 através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica: tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), Fase móvel: etanol; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹; V.injeção: 20 µL, λ:289 nm e polaridade negativa. (a) 1º enantiômero: (+)-Ro 18-5364, (b) 2º enantiômero: (-)-Ro 18-5364.

TABELA 3.34. Dados da separação semi-preparativa dos enantiômeros do Ro 18-5364.

	1º enantiômero (+)-Ro 18-5364	2º enantiômero (-)-Ro 18-5364
Massa obtida (mg)	6,8	6,5
Pureza enantiomérica (%)	99,5	99,1
Rendimento (%)	90,7	86,7
Excesso enantiomérico (%)	99,0	98,2
α _D etanol, 25°C	+76,4°	-74,6°
Produtividade (mg.h ⁻¹)	2,55	2,44

3.6.3. Separação dos enantiômeros do omeprazol em escala multi-miligrama empregando-se injeção em fase sólida de amostra: uma comparação com o método convencional

Uma separação quiral analítica bem desenvolvida nem sempre é sinônimo de uma boa separação quiral em escala multi-miligrama. Enquanto a solubilidade da amostra nem sempre é um sério problema em cromatografia analítica, em preparativa é muitas vezes o fator que determina o limite a ser injetado, prejudicando, portanto, a produtividade.

Considerando-se que a separação analítica foi desenvolvida nas melhores condições possíveis de análise visando a separação preparativa, a insolubilidade da amostra, no volume de solvente a ser injetado, exige alternativas a serem examinadas ¹⁸.

Apesar do omeprazol não apresentar problemas de solubilização, a comparação entre dois métodos de injeção de amostra foi realizada. O método convencional, no qual a amostra está em solução e o método que utiliza a injeção em fase sólida de amostra.

A técnica de injeção em fase sólida de amostra consiste em misturar o racemato com sílica e colocar em uma pré-coluna (*Figura 3.6*), a qual é acoplada a uma coluna cromatográfica. À medida que o eluente passa pela pré-coluna o analito é solubilizado e encaminhado à coluna cromatográfica para a análise em questão.

Esta técnica foi empregada, com sucesso, na resolução em escala multi-miligrama de quatro racematos de kielcorinas, que apresentam baixa solubilidade, utilizando uma coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e o modo polar-orgânico como fase móvel ⁹⁷.

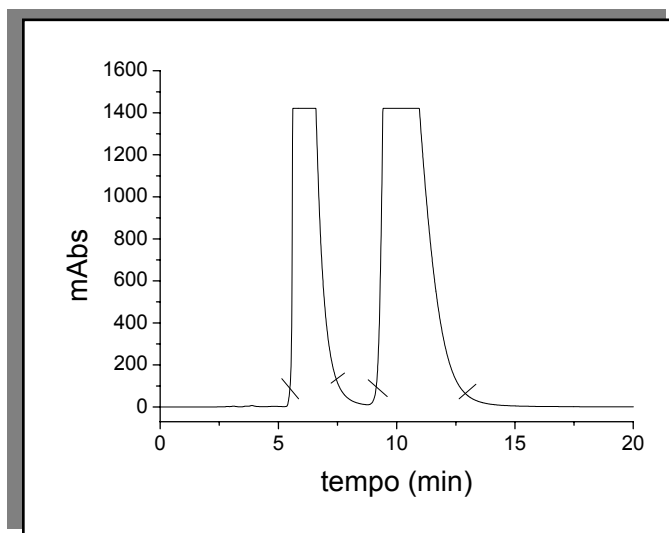
Neste trabalho, houve o interesse de explorar o modo polar-orgânico de eluição como uma alternativa ao modo normal, assim, com base em trabalho realizado anteriormente no grupo por Cassiano e colaboradores, foi selecionado metanol como fase móvel ³².



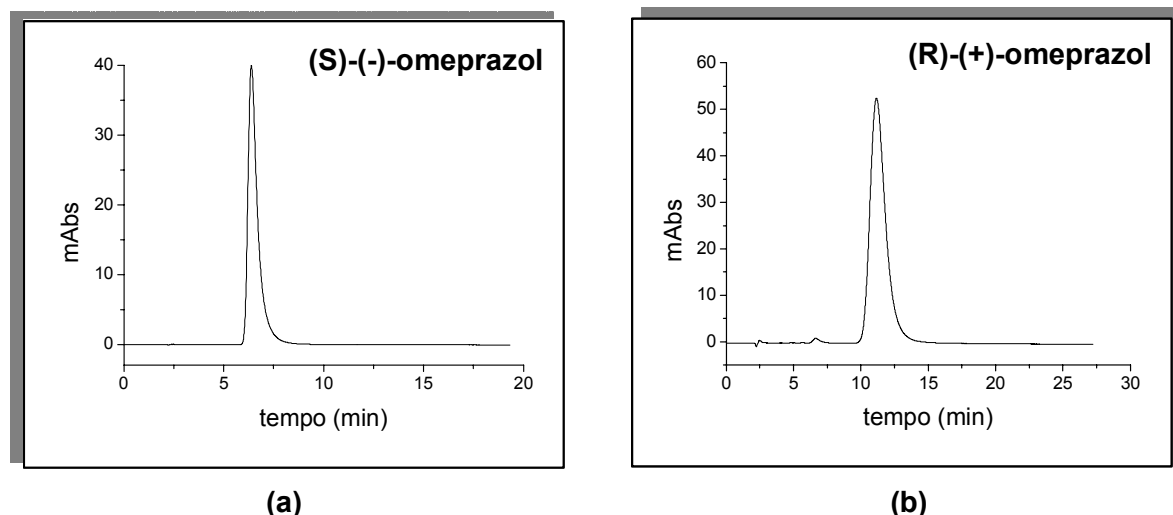
FIGURA 3.6. Pré-coluna utilizada na injeção de amostra em fase sólida.

3.6.3.1. Método convencional

O método convencional para a enantiorresolução, em escala semi-preparativa, consiste em preparar uma solução de concentração conhecida do racemato e, com o auxílio de uma seringa, realizar o número necessário de injeções para que todo racemato seja resolvido. Para este estudo foram realizadas 10 injeções (200 μL) de concentração 8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, totalizando 16 mg de racemato (*Cromatograma 3.14, Cromatogramas 3.15 a e b e Tabela 3.35*).



CROMATOGRAMA 3.14. Separação em escala semi-preparativa dos enantiômeros do omeprazol pelo método convencional. Coluna semi-preparativa: tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 μm) (20% g/g) (CSP-6); Fase móvel: metanol; Vazão: 3,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; V.injeção: 200 μL e λ : 302 nm.



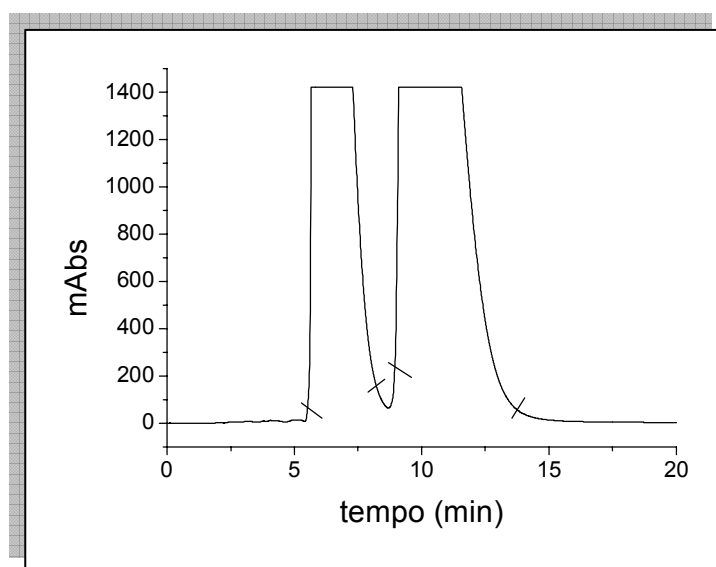
CROMATOGRAMAS 3.15. Determinação da pureza enantiomérica do omeprazol. Coluna analítica: tris (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-2); Fase móvel: metanol; Vazão: 1,0 mL.min⁻¹, V.injeção: 20 µL e λ:302 nm. (a) 1º enantiômero: (S)-(-)-omeprazol⁵¹, (b) 2º enantiômero: (R)-(+)-omeprazol⁵¹.

TABELA 3.35. Dados da separação semi-preparativa dos enantiômeros do omeprazol utilizando o método convencional.

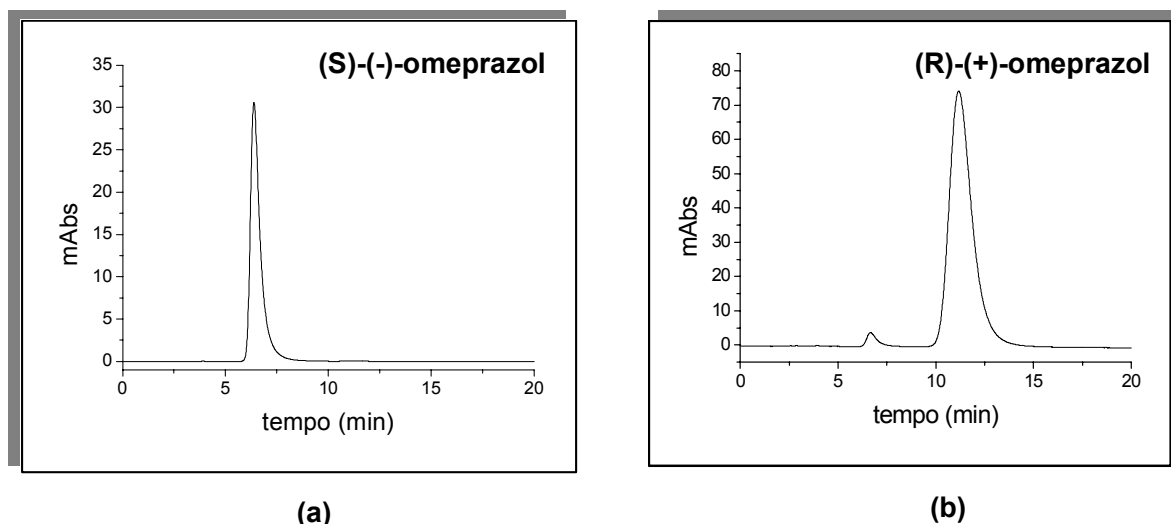
	1º enantiômero (S)-(-)-omeprazol	2º enantiômero (R)-(+)-omeprazol
Massa obtida (mg)	7,7	7,9
Pureza enantiomérica (%)	96,1	99,2
Rendimento (%)	96,2	98,7
Excesso enantiomérico (%)	92,2	98,4
α _D etanol, 25°C	-83,7°	+98,0°
Produtividade (mg.h ⁻¹)	3,08	3,16

3.6.3.2. Método de injeção em fase sólida

Para cada análise, a mistura racêmica do omeprazol (4 mg) foi misturada com sílica gel (500 mg), umedecida com metanol e introduzida na pré-coluna, totalizando 4 análises. A pré-coluna foi acoplada à coluna semi-preparativa (CSP-6) para a enantioseparação no modo polar orgânico de eluição (*Cromatograma 3.16, Cromatogramas 3.17 a e b e Tabela 3.36*).



CROMATOGRAMA 3.16. Separação em escala semi-preparativa dos enantiômeros do omeprazol por injeção em fase sólida. Coluna semi-preparativa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-6); Fase móvel: metanol ; Vazão: 3,0 mL.min⁻¹; V.injeção: 200 µL e λ: 302 nm.



CROMATOGRAMAS 3.17. Determinação da pureza enantiomérica do omeprazol. Coluna analítica tris (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-2), Fase móvel: metanol; Vazão: 1,0 mL.min⁻¹, V.injeção: 20 µL e λ:302 nm. (a) 1º enantiômero: (S)-(-)-omeprazol, (b) 2º enantiômero: (R)-(+)-omeprazol ⁵¹.

TABELA 3.36. Dados da separação semi-preparativa dos enantiômeros do omeprazol utilizando o método de injeção em fase sólida.

	1º enantiômero <i>(S)-(-)-omeprazol</i>	2º enantiômero <i>(R)-(+)-omeprazol</i>
Massa obtida (mg)	7,1	7,3
Pureza enantiomérica (%)	99,7	97,5
Rendimento (%)	88,7	91,2
Excesso enantiomérico (%)	99,4	95,0
α _D etanol, 25°C	-101,0°	+81,8°
Produtividade (mg.h ⁻¹)	7,1	7,3

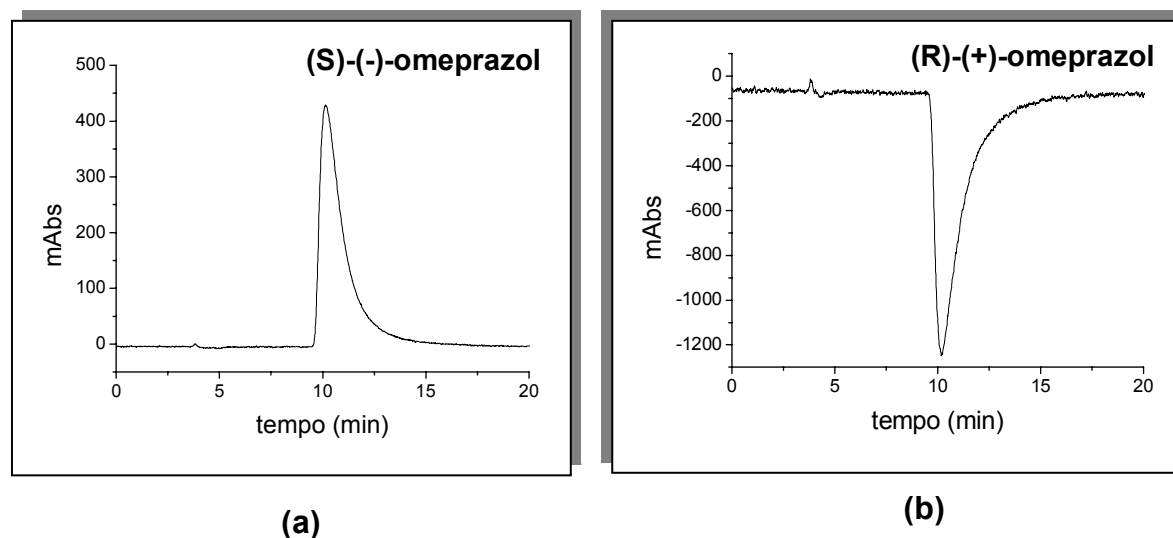
No método de injeção em fase sólida de amostra, o número de injeções realizadas e o tempo gasto para as análises são 2,5 vezes menores quando comparado com o método convencional (*Tabela 3.37*).

TABELA 3.37. Comparação entre os dois modos de injeção na separação dos enantiômeros do omeprazol em escala semi-preparativa.

	Injeção em Fase Sólida	Método Convencional
Massa total injetada (mg)	16	16
Massa recuperada (mg)	14,4	15,6
Massa 1º enantiômero (mg)	7,1	7,7
Massa 2º enantiômero (mg)	7,3	7,9
Pureza do 1º enantiômero (%)	99,7	96,1
Pureza do 2º enantiômero (%)	97,5	99,2
Produtividade 1º enantiômero (mg.h⁻¹)	7,1	3,08
Produtividade 1º enantiômero (mg.h⁻¹)	7,3	3,06
Tempo total de análise (min)	80	200
Número de injeções	4	10

Com relação à massa recuperada e pureza enantiomérica nenhuma diferença significativa foi observada entre os métodos. Deste modo, os resultados obtidos nesse trabalho indicaram que a utilização de uma pré-coluna para a injeção da amostra torna o processo de separação, em escala multi-miligrama, muito mais produtivo considerando o menor número de injeções e, conseqüentemente, a redução no tempo total da separação e no volume de solvente utilizado.

Para a determinação da atividade óptica dos enantiômeros do omeprazol através do uso do detector de dicroísmo circular, foram consideradas as maiores purezas enantioméricas obtidas. Neste caso, utilizou-se o 1º enantiômero obtido pelo método de injeção em fase sólida e o 2º enantiômero do método convencional. As análises foram feitas em etanol (*Figuras 3.7 a e b*).



FIGURAS 3.7. Atividade óptica dos enantiômeros do Ro 18-5364 através do uso do detector de dicroísmo circular. Coluna analítica tris (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (CSP-2), Fase móvel: etanol; Vazão: 0,8 mL.min⁻¹, V.injeção: 20 µL, λ:302 nm e polaridade negativa. (a) 1º enantiômero: (S)-(-)-omeprazol, (b) 2º enantiômero: (R)-(+)-omeprazol.

Não foi possível realizar a separação em escala multi-miligramas dos enantiômeros do pantoprazol, pois a coluna cromatográfica disponível naquela circunstância apresentava pressão muito elevada (CSP-4), o que comprometeu a resolução desses enantiômeros. Mesmo assim, pequenas frações do 1º enantiômero foram obtidas com pureza enantiomérica de 91,7 %, o que permitiu a realização da medida da atividade óptica deste enantiômero e a determinação da ordem de eluição dos enantiômeros nas fases móveis utilizadas ($\alpha_{D, \text{etanol}, 25^{\circ}\text{C}} = +52,5^{\circ}$ / (R)-(+)-pantoprazol)¹⁰¹.

A ordem de eluição dos enantiômeros do lansoprazol, omeprazol, rabeprazol Ro 18-5364 e pantoprazol permaneceram inalteradas quando se avaliou o modo normal constituído de hexano/etanol, o modo reverso em etanol/água e modo polar-orgânico com 100% de etanol. No caso do omeprazol, a ordem de eluição também não foi alterada quando se utilizou metanol como eluente.

Através de uma análise geral, verifica-se que somente no caso do omeprazol o primeiro enantiômero a eluir é o (-)-enantiômero, pois para os demais o (+)-enantiômero é o que apresenta o menor tempo de retenção.

“Nada melhor que um sonho para criar o futuro”.

Victor Hugo

*“Uma coisa só é impossível até que alguém duvida
e acaba provando o contrário”.*

Albert Einstein

Conclusões

4. Conclusões

A construção de um modelo matemático preditivo para a separação quiral não foi possível. Os valores dos coeficientes cromatográficos de partição dos benzimidazóis, determinados nas três colunas quirais de polissacarídeos tendo etanol como modificador orgânico, foram subestimados, não permitindo a elaboração do modelo.

Com a realização das análises sistemáticas, no modo reverso e normal de eluição, pela variação da concentração de etanol nas fases estacionárias de polissacarídeos, foi possível observar pelos resultados obtidos, que as características do modo polar-orgânico de eluição se manifestam mesmo sob condições de modo normal ou reverso de eluição. Tal fato é verificado pelos perfis dos fatores de retenção descritos neste trabalho.

Em condições de modo reverso de eluição, a porcentagem de etanol necessária, para que as retenções de modo polar-orgânico comecem a vigorar, é menor. As características do modo polar-orgânico prevalecem mesmo havendo uma porcentagem de água na fase móvel em torno de 15%.

Em condições de modo normal de eluição, a mudança de modo de eluição, é menos efetiva quando comparada ao modo reverso, pois uma porcentagem maior de etanol é necessária para que as retenções de modo polar-orgânico comecem a prevalecer. Os resultados indicam que as interações no modo normal são muito próximas ao do modo polar-orgânico, não sendo possível verificar grandes mudanças nos perfis de retenção.

Os valores experimentais e teóricos obtidos demonstram que a mudança de modo de eluição do normal para o polar-orgânico é lenta, enquanto que a passagem do modo reverso para o polar-orgânico é rápida.

Considerando os resultados teóricos e os intervalos de confiança, a mudança de modo de retenção do reverso para o polar orgânico, ocorre na seguinte ordem das colunas usadas: CSP-3 > CSP-1 > CSP-2. Já a mudança do modo de normal para o polar orgânico de eluição é mais definida na seguinte ordem CSP -2 > CSP -3.1 > CSP -1,

O perfil de retenção nas fases estacionárias quirais foi similar na análise da série homóloga considerando o modo de eluição empregado, modo

normal e reverso. Em contrapartida, o poder de discriminação quiral destas fases foi distinto quando avaliada a variação da concentração de etanol na fase móvel. Dentre as colunas quirais, a tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3.1) foi a que apresentou maior capacidade de discriminação quiral dos enantiômeros desta série no modo normal de eluição. No modo reverso, as três colunas avaliadas apresentaram baixo poder de resolução para os enantiômeros do lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e Ro 18-5364. No entanto, a coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2) mostrou ótima capacidade de resolução dos enantiômeros do omeprazol no modo normal, reverso e polar-orgânico.

Com este trabalho, estabeleceu-se, pela primeira vez, uma relação entre o modo normal e reverso de eluição ao se determinar o ponto de isoeluição, utilizando-se as fases de polissacarídeos como seletores quirais. Mesmo sob condições de modo de eluição distintos, foram obtidos os mesmos valores de fatores de retenção para cada composto da série homóloga.

As fases estacionárias de polissacarídeos demonstraram, mais uma vez, excelente capacidade de resolução enantiomérica em escala multi-miligrama. Os enantiômeros foram obtidos com alta pureza enantiomérica e estes não apresentaram mudança na ordem de eluição quando foi analisado o modo reverso (etanol/água), polar-orgânico (etanol) e normal (hexano/etanol).

O método de injeção em fase sólida mostrou-se produtivo e eficiente para a resolução de amostras em escala multi-miligramas.

Para um melhor entendimento da existência do ponto de isoeluição e sobre as mudanças de modos de retenção, talvez seja necessário recorrer a um tratamento matemático dos dados aqui obtidos, valendo-se possivelmente de programas de modelagem molecular.

Pescador de Ilusões

Se meus joelhos não doessem mais

Diante de um bom motivo

Que me traga fé, que me traga fé

Se por alguns segundos eu observar

E só observar

A isca e o anzol, a isca e o anzol

A isca e o anzol, a isca e o anzol

Ainda assim estarei pronto pra comemorar

Se eu me tornar menos faminto

E curioso, e curioso

O mar escuro, é, trará o medo lado a lado

Com os corais mais coloridos

Valeu a pena, ê, ê

Valeu a pena, ê, ê

Sou pescador de ilusões

Sou pescador de ilusões

Se eu ousar catar

Na superfície de qualquer manhã

As palavras de um livro sem final

Sem final, sem final, sem final, final

Valeu a pena, ê, ê

Valeu a pena, ê, ê

Sou pescador de ilusões

Sou pescador de ilusões

“ Para cada esforço disciplinado há uma retribuição múltipla ”.

Jim Rohn

Parte Experimental

5. Parte Experimental

5.1. Generalidades:

5.1.1. Fármacos

As misturas racêmicas utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelas seguintes empresas:

Omeprazol : Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), lote 1030;

Lansoprazol : Boehringer Ingelheim, lote H505;

Rabeprazol :Elisai Co.,Ltd.,Clinical Research Center, lote 14040204;

Pantoprazol : Eurofarma, ordem de produção 12100028;

Ro 18-5364 : F.Hoffmann–La Roche Ltd1040358.

5.1.2. Sistemas cromatográficos

As análises cromatográficas foram realizadas nos seguintes sistemas cromatográficos:

Sistema 1: Cromatógrafo analítico líquido de alta eficiência da marca SHIMADZU composto de uma bomba LC-20AT, com válvula solenóide de quatro linhas, degaseificador DGU-20A₅, auto-injetor SIL-10A, forno CTO-10A_{svp}, detector espectrofotométrico de absorção no UV visível SPD-20A ligado a uma interface CBM 20A. Os cromatogramas foram registrados pelo software LC SOLUTION.

Sistema 2: Cromatógrafo preparativo líquido de alta eficiência da marca SHIMADZU, composto de uma bomba modelo LC-6AD acoplada a um detector espectrofotométrico de absorção no UV visível, de comprimento de onda variável, modelo SPD-10AV_{vp}, injetor manual RHEODYNE 7725 com alça dosadora de 200 µL. O equipamento está ligado a uma interface CBM SCL-10AV_{vp} e os cromatogramas são registrados pelo software CLASS-VP.

Sistema 3: Cromatógrafo analítico líquido de alta eficiência da marca SHIMADZU composto de duas bombas LC-10AD_{vp}, com válvula solenóide de quatro linhas, auto-injetor SIL-10AD_{vp}, detector espectrofotométrico de absorção no UV

visível SPD-10AV_{vp}, detector quiral da marca JASCO CD 2095 Plus. O equipamento está ligado a uma interface SCL-10AV_{vp} e os cromatogramas foram registrados pelo software LC SOLUTION.

5.1.3. Equipamentos e materiais

As fases estacionárias quirais foram empacotadas numa empacotadora SHANDON, utilizando tubos de aço inox (15,0 X 0,46 cm D.I.) sob pressão de 7000 psi.

A análise elementar do carbamato sintetizado foi realizada no DQ-UFSCar, utilizando-se um equipamento FISIONS EA 1108.

O espectro vibracional do carbamato na região do infravermelho foi realizado no DQ-UFSCar, em um espectrofotômetro BOMEM-MICHELSON FT-IR, modelo Power Male 1-Ultrasync.

Para a uniformização do tamanho de partícula e homogeneização da fase estacionária quiral sintetizada, foi utilizada uma peneira com orifício de 38 µm, ENDECOTT-SBS 410/1986 (995308).

As fases móveis foram preparadas sempre na relação volume/volume e filtradas a vácuo no sistema MILLIPORE, com o auxílio de uma membrana de nylon PHENOMENEX de 0,45 µm, sendo posteriormente degaseificadas em um ultra-som COLE-PALMER 8852.

A água utilizada na composição das fases móveis foi obtida em um sistema MILLI-Q (Millipore, São Paulo, SP, Brasil).

A sílica utilizada para a separação dos enantiômeros por injeção em fase sólida foi a sílica gel Merk 60 (0,50-0,20 mm)

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica marca AND, modelo HR200, com precisão de 0,0001 g e uma balança semi-analítica MARTE, com precisão de 0,001 g.

Para a evaporação de solventes, foram utilizados rotaevaporadores BUCHI modelo Rotavapor R-200 e Rotavapor R-114.

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram de pureza analítica ou grau HPLC.

Na preparação da fase estacionária quiral tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose, foram utilizados os seguintes reagentes: amilose tipo III de batata (SIGMA), 3,5 dimetoxifenilisocianato 98% (ALDRICH) e 3-aminopropilsílica Nucleosil (Machery-Nagel) (500 Å, 7 µm) derivada no grupo de

pesquisa. Também foram utilizados: N,N-dimetilacetamida, metanol (TEDIA) e piridina (MERCK).

Para a avaliação das colunas quirais empregadas neste trabalho foram utilizados os padrões racêmicos base de Troger e óxido de trans estilbeno.

Os tempos mortos das colunas (t_0) foram determinados com 1,3,5-tri-tert-butilbenzeno quando a eluição foi no modo normal e acetonitrila no modo reverso de eluição.

A atividade óptica dos enantiômeros isolados foi determinada no DQ-UFSCar através do equipamento Polarimeter 241 Perkin-Elmer, com lâmpada de sódio 589 nm e célula de 1 decímetro.

A pureza enantiomérica dos enantiômeros isolados foi determinada através dos softwares LC SOLUTION e CLASS-VP.

5.1.4. Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram ¹⁸:

Fator de retenção (k): é a razão do número de moléculas do soluto na fase estacionária pelo número de moléculas na fase móvel sendo calculado pela fórmula, $k = t_r - t_0 / t_0$, onde, t_r = tempo de retenção do composto a ser analisado; t_0 = tempo morto da coluna, ou seja, é o tempo de eluição de um soluto não retido desde sua injeção até a chegada no detector.

Fator de separação (α): é o parâmetro que mede a seletividade da separação para duas bandas adjacentes, $\alpha = k_2 / k_1$, onde k_1 e k_2 são os fatores de retenção do primeiro e segundo composto a eluir, neste caso, do 1º e do 2º enantiômero respectivamente.

Resolução (R_s): mostra a qualidade da separação baseando-se nas larguras das bandas além de suas distâncias, sendo calculado através da seguinte fórmula: $R_s = 1,18 (t_2 - t_1) / w_1 + w_2$, onde t_2 e t_1 são os tempos de retenção de duas bandas adjacentes, w_1 e w_2 são as larguras das bandas medidas na meia altura em unidade de tempo.

5.2. Síntese da fase estacionária quiral de amilose

5.2.1. Síntese do tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose

Inicialmente secou-se o isocianato na bomba a vácuo por um período de 5 horas e a amilose em estufa a vácuo na temperatura de 60 °C por 24 horas.

Em um sistema de refluxo, adicionou-se piridina (25,7 mL) a amilose (0,506 g; $3,12 \times 10^{-3}$ mol) mantendo-se a mistura sob agitação por 24 horas, à temperatura de aproximadamente 98 °C. Após este período, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente, onde se adicionou o reagente 3,5 dimetoxifenilisocianato (1,95 g; $10,9 \times 10^{-3}$ mol) solubilizado em piridina (5 mL). A reação permaneceu sob aquecimento e agitação por mais 72 horas.

Após o resfriamento da reação à temperatura ambiente, o produto foi precipitado, sob agitação em metanol (300 mL). A mistura foi mantida em agitação durante 1 hora e, então, o produto branco foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com metanol, repetidas vezes, até que não se observasse mais resíduos de piridina.

O carbamato foi seco em dessecador com vácuo por 24 horas e caracterizado por análise elementar e infravermelho.

Análise elementar :

Valores teóricos: %C=56,65; %H=5,29; %N=6,96

Valores Experimentais: %C=54,82; %H=5,49; %N=5,95

Espectro no infravermelho ($\nu_{máx}$, cm^{-1}): 3340, 1748, 1552.

5.2.2. Cobertura do carbamato ao suporte APS-Nucleosil (500 Å, 7 μ m)

O produto tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (0,500 g) foi dissolvido em uma mistura contendo clorofórmio:THF:N,N-dimetilacetamida (6:3:1 v/v)(20,0 mL).

Esta solução foi adicionada, em pequenas porções, a 3-aminopropilsílica Nucleosil (2,500 g), previamente deixada em refluxo por meia hora em THF (50,0 mL) e resfriada à temperatura ambiente. Os solventes foram lentamente evaporados em rotaevaporador num banho de gelo.

A fase estacionária foi totalmente seca em bomba a vácuo e, posteriormente, peneirada.

O resultado final foi uma cobertura de 20% (g/g) de carbamato em relação à APS-Nucleosil.

5.3. Empacotamento da fase tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil

A fase estacionária quiral (1,8 g) foi suspensa em 50,0 mL de hexano:isopropanol (50:50 v/v) e agitada por 3 minutos no ultrassom. Posteriormente, foi empacotada em uma coluna de aço inoxidável (15,0 x 0,46 cm D.I) sob pressão de 7500 psi utilizando-se hexano:isopropanol (90:10 v/v) como eluente.

A coluna foi condicionada durante 24 horas em hexano:isopropanol (95:05 v/v), numa vazão de 0,5 mL.min⁻¹, e avaliada com o padrão racêmico óxido de trans-estilbeno, com detecção em 254 nm.

5.4. Fases estacionárias quirais de polissacarídeos utilizadas

CSP-1: Coluna analítica tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46 cm);

CSP-2: Coluna analítica tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46 cm);

CSP-3: Coluna analítica tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46 cm);

CSP-3.1: Coluna analítica tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46 cm);

CSP-4: Coluna semi-preparativa tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Hypersil (120 Å, 5 µm) (15% g/g) (25 x 0,8 cm).

CSP-5: Coluna semi-preparativa tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosill (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm);

CSP-6: Coluna semi-preparativa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (20 x 0,7 cm);

5.5. Estudo sistematizado no modo reverso de eluição

Para a realização deste estudo foram utilizadas as colunas analíticas preparadas com as fases tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose (CSP-1), tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (CSP-2) e tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose (CSP-3), adsorvidas em APS-Nucleosil.

Foram preparadas soluções de concentração 50 µg.mL⁻¹ de cada fármaco (lansoprazol, omeprazol, rabeprazol, pantoprazol, Ro 18-5364) e alíquotas de 20µl foram injetadas no sistema cromatográfico 1.

Inicialmente, para a determinação do coeficiente cromatográfico de partição $\log k_w$, foram realizadas medidas em 35%, 50%, 65% e 80% de etanol em água. Os valores de $\log k_w$ foram obtidos pela extrapolação a partir das relações entre $\log k$ e fração de etanol, considerando-se dois tipos de dependências da equação de Snyder: linear e não-linear.

Para o estudo sistematizado, no modo reverso, a composição da fase móvel variou de 0%, 0,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% e 75% de água em etanol. O tempo máximo estabelecido de análise foi de 200 minutos, desta forma para alguns compostos não foi possível determinar os parâmetros cromatográficos em concentrações elevadas de água (70 e 75%).

As análises foram feitas na vazão de 0,5 mL.min⁻¹ e temperatura constante de 25 °C. A detecção para o omeprazol foi em 302 nm e para o lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e Ro 18-5364 foi em 289 nm.

Todas as equações de regressão linear foram obtidas a partir do programa de regressão linear múltipla Hansch Analysis and Bilinear Model – Hugo Kubinyi, BASF AG, august 1998.

5.6. Estudo sistematizado no modo normal de eluição

As colunas analíticas tris (3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (CSP-1), tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (CSP-2) e tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (CSP-3.1), foram avaliadas no modo normal de eluição.

Para este estudo foi necessário substituir a coluna analítica quiral CSP-3, que apresentava pressão elevada, pela CSP-3.1.

As soluções de concentração $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada fármaco (lansoprazol, omeprazol, rabeprazol, pantoprazol, Ro 18-5364), foram preparadas e injetadas no sistema cromatográfico 1 sob alíquotas de $20 \mu\text{l}$.

Para o estudo sistematizado no modo normal de eluição a composição da fase móvel variou de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% de etanol em hexano.

As análises foram feitas na vazão de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura constante de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A detecção para o omeprazol foi em 302 nm e para o lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e Ro 18-5364 foi em 289 nm.

Todas as equações de regressão linear foram obtidas a partir do programa de regressão linear múltipla Hansch Analysis and Bilinear Modeal – Hugo Kubinyi, BASF AG, august 1998.

5.7. Separação dos enantiômeros do rabeprazol, lansoprazol, e Ro 18-5364 em escala multi-miligrama

Para a separação dos enantiômeros do lansoprazol foi utilizada a coluna quiral semi-preparativa tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Hypersil (120 \AA , $5 \mu\text{m}$) (15% g/g) ($25 \times 0,8 \text{ cm}$) (CSP-4). Hexano:etanol (70:30 v/v) foi usado como fase móvel numa vazão de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $\lambda=289 \text{ nm}$. Foi realizado um reciclo em cada análise.

Os enantiômeros do rabeprazol e Ro 18-5364 foram separados utilizando a coluna quiral semi-preparativa tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 \AA , $7 \mu\text{m}$) (20% g/g) ($20 \times 0,7 \text{ cm}$) (CSP-5). Hexano:etanol

(80:20 v/v) + 0,02% ácido acético + 0,02% trietilamina, foi usado como fase móvel numa vazão de 2,0 mL.min⁻¹ e $\lambda=289$ nm .

Todas as misturas racêmicas foram solubilizadas em etanol e foram injetadas no sistema cromatográfico sob alíquotas de 200 μ L.

As frações dos enantiômeros foram coletadas separadamente, sendo reunidas e evaporadas no rotaevaporador à temperatura ambiente.

A pureza enantiomérica do lansoprazol foi determinada nas mesmas condições cromatográficas da separação semi-preparativa.

A pureza enantiomérica do rabeprazol e Ro 18-5364 foram determinadas na coluna analítica tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 μ m) (20% g/g) (20 x 0,7 cm) (CSP-3.1), tendo hexano:etanol (80:20 v/v) + 0,02% ácido acético + 0,02% trietilamina como fase móvel numa vazão de 0,8 mL.min⁻¹.

As medidas das atividades ópticas dos enantiômeros através do polarímetro foram realizadas em etanol a temperatura ambiente de 25°C. Enquanto que as medidas das atividades ópticas com o uso do dicroísmo circular foram obtidas na coluna analítica CSP-3.1, numa vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e etanol como eluente.

O excesso enantiomérico (e.e) foi calculado valendo-se da fórmula:

$$e.e (\%) = (\text{pureza enantiomérica}) - (100 - \text{pureza enantiomérica})$$

Separação dos enantiômeros do lansoprazol

Massa injetada: 15,0 mg

Número de injeções: 10

1º enantiômero: 6,3 mg / pureza enant: 99,9% / e.e: 99,8% / α_D etanol, 25°C: + 142,4°

2º enantiômero: 5,2 mg / pureza enant: 95,3% / e.e: 90,6% / α_D etanol, 25°C: - 124,4°

Separação dos enantiômeros do rabeprazol

Massa injetada: 35,2 mg

Número de injeções: 10

1º enantiômero: 16,1 mg / pureza enant: 99,9% / e.e: 99,8% / α_D etanol, 25°C: + 74,7°

2º enantiômero: 15,7 mg / pureza enant: 99,6% / e.e: 99,4% / α_D etanol, 25°C: - 73,4°

Separação dos enantiômeros do Ro 18-5364

Massa injetada: 15,0 mg

Número de injeções: 8

1º enantiômero: 6,8 mg / pureza enant: 99,5% / e.e: 99,0% / α_D etanol, 25°C: + 76,4°

2º enantiômero: 6,5 mg / pureza enant: 99,1% / e.e: 98,2% / α_D etanol, 25°C: - 74,6°

5.8. Separação dos enantiômeros do omeprazol em escala multi-miligrama

Para a separação dos enantiômeros do omeprazol e realização do estudo comparativo entre dois métodos de injeção utilizou-se a coluna quiral semi-preparativa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS Nucleosil (500 Å, 7µm) (20 x 0,7 cm) (CSP-6), metanol como eluente, vazão de 3,0 mL.min⁻¹ e $\lambda=302$ nm.

As frações referentes a cada enantiômero foram coletadas separadamente, reunidas e evaporadas no rotaevaporador à temperatura ambiente.

A pureza enantiomérica foi determinada por injeções das frações coletadas na coluna analítica tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (500 Å, 7 µm) (20% g/g) (15 x 0,46 cm) (CSP-2), tendo metanol com eluente e vazão de 1,0 mL.min⁻¹.

As medidas das atividades ópticas pelo uso do polarímetro foram realizadas para os todos os enantiômeros isolados pelos dois métodos de injeção. Enquanto que para a determinação das atividades ópticas pelo uso do dicroísmo circular foram consideradas as maiores purezas enantioméricas obtidas entre os dois métodos de injeção. Neste caso, utilizou-se o 1º enantiômero obtido pelo método de injeção em fase sólida e o 2º enantiômero obtido pelo método convencional. A vazão utilizada na obtenção do dicroísmo circular foi de 0,8 mL.min⁻¹ na CSP-2. As análises foram feitas em etanol

5.8.1. Separação pelo método convencional

Dissolveu-se o racemato (16 mg) em metanol (2 mL) resultando num solução de concentração 8 mg.mL^{-1} , que foi injetada no sistema cromatográfico sob alíquotas de 200 μL .

Separação dos enantiômeros do omeprazol

Massa injetada: 16,0 mg

Número de injeções: 10

1º enantiômero: 7,7 mg / pureza enant: 96,1% / e.e: 92,2% / $\alpha_{\text{D etanol, 25}^\circ\text{C}}$: $-83,7^\circ$

2º enantiômero: 7,9 mg / pureza enant: 99,2% / e.e: 98,4% / $\alpha_{\text{D etanol, 25}^\circ\text{C}}$: $+98,0^\circ$

5.8.2. Separação pelo método em fase sólida

Omeprazol (4 mg) foi misturado à sílica gel (500 mg) e, em seguida a mistura foi umedecida com metanol e empacotada, com o auxílio de uma espátula, na pré-coluna de inox (15 x 8,0 mm DI) fabricada pela oficina mecânica do Departamento de Química da UFSCar.

A pré-coluna foi acoplada a coluna semi-preparativa quiral (CSP-6) e a separação realizada como descrito anteriormente (*Item 5.7*).

Separação dos enantiômeros do omeprazol

Massa injetada: 16,0 mg

Número de injeções: 4

1º enantiômero: 7,1 mg / pureza enant: 99,7% / e.e: 99,4% / $\alpha_{\text{D etanol, 25}^\circ\text{C}}$: $-101,0^\circ$

2º enantiômero: 7,3 mg / pureza enant: 97,5% / e.e: 95,0% / $\alpha_{\text{D etanol, 25}^\circ\text{C}}$: $+81,8^\circ$

“A imaginação é a maior pipa que se pode empinar”.

Lauren Bacall

*“Quem decide pode errar.
Quem não decide já errou”.*

Herbert von Karajan

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

1. MILLOT, M. C.; "Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors"; *Journal of Chromatography B*, **797**: 131-159, 2003.
2. ELIEL, E. L.; WILEN, S. H.; "Stereochemistry of Organic Compounds"; New York Wiley & Sons Inc.; p.1-1210, 1994.
3. ANOVA, C. M.; HUTTA, M.; "Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography"; *Journal of Chromatography B*, **797**: 91-109, 2003.
4. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; "Aspectos gerais da ação dos fármacos"; 1º ed. Rio de Janeiro, Artmed, 2001.
5. BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R.; "Substâncias enantiomericamente puras (SEP): A questão dos fármacos quirais"; *Química Nova*, **20** (6): 647-656, 1997.
6. AGRANAT, I.; CANER, H.; "Intellectual property and chirality of drugs"; *Drug Discovery Today*, **4** (7):313-321, 1999.
7. PIERINA, S.; B.; JABOR, V, A. R.; "Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar"; *Química Nova*, **28** (4): 683-691, 2005.
8. www.freepatentsonline.com/608073.hyaml acesso em 13/12/2006
9. MAGOON, T.; OTA, K.; JAKUBOWSKI, J.; NEROZZI, M.; WERNER, T. C.; "The use of neutral cyclodextrins as additives in capillary electrophoresis for the separation and identification of propoxyphene enantiomers"; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **373**: 628-631, 2002.
10. LIMA, V. L. E.; "Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem"; *Química Nova*, **20** (6): 657-663, 1997.
11. RENTSCH, K. M.; "The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory"; [*Journal of Biochemical and Biophysical Methods*](#), **54**: 1-9, 2002.
12. GOHEL, M. C.; "Overview on chirality and applications of stereo-selective dissolution testing in the formulation and development work"; *Dissolution Technologies*, August, 2003.
13. MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W.; "Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 3-33, 2001.

14. AGRANAT, I.; CANER, H.; GRONER, E.; LEVY, L.; "Trends in the development of chiral drugs"; *Drug Discovery Today*, **3** (9):105-110, 2004.
15. ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T. D.; LOHR, L. L.; SHARP, T. R.; "Isolation and identification of process related impurities and degradation products from pharmaceutical drug candidates. Part 1"; *American Pharmaceutical Review*, **4** (1): 70-78, 2001.
16. ROUCHI, M. A.; "Chiral Chemistry"; *Chemical and Engineering News*, **82** (24): 47-62, 2004.
17. BERMUDEZ, J. A. Z.; BARRAGAT, P.; "Medicamentos quirais: da dimensão química à discussão política"; *Caderno Saúde Pública*, **12** (1): 47-51, 1996.
18. CASS, Q. B; DEGANI, A. L. G.; "Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação"; São Carlos, EdUFSCar, 1ª ed, p.49-55, 2001.
19. SYNDER, L. R.; KIRKLAND, J. J; GLAJCH, J. L.; "Chiral Separation" IN: *Practical HPLC Method Development*, Nova York, John Wiley and Sons Inc., 2ª ed , p.537-615, 1997.
20. TAYLOR, D. R.; MAHER, K.; "Chiral separation by high performance liquid chromatography"; *Journal of Chromatography Science*, **30**: 67-85, 1992.
21. TACHIBANA, K.; OHNISHI, A.; "Reversed phase liquid chromatography separation of enantiômeros on polysaccharide type chiral stationary phase"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 127-154, 2001.
22. PIRKLE, W. H.; POCHAPSKI, T. C.; "Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers"; *Chemical Reviews*, **89**: 347-362, 1989.
23. BOOTH, T. D.; WAHNON, D.; WAINER, I.W.; "Is chiral recognition a three point process?"; *Chirality*, **9**: 96-98, 1997.
24. BERTHOD, A.; "Chiral recognition mechanisms"; *Analytical Chemistry*, april: 2093-2099, 2006.
25. NIKITAS, P.; PAPPAR-LOUISI, A.; AGRAFIOTOU, P.; "Effect of the organic modifier concentration on the retention in reversed-phase liquid chromatography I. General semi-thermodynamic treatment for adsorption and partition mechanisms"; *Journal of Chromatography A*, **946**: 9-32, 2002.
26. BOJARSKI, J.; HASSAN, Y.; ENEIN, A.; GHANEM, A.; "What's new in chromatographic enantioseparations"; *Analytical Chemistry*, **1**: 59-77, 2005.
27. SANTORO, M. I. R. M. ; SINGH, A. K. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; "Enantiomeric separation and quantitative determination of propranolol enantiomers in pharmaceutical preparations by chiral liquid chromatography"; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, **40** (3):301-308, 2004.

28. YASHIMA, E.; "Polysaccharide-based chiral stationary phases for High Performance Liquid Chromatography enantioseparation"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 105-125, 2001.
29. WAINER, I. W.; "HPLC chiral stationary phases for the stereochemical resolution of enantiomeric compounds. The current state of the art"; *In: Drug Stereochemistry Analytical Methods and Pharmacology*. Waine, I. W. (ed), Nova Iorque, Marcel Dekker Inc., 2^a ed., p.139-182, 1993.
30. KENNEDY, J. K.; "Comparison of chiral separations on polysaccharide chiral stationary phases to an improved Pirkle phase"; *Journal of Chromatography A*, **725**: 219-224, 1996.
31. PIRKLE, W. H.; WEKCH, C. J.; LAMM, B.; "Design, synthesis and evaluation of an improved enantioselective naproxen selector"; *American Chemical Society*, **23**: 409, 1992.
32. CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G., CASSIANO, F. N. M.; "Effects on enantioselectivity by the use of polysaccharide-based columns by multimodal elution"; *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, **26** (13): 2083-2101, 2003.
33. CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G., CASSIANO, N. M., PEDRAZOLLI, Jr. J.; "Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography"; *Journal of Chromatography B*, **766**: 153-160, 2002.
34. CASS, Q. B., BATIGALHIA, F.; "Enantiomeric resolution of a series of chiral sulfoxides high-performance liquid chromatography on polysaccharide-based columns with multimodal elution"; *Journal of Chromatography A*, **987**: 445-452, 2003.
35. HESSE, G.; HAGEL, R.; "Eine vollstandige racemattrennung durch elutions chromatographie na cellulose-tri-acetat"; *Chromatography*, **6**: 277-280, 1973.
36. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K.; "Useful chiral packing materials for high performance liquid chromatography resolution of enantiomers phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel"; *Journal of the American Chemical Society*, **106** (18): 5357-5359, 1984.
37. OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E.; "Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers"; *Angewandte Chemie International Edition*, **37**: 1020-1043, 1998.
38. OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y.; "Resolution by high performance liquid chromatography using polysaccharides carbamates and benzoates as chiral stationary phases"; *Journal of Chromatography A*, **666**: 403-419, 1994.
39. OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E.; "Chiral discrimination on polysaccharides derivatives"; *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **68**: 3289-3307, 1995.

40. OKAMOTO, Y.;KAIDA, Y.; HAYASHIDA, H.; HATADA, K.; “Tris (1-phenylethylcarbamate)s of cellulose and amylose as useful chiral stationary phases for chromatography optical resolution”; *Chemical Letters*, 909-912,1990.
41. MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y. V.; “Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar organic solvent chromatography”; *Journal of Chromatography A*, **1111**: 48-61, 2006.
42. LYNAM, K.; STRINGHAM, R. W.; “Chiral separations on polysaccharide stationary phases using polar organic mobile phases”; *Chirality*, **18**: 1-9, 2006.
43. KIRKLAND, K. M.; “Optimization of chiral selectivity on cellulose based high performance liquid chromatographic columns using aprotic mobile phase modifiers”; *Journal of Chromatography A*, **718**: 9-26, 1995.
44. 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** (13): 1029-1038, 2000.
45. BONATO, P. S.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C. M.; PAIAS, F. O.; IHA, M. H.; LIMA, R. P.; “Enantiomeric resolution of drug and metabolites in polysaccharide and protein based chiral stationary phases”; *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2** (13): 190-199, 2002.
46. ZONG Z.; XINGPING, L.; XIAOMEI, W.; HONG, Z.; YANPING, S.; LIREN, C.; YONGMIN, L.; “Analytical and semipreparative resolution of enantiomers of albendazole sulfóxido by HPLC on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) amylose chiral stationary phases”; *Journal of Biophysical Methods*, **62**: 69-79, 2005.
47. CASS, Q. B.; OLIVEIRA, R. V.; “Separation of multi-milligram quantities of gossypol enantiomers on polysaccharide based stationary phases”; *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, **25** (5): 819-829, 2002.
48. KARTOZIA, I.; KANNYONYO, M.; HAPPAERTS, T.; LAMBERT, D. M.; SCRIBA, G. K. E.; CHANKVETADZE; “Comparative HPLC enantioseparation of new chiral hydantoin derivatives on three different polysaccharide type chiral stationary phase”; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **27**: 457-465, 2002.
49. RAO, R. N.; RAJU, A. N.; NAGARAJU, D.; “Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of enantiomeric purity of citalopram in bulk drugs and pharmaceuticals”; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 280-285, 2006.
50. GATTI, G.; BONOMI, I.; MARCHISELLI, R.; FATTORE, C.; SPINA, E.; SCORDO, G.; PACIFICI, R.; PERUCCA, E.; “Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography”; *Journal of Chromatography B*, **784**: 375-383, 2003.

51. CASS, Q. B.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; CASSIANO, N. M.; DEGANI, A. L. G.; PEDRAZOLLI, 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**: 275-281, 2003.
52. NAKANO, T.; "Optically active synthetic polymers as chiral stationary in HPLC"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 205-225, 2001.
53. ARMSTRONG, D. W.; ZUKOWSKI, J.; "Direct enantiomeric resolution of monoterpene hydrocarbons via reversed phase high performance liquid chromatography with α -cyclodextrin bonded phase"; *Journal of Chromatography A*, **666**: 445-448, 1994.
54. ARMSTRONG, D. W.; DEMOND, W.; "Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical and structural isomers"; *Journal of Chromatography Science*, **22** (9): 411-415, 1984.
55. KURGANOV, A.; "Chiral chromatography separations based on ligand exchange"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 51-71, 2001.
56. CAMILLERI, P.; "Biomedical applications of chiral liquid chromatography"; *Biomedical Chromatography*, **5**(3): 32-128, 1991.
57. HAGINAKA, J.; "Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 253-273, 2001.
58. ARMSTRONG, D. W.; TANG, Y.; CHEN, S.; ZHOU, Y.; BAGWILL, C.; CHEN, J. R.; "Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography"; *Analytical Chemistry*, **66** (9): 1473-1484, 1994.
59. WAR, T. J.; FARRIS, A. B.; "Chiral separation using the macrocyclic antibiotics: a review"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 73-89, 2001.
60. KARLSSON, A.; ASPEGREN, A.; "Enantiomeric separation of amino alcohols on protein phases using statistical experimental design: a comparative study"; *Journal of Chromatography A*, **866**: 75-23, 2000.
61. THAKUR, A. K.; "New trends in pharmacokinetics"; Eds. Rescigno, A.; Thakur, A. k.; Plenum Press, New York, p.41-51, 1991.
62. PIRKLE, W. H.; WELCH, C. J.; "An investigation into the role of solvation in a well characterized chiral recognition system"; *Journal of Chromatography A*, **14**: 2027-2042, 1991.
63. CHANKVETADZE, B.; KARTOZIA, I.; YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y.; "Comparative enantioseparation of selected chiral drugs on four different polysaccharide type chiral stationary phases using polar organic mobile phases"; *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, **27**: 467-478, 2002.

64. SUNDARESAN, V.; ABROL, R.; "Biological chiral recognition the substrate's perspective"; *Chirality*, **17**: S30-S39, 2005.
65. NIKITAS, P.; PAPPAR-LOUISI, A.; AGRAFIOTOU, P.; "Effect of the organic modifier concentration on the retention in reversed-phase liquid chromatography I. General semi-thermodynamic treatment for adsorption and partition mechanisms"; *Journal of Chromatography A*, **946**: 9-32, 2002.
66. ROUSSEL, C.; VANTHUYNE, N.; SERRADEIL-ALBALAT, M.; VALLEJOS, J. C.; "True or apparent reversal of elution order during chiral high performance liquid chromatography monitored by a polarimetric detector under different mobile phase conditions"; *Journal of Chromatography A*, **995**: 79-85, 2003.
67. TAVARES, L. C.; "QSAR: The Hansch's approach"; *Química Nova.*, **27**(4): 631-639, 2004.
68. OPREA T. I.; "Current trends in lead discovery: Are we looking for the appropriate properties?"; *Journal of Computer-Aided Molecular Design.*, **16**(6): 325-334, 2002.
69. VALKO, K.; "Application of high performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution"; *Journal of Chromatography A*, **1037**: 299-310, 2003.
70. MONTANARI, M. L. C.; CASS, Q. B.; MONTANARI, C. A.; "Quantitative structure-retention relationship of antimicrobial hydrazides evaluated reverse-phase liquid chromatography"; *Chromatographia*, **51**(11): 722-726, 2000.
71. MONTANARI, M. L. C.; GAUDIO, A. C.; LEITÃO, A.; ALMEIDA, T. M. G.; MONTANARI, C. A.; "Chemometric characterization of chromatographic retention parameters of mesoionic 1,3,4-thiadiazolium-3-aminides by molecular interaction fields"; *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, **29** : 307-327, 2006.
72. BRITO, M. M.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C.; CASS, Q. B.; "On the partitioning of some newly synthesized mesoionic 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide and precursors evaluated by RP-HPLC"; *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, **22** (3): 357-366, 1999.
73. DIXIT, S.; SOPER, A. K.; FINNEY, J. L.; CRAIN, J.; "Water structure and solute association in dilute aqueous methanol"; *Europhysics Letters*, **59**(3): 377-383, 2002.
74. SNYDER, L. R.; DOLAN J. W.; GANT J. R.; "Gradient elution in high-performance liquid-chromatography. Theoretical basis for reversed-phase systems." *Journal of Chromatography*, **165**(1): 3-30, 1979.
75. SYNDER, L. R.; CARR P. W.; RUTAN S. C.; "Solvatochromically based solvent-selectivity triangle"; *Journal of Chromatography A*, **656**(1-2): 537-547, 1993.

76. VALKO, K.; SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L.; "Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition"; *Journal of Chromatography A*, **656**: 501-520, 1993.
77. HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J.; "Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease", In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRG, L. C.; GILMAN, A. G.; (Editors). Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics, 10^a edition, New York, McGRAW-HILL, p. 20-1005, 2001.
78. OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P.; "A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole"; *Natural Drug Discovery*, **2**: 9-132, 2003.
79. SIGRIST, N.; KRASSO, A.; MULLER, R. K.; FISCHLI, A. E.; "Ro 18-5364, a potent new inhibitor of the gastric (H⁺/K⁺)-ATPase"; *European Journal Biochemistry*, **166**: 453-459, 1987.
80. TORIBIO, L.; NOZAL, M. J.; ALONSO, C.; JIMÉNEZ, J. J.; "Comparative study of the enantioselective separation of several antiulcer drugs high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography"; *Journal of Chromatography A*, **1091**: 118-123, 2005.
81. SHERIF, Z. A.; MOHAMED, A. O.; BARDICY, M. G.; TARRAS, M.; "Reversed phase high performance liquid chromatographic method for the determination of lansoprazole, omeprazole e pantoprazole sodium sesquihydrate in presence of their acid induced degradation products"; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **54** (6): 814-818, 2006.
82. MIMURA, M.; TADA, H.; SUZUKI, T.; "Simultaneous determination of lansoprazole enantiomers and their metabolites in plasma by liquid chromatography with solid-phase extraction"; *Journal of Chromatography A*, **804**: 389-395, 2004.
83. MIMURA, M.; TADA, H.; SATOH, S.; HABUCHI, T.; SUZUKI, T.; "Determination of rabeprazole enantiomers and their metabolites by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction"; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 565-570, 2006.
84. UNO, T.; FURUKORI, N. Y.; SHIMIZU, M.; SUGAWARA, K.; TATEISHI, T.; "Determination of rabeprazole and its active metabolite, rabeprazole thioether in human plasma by column-switching high performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic study"; *Journal of Chromatography B*, **824**: 238-243, 2005.
85. NEVADO, B. J. J.; PENALVO, G.; DORADO, R. M. R.; "Method development and validation for the separation and determination of omeprazole enantiomers in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis"; *Analytica Chimica Acta*, **533**: 127-133, 2005.

86. MONTANARI, M. L. C.; CASS, Q. B.; ANDRICOPULO, A. D.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A.; "Identification of chiral selectors for improved enantioseparation base on molecular interaction fields"; *Analytica Chimica Acta*, **545**: 33-45, 2005.
87. MONTANARI, M. L. C.; CASS, Q. B.; ANDRICOPULO, A. D.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A.; "The role of molecular interaction fields on enantioselective and nonselective separation of chiral sulfoxides"; *Journal of Chromatography A*, **1121**: 64-75, 2006.
88. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; TRITAN, M. E.; MATLIN, S. A.; CURRAN, D. P.; BALOG, A.; "Enantiomeric resolution by HPLC of axial chiral amides using amylose tris[(S)-1-phenylethylcarbamate]"; *Chirality*, **9**: 109-112, 1997.
89. MONTANARI, C. A.; CASS, Q. B.; TRITAN, M. E.; "A QSERR study on enantioselective separation of enantiomeric sulfoxides"; *Analytica Chimica Acta*, **419**: 93-100, 2000.
90. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K.; "XI Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivates supported on silica gel"; *Journal of Chromatography A*, **363**: 173, 1986.
91. DEGANI, A. L. G.; Desenvolvimento e Aplicação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Multimodal e Multidimensional com Colunas de Polissacarídeos em Estudos de Barreiras de Racemização e Determinação do Pantoprazol em Plasma. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001.
92. GRIEB, S. J.; MATLIN, S. A.; BELENGUER, A. M.; RITCHIE, H. J.; "Chiral HPLC with cellulose carbamate coated phases: Influence of support surface chemistry on enantioselectivity"; *Chirality*, **6**: 129-134, 1994.
93. TATE, P. A.; DORSEY, J. G.; "Column selection for liquid chromatographic estimation of the k'_w hydrophobicity parameter"; *Journal of Chromatography A*, **1042**: 37-48, 2004.
94. CHANKVETADZE, B.; YAMAMOTO, C.; OKAMOTO.; "Enantioseparation of selected chiral sulfoxides using polysaccharide-type chiral stationary phases and polar organic, polar aqueous-organic and normal-phase eluents"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 127-137, 2001.
95. FRANCOTTE, E. R.; "Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers"; *Journal of Chromatography A*, **906**: 379-397, 2001.
96. RAO, R. N.; NARASA, A.; NAGARAJU, D.; "Enantiospecific resolution of rabeprazole by liquid chromatography on amylose derivad chiral statonary phase using photo diode array and polarimetic detectors in series"; *Talanta*, **70**: 805-510, 2006.

-
97. SOUZA, M. E.; TIRITAN, M. E.; BELAZ, K. R. A.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M. S. J.; CASS, Q. B.; PINTO, M. M. M.; “Multimilligram enantioresolution of low solubility xanthonolignoids on polysaccharide chiral stationary phases using a solid-phase injection system”; *Journal of Chromatography A*, **1120**: 75-81, 2006.
 98. www.freepatentsonline.com/20030008903.html acesso em 14/02/2007
 99. www.freshpatents.com/S-lansoprazole-compositions-and-methods-dt20060629ptan2006142346.php acesso em 14/02/2007
 100. www.freshpatents.com/S--rabeprazole-compositions-and-methods-dt20051006ptan20050222211.php acesso em 14/02/2007
 101. www.frespatents.com/Dosage-form-containing--S--pantoprazole-as-active-ingredient-dt20060928ptan20060216346.php?type=description acesso em 14/02/2007
 102. STRINGHAM, R. R.; LYNAM, K. G.; LORD, B. S.; “Memory effect of diethylamine mobile phase additive on chiral separations on polysaccharide stationary phases”; *Chirality*, **16**: 493-498, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)