



A IMPORTÂNCIA DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA NO ISOLAMENTO DO FÁRMACO ENANTIÔMERO PURO ESOMEPRAZOL

The importance of the high efficiency liquid chromatography technique in the isolation of pure esomeprazol

Renata Cristina Gandolfi¹, Marcos Aurélio Almeida Pereira¹, Rildo Yamaguti Lima¹, Enny Fernandes Silva¹, João Vicente Tzanno Branco Martins², Rafael Guzella de Carvalho³, Adiel Goes de Figueiredo Junior³, Renato Ribeiro Nogueira Ferraz⁴, Francisco Sandro Menezes-Rodrigues¹.

¹Universidade de Paulista (UNIP), São Paulo - SP. ²Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo - SP. ³Hospital São Paulo - Hospital Universitário da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, - SP. ⁴Faculdade de Medicina de São Bernardo do Campo (FMSBC) – São Bernardo do Campo, SP.

Resumo

Anualmente a indústria farmacêutica lança um grande número de fármacos, considerados inovadores, prometendo proporcionar vantagens farmacológicas ao paciente. No entanto, em muitos casos, estas moléculas inovadoras foram obtidas a partir da separação de misturas de enantiômeros, de fármacos protótipos, já conhecidos e disponíveis no mercado há muitos anos, ou seja, são obtidos ou isolados a partir de uma mistura racêmica. Isso proporcionou a muitas empresas farmacêuticas obterem novas patentes para a produção e comercialização do fármaco enantiômero puro como, por exemplo, o esomeprazol que foi obtido da mistura racêmica de omeprazol. Juntamente, com o avanço na obtenção de enantiômeros puros, técnicas analíticas foram desenvolvidas para determinação de enantiômeros em fármacos, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral a técnica mais utilizada atualmente devido à precisão e exatidão dos resultados obtidos e aplicação a uma grande variedade de misturas de enantiômeros além de proporcionar alto grau de pureza óptica dos enantiômeros isolados.

Palavras-chave: Enantiômeros, Omeprazol, Esomeprazol, Cromatografia líquida de alta eficiência, Fase estacionária quiral.

Abstract

Every year the pharmaceutical industry launches a large number of drugs, considered innovative, promising to provide pharmacological benefits to the patient. However, in many cases, these novel molecules have been obtained from the separation of mixtures of enantiomers, from prototype drugs, already known and commercially available for many years, that is, they are obtained or isolated from a racemic mixture. This has led many pharmaceutical companies to obtain new patents for the production and marketing of the pure enantiomer drug, such as esomeprazole which has been obtained from the racemic mixture of omeprazole. Together with the progress in obtaining pure enantiomers, analytical techniques were developed for the determination of enantiomers in drugs, with high performance liquid chromatography with chiral stationary phase being the most used technique today due to the precision and accuracy of the obtained results and application to a large variety of enantiomeric mixtures in addition to providing high degree of optical purity of the isolated enantiomers.



Keywords: Enantiomers, Omeprazole, Esomeprazole, High-performance liquid chromatography, Chiral stationary phase.

Introdução

Os fármacos enantioméricos são quase sempre comercializados na forma de misturas racêmicas, ou seja, uma mistura de quantidades iguais dos enantiômeros, devido a dificuldades técnicas e econômicas em separar os mesmos, o que é possível somente em ambientes quirais (SHEN, ZENG, 2016).

Os enantiômeros são substâncias que apresentam a mesma fórmula molecular, no entanto não se sobrepõem devido à maneira como os átomos estão arranjados no espaço e diferem-se devido ao arranjo espacial dos ligantes ao redor do carbono quiral e, dessa forma, possuem imagens especulares não sobreponíveis, propriedades físico-químicas idênticas, e quimicamente demonstram comportamentos diferentes somente em ambiente quirais, sendo esta última característica de extrema importância biológica, uma vez que a maioria dos alvos moleculares de fármacos como, por exemplo, proteínas de membranas e enzimas também são compostos quirais, o que pode influenciar diretamente na eficácia ou toxicidade do medicamento (EVANS, HORDERN, 2014).

A quiralidade deve ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos, uma vez que a disposição cinética e dinâmica estereosseletiva é afetada, pois ao administrar um fármaco quiral na forma de racemato, os dois enantiômeros podem sofrer os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção de forma estereosseletiva, por meio de interações com alvos moleculares (relação estrutura-atividade/REA), por isso, fármacos comercializados como racematos estão sendo exaustivamente estudados, na tentativa de obter vantagens farmacológicas e econômicas sobre a produção do enantiômero em sua forma isolada (OLIVEIRA, 2011).

Dentre os diversos exemplos de fármacos enantiômeros isolados, podemos destacar o fármaco esomeprazol, comercializado na forma de enantiômero puro (-) -(S), obtido a partir do fármaco protótipo omeprazol, originalmente desenvolvido e comercializado como racemato e prescrito para diminuição das secreções gástricas em pacientes com refluxo gastroesofágico, gastrite e úlceras gástricas e duodenais. O enantiômero puro esomeprazol apresenta características inovadoras, devido a sua maior biodisponibilidade em relação ao racemato omeprazol, a qual ocorre devido à menor variabilidade do pH intragástrico, fato este que comprova sua maior eficácia no controle da secreção ácida estomacal (LOURENÇO et al., 2010). No entanto, apesar de diferenças e/ou vantagens farmacocinéticas, os fármacos omeprazol e esomeprazol inibem fortemente a secreção de ácido gástrico, não demonstrando diferenças terapêuticas significativas entre si (BRAGA et al., 2011).

Desta forma, o isolamento de enantiômeros levou muitas empresas produtoras de fármacos quirais a obter novos fármacos a partir da produção e comercialização de enantiômeros puros. Esta técnica mostrou-se muito atrativa para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois muitos estudos clínicos necessários para o desenvolvimento do enantiômero puro já foram realizados durante o desenvolvimento do racemato, o que torna o processo mais dinâmico e vantajoso economicamente (AGRANAT, WAINSCHEIN, 2010).

O isolamento e produção de enantiômeros puros baseia-se no fato dos mesmos apresentarem uma ou mais vantagens, tais como maior índice terapêutico, menor ou maior meia-vida, menor variabilidade interindividual, menor potencial de interações medicamentosas, além de menor incidência de efeitos colaterais (LOURENÇO et al., 2010).



Acompanhado do avanço na obtenção de enantiômeros puros, surgiu a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinação quantitativa exata e reprodutível dos enantiômeros em fármacos (OLIVEIRA, 2011).

Muito utilizada no passado para determinação da pureza de substâncias opticamente ativas, a técnica de rotação óptica (α) cedeu lugar a métodos altamente seletivos e sofisticados, como a eletroforese capilar (CE), a espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), o dicroísmo circular (DC), as medidas cristalográficas utilizando raio-X, a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (WESOLOWSKI, PIVONKA, 2013).

Dentre as técnicas anteriormente citadas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca como a mais utilizada nos estudos de fármacos enantiômeros, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, quando comparada com as outras técnicas de detecção. Pode ser aplicado o método indireto, no qual são utilizados reagentes de derivatização quirais (CDRs), ou o método direto onde são utilizados aditivos de fase móvel quirais (CMPAs) ou fase estacionária quiral (CSPs). Após a separação cromatográfica, para identificação dos enantiômeros obtidos em sua forma isolada, pode ser empregado detector ultravioleta, de fluorescência ou de espectrometria de massa (SHEN, ZENG, 2016).

Objetivo

Este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão da literatura acerca das vantagens da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência empregando fase estacionária quiral para o isolamento de fármacos enantiômeros, evidenciando a obtenção do fármaco esomeprazol na forma pura a partir da mistura racêmica.

Método

Foi realizada a pesquisa bibliográfica nas bases de dados SciELO, *Science Direct*, Portal de Periódicos CAPES/MEC, EBSCO, *SpringerLink*, *Web of Science*, *Pubmed* e Google Acadêmico, com as seguintes palavras-chave: enantiômeros, esomeprazol, omeprazol, cromatografia líquida de alta eficiência, fase estacionária quiral. Com a utilização desta metodologia, foram obtidos dezoito (18) artigos, duas (2) teses e uma (1) monografia que foram selecionados para o estudo e que constituíram a amostra utilizada nesta revisão.

Discussão

Enantiômeros e moléculas quirais

A partir das descobertas das propriedades de assimetria molecular e capacidade em desviar o plano da luz polarizada, além da configuração tetraédrica do átomo de carbono, foi possível compreender que substâncias que não possuem elemento de simetria no arranjo espacial de seus grupos ligantes apresentam-se como dois enantiômeros que são imagens especulares (SANTOS, 2012).

Os estereoisômeros são divididos em diastereoisômeros e enantiômeros. Os diastereoisômeros são moléculas que possuem diferentes configurações espaciais de seus ligantes, porém, não são imagens especulares sobreponíveis umas das outras. Enquanto os enantiômeros são imagens especulares umas das outras, que não se sobrepõem (SANTOS, 2012).

A enantiomeria só ocorre em compostos de moléculas quirais, as quais são definidas como sendo moléculas não idênticas às suas imagens especulares, conforme demonstrado na Figura 1. É possível reconhecer a existência de um par de enantiômeros quando a molécula contém um átomo



tetraédrico central ao qual se ligam quatro substituintes diferentes e a ausência de um plano de simetria (FREITAS, 2009).

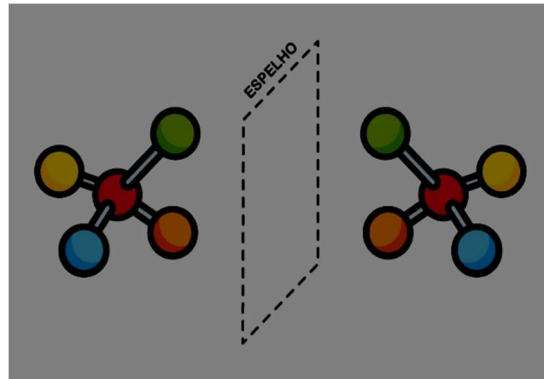


Figura 1: Ilustração da quiralidade de uma molécula tetraédrica (FREITAS, 2009, MODIFICADO).

Uma importante propriedade dos enantiômeros é que a substituição de quaisquer dois grupos ligados ao átomo central transforma um enantiômero no outro, ou seja, forma-se um estereoisômero (FREITAS, 2009).

Os enantiômeros, isoladamente, provocam a rotação do plano da luz polarizada e são opticamente ativos, possuem rotações específicas de mesmo valor, porém de sinais opostos e apresentam propriedades físicas iguais, dentre as quais se destacam ponto de fusão, ponto de ebulição, índices de refração, espectros de infravermelho, solubilidade em solventes comuns. No entanto, só exibem comportamento diferente quando interagem com outras substâncias quirais (FREITAS, 2009).

Fármacos quirais

Durante muito tempo, a questão da quiralidade foi ignorada pela comunidade científica e, por este motivo, a talidomida foi comercializada durante anos, inicialmente, como sedativo-hipnótico em 1957 e, no início da década de 60 como agente antiemético, principalmente, por gestantes, sem que houvesse o conhecimento da propriedade teratogênica da talidomida na forma de enantiômero de configuração (S)-(-). Esta descoberta marcou o início da conscientização de possíveis riscos decorrentes do uso de fármacos em sua forma racêmica e levou ao desenvolvimento de novos modelos de estudos para fármacos quirais (FREITAS, 2009).

Após o conhecimento de que determinado enantiômero pode ser capaz de promover efeitos nocivos, os fármacos enantioméricos receberam maior atenção durante a realização de estudos farmacológicos. Assim, evidenciou-se que o arranjo espacial dos átomos nas moléculas interfere na interação dos fármacos com macromoléculas biológicas e, por isso, influencia os processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos (ROCHA, GALENDE, 2014).

Sabe-se hoje que muitos fármacos quirais apresentam diferenças estereosseletivas significativas, o que promove importantes diferenças de potência, toxicidade e propriedades farmacocinéticas (ROCHA, GALENDE, 2014).

Tais características enantioméricas podem tornar um isômero fármaco e o outro um agente tóxico, ou ainda sem efeito biológico. Fármacos produzidos a partir de enantiômeros puros possuem, geralmente, ação superior se comparados as suas respectivas misturas racêmicas, pois quando são



absorvidos pelo organismo, passam por diferentes fases e em cada uma delas são discriminadas, pois os sistemas biológicos são dotados de quiralidade e formam complexos ao interagirem com um par de enantiômeros denominado de complexo diastereoisomérico, que possui a mesma quiralidade no sistema biológico e diferentes propriedades físico-químicas capazes de modificar a biomembrana resultando em permeabilidades distintas, assim como a distribuição na biofase já que os complexos apresentam estabilidades também distintas (FREITAS, 2009).

A especificidade de enantiômeros está presente em vários níveis de interação com o sistema biológico, o que explica as diferenças elevadas tanto de toxicidade quanto de propriedades farmacoterapêuticas destes fármacos. Por isso, uma mistura racêmica seja utilizada como medicamento, todos os ensaios químicos e toxicológicos devem ser realizados com cada enantiômeros isoladamente e comparados à mistura racêmica (FREITAS, 2009).

Apesar do investimento em tecnologias para a concepção de fármacos enantiomericamente puros, a comercialização de misturas racêmicas, ainda, é muito frequente, devido às dificuldades técnicas encontradas tanto nas sínteses de enantiômeros puros quanto na separação dos mesmos, o que torna o custo muito elevado sendo inviável economicamente manter este medicamento no mercado (AGRANAT, WAINSCHEIN, 2010).

A importância da identificação de fármacos puros

Devido às diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas de fármacos enantiômeros, as agências regulamentadoras de saúde, em nível mundial, exigem o estudo dos enantiômeros isolados, incluindo a avaliação de racemização do centro quiral, além de preconizar a comercialização de fármacos quirais na forma de enantiômeros puros e ensaios de bioequivalência (CAPUCHO et al., 2008).

O desenvolvimento dos enantiômeros em sua forma isolada levou muitas indústrias produtoras de fármacos quirais a obter novas patentes para a produção e comercialização do enantiômero puro, fato que se tornou lucrativo e, por isso, altamente atrativo para a obtenção de novos fármacos, uma vez que muitos dos estudos clínicos necessários para a aprovação e comercialização já foram realizados durante o desenvolvimento do racemato, além do fato de que os enantiômeros puros apresentam uma ou mais vantagens farmacológicas como, por exemplo: maior índice terapêutico, menor ou maior tempo de meia vida, menor potencial de interações medicamentosas desfavoráveis, e menor risco de desenvolver efeitos adversos. Dentre os inúmeros exemplos, podemos destacar o isolamento do enantiômero puro esomeprazol a partir da mistura racêmica do omeprazol (CALCATERRA, D'ACQUARICA, 2018).

O caso omeprazol

O fármaco protótipo omeprazol foi lançado como o primeiro inibidor da bomba de prótons usado na prática clínica, e comercializado na sua forma racêmica, indicado no tratamento da esofagite, úlcera gástrica e duodenal, refluxo gastroesofágico e algumas outras doenças relacionadas à acidez gástrica, devido ao fato de inibir a secreção ácido do estômago, através da inibição específica do sistema enzimático adenosina trifosfatase $H^+/K^+ATPase$ (bomba de $H^+/K^+ATPase$), que está localizada na membrana secretora das células parietais presentes na mucosa gástrica e constituem a etapa final da secreção HCl (FREITAS, 2009).

Seu mecanismo de ação é específico e seletivo, uma vez que a molécula de omeprazol deve ser protonada e transformada em sulfenamida ou ácido sulfênico, para se ligar de forma irreversível



originando um complexo covalente inativo com o grupo sulfidrila dos radicais da cisteína do domínio extracelular da enzima H^+/K^+ ATPase (DELOS RIOS et al., 2009).

A inibição máxima da secreção de HCl ocorre quando duas moléculas do inibidor (sulfenamida) se ligam à bomba de prótons, ligação esta influenciada pela dose administrada, assim como pela inibição da secreção ácida basal quanto estimulada. A secreção de ácido retorna apenas após a inserção de novas moléculas de H^+/K^+ ATPase na membrana luminal (FREITAS, 2009).

Pequenas modificações na estrutura química do fármaco protótipo omeprazol levaram à síntese fármacos congêneros que constituem a classe de antissecretores tais como pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol e esomeprazol (FERES, FILHO, 2012). Contudo, o esomeprazol foi o primeiro inibidor da bomba de prótons a ser desenvolvido como enantiômero puro, demonstrando maior eficácia que o fármaco protótipo omeprazol, oferecendo novas oportunidades no tratamento das enfermidades ácido-pépticas (BRAGA, et al., 2011).

Desta forma, o esomeprazol é o enantiômero (S)-(-) do omeprazol - sendo também uma base fraca, convertido na forma ativa no meio altamente ácido dos canalículos secretores da célula parietal, onde ocorre a inibição das secreções ácidas (BRAGA, et al., 2011).

Dados da literatura demonstram que o esomeprazol mostrou-se mais rápido em ajustar o pH gástrico comparado ao omeprazol. Dentre os diversos exemplos, podemos destacar a resolução dos sinais e sintomas e o controle do refluxo gastroesofágico. Outro exemplo importante é o tratamento das esofagites, o tempo de tratamento com esomeprazol é de quatro semanas, enquanto que com omeprazol é de 8 semanas (CARVALHAES, et al., 2011).

O esomeprazol, na forma de microgrânulos em cápsulas, demonstrou promover maior controle sobre a acidez gástrica quando comparado às formulações com lansoprazol, omeprazol, pantoprazol e rabeprazol (OMARI, 2017).

Apesar de possuir diversas vantagens farmacocinéticas, de acordo com inúmeros autores da literatura, ambos enantiômeros omeprazol e esomeprazol inibem de forma semelhante à secreção de HCl, não demonstrando diferenças farmacoterapêuticas significativas. Desta forma, os autores sugerem que o lançamento do fármaco esomeprazol não trouxe benefícios relevantes sob o ponto de vista farmacoterapêutico e por isso não há justificativa para que este seja o fármaco de primeira escolha, além de apresentar um custo para o paciente superior ao do fármaco omeprazol. Assim, o fármaco protótipo omeprazol se mantém como primeira escolha devido a sua grande vantagem sob a visão de custo x benefício do tratamento. A Figura 2 apresenta a estrutura molecular dos enantiômeros do omeprazol e do enantiômero puro esomeprazol (MURAKAMI, 2009).

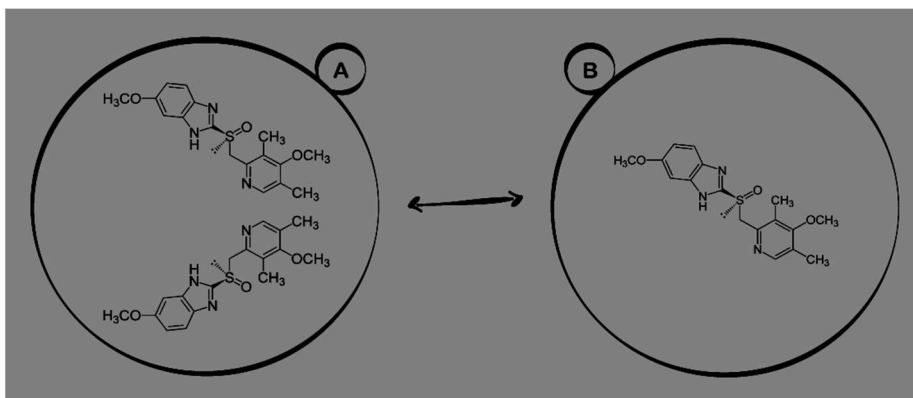


Figura 2: Estrutura molecular a) enantiômeros do omeprazol; b) enantiômero puro esomeprazol (MURAKAMI, 2009, MODIFICADO).

Obtenção dos isômeros opticamente ativos

Os compostos enantioméricamente puros podem ser obtidos por síntese estereosseletiva (produção de um único enantiômero) ou a partir de uma mistura racêmica (produção de ambos enantiômeros) (MURAKAMI, 2009).

Na síntese estereosseletiva os substratos quirais e pró-quirais (reagentes e catalisadores quirais) são utilizados e influenciam o desenvolvimento da reação para que haja a formação majoritária de um dos enantiômeros. A dificuldade deste método está relacionada à pureza óptica desejada dos produtos (MURAKAMI, 2009).

Na síntese que utiliza o método racêmico, o racemato é obtido por uma sequência de reações e, em seguida, a separação dos enantiômeros é realizada por recristalização, cromatografia ou filtração por membrana. A enantioseparação por cromatografia pode ser realizada através de uma fase estacionária aquiral e um solvente ou aditivo quiral adicionado à fase móvel ou uma fase estacionária quiral (FEQ) (MURAKAMI, 2009). A Figura 3 apresenta as duas possíveis rotas para obtenção de compostos enantiomericamente puros.

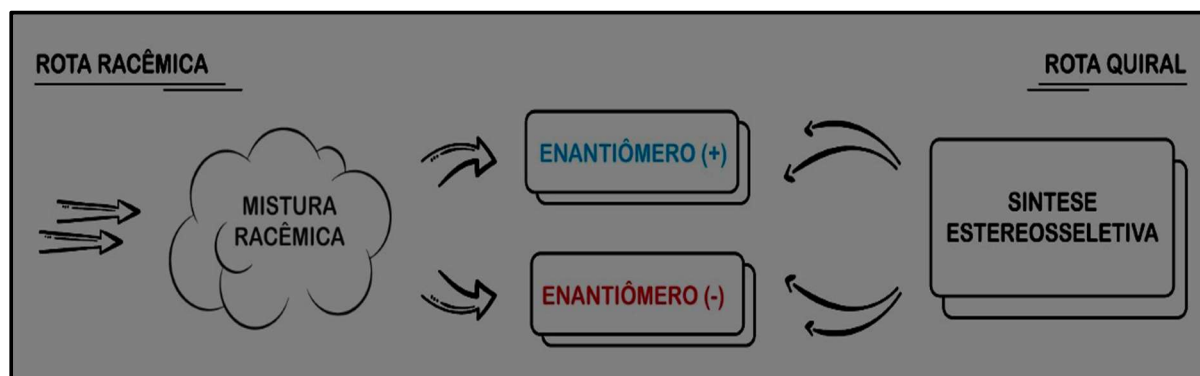


Figura 3: Rotas para obtenção de compostos enantiomericamente puros (MURAKAMI, 2009, MODIFICADO).



A importância da cromatografia quiral

Devido à grande semelhança observada nas propriedades físicas dos enantiômeros não é possível separá-los um por métodos tradicionais de separação como filtração, decantação ou extração, e desta forma, a separação dos dois enantiômeros de uma mistura racêmica exige a utilização de métodos especiais, tais como a eletroforese capilar (EC), a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia com fluido supercrítico (CFS) e a cromatografia em papel (PORTE, et al., 2014).

Entretanto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ocupa um lugar de destaque, sendo uma das técnicas mais importantes entre os métodos cromatográficos de separação devido à sua rapidez, alta capacidade e facilidade em efetuar separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (MALDANER, JARDIM, 2009).

A separação cromatográfica ocorre por meio da distribuição dos componentes nas fases estacionária e móvel. Essa separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, devido às diferentes interações com a fase estacionária (MALDANER, JARDIM, 2009).

A chave para o sucesso na separação de racematos deve-se em grande parte às fases estacionárias quirais utilizadas. O mecanismo de separação sobre o reconhecimento enantiomérico pela fase estacionária quiral está baseado na teoria de três pontos de ligação. Três pontos de interações ou de ligações são necessários entre a fase estacionária quiral e a molécula quiral para que a análise seja efetiva, uma destas interações deve ser estereoespecífica. Tais pontos de ligações devem-se a presença de ácidos e bases doadores ou receptores de ligações de hidrogênio ou diferentes grupos funcionais (MURAKAMI, 2009).

Podem existir outros pontos que também contribuirão para as interações, sejam elas atrativas ou mesmo repulsivas contribuindo também com a enantiosseletividade (MURAKAMI, 2009).

As principais vantagens das técnicas cromatográficas são: aplicação a uma larga variedade de estruturas racêmica, obtenção dos dois enantiômeros com elevado grau de pureza óptica, rápida e fácil realização de separação de enantiômeros de misturas racêmicas com características específicas como compostos que não podem ser derivatizados (hidrocarboneto), os quais são facilmente racemizados ou tem um tipo incomum de quiralidade (isto é, quiralidade do tipo helicoidal). Entretanto, como ocorre em alguns métodos, a rota cromatográfica possui algumas desvantagens, tais como: alto custo da fase estacionária, indisponibilidade de uma FEQ que separa uma ampla classe de compostos racêmicos, analito coletado em grandes volumes sendo necessária a concentração, consumo de uma larga quantidade da fase móvel e dificuldades associadas ao reciclo da fase móvel. Estes são obstáculos para o escalonamento, que estão sendo superados devido às melhorias em técnicas cromatográficas e o desenvolvimento de fases estacionárias quirais novas e de menor custo (PATIL, et al., 2012).

Os enantiômeros podem ser separados pelos métodos direto ou indireto de separação. O método direto de separação baseia-se na diferença de estabilidade dos complexos diastereoisoméricos formados entre os enantiômeros e a fase estacionária quiral, devido às diferentes forças (atração ou repulsão) de interação simultânea. Como vantagens desta técnica: análises cromatográficas rápidas, recuperação dos enantiômeros com relativa facilidade e existência de várias colunas quirais disponíveis comercialmente. No entanto, os métodos que empregam essa técnica requerem um alto investimento devido ao elevado custo da fase estacionária quiral e elevados volumes de solventes orgânicos que compõem a fase móvel para a eluição do fármaco, que além de apresentar um alto



custo, podem levar à contaminação ambiental se não forem descartados corretamente. Além disso, como o produto encontra-se diluído na fase móvel, um elevado consumo de energia é inevitável para recuperar o composto desejado (PATIL, et al., 2012).

No método indireto, a separação dos enantiômeros com um reagente quiral e enantioméricamente puro leva a formação de um par de diastereoisômeros que, por apresentarem propriedades físico-químicas diferentes, podem ser separados empregando-se fases estacionárias quirais. As vantagens desse método consistem na disponibilidade comercial de reagentes para a derivação de vários grupos funcionais e na alta flexibilidade com relação às condições cromatográficas. No entanto, o longo tempo da reação de derivação, o uso de reagentes opticamente puros, a possibilidade de racemização do reagente durante a formação dos diastereoisômeros ou seu armazenamento, a variação no rendimento da formação dos diastereoisômeros e a necessidade de um tratamento químico posterior para a recuperação dos enantiômeros são as desvantagens apresentadas pelo método indireto (PATIL, et al., 2012).

A formação do complexo diastereoisomérico-transitório

Quando num ambiente quiral, dois enantiômeros são considerados compostos fisicamente distintos e interagem diferentemente com a fase estacionária devido à conformação espacial dos átomos (MURAKAMI, 2009).

Duas técnicas são aplicadas na separação direta de enantiômeros por cromatografia com FEQs. A primeira consiste em selecionar ou adaptar a FEQ ao composto racêmico de interesse, esse processo é feito através da avaliação das FEQs disponíveis, baseado na experiência profissional, banco de dados ou pela síntese de uma FEQ específica. A segunda técnica consiste em adaptar o soluto a uma FEQ específica através da derivação do racemato ou mudança para um precursor do composto desejado (MURAKAMI, 2009).

A separação de uma mistura racêmica através de colunas quirais ocorre devido à formação de complexo diastereoisomérico-transitório com diferentes energias de interação entre os enantiômeros e o seletor quiral da fase estacionária, por meio de forças de ligação intermoleculares como ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, complexos de inclusão ou impedimento estérico. O seletor quiral é adsorvido fisicamente ou ligado quimicamente ao suporte de sílica (MURAKAMI, 2009).

Apesar do processo de difusão nas cavidades da matriz quiral não envolver nenhum tipo de ligação, os enantiômeros estão em um meio quiral e o reconhecimento é totalmente estérico. Fases estacionárias com cavidades quirais, como a ciclodextrina, apresentam equivalente mecanismo de discriminação. Além disso, FEQs proteicas e poliméricas formam complexos diastereoisoméricos envolvendo interações atrativas ou repulsivas e cavidades quirais (MURAKAMI, 2009).

FEQs baseadas em derivados de polissacarídeos

Inúmeros seletores quirais foram estudados em relação à sua capacidade de resolução quiral e empregados em diversas fases estacionárias quirais. Dentre essas, as fases que apresentaram melhor desempenho quanto à enantioseparação de uma ampla classe de compostos quirais estão disponíveis comercialmente para separações em escala preparativa e são empregadas em aplicações diversas. Destacam o uso das fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos de celulose e amilose, polímeros com atividade óptica encontrados em maior abundância na natureza para a análise de fármacos quirais e seus metabólitos. Estes polissacarídeos apresentam reconhecimento quiral, porém, não fornecem FEQ de grande utilidade prática. Entretanto, suas derivatizações com a



introdução de grupos apolares fornecem FEQ com alto reconhecimento quiral que podem separar uma larga faixa de compostos racêmicos em enantiômeros (FREITAS, 2009).

Estudos indicaram que derivados de celulose e amilose apresentam uma estrutura de “calha” helicoidal com grupos carbamatos e benzoatos no interior e grupos aromáticos hidrofóbicos na parte externa. O ajuste dos enantiômeros nessa “calha” do polissacarídeo com os grupos carbamato e benzoato é o que determinara o reconhecimento quiral (FREITAS, 2009).

Três modos de eluição podem ser propostos para fases estacionárias derivadas de polissacarídeos. O primeiro modo de eluição, a fase normal, utiliza fases móveis constituintes de hexano-álcool, geralmente isopropanol ou etanol e pequenas quantidades de uma base orgânica ou de um ácido orgânico, adicionadas a fim de reduzir a interação de analitos básicos e ácidos presentes na sílica que é empregada como suporte nestas fases estacionárias. A retenção não quiral nesta fase se dá pela polaridade do composto em análise. No geral, os metabólitos mais polares que o fármaco irão eluir com uma velocidade menor. Exceções a este caso podem ocorrer devido às interações enantiosseletivas que ocorrem concomitantemente (FREITAS, 2009).

O segundo modo de eluição, a fase reversa utiliza fases móveis constituídas de uma solução aquosa e um solvente orgânico miscível, sendo os mais usados a acetonitrila ou o metanol. Os analitos ácidos são mantidos na forma não ionizada, pois a enantioseparação ocorre em meio ácido. No caso dos solutos básicos se deve levar em consideração dois parâmetros: o pH e o tipo de solução tampão empregados. O suporte de sílica possui algumas limitações em relação a sua estabilidade, necessitando de uma fase móvel com pH menor que 7,0. Entretanto, em pH menor que 7,0 a maioria dos solutos básicos encontram-se positivamente carregados o que impede que a interação com a fase estacionária seja significativa. Ânions como o perclorato, por exemplo, podem ser adicionados à fase móvel resultando na formação de pares iônicos que são praticamente neutros. Desta forma, o soluto se torna adequado à fase estacionária. A retenção dos solutos básicos dependerá em grande escala do contra-íon usado. A formação dos pares iônicos e, conseqüentemente, a retenção e a separação serão proporcionais à concentração do ânion. Uma maior concentração ocasiona uma maior eficácia. E a concentração adequada dependerá da solubilidade do reagente de pareamento na fase móvel (RIBEIRO, et al., 2016).

O terceiro modo de eluição, conhecido como polar, caracteriza-se pelas suas fases móveis compostas exclusivamente de solventes orgânicos polares como acetonitrila, etanol, metanol ou mesmo o propanol. O uso destas fases móveis traz muitas vantagens como, por exemplo, a possibilidade de uma inversão na retenção, uma maior solubilidade de alguns compostos e uma maior facilidade de remoção e reutilização. Tais fatos tornam este método muito utilizado principalmente em separações em grande escala. A separação dependerá além das fases móveis e estacionárias, dos tipos de compostos separados (RIBEIRO, et al., 2016).

É recomendado o uso de coluna específica para cada modo de eluição a fim de que a faixa de erro seja reduzida ao máximo e que os resultados obtidos sejam efetivos (RIBEIRO, et al., 2016).

No entanto, alguns parâmetros são importantes para escolha da FEQ, dentre os quais destacamos a estabilidade química, a qual limita um número de fases móveis e, indiretamente, a solubilidade máxima do soluto, as faixas de pH da fase móvel utilizada, estabilidade mecânica, que é particularmente importante em aplicações em CLAE, na qual partículas pequenas são empregadas originando elevadas quedas de pressão, tempo de vida, capacidade de carga e custo (MURAKAMI, 2009).

Uma coluna cromatográfica quiral ideal deve apresentar boa estabilidade química diante da maioria dos solventes e tampões usados como fase móvel. Em cromatografia quiral é de grande



importância a utilização de partículas de sílica de menores diâmetros para obter um processo de separação de alta eficiência e com reduzida pressão. A coluna cromatográfica quiral deve apresentar estabilidade mecânica e química além de baixa queda de pressão, proporcionando o uso da mesma em cromatografia preparativa, no qual o processo de separação torna-se dispendioso devido ao elevado valor e quantidade de fase estacionária e de solventes usados como fase móvel. A coluna deve conter alta capacidade de carga da fase, geralmente atribuída à extensa área de superfície disponível e à alta densidade do ligante quiral (FREITAS, 2009).

A separação enantiosseletiva de (\pm) omeprazol em diferentes fases estacionárias quirais tem sido desenvolvida, no entanto, a maioria das separações dos enantiômeros do omeprazol tem sido realizada em FEQ baseadas em polissacarídeos, tais como a celulose e a amilose descritas previamente (FREITAS, 2009).

Conclusão

De fato, o isolamento de enantiômeros puros é um método importante, eficiente e relativamente barato para o lançamento de fármacos obtidos a partir de misturas racêmicas. Dentre os métodos utilizados para realização do isolamento de enantiômeros, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência com coluna quiral que foi utilizada para obtenção do enantiômero esomeprazol com alto grau de pureza óptica a partir da mistura racêmica de omeprazol.

Referências

- AGRANAT, I.; WAINSCHEIN, S., R. The strategy of enantiomer patents of drugs. *Drug Discovery Today*, v. 15, nº 5/6, p. 163-170, 2010.
- BRAGA, M.P.; SILVA, C.B.; ADAMS, A.I.H. Inibidores da bomba de prótons: Revisão e análise farmacoeconômica. *Saúde (Santa Maria)*, v. 37, n. 3, p. 19-32, 2011.
- CALCATERA, A.; D'ACQUARICA, I. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 323-340, 2018.
- CAPUCHO, H.C.; MASTROIANNI, P.C.; CUFFINI, S. Farmacovigilância no Brasil: a relação entre polimorfismo de fármacos, efetividade e segurança dos medicamentos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n. 3, p. 277-283, 2008.
- CARVALHAES, A.; JÚNIOR, A.P.F.; MAGALHÃES, A.F.; NASY, A.; SILVA, C.M.P.; HASHIMOTO, C.L.; CHINZON, D.; SILVA, E.P.; MOURA, E.G.H.; LEMME, E.M.O.; FILHO, I.J.; NADER, F.B.I.; FILHO, F.M.; DOMINGUES, G.R.S.; BARRETO, I.; MAGUILNIK, I.; CECCONELLO, I.; EISIG, J.N.; FILHO, J.P.P.M.; FILHO, J.R.; GRANDE, J.C.D.; MODENA, J.L.P.; ALMEIDA, J.R.; APRILE, L.R.P.; LOBATO, L.C.; MORETZOHN, L.D.; CURY, M.S.; TOLENTINO, M.M.; SANTO, M.A.; KLEINER, M.; HADDAD, M.T.; PASSOS, M.C.F.; MION, O.; MALAFAIA, O.; ROCHA, P.R.S.; STELMACH, R.; CORREA, E.A.; BARBUTI, R.C.; GURSKY, R.; AZZAM, E.S.; IBRAHIM, R.E.; SALLUM, R.A.A.; SANTAS, R.O.; ZATERKA, S.; BARROS, S.G.S.; RODRIGUEZ, T.N.; MENEGHELLI, U.G.; POLARA, W.M. Doença do refluxo gastroesofágico: tratamento farmacológico. *Rev Assoc Med Bras*, v. 6, n. 57, p. 617-628, 2011.
- DELOS RIOS, R.; PINTO, L.J.; ZEGARRA, A.; GARCÍA, C.; REFULIO, E.; PISCOYA, A.; HUERTA-MERCADO, J.; BUSSALLEU, A. Esomeprazol em la terapia triple para la erradicación de *Helicobacter Pylori* en pacientes dispépticos no ulcerosos. *Rev. Gastroenterol. Peru*, v. 3, n. 29, p. 234-238, 2009.



- EVANS, S.E.; HORDERN, B.K. Applications of chiral chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of chiral pharmaceuticals in the environment. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 1, p. 34-51, 2014.
- FERES, M.V.C; FILHO, M.C.C. Esomeprazol: estratégia de mercado ou evolução terapêutica? *Cientefico*, v. 1, p. 75-96, 2012.
- FREITAS, A. F. Caracterização e aplicação da fase estacionária quiral tris-(3-5-dimetilfenilcarbamato) de amilose na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009, 138 p.
- LOURENÇO, A.L.; LIRA, L.M.; CARVALHO, D.P.; MELO, P.A.; SILVA, T.S.C. Gestão das inovações incrementais, o caso omeprazol. *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 1000-1004, 2010.
- LOURENÇO, T.C.; CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.
- MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.
- MURAKAMI, F.S. Omperazol sódico: caracterização das propriedades físico-químicas e desenvolvimento de comprimidos gastro-resistentes. Tese (Doutorado em Farmácia), Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências em Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009, 139 p.
- OLIVEIRA, A.R.M. Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos empregando eletroforese capilar. *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 3, p. 231-247, 2011.
- OMARI, D.M. Formulation and in vitro/in vivo evaluation of esomeprazole enteric coated minitabets. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 39, p. 156-165, 2017.
- PATIL, K.; RANE, V.; YEOLE, R.; SHINDE, D. A validated chiral LC method for the enantiomeric separation of regaglinide on immobilized amylose based stationary phase. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 23, nº 6, p. 1048-1053, 2012.
- PORTE, A.; PORTE, L.H.; OLIVEIRA, L.M. Cromatografia gasosa quiral na resolução de enantiômeros envolvidos em *flavours* de frutas. *Química Nova*, v. 37, n. 10, p. 1670-1679, 2014.
- RIBEIRO, A. R.; AFONSO, C.; CASTRO, P.M.L.; TIRITAN, M.E. Fármacos quirais em diferentes matrizes ambientais: ocorrência, remoção e toxicidade. *Química Nova*, v. 39, nº 5, p. 598-607, 2016.
- ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. *Revista UNINGÁ Review*, v. 20, n. 2, p. 97-103, 2014.
- SANTOS, M. B. Revisão sobre fármacos quirais e a sua importância na medicina atual. Monografia de conclusão de curso (Licenciatura em Química) – Licenciatura em Química, Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, 2012, 36 p.
- SHEN, Z.; ZENG, C.L. Significance and challenges of stereoselectivity assessing methods in drug metabolismo. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 6, p. 1-10, 2016.
- WESOLOWSKI, S.S.; PIVONKA, D.E. A rapid alternative to x-ray crystallography for chiral determination: case studies of vibrational circular dichroism (VCD) to advance drug discovery projects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, p. 4019-4025, 2013.