

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA QUIRAL DE ANESTÉSICOS A PARTIR DE SOLUÇÕES DILUÍDAS E CONCENTRADAS EM ESCALA PREPARATIVA

Ivanildo José da Silva Jr.*

Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará. Campus do PICI, 60455-760 Fortaleza – CE, Brasil

Amaro Gomes Barreto Jr.

Departamento de Engenharia Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo, 2030, CT, Bloco E, Cidade Universitária, 21941-909 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Cesar Costapinto Santana

Departamento de Processos Biotecnológicos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6066, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 3/3/08; aceito em 31/10/08; publicado na web em 2/2/09

CHIRAL CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF ANESTHETICS FROM DILUTE AND CONCENTRATED SOLUTIONS UNDER PREPARATIVE SCALE. In this work the separation of the chiral anesthetic compounds ketamine and bupivacaine was developed using two chiral stationary phases (CSP). Ketamine enantiomers were well separated in the polysaccharide-based CSP (microcrystalline cellulose triacetate – MCTA) while bupivacaine in the tartardiamide-based CSP (Kromasil CHI-TBB). In both cases, the effect of temperature was investigated under analytical conditions. An improvement in the separation performance with temperature was observed. Thermodynamic parameters were evaluated by the van't Hoff plot. We concluded that enthalpic effects controlled the retention in these chiral columns. The enantiomers of ketamine and bupivacaine were separated under overloaded conditions with a good performance.

Keywords: enantiomer separation; chiral stationary phases; liquid chromatography.

INTRODUÇÃO

A separação de isômeros ópticos é importante para o desenvolvimento e a manufatura de numerosos terapêuticos. No intuito de conferir a composição dos fármacos, bem como estudos farmacocinéticos e clínicos mais elaborados, a habilidade para obter quantidades destes isômeros ópticos separadamente tornou-se de essencial importância. Muitos fármacos são administrados como uma mistura racêmica. No organismo, a maioria dos enantiômeros se comporta como duas entidades diferentes; processos controlados pela estereosseletividade, tais como absorção do fármaco, distribuição, metabolismo e eliminação, podem diferir substancialmente entre os enantiômeros.¹

Como exemplo clássico da importância da quiralidade na indústria farmacêutica, podemos citar o caso da talidomida. Na década de 60, a talidomida foi comercializada na sua forma racêmica como um sedativo, para aliviar náuseas matinais em gestantes. Esse medicamento foi retirado do mercado após ter sido constatado apresentar sérios efeitos colaterais. Estudos posteriores confirmaram que apenas o *R*-enantiômero possui a atividade sedativa desejada, enquanto que o *S*-enantiômero apresenta propriedades teratogênicas, levando a deformações congênitas em fetos, quando administrado em gestantes.²

Durante a última década, houve grande interesse quanto à obtenção de enantiômeros em sua forma opticamente pura, devido a razões científicas e econômicas, sendo a indústria farmacêutica a principal interessada.³ Entre 1992 e 2000, o mercado mundial para compostos químicos opticamente puros aumentou de US\$ 30 bilhões para uma estimativa de US\$ 100 bilhões, com quase duas dúzias de companhias que se especializaram em separações quirais.⁴

Em 2002, a venda mundial de medicamentos contendo um único

enantiômero ultrapassou os US\$ 159 bilhões, sendo que as duas drogas mais vendidas nesse mesmo ano, o Liptor e Zocor, renderam juntas US\$ 14 bilhões.⁵ Rekoske⁴ relatou que entre as 500 drogas mais vendidas no mundo, 269 já estavam sendo comercializadas como um único enantiômero.

A cromatografia é um processo de separação baseado no equilíbrio de distribuição dos componentes entre duas diferentes fases: a estacionária e a móvel. O transporte seletivo é o resultado da tendência do sistema para evoluir a um estado de equilíbrio que é caracterizado pela igualdade dos potenciais químicos de cada componente nestas duas fases.⁷

Cromatografia preparativa em fase estacionária quiral é hoje considerada a técnica mais geral e eficiente para a obtenção de enantiômeros com elevado grau de pureza óptica e tem sido uma ferramenta importante na pesquisa farmacêutica e nas fases iniciais do desenvolvimento de novas drogas.⁶

Atualmente, grande parte das separações enantioméricas em escalas preparativas e semipreparativas têm sido executadas em fase estacionária quiral (FEQ) baseadas em polissacarídeos, tais como celulose e amilose. O primeiro derivado de celulose utilizado para esta finalidade foi o triacetato de celulose microcristalina (MCTA). Embora o MCTA possua uma alta capacidade de discriminação quiral, esta FEQ apresenta limitações com relação às suas características mecânicas, o que tem limitado sua utilização em larga escala. No entanto, estudos recentes têm demonstrado sua eficácia na separação de alguns compostos quirais, o qual tem sido satisfatoriamente empregado.⁸⁻¹¹ Assim como em cromatografia analítica quiral, a celulose tris(3,5-dimetilfenil carbamato) (Chiracel OD) e a amilose tris(3,5-dimetilfenil carbamato) (Chiralpak AD) têm sido as FEQs mais utilizadas em escala preparativa. A capacidade de saturação deste tipo de FEQ foi reconhecida por ser um importante recurso na obtenção de elevados valores de produtividade variando desde 10 até

*e-mail: ivanildo@gpsa.ufc.br

1.500 g de racemato por quilograma de FEQ por dia.^{12,13} A Tabela 1 apresenta algumas FEQ baseadas em polissacarídeos atualmente mais utilizadas em cromatografia preparativa.

Tabela 1. Fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos atualmente mais utilizados para separações em escala preparativa. Adaptada da ref. 13

Nome	Nome comercial
Triacetato de celulose microcristalina	MCTA
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose	Chiralcel OD
Tris(4-metilbenzoato) de celulose	Chiralcel OJ
Tribenzoato de celulose	Chiralcel OB
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	Chiralpak AD
Tris[(S)-feniletilcarbamato] de amilose	Chiralpak AS

Diversas outras FEQ têm sido utilizadas com sucesso para separação de enantiômeros em escala preparativa ou semipreparativa. Essas incluem as fases baseadas em dialil-*L*-tartardiamida com ligações cruzadas (Kromasil CHI-DMB e Kromasil CHI-TBB)¹⁴⁻²² e as fases baseadas em ciclodextrinas.^{23,24} Embora ainda tenham sido pouco estudadas, as FEQ baseadas em dialil-*L*-tartardiamida têm apresentado, além de uma boa capacidade de saturação, um elevado número de pratos teóricos quando comparados com outras fases.⁶

A cetamina (Figura 1Sa – Material Suplementar), [cloridrato de DL-2-(*O*-clorofenil)-2-(metilamino) ciclo-hexano], é um anestésico local produzida sob a forma de racemato.²⁵ A utilização da cetamina sob a forma de mistura racêmica provoca sérios efeitos colaterais, além das formas enantioméricas apresentarem potências distintas entre os enantiômeros. *S*-cetamina é cerca de quatro vezes mais potente em analgesia que a *R*-cetamina.²⁶ Os efeitos da cetamina sobre o sistema nervoso central estão intimamente relacionados com a sua potente ação analgésica e com sua propensão à produção de sonhos e alucinações,²⁷ sendo que estes efeitos colaterais são atribuídos ao isômero *R* quando a droga é administrada sob a forma de racemato.²⁸

A bupivacaína (Figura 1Sb), [(±)-1-butyl-*N*-(2,6-dimetilfenil)-2-piperidinacarboxamida], a qual também é um anestésico local produzido sob a forma de racemato, tem sido comercializada sob a forma de uma mistura ou na proporção 75% *S*-(-)-bupivacaína e 25% *R*(+)-bupivacaína. A bupivacaína tem sido amplamente utilizada em anestesia peridural para procedimentos de longa duração, proporcionando excelente anestesia sensitiva. Ambos os enantiômeros são ativos, mas o isômero levógiro *S*-(-)-bupivacaína produz uma maior duração do bloqueio neural, bem como uma menor tendência para toxicidade no SNC e cardiovascular.²⁹⁻³²

Diante dessa exposição, o objetivo desse trabalho foi avaliar dois diferentes tipos de FEQ (MCTA e Kromasil CHI-TBB) na separação dos anestésicos cetamina e bupivacaína em escala semipreparativa. A escolha da fase móvel adequada, os efeitos da vazão e da temperatura também foram estudados. Os resultados obtidos foram úteis para o entendimento do processo de reconhecimento quiral e também para o projeto de condições de operação para a transposição de escalas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e equipamentos

A cetamina e a bupivacaína utilizadas neste trabalho foram gentilmente fornecidas pela Cristália Indústrias Farmacêuticas (Itapira, SP). O composto inerte tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB) foi adquirido da Sigma-Aldrich (USA).

O MCTA (Figura 2S) foi adquirido da empresa Macherey-Nagel (USA) e apresenta uma distribuição do tamanho de partículas entre 15 e 25 µm (diâmetro médio de 22 µm). O MCTA foi empacotado em uma coluna de aço inoxidável (20 x 0,77 cm D.I.) usando o método descendente, utilizando metanol como impulsador. Anteriormente ao empacotamento, o MCTA foi ativado pelo aquecimento em suspensão contendo etanol por cerca de 30 min. Após aquecimento e decantação, a suspensão foi tratada em um banho ultrassônico Cole Parmer 8892 por 5 min a temperatura ambiente, de acordo com o apresentado por Seidel-Morgenstern e Guiochon.³³

A coluna cromatográfica empacotada com a FEQ *O,O'*-bis[4-*tert*-butil-benzoil]-*N,N'*-dialil-*L*-tartardiamida covalentemente imobilizada à sílica Kromasil por ligações cruzadas, comercialmente conhecida como Kromasil CHI-TBB, foi gentilmente cedida pela Eka Chemicals (Suécia). A coluna quiral de aço inoxidável (25 x 1 cm D.I.) foi empacotada com a FEQ com tamanho de partículas de 16 µm de diâmetro e com 100 Å (10 nm) de diâmetro interno de poro. Essa fase estacionária é obtida a partir do precursor *N,N'*-dialil-*L*-tartardiamida (DATD) pela derivatização de grupos hidroxilas e posterior imobilização em sílica (Figura 3S). A imobilização em um polímero multifuncional fornece à FEQ uma maior eficiência da coluna e uma maior capacidade de saturação.

Etanol, *n*-hexano, 2-propanol (grau CLAE) foram adquiridos da J. T. Baker (USA). O ácido acético e trietilamina (grau P.A.) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). Tanto as soluções quanto as fases móveis foram previamente filtradas em sistema de filtração Millipore (membranas 0,45 µm) e desgaseificadas em banho ultrassônico da Cole Parmer 8892, simultaneamente.

Os experimentos cromatográficos foram realizados em um sistema de CLAE equipado com duas bombas Waters modelo 1525, detector UV/Vis Waters modelo 2487, controlador de temperatura e sistema de aquisição de dados computadorizado. Para os experimentos realizados a temperaturas inferiores à 30 °C utilizou-se um banho termostático Neslab RTE 110.

Experimentos

Experimentos baseados na resposta de cada coluna a pulsos de concentração de cada enantiômero foram realizados a diferentes vazões e temperaturas. Para experimentos realizados com a coluna de MCTA foram utilizadas vazão de 1,0 mL/min em temperaturas de 10 a 50 °C. Para experimentos com a coluna Kromasil CHI-TBB foram realizados experimentos com vazão de 3,0 mL/min em temperaturas de 25 a 45 °C. Temperaturas inferiores não foram utilizadas devido ao elevado tempo de retenção. Temperaturas superiores a de 45 °C não foram utilizadas devido a limitações reportadas pelo fabricante das colunas. Amostras diluídas (20 µL a 0,5 g/L) do TTBB e das misturas racêmicas da cetamina e da bupivacaína foram injetadas nas colunas após um intervalo de tempo necessário para a estabilização do sistema. As respostas observadas na saída das colunas foram úteis para determinação dos parâmetros analíticos de separação.

Experimentos em condições de sobrecarga também foram realizados. Neste conjunto de experimentos, amostras concentradas das soluções das misturas racêmicas da cetamina e da bupivacaína foram injetadas nas colunas variando-se o volume de injeção (20, 50 e 200 µL).

Em todos os experimentos cromatográficos o comprimento de onda foi mantido a 254 nm para a cetamina e 270 nm para a bupivacaína. A escolha da fase móvel para ambos os sistemas foi feita com base em trabalhos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa. A fase móvel empregada para separação da cetamina em MCTA foi etanol (100%), enquanto que para a separação da bupivacaína em Kromasil CHI-TBB a fase móvel foi *n*-hexano/2-propanol/ácido acético/trietilamina (98/2/0,3/0,05 v/v).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da temperatura nos perfis cromatográficos sob condições de diluição infinita

As Figuras 4S e 5S apresentam os cromatogramas para a cetamina em MCTA e da bupivacaína em Kromasil CHI-TBB a 25 °C, respectivamente. A separação dos enantiômeros da cetamina em Kromasil CHI-TBB não foi alcançada mesmo testando-se diversas composições de fases móveis e com elevação de temperatura. Da mesma forma, os enantiômeros da bupivacaína não foram separados em MCTA.

O cromatograma apresentado na Figura 4S mostra um considerável alargamento das bandas, principalmente para o enantiômero mais retido (*R*-cetamina). Conforme reportado por diversos autores,^{9,34,35} esse comportamento é atribuído ao lento processo de transferência de massa em que a difusão intrapartícula é dominante para essa fase estacionária. Com relação ao cromatograma apresentado na Figura 5S,¹⁴ é possível observar uma melhor resolução, com largura de base relativamente pequena e separação por linha base. Silva Jr.⁶ reportou que esse comportamento é devido à alta eficiência da coluna em que a taxa de transferência de massa é alta, sendo os mecanismos convectivos dominantes nesta coluna quiral. Por isto, a separação da bupivacaína na coluna Kromasil CHI-TBB é governada pelos efeitos termodinâmicos do processo de adsorção.

A Figura 6S apresenta os perfis cromatográficos da cetamina em MCTA nas temperaturas de 10, 20, 25, 30, 40 e 50 °C. Observa-se que, com o aumento da temperatura, houve uma melhora significativa nos perfis cromatográficos, reduzindo consideravelmente os tempos de retenção e o alargamento das bandas. Essa melhora é devida à redução nas interações químicas entre os enantiômeros e os seletores quirais das fases estacionárias, reduzindo assim o seu tempo de retenção. Além disto, os processos de transferência de massa são favorecidos com o aumento da temperatura. De fato, Silva Jr. *et al.*⁹ mostraram que há um aumento na difusividade intrapartícula com o aumento da temperatura da coluna.

Os cromatogramas da bupivacaína em Kromasil CHI-TBB nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C são mostrados na Figura 7S.³⁶ Nota-se que, com o aumento da temperatura, assim como mostrado na Figura 6S, também houve uma diminuição nos tempos de retenção com aproximação dos picos, principalmente para as temperaturas mais elevadas. Mesmo assim, a separação aconteceu até a linha de base. Embora no caso da bupivacaína a separação tenha ocorrido com uma boa resolução e com largura de base relativamente pequena, pode-se observar que, com o aumento da temperatura, houve uma redução na largura dos picos.

Uma variação significativa nos tempos de retenção com a elevação da temperatura para ambos os enantiômeros da cetamina e da bupivacaína foi observada e estes resultados são mostrados nas Figuras 8S e 9S, respectivamente. De acordo com a Figura 8S, o enantiômero mais retido (*R*-cetamina) mostrou-se mais sensível a esta elevação da temperatura, provocando uma aproximação entre os picos dos dois enantiômeros à medida que a temperatura foi aumentada. De maneira semelhante, conforme mostrado na Figura 9S, o enantiômero mais retido (*S*-bupivacaína) também se mostrou mais sensível à elevação da temperatura da coluna. Este fato mostra que a temperatura influencia predominantemente a intensidade das interações seletivas, uma vez que o decréscimo do fator de capacidade é maior para os enantiômeros mais retidos. Este efeito pode ser quantificado através do cálculo dos fatores de retenção (k) e fatores de separação (α) dos sistemas, definidos pelas Equações 1 e 2, os quais são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Nas Equações 1 e 2, t_R corresponde ao tempo de retenção da amostra em análise, t_M é o tempo de retenção do composto inerte. Os subíndices 1 e 2 indicam os enantiômeros menos e mais retidos, respectivamente.

O aumento da temperatura provoca diferentes variações entre os tempos de retenção para os enantiômeros de cada mistura racêmica, provocando decréscimos nos valores de α . Apesar desta variação com o aumento da temperatura, o sistema apresentou uma boa separação com valores de α superiores a 2,0 para a cetamina em MCTA e valores de α superiores a 1,2 para bupivacaína em Kromasil CHI-TBB.

Tabela 2. Fatores de capacidade (k) e de separação (α) da cetamina em MCTA como função da temperatura

Temperatura (°C)	k_1	k_2	α
10	1,27	3,28	2,59
20	1,08	2,70	2,50
25	0,92	2,29	2,49
30	0,91	2,18	2,41
40	0,73	1,65	2,24
50	0,61	1,25	2,07

Tabela 3. Fatores de capacidade (k) e de separação (α) da bupivacaína em Kromasil CHI-TBB como função da temperatura

Temperatura (°C)	k_1	k_2	α
25	1,64	2,23	1,36
35	1,37	1,81	1,32
45	1,12	1,41	1,26

Análise termodinâmica e mecanismo de retenção

O estudo termodinâmico é uma estratégia que tem sido amplamente empregada para explicar o mecanismo de reconhecimento quiral.³⁷⁻⁴⁴

Silva Jr. *et al.*³⁷ reportaram o estudo termodinâmico envolvido na separação dos fármacos quirais rolipram, omeprazol e bupivacaína, utilizando uma coluna quiral semipreparativa Kromasil CHI-TBB.

Conforme detalhado no referido trabalho,³⁷ a separação de enantiômeros por cromatografia é baseada na formação de complexos disateoisoméricos transitórios (reversíveis), que são criados por interações intermoleculares entre os enantiômeros com o seletor quiral da fase estacionária. O processo de formação para os enantiômeros *S* e *R* pode ser caracterizado por parâmetros termodinâmicos (ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0).

Classicamente, no equilíbrio de adsorção a dependência da temperatura com relação ao fator de retenção k pode ser descrita pela equação de van't Hoff:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (3)$$

em que R é a constante universal dos gases, e T a temperatura absoluta.

Assumindo que a entalpia molar padrão de adsorção ΔH^0 e a entropia de adsorção ΔS^0 são constantes dentro de uma faixa de temperatura relevante, que é usualmente o caso em cromatografia líquida, o gráfico

de $\ln k$ versus $1/T$ é capaz de fornecer os valores de ΔH^0 e ΔS^0 a partir da inclinação e da interseção com o eixo da ordenada.

Para obter mais informações sobre o processo de discriminação quiral, é importante examinar os parâmetros de Gibbs-Helmholtz ($\Delta\Delta H^0$ e $\Delta\Delta S^0$). Separações cromatográficas quirais são determinadas pela diferença de energia livre de adsorção $\Delta\Delta G^0$ dos enantiômeros. As diferenças entre as energias livres podem ser calculadas a partir da seletividade, de acordo com a Equação 4:

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta\Delta H^0 - T\Delta\Delta S^0 = -RT \ln \alpha = -RT \ln \frac{k_2}{k_1} \quad (4)$$

A combinação da Equação 3 com a relação de Gibbs-Helmholtz (Equação 4) fornece a Equação 5:

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta\Delta S^0}{R} \quad (5)$$

Nas Equações acima, ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 representam as diferenças de energia livre, entalpia e entropia de um enantiômero na FEQ e fase móvel, respectivamente. $\Delta\Delta G^0$, $\Delta\Delta H^0$ e $\Delta\Delta S^0$ representam as diferenças de ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 para um dado par de enantiômeros, respectivamente.

Obviamente, a mudança na temperatura influencia, diferentemente, as interações dos enantiômeros constituintes de uma mistura racêmica com a FEQ utilizada em sua separação. De fato, os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 mostraram que houve um decréscimo nos valores de k e α com o aumento da temperatura. O estudo da variação de $\ln k$ e $\ln \alpha$ versus $1/T$ para a cetamina (Figura 1) e para a bupivacaína³⁷ (Figura 2), de acordo com a Equação de van't Hoff, mostrou uma dependência linear. Esse resultado indica que o mecanismo de reconhecimento quiral não varia dentro da faixa de temperatura utilizada nos experimentos. O caráter linear associado ao decréscimo dos valores de $\ln k$ e $\ln \alpha$ versus $1/T$ é um indicativo de que os parâmetros termodinâmicos são independentes da temperatura e também que a separação é controlada por efeitos entálpicos.

Os parâmetros termodinâmicos (Tabela 4) foram determinados

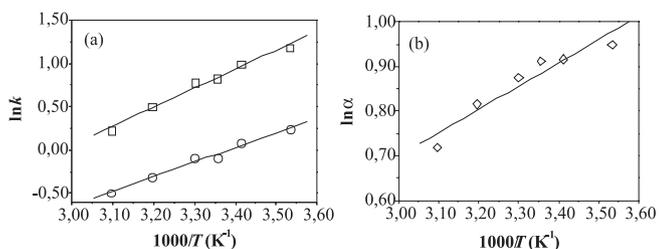


Figura 1. Gráficos de van't Hoff para a cetamina em MCTA: (a) $\ln k$ versus $1/T$ para (□) *S*-bupivacaína com $R^2 = 0,9936$ e (○) *R*-bupivacaína com $R^2 = 0,9926$; (b) $\ln \alpha$ versus $1/T$ com $R^2 = 0,9561$

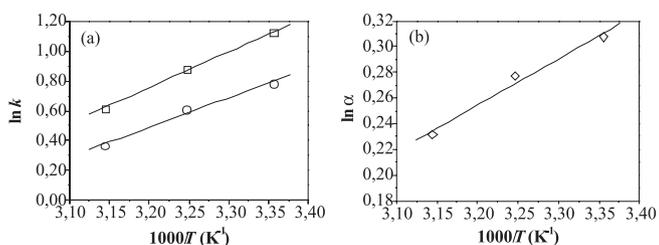


Figura 2. Gráficos de van't Hoff para a bupivacaína em Kromasil CHI-TBB: (a) $\ln k$ versus $1/T$ para (□) *S*-bupivacaína com $R^2 = 0,9997$ e (○) *R*-bupivacaína com $R^2 = 0,9989$; (b) $\ln \alpha$ versus $1/T$ com $R^2 = 0,9929$

a partir da inclinação e da interseção das retas obtidas. Os valores negativos de ΔH^0 indicam que é energeticamente mais favorável para os enantiômeros estarem presentes na FEQ. Valores negativos de ΔS^0 também indicam um aumento na desordem do sistema cromatográfico (FEQ/fase móvel/enantiômeros), com os enantiômeros sendo transferidos da fase móvel para a FEQ. Os parâmetros ΔH^0 , ΔS^0 , $\Delta\Delta H^0$ e $\Delta\Delta S^0$ são todos negativos, indicando realmente que há transferência do soluto da fase móvel para a FEQ.

Como mostrado nas Tabelas 2 e 3, os valores de α decrescem visivelmente com o aumento da temperatura da coluna. Esse fato está associado ao alto valor de $-\Delta\Delta H^0$. O valor de $-\Delta H^0$ para o enantiômero mais retido, obviamente, é mais alto que para o enantiômero menos retido, confirmando a conclusão de que a *R*-cetamina e a *S*-bupivacaína possuem interações mais fortes com as FEQ, as quais foram utilizadas.

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos da separação dos enantiômeros da cetamina e da bupivacaína³⁷ nas colunas quirais MCTA e Kromasil CHI-TBB, respectivamente

Parâmetros termodinâmicos	<i>S</i> -cetamina	<i>R</i> -cetamina	<i>R</i> -bupivacaína	<i>S</i> -bupivacaína
ΔH^0 ^a (kJ mol ⁻¹)	-13,95	-18,28	-14,82	-19,07
ΔS^0 ^b (J-K mol ⁻¹)	-47,19	-54,37	-45,88	-57,42
$\Delta\Delta H^0$ ^c (kJ mol ⁻¹)	-4,29		-4,25	
$\Delta\Delta S^0$ ^d (J-K mol ⁻¹)	-7,03		-11,54	
T_{iso} ^e (K)	610,24		368,63	

^a Parâmetro obtido a partir da inclinação do gráfico $\ln k$ versus $1/T$;

^b Parâmetro obtido a partir da interseção do gráfico $\ln k$ versus $1/T$;

^c Parâmetro obtido a partir da inclinação do gráfico $\ln \alpha$ versus $1/T$;

^d Parâmetro obtido a partir da interseção do gráfico $\ln \alpha$ versus $1/T$;

^e Calculado da $T_{iso} = \Delta\Delta H^0/\Delta\Delta S^0$

A enantiosseletividade expressa pela Equação 4 por $\Delta\Delta G^0$ é, principalmente, influenciada por $\Delta\Delta H^0$ a baixas temperaturas. Em temperaturas mais elevadas o termo entálpico irá ser cada vez mais compensado pelo termo entrópico $T\Delta\Delta S^0$. Em uma certa temperatura, a temperatura enantiosseletiva T_{iso} , o termo entálpico é compensado pelo termo entrópico $T\Delta\Delta S^0$, conduzindo uma completa perda de separação quiral ($\Delta\Delta G^0 = 0$):

$$T_{iso} = \frac{\Delta\Delta H^0}{\Delta\Delta S^0} \quad (6)$$

À temperatura T_{iso} , nenhuma separação irá acontecer. Em temperaturas maiores que T_{iso} , a ordem de eluição dos enantiômeros deve ser invertida. Entretanto, para a maioria dos enantiômeros, T_{iso} é muito maior que a faixa de temperatura de trabalho. De acordo com os valores reportados na Tabela 4, para a faixa de temperatura utilizada no presente trabalho, o sistema é controlado por efeitos entálpicos, pois $T < T_{iso}$. Isso significa que a ordem de eluição dos enantiômeros foi mantida em todos os experimentos.

Na Figura 1b é mostrado o gráfico $\ln \alpha$ versus $1/T$ com um $R^2 = 0,9561$. Esse valor reflete o comportamento dos pontos experimentais com um certo desvio da linearidade. Em cromatografia quiral, os gráficos de van't Hoff podem apresentar desvios da linearidade devido à não-homogeneidade da superfície da FEQ, causada por mecanismos de retenção distintos. Como consequência, os cálculos dos parâmetros termodinâmicos podem ser realizados de forma errada. Embora a habilidade do MCTA para reconhecimento quiral tenha sido relatada por diversos autores, o mecanismo de reconhecimento

quiral ainda permanece obscuro. Hesse e Hagel em 1973⁴⁵ propuseram o conceito de complexo de inclusão cromatográfica: interações dos compostos quirais ocorrendo por inclusão em cavidades assimétricas do polissacarídeo. A força da interação é determinada pelo ajuste das espécies quirais às cavidades quirais do MCTA expandido. Pais *et al.*⁴⁶ afirmaram que, contrariamente às outras fases estacionárias, a adsorção em MCTA parece ser fortemente influenciada por interações estéricas entre as espécies quirais e os substituintes da fase estacionária. Apenas para efeito de comparação é interessante observar os resultados apresentados por Jacobson *et al.*,⁴⁷ com relação à separação cromatográfica dos enantiômeros da base de Tröger em MCTA e etanol a várias temperaturas. Estes autores encontraram valores de ΔH^0 igual a -20,1 kJ/mol para o enantiômero menos retido e -22,3 kJ/mol para o enantiômero mais retido. Esses valores encontram-se próximos aos obtidos para a separação dos enantiômeros da cetamina usando MCTA (Tabela 4), indicando que os mecanismos de discriminação quiral devem ser análogos aos propostos por Pais *et al.*⁴⁶

Conforme reportado por Silva Jr. *et al.*,³⁷ as interações estereoeletrônicas entre os enantiômeros da bupivacaína, a FEQ Kromasil CHI-TBB e a fase móvel produzem estados de transição diastereoisoméricos com diferentes energias proporcionando, assim, diferentes velocidades de migração, conferindo diferentes tempos de retenção a cada isômero. Provavelmente, a presença de grupos aromáticos, carbonilas e hidrogênios ligados a heteroátomos eletronegativos, como N e O, na estrutura molecular da bupivacaína favorece uma maior interação do tipo π - π e ligações de hidrogênio.

Separação cromatográfica em condições preparativas

Com a finalidade de avaliar o desempenho de separação dos enantiômeros da cetamina e da bupivacaína em condições de sobrecarga, foram realizados experimentos cromatográficos com as misturas racêmicas, variando-se o volume de injeção. As Figuras 3 e 4 apresentam os cromatogramas para três injeções consecutivas com concentrações diferentes, com diferentes volumes de injeção (20, 50 e 200 μ L) à concentração de 20,0 g/L.

Conforme Schulte e Epping,⁴⁸ em cromatografia analítica a coluna é operada com soluções muito diluídas. Dessa forma, os parâmetros cromatográficos de adsorção geralmente se encontram dentro da região linear das isothermas e são independentes da massa injetada, sendo os perfis de concentração simétricos e Gaussianos. Quando há um aumento na concentração a um volume de injeção constante (sobrecarga de concentração) ou quando há um aumento na massa injetada com variação no volume de injeção (sobrecarga de volume) os perfis de concentração mudam. Essa situação é chamada sobrecarga da coluna e é caracterizada pelo decréscimo nos coeficientes de retenção dos solutos, um decréscimo no número de pratos ou aumento na altura equivalente a um prato e uma perda de resolução cromatográfica. Do ponto de vista de engenharia, sistemas operando em sobrecarga são não-lineares, devido à não-linearidade das isothermas de adsorção, bem como à dispersão e aos efeitos de transferência de massa. Do ponto de vista de química analítica, a sobrecarga da coluna é considerada, por convenção, quando a massa da amostra por unidade de massa do empacotamento causa um decréscimo de 10% no fator de retenção ou um decréscimo de 50% no número de pratos.

Em outras palavras, a sobrecarga é caracterizada por uma perda de resolução, aumento na assimetria (efeito de cauda nos cromatogramas) e redução nos tempos de retenção, devido a um aumento da não-linearidade do equilíbrio de adsorção, isto é, a isoterma de adsorção possui um desvio da linearidade, deixando de seguir a lei de Henry. Em ambos os cromatogramas em condições de sobrecarga (Figuras 3 e 4), foi possível observar um decréscimo nos tempos de retenção e efeito de cauda com o aumento do volume de injeção.

Esse resultado já era esperado, pois com o aumento no volume de injeção há uma maior quantidade de moléculas competindo pelos sítios de adsorção disponíveis e a saturação da coluna tende a acontecer mais rapidamente. Apenas para o caso da cetamina (Figura 3) houve uma sobreposição dos picos, principalmente para o maior volume de injeção. Esse comportamento reflete uma condição de sobrecarga em que as isothermas de adsorção se encontram numa faixa não-linear.⁸ Para o caso da bupivacaína, apesar do aumento na assimetria, a separação continua ocorrendo até a linha de base. Os perfis de eluição para a *R*-bupivacaína (Figura 4) apresentam um rápido aumento na concentração e o deslocamento acontece praticamente sem inclinação, porém, com um forte efeito de cauda à medida que a concentração diminuiu, principalmente para o maior volume de injeção. Para a *S*-bupivacaína, os cromatogramas possuem um aumento na concentração não tão rápido e os efeitos de cauda também não são tão fortes quando comparados com a *R*-bupivacaína. De maneira similar ao caso da cetamina, a diminuição nos tempos de retenção e aumento na assimetria é devida a uma não-linearidade das isothermas de adsorção.⁶ A separação por linha de base pode ser atribuída à elevada eficiência de separação apresentada pela coluna quiral Kromasil CHI-TBB.

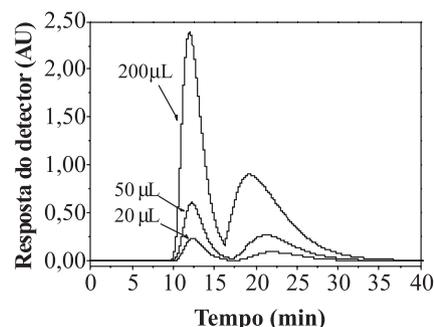


Figura 3. Cromatogramas da cetamina em MCTA variando o volume de injeção (20, 50 e 200 μ L) à concentração de 20,0 g/L. Condições experimentais: fase móvel etanol; vazão da fase móvel de 1,0 mL/min; temperatura de 25 °C

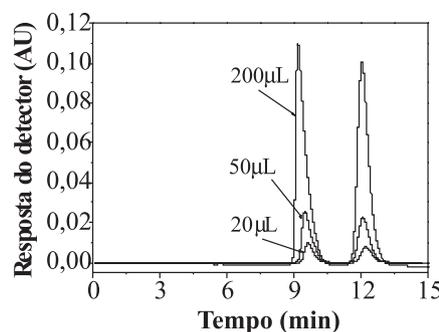


Figura 4. Cromatogramas da bupivacaína em Kromasil CHI-TBB variando o volume de injeção (20, 50 e 200 μ L) à concentração de 10,0 g/L. Condições experimentais: fase móvel *n*-hexano/2-propanol/ácido acético/trietilamina (98/2/0,3/0,05 v/v); vazão da fase móvel de 3,0 mL/min; temperatura de 25 °C

CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou resultados da separação cromatográfica dos anestésicos cetamina e bupivacaína utilizando duas fases estacionárias quirais distintas. A cetamina foi bem resolvida em uma coluna empacotada com uma FEQ baseada no polissacarídeo celulose

(MCTA), enquanto que a bupivacaína, em uma FEQ baseada em tartardiamida (Kromasil CHI-TBB).

Experimentos com soluções diluídas foram realizados em ambas as colunas. Foi observado um bom desempenho de separação tanto para a cetamina quanto para a bupivacaína; a separação ocorreu por linha base. Uma análise termodinâmica foi realizada com a finalidade de elucidar o mecanismo de retenção dos enantiômeros dos anestésicos nas respectivas colunas quirais. Em ambas as colunas, o processo de separação é dominado por efeitos entálpicos. Também foram realizados experimentos em condições de sobrecarga (soluções concentradas). No caso da bupivacaína, a separação ocorreu por linha base mesmo com o aumento do volume de injeção. O mesmo comportamento não foi observado para o caso da cetamina que teve seus picos sobrepostos com o aumento do volume de injeção. Esse comportamento demonstra a alta eficiência de separação da coluna quiral Kromasil CHI-TBB.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As Figuras 1S a 9S encontram-se disponíveis em <http://quimica-nova.sbq.org.br>, em arquivo PDF, com acesso gratuito.

REFERÊNCIAS

- Sioni, H.; Riekkola, M.-L.; Novotny, M. V.; *J. Chromatogr.* **1992**, *608*, 265.
- Juza, M.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M.; *Tibitech.* **2000**, *18*, 08.
- Maier, N.; Franco, P.; Linder, W.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 3.
- Rekoske, J. A.; *AIChE J.* **2003**, *47*, 02.
- Rouhi, A. M.; *Chem. Eng. News* **2003**, *81*, 45.
- Silva Jr., I. J.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Campinas, Brasil, 2006.
- Guiochon, G.; Lin, B.; *Modeling for preparative chromatography*, Academic Press: San Diego, 2003.
- Silva Jr., I. J.; Santos, M. A. G.; Veredas, V.; Santana, C. C.; *Sep. Purif. Technol.* **2005**, *43*, 103.
- Silva Jr., I. J.; Santos, M. A. G.; Veredas, V.; Santana, C. C.; *Sep. Sci. Technol.* **2005**, *40*, 2593.
- Santos, M. A. G.; Veredas, V.; Silva Jr., I. J.; Correia, C. D. R.; Furlan, L. T.; Santana, C. C.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2004**, *21*, 127.
- Migliorini, C.; Mazzotti, M.; Zenoni, G.; Morbidelli, M.; *AIChE J.* **2002**, *48*, 69.
- Schulte, M.; Strube, J.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 399.
- Francotte, E. R.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 379.
- Silva Jr., I. J.; Veredas, V.; Carpes, M. J. S.; Santana, C. C.; *Adsorption* **2005**, *11*, 123.
- Skogsberg, U.; Handel, H.; Sanchez, D.; Albert, K.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1023*, 215.
- Peper, S.; Lübbert, M.; Johannsen, M.; Brunner, G.; *Sep. Sci. Technol.* **2002**, *37*, 2545.
- Andersson, S.; Allenmark, S. G.; *J. Biochem. Biophys. Met.* **2002**, *54*, 11.
- Skogsberg, U.; Allenmark, S.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *921*, 161.
- Johannsen, M.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *937*, 135.
- Andersson, S.; Balmér, K.; Persson, B.; *Chirality* **1999**, *11*, 420.
- Löwendahl, A. C.; Allenmark, S. G.; *Chirality* **1997**, *9*, 167.
- Andersson, S.; Allenmark, S.; Möller, P.; Persson, B.; Sanchez, D.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *741*, 23.
- Wang, X.; Ching, C. B.; *Chem. Eng. Sci.* **2005**, *60*, 1337.
- Wang, X.; Ching, C. B.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1035*, 167.
- Svensson, J.; Gustafsson, L. L.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *678*, 373.
- Yanagihara, Y.; Ohtani, M.; Kariya, S.; Uchino, K.; Aoyama, T.; Yamamura, Y.; Iga, T.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2000**, *746*, 227.
- Silva, P.; *Farmacologia*, 5ª ed., Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1998.
- Nishizawa, N.; Nakao, S.; Nagata, A.; Hirose, T.; Masuzawa, M.; Shingu, K.; *Brain Res.* **2000**, *857*, 188.
- Sah, N.; Vallejo, M. C.; Ramanathan, S.; Golebiewski, K.; *J. Clin. Anest.* **2005**, *17*, 91.
- Sato, R. T. C.; Porsani, D. F.; Amaral, A. G. V.; Shultz Jr, O. V.; *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2005**, *55*, 165.
- Tanaka, P. P.; Souza, R. O.; Salvalaggio, M. F. O.; Tanaka, M. A. A.; *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2003**, *53*, 331.
- Fawcett, J. P.; Kennedy, J. M.; Kumar, A.; Ledger, R.; Kumara, G. M.; Patel, M. J.; Zacharias, M.; *J. Pharma. Pharmacol. Sci.* **2002**, *5*, 199.
- Seidel-Morgenstern, A.; Guiochon, G.; *Chem. Eng. Sci.* **1993**, *48*, 2787.
- Miyabe, K.; Guiochon, G.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *849*, 445.
- Rizzi, A. M.; *J. Chromatogr.* **1989**, *478*, 71.
- Silva Jr., I. J.; Sartor, J. P.; Barreto Jr., A. G.; Santana, C. C.; *Adsorpt. Sci. Tecnol.* **2007**, *25*, 769.
- Silva Jr., I. J.; Sartor, J. P.; Rosa, P. C. P.; Veredas, V.; Barreto Jr., A. G.; Santana, C. C.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1162*, 97.
- Weng, W.; Zeng, Q. L.; Yao, B. X.; Wang, Q. H.; Li, S.; *Chromatographia* **2005**, *61*, 561.
- Weng, W.; Wang, Q. H.; Yao, B. X.; Zeng, Q. L.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1042*, 81.
- Danel, C.; Foulon, C.; Park, C.; Yous, S.; Bonte, J. P.; Vaccher, C.; *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 428.
- Wang, P.; Jiang, S.; Liu, D.; Jia, G.; Wang, Q.; Wang, P.; Zhou, Z.; *Biomed. Chromatogr.* **2005**, *19*, 454.
- Rojkovicová, T.; Lehotay, J.; Krupčík; Fedurcová, A.; Čížmárik, J.; Armstrong, D. W.; *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2004**, *27*, 1653.
- He, H.; Liu, Y.; Sun, C.; Wang, X.; Huy, C. P.; *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 62.
- Schlauch, M.; Frahm, A. W.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 262.
- Hesse, G.; Hagel, R. A.; *Chromatographia* **1973**, *6*, 277.
- Pais, L. S.; Loureiro, J. M.; Rodrigues, A. E.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *827*, 215.
- Jacobson, C. S.; Seidel-Morgenstern, A.; Guiochon, G.; *J. Chromatogr.* **1993**, *637*, 13.
- Schulte, M.; Epping, A. Em *Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents*; Shimidt-Traub, H., ed.; Wiley-VCH Verlag CmbH & Co. KgaA: Weinheim, 2005.

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA QUIRAL DE ANESTÉSICOS A PARTIR DE SOLUÇÕES DILUÍDAS E CONCENTRADAS EM ESCALA PREPARATIVA

Ivanildo José da Silva Jr.*

Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará. Campus do PICI, 60455-760 Fortaleza – CE, Brasil

Amaro Gomes Barreto Jr.

Departamento de Engenharia Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo, 2030, CT, Bloco E, Cidade Universitária, 21941-909 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Cesar Costapinto Santana

Departamento de Processos Biotecnológicos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6066, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

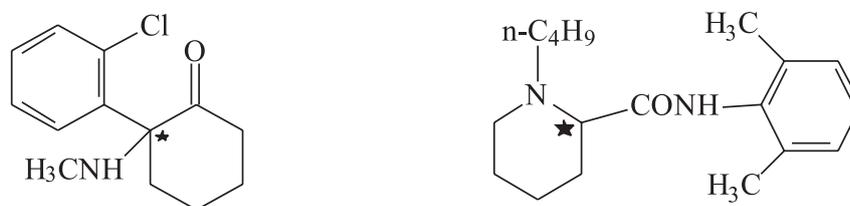


Figura 1S. (a) Estrutura química da cetamina; (b) estrutura química da bupivacaína. O símbolo (★) representa o centro de quiralidade das moléculas

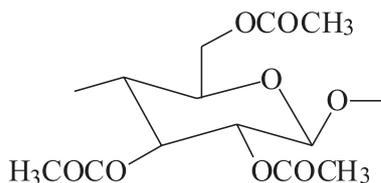


Figura 2S. Estrutura química do MCTA

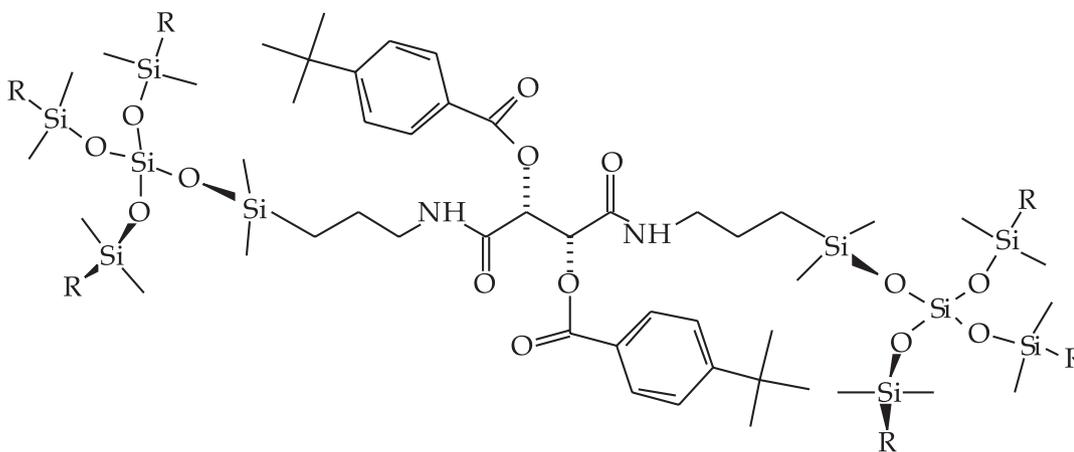


Figura 3S. Estrutura molecular da FEQ O,O'-bis[4-terc-butil-benzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida. R denota a repetição da unidade do seletor

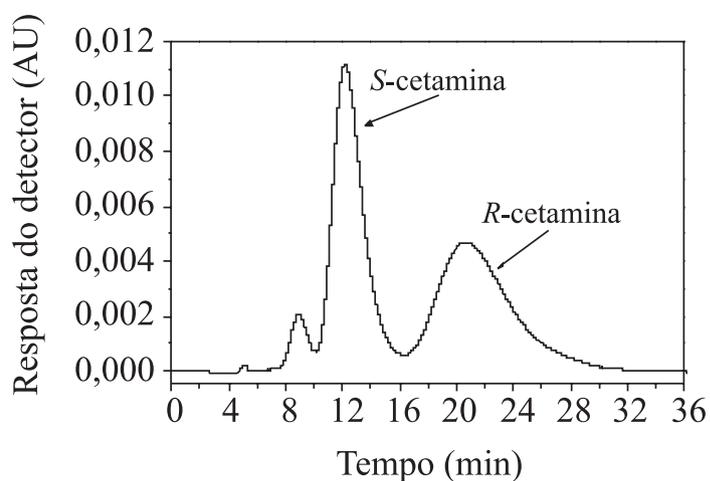


Figura 4S. Cromatograma da cetamina em MCTA. Condições experimentais: fase móvel etanol; vazão da fase móvel de 1,0 mL/min; temperatura de 25 °C; volume de injeção de 20 μ L

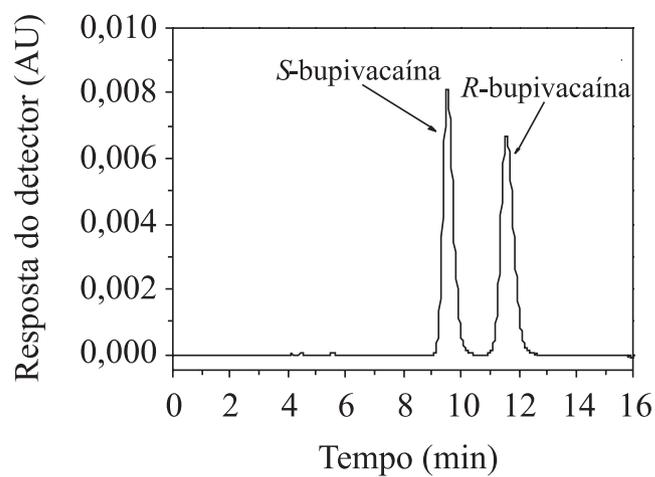


Figura 5S. Cromatograma da bupivacaína em Kromasil CHI-TBB. Condições experimentais: fase móvel n-hexano/2-propanol/ácido acético/trietilamina (98/2/0,3/0,05 v/v); vazão da fase móvel de 3,0 mL/min; temperatura de 25 °C; volume de injeção de 20 μ L

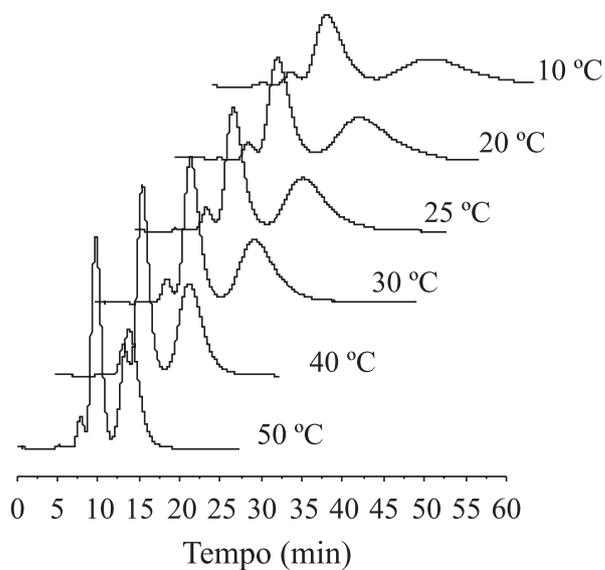


Figura 6S. Cromatogramas da cetamina em MCTA às temperaturas de 10, 20, 25, 30, 40 e 50 °C. Condições experimentais: *idem* à Figura 4S

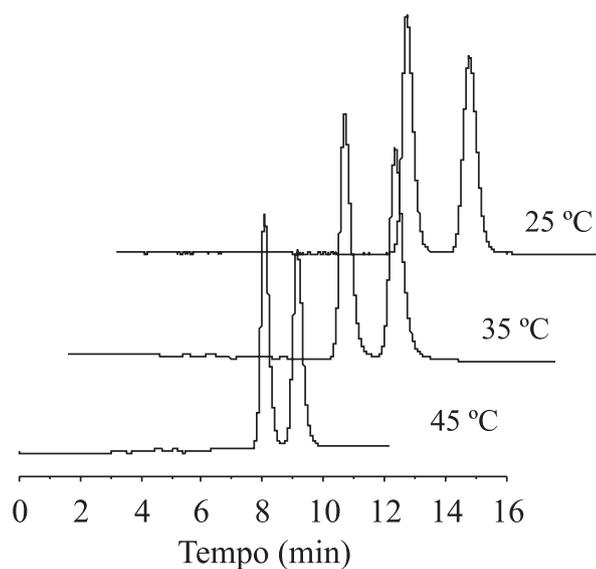


Figura 7S. Cromatogramas da bupivacaína racêmica às temperaturas de 25, 35 e 45 °C. Condições experimentais: idem à Figura 5S

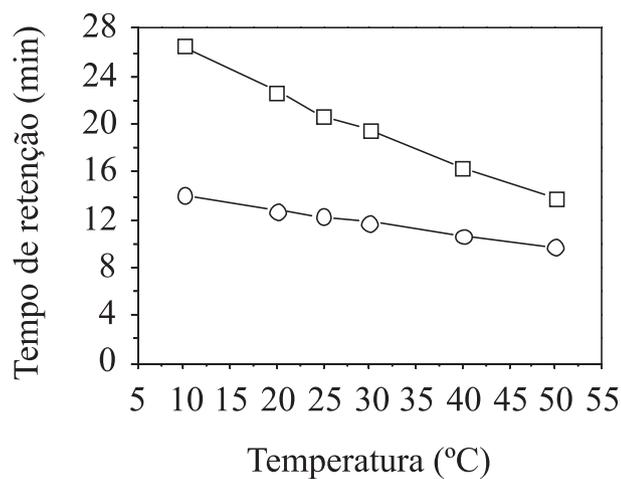


Figura 8S. Tempo de retenção dos enantiômeros da cetamina como função da temperatura a uma vazão de 1,0 mL/min da fase móvel. S-cetamina (○) e R-cetamina (□)

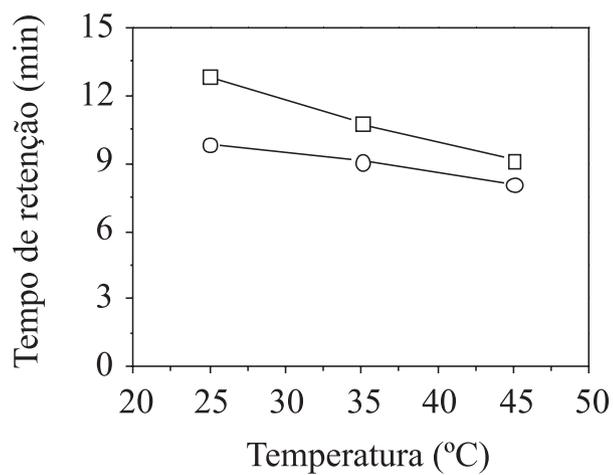


Figura 9S. Tempo de retenção dos enantiômeros da bupivacaína como função da temperatura a uma vazão de 3,0 mL/min da fase móvel. R-cetamina (○) e S-cetamina (□)