



INFLUÊNCIA DA POROSIDADE TOTAL DO LEITO NA CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM BATELADA DOS ENANTIÔMEROS DO OMEPRAZOL

A. F. N. DOMINGUES¹ e C. C. SANTANA²

¹ Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Agroindústria

² Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

E-mail para contato: ferraiolo@cpatu.embrapa.br

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da porosidade total do leito na recuperação do enantiômero S-(-)-omeprazol em um processo cromatográfico preparativo em batelada. A variável foi calculada a partir do perfil de concentração dos enantiômeros e este obtido através da resolução numérica da equação do balanço de massa utilizando-se o modelo do equilíbrio-dispersivo. Foram avaliados dois conjuntos de dados e realizadas 50 simulações com cada um. No primeiro conjunto avaliou-se a recuperação do enantiômero de interesse em uma coluna. No segundo, a variável de desempenho foi avaliada levando-se em consideração a porosidade total média de sete colunas. Cada simulação gerou um perfil de concentração devido os dados de entrada serem aleatoriamente escolhidos pelo programa, dentro de um determinado intervalo de confiança. No primeiro conjunto de dados pode-se observar que variações da ordem de 1% na porosidade total (0,669-0,677) implicaram em uma recuperação na faixa de 51 a 100%. O valor médio dos dados forneceu uma recuperação de $92 \pm 3\%$. Já no segundo conjunto de dados a recuperação do enantiômero de interesse variou de 10 a 100% quando consideradas variações da ordem de 3% na porosidade total (0,66-0,68). A recuperação média foi de $78 \pm 10\%$. Diante disso, pode-se verificar que pequenas variações na porosidade total afetam significativamente a recuperação do produto.

1. INTRODUÇÃO

A administração de fármacos preparados a partir de enantiômeros puros apresenta uma maior eficiência e ocasionam menos efeitos colaterais do que os fármacos comercializados como mistura racêmica, geralmente misturas equimolares de ambos os enantiômeros (Graff, 2002). Por outro lado, fármacos já comercializados como racematos estão sendo exaustivamente estudados, com a finalidade de se avaliar qual a influência do estereoisomerismo sobre as suas propriedades farmacológicas e verificar quais as vantagens existentes na produção do enantiômero puro (Tucker, 2000).

O omeprazol, originalmente desenvolvido e administrado durante muitos anos como mistura racêmica, agora é comercializado como enantiômero puro pela AstraZeneca AB (Södertälje, Suécia) (Orlando e Bonato, 2003). O S-(-)-omeprazol (esomeprazol magnésio), registrado como Nexium[®], tem sido alvo de estudos comparativos em relação à mistura



racêmica por apresentar menor variabilidade do pH intragástrico e uma maior biodisponibilidade permitindo um melhor controle da secreção ácida estomacal (Kahrilas *et al.*, 2000; Lind *et al.*, 2000).

Muitos métodos de enantioseparação têm sido amplamente estudados (Gasparrini *et al.*, 2001), no entanto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada na determinação do excesso ou pureza enantiomérica da matéria-prima e de formulações farmacêuticas comercializadas como enantiômeros puros.

Os fenômenos físico-químicos envolvidos nos processos cromatográficos são a termodinâmica de adsorção, a resistência à transferência de massa e a hidrodinâmica da coluna (Guiochon e Lin, 2003). Estes fenômenos podem ser descritos por modelos matemáticos desenvolvidos a partir de equações de balanço de massa (Kaczamarski, 2007; Schmidt-Traub, 2005).

A complexidade destes modelos aumenta com o número de parâmetros (fenômenos abordados). No entanto, os mais complexos nem sempre são os que proporcionam a melhor correlação entre o perfil calculado e o perfil experimental (Zhou *et al.*, 2003).

O modelo ideal, o mais simples dos modelos, assume equilíbrio instantâneo entre as fases líquida e sólida e eficiência infinita da coluna, negligenciando assim os efeitos de dispersão axial e de resistência à transferência de massa. O balanço de massa do componente i é dado por (Mihlbachler *et al.*, 2001; Mihlbachler *et al.*, 2002 a):

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} + \left(\frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} \right) \frac{\partial q_i}{\partial t} = 0 \quad (1)$$

onde C_i é a concentração do componente i na fase líquida; q_i , a concentração do componente i na fase sólida e ε_T , a porosidade total da coluna.

Em sistemas não-ideais, sistemas onde os efeitos hidrodinâmicos e de transferência de massa são considerados, os modelos mais utilizados são: o modelo geral (MG), o modelo do transporte-dispersivo (MTD) e o modelo do equilíbrio-dispersivo (MED). Entre eles, o mais simples é o modelo do equilíbrio-dispersivo (Zhou *et al.*, 2003).

O modelo do equilíbrio-dispersivo também assume um equilíbrio instantâneo entre as fases líquida e sólida mas considera os efeitos de eficiência finita da coluna. Os fenômenos que favorecem o alargamento dos picos, dispersão axial e resistência à transferência de massa, são descritos por um coeficiente de dispersão aparente (Cherrak *et al.*, 2000; Felinger *et al.*, 2003; Felinger *et al.*, 2004; Mihlbachler *et al.*, 2002 a, b). Este modelo é comumente utilizado quando o número de pratos teóricos da coluna é superior a 1000. Neste caso, o comportamento não linear da isoterma de equilíbrio exerce uma maior influência sobre o perfil de eluição do que a cinética de transferência de massa (Cherrak *et al.*, 2000).

A Equação 2 representa a equação do balanço de massa para cada componente da amostra.



$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \left(\frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} \right) \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (2)$$

onde D_a é o coeficiente de dispersão aparente $\left(D_a = \frac{uL}{2N} \right)$.

$$t = 0 \quad C_i = 0 \text{ e } q_i = 0$$

$$z = 0 \quad \left. \frac{\partial C_i}{\partial z} \right|_{z=0} = \frac{u}{D_a} (C_i|_{z=0} - C_f(t))$$

$$z = L \quad \left. \frac{\partial C_i}{\partial z} \right|_{z=L} = 0$$

A cromatografia preparativa em batelada é comumente utilizada quando pequenas quantidades de enantiômeros puros são requeridas para a realização de testes farmacológicos (Nicoud *et al.*, 1993).

A otimização do processo está relacionada ao método de fracionamento ou estratégia de corte das bandas cromatográficas (Figura 1) (Schmidt-Traub, 2005).

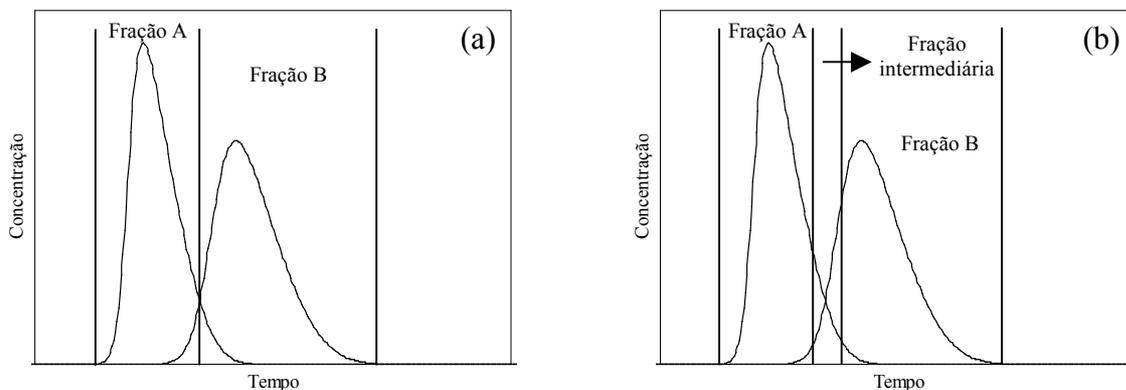


Figura 1 - Métodos de fracionamento para uma mistura binária (Adaptado de Schmidt-Traub, 2005).

No primeiro método (a) os enantiômeros são coletados consecutivamente e uma elevada pureza só é obtida reduzindo-se a concentração ou o volume da alimentação. No segundo método (b) três frações são coletadas na saída da coluna: a primeira corresponde ao enantiômero menos retido, a segunda corresponde a região intermediária dos enantiômeros e a terceira corresponde ao enantiômero mais retido (Grill *et al.*, 2004). A segunda fração pode ser descartada, reciclada ou submetida a um outro método de purificação, e sua presença não aumenta a complexidade da otimização uma vez que os tempos de coleta (início e término) podem ser definidos fixando-se a pureza desejada. Neste caso, pode-se alcançar uma elevada



pureza reduzindo-se a concentração ou o volume da alimentação ou aumentando-se o tempo de coleta da segunda fração (Schmidt-Traub, 2005).

No entanto, embora a pureza sirva como uma restrição para o problema associado ao tempo de coleta, nos dois métodos de fracionamento mencionados acima, a recuperação do processo é influenciada pelas variações de porosidade, uma vez que esta é calculada a partir do perfil de concentração e este é obtido da resolução numérica da Equação 2, que tem como dados de entrada a porosidade total, as constantes de Henry e os parâmetros das isotermas.

Diante do exposto, avaliou-se a influência da porosidade total na recuperação do enantiômero S-(-)-omeprazol em um processo cromatográfico preparativo em batelada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A mistura racêmica da fármaco omeprazol (OMP) foi doada pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (Itapira, São Paulo).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, modelo 2487), composto por duas bombas (modelo 1525) e detector de absorvância no ultravioleta-visível (UV-vis). Os perfis de eluição foram registrados pelo software Breeze.

Os materiais e solventes utilizados nas análises foram: metanol (J.T. Baker, EUA), 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB) (Aldrich, EUA) e nove colunas cromatográficas semipreparativas (SP) (25 x 1,0 cm D.I.) contendo a fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

2.2. Procedimento Experimental

A colunas cromatográficas, contendo a FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, adsorvida fisicamente em partículas de sílica Luna NH₂, foram confeccionadas por Freitas (2009), de acordo com a metodologia descrita em Matlin *et al.* (1994).

A homogeneidade do empacotamento foi avaliada pela porosidade total, a qual foi determinada por experimentos de pulsos cromatográficos com um composto não retido pela fase estacionária. Foram realizadas injeções de 20 µL do TTBB (3,0 mg/mL) e as respostas dos pulsos monitoradas no comprimento de onda de 254 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os valores de ε_T foram obtidos de acordo com a Equação 3 (Kostova e Bart, 2007; Pedferri *et al.*, 1999).

$$\varepsilon_T = \frac{V_L}{V_C} = \frac{t_M \cdot Q}{V_C} \quad (3)$$



onde t_M é o tempo de retenção do componente não retido; Q , a vazão da fase móvel; V_L , o volume de líquido e V_C , o volume da coluna.

A recuperação do enantiômero S(-)-omeprazol foi calculada a partir do perfil de concentração e este obtido através da resolução numérica da Equação 2. O programa computacional foi desenvolvido em linguagem Fortran pelo professor Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A concentração da alimentação, o volume de injeção, a vazão da fase móvel e o excesso enantiomérico foram mantidos constantes e iguais a 5,0 mg/mL, 200 μ L, 2,0 mL/min e 99,9%, respectivamente. A base de referência do excesso enantiomérico foi a patente do medicamento Nexium[®] (esomeprazol magnésio) (Lindberg e Von Unge, 2005).

Foram avaliados dois conjuntos de dados e realizadas 50 simulações com cada um. No primeiro conjunto avaliou-se a recuperação na coluna SP9. No segundo, a variável de desempenho foi avaliada levando-se em consideração a porosidade total média das colunas SP1, SP3, SP4, SP5, SP6, SP8 e SP9. Cada simulação gerou um perfil de concentração diferente devido aos dados de entrada serem aleatoriamente escolhidos pelo programa, dentro do próprio intervalo de confiança.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios das porosidades e seus respectivos intervalos de confiança em cada coluna.

Tabela 1 - Porosidades médias das colunas

Coluna	ε_T	ε
SP1	0,680 \pm 0,004	0,436 \pm 0,007
SP2	0,628 \pm 0,002	0,344 \pm 0,003
SP3	0,693 \pm 0,004	0,459 \pm 0,007
SP4	0,658 \pm 0,006	0,40 \pm 0,01
SP5	0,672 \pm 0,007	0,42 \pm 0,01
SP6	0,680 \pm 0,004	0,436 \pm 0,007
SP7	0,587 \pm 0,005	0,272 \pm 0,009
SP8	0,650 \pm 0,006	0,383 \pm 0,001
SP9	0,673 \pm 0,004	0,423 \pm 0,007

Os valores dos dados de entrada, porosidade total, constantes de Henry e constantes de associação das isotermas, e seus respectivos intervalos de confiança são apresentados na Tabela 2. Os valores das constantes de associação permaneceram constantes uma vez que foram determinados apenas na coluna de número seis (SP6).



Tabela 2 - Dados de entrada

	Coluna SP9	Colunas SP*
Porosidade total	$0,673 \pm 0,004$	$0,67 \pm 0,01$
H (S(-)-OMP)	$7,1 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,5$
H (R(+)-OMP)	$9,3 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,6$
b (S(-)-OMP)	$0,368 \pm 0,007$	$0,368 \pm 0,007$
b (R(+)-OMP)	$0,45 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$

*Colunas SP1, SP3, SP4, SP5, SP6, SP8 e SP9.

A Figura 2 mostra os valores percentuais da recuperação do S(-)-omeprazol obtidos com o primeiro conjunto de dados. A linha horizontal representa a recuperação obtida com o valor médio dos parâmetros de entrada. Pode-se observar que variações da ordem de 1% na porosidade total (0,669-0,677) implicam em uma recuperação na faixa de 51 a 100%. O valor médio dos dados forneceu uma recuperação de $92 \pm 3\%$.

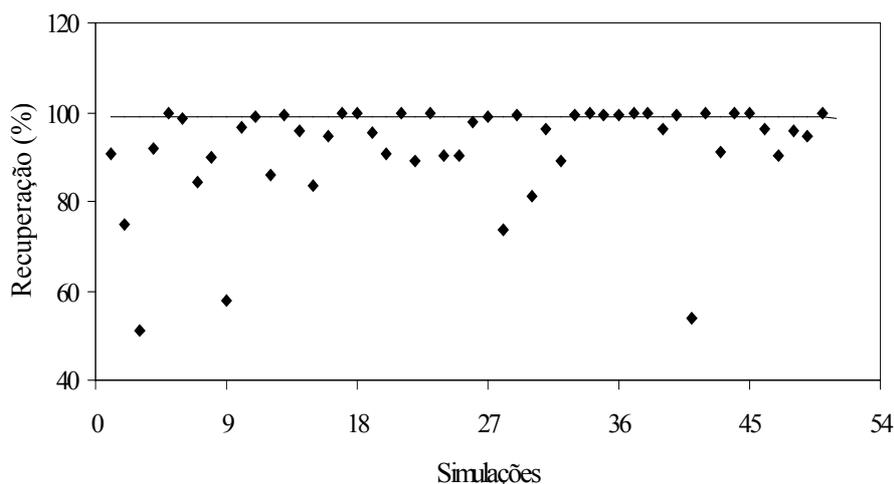


Figura 2 - Recuperação do enantiômero S(-)-omeprazol considerando variações de 1% na porosidade total.

Os valores percentuais obtidos com o segundo conjunto de dados, são mostrados na Figura 3. Neste caso, a recuperação do enantiômero de interesse variou de 10 a 100% quando consideradas variações da ordem de 3% na porosidade total (0,66-0,68). A recuperação média foi de $78 \pm 10\%$.

Diante disso, pode-se verificar que pequenas variações na porosidade total afetam significativamente a recuperação do produto.

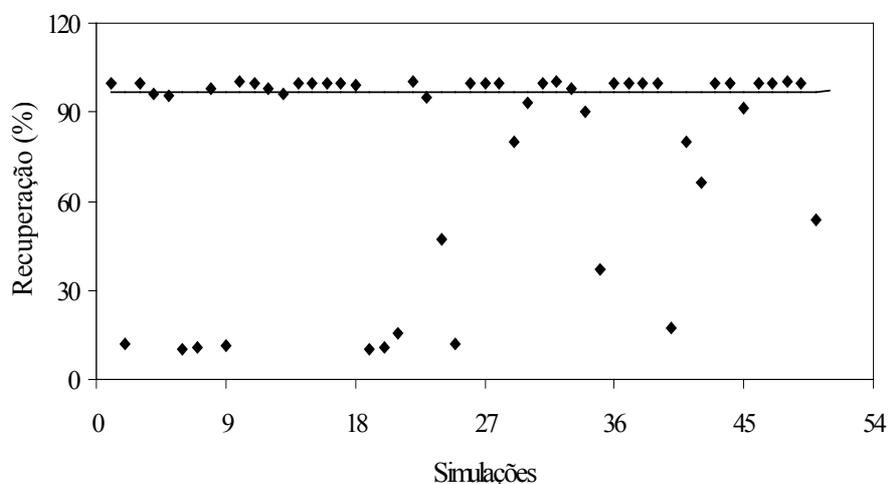


Figura 3 - Recuperação do enantiômero S(-)-omeprazol considerando variações de 3% na porosidade total.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que a recuperação do enantiômero de interesse, S(-)-omeprazol, é significativamente influenciada pela porosidade total. Variações da ordem de 1 e 3% nos valores implicam, respectivamente, em uma recuperação de 51-100% e de 10-100%.

5. REFERÊNCIAS

- CHERRAK, D. E.; KHATTABI, S.; GUIOCHON, G. Adsorption behavior and prediction of the band profiles of the enantiomers of 3-chloro-1-phenyl-1-propanol. Influence of the mass transfer kinetics. *J. Chromatogr., A*, 877, p. 109-122, 2000.
- FELINGER, A.; CAVAZZINI, A.; GUIOCHON, G. Numerical determination of the competitive isotherms of enantiomers. *J. Chromatogr., A*, 986, p. 207-225, 2003.
- FELINGER, A.; GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Repeatability and reproducibility of high-concentration data in reversed-phase liquid chromatography, III Isotherm reproducibility on Kromasil C₁₈. *J. Chromatogr., A*, 1024, p. 21-38, 2004.
- FREITAS, A. F. *Caracterização e aplicação da fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol*. 2009. 118 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- GASPARRINI, F.; MISITI, D.; VILLANI, C. High-performance liquid chromatography chiral stationary phases based on low-molecular-mass selectors. *J. Chromatogr., A*, 906, p. 35-50, 2001.



- GRAFF, G. Custom chemicals makers stress chiral technologies. *Plant Eng. Mag.*, jul. 2002. Disponível em <<http://www.technology-catalysts.com/pdf/TCI-PlantEngineering-0702.pdf>>. Acesso em 5 set. 2006.
- GRILL, C. M.; MILLER, L.; YAN, T. Q. Resolution of a racemic pharmaceutical intermediate: A comparison of preparative HPLC, steady state recycling and simulated moving bed. 1026, p. 101-108, 2004.
- GUIOCHON, G.; LIN, B. *Modeling for Preparative Chromatography*. Amsterdam: Academic Press, 2003. 342 p.
- KACZMARSKI, K. Estimation of adsorption isotherm parameters with inverse method - possible problems. *J. Chromatogr., A*, 1176, p. 57-68, 2007.
- KAHRILAS, P. J.; FALK, G. W.; JOHNSON, D. A.; SCHMITT, C.; COLLINS, D. W.; WHIPPLE, J.; D'AMICO, D.; HAMELIN, B.; JOELSSON, B. Esomeprazole improves healing and symptom resolution as compared with omeprazole in reflux oesophagitis patients: a randomized controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 14, p. 1249-1258, 2000.
- KOSTOVA, A.; BART, H. J. Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixtures. I Adsorption isotherms. *Sep. Sci. Technol.*, 54, p. 340-348, 2007.
- LIND, T.; RYDBERG, L.; KYLEBÄCK, A.; JONSSON, A.; ANDERSSON, T.; HASSELGREN, G.; HOLMBERG, J.; RÖHSS, K. Esomeprazole provides improved acid control vs. omeprazole in patients with symptoms of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 14, p. 861-867, 2000.
- LINDBERG, P. L.; VON UNGE, S. USP 6875872, 05 de abril de 2005. Disponível em <<http://www.drugpatentwatch.com>>. Acesso em 13 mai. 2009.
- MATLIN, S. A.; TIRITAN, M. E.; CRAWFORD, A. J.; CASS, Q. B.; BOYD, D. R. High with carbohydrate carbamate chiral phases: Influence of chiral phase structure on enantioselectivity. *Chirality*, v. 6, n. 2, p. 135-140, 1994.
- MIHLBACHLER, K.; FRICKE, J.; YUN, T.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; SCHMIDT-TRAUB, H.; GUIOCHON, G. Effect of the homogeneity of the column set on the performance of a simulated moving bed unit. I. Theory. *J. Chromatogr., A*, 908, p. 49-70, 2001.
- MIHLBACHLER, K.; KACZMARSKI, K.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Effect of the homogeneity of the column set on the performance of a simulated moving bed unit. II. Experimental study. *J. Chromatogr., A*, 944, p. 3-22, 2002a.
- MIHLBACHLER, K.; KACZMARSKI, K.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Träger's base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase. *J. Chromatogr., A*, 955, p. 35-52, 2002 b.
- NICOUD, R. M.; FUCHS, G.; ADAM, P.; BAILLY, M.; KÜSTERS, E.; ANTIA, F. D.; REUILLE, R.; SCHMID, E. Preparative scale enantioseparation on a chiral epoxide: Comparison of liquid chromatography and simulated moving bed adsorption technology. *Chirality*, v. 5, n. 4, p. 267-271, 1993.
- ORLANDO R. M.; BONATO, P. S. Simple and efficient method for enantioselective determination of omeprazole in human plasma. *J. Chromatogr., B*, 795, p. 227-235, 2003.



PEDEFERRI, M. P.; ZENONI, G.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Experimental analysis of a chiral separation through simulated moving bed chromatography. *Chem. Eng. Sci.*, 54, p. 3735-3748, 1999.

SCHMIDT-TRAUB, H. *Preparative Chromatography*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 458 p.

TUCKER, G. T. Chiral switches. *The Lancet*, 355, p. 1085-1087, 2000.

ZHOU, D.; CHERRAK, D. E.; KACZMARSKI, K.; CAVAZZINI, A.; GUIOCHON, G. Prediction of the band profiles of the mixtures of the 1-indanol enantiomers from data acquired with the single racemic mixture. *Chem. Eng. Sci.*, 58, p. 3257-3272, 2003.