Cromatografia Quiral no Desenvolvimento de Novas Drogas

Fernando Petacci e Silvia de Sousa Freitas

A quiralidade é um aspecto fundamental no desenvolvimento de drogas, tendo em vista que é necessário conhecer e descrever alvos biológicos para projetar drogas eficazes. A cromatografia enantioseletiva tem ampliado seu papel na indústria farmacêutica tanto como ferramenta analítica para a análise da quiralidade quanto como técnica preparativa para obter enantiomeros puros em larga escala, a partir de racematos de maneira rápida. Diferentes técnicas cromatográficas enantioseletivas são discutidas aqui, com ênfase nas mais difundidas: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia por fluído supercrítico (CFS). O desenvolvimento das fases estacionárias quirais (FEQs), que tornaram CLAE e CFS indispensáveis na descoberta de novas drogas, também é discutido.

Palavras-chave: cromatografia enantioseletiva; desenvolvimento de drogas; fases estacionárias quirais.

The chirality is a fundamental aspect in drug development because it is necessary to understand and describe biological targets as well as to design effective pharmaceutical agents. Enantioselective chromatography has played an increasing role on the pharmaceutical industry, both as analytical tool for chiral analysis also as preparative technique to obtain pure enantiomers from racemates in large scale, quickly. Different enantioselective chromatography techniques are discussed here, with particular emphasis on the most widespread: high performance liquid chromatography (HPLC) and supercritical fluid chromatography (SFC). The development of chiral stationary phases (CSPs), that have made HPLC and SFC indispensable techniques for drug discovery, is discussed too.

Key-words: enantioselective chromatography; drug development; chiral stationary phase.

46 Revista Processos Químicos Jan / Jun de 2008

Introdução

De maneira geral, o funcionamento dos organismos vivos é baseado em moléculas guirais, ou seja, aquelas que contêm um centro que confere assimetria à molécula, como, por exemplo, um átomo de carbono, silício, fósforo, entre outros. A atividade farmacológica de dois enantiômeros pode diferir consideravelmente e às vezes ser muito semelhante. Esta diferenca de comportamento está relacionada ao mecanismo de ação a nível molecular, pois um dos enantiômeros pode possuir maior complementaridade estérica ao receptor em relação ao seu antípoda. Assim, esses compostos podem apresentar diferentes perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos, que podem resultar em diferenças na biodisponibilidade plasmática e toxicológica.^{1,2} Por esse motivo o FDA tem solicitado avaliações clínicas de enantiômeros isoladamente,3 o que fez a indústria farmacêutica dar ênfase no desenvolvimento de drogas enantiomericamente puras.^{4,5} Levantamento feito por Agranat⁶ sugere que o número de drogas com apenas um enanciômero é maior que aquelas oriundas de misturas racêmicas e drogas aquirais (Figura 1).

Desta maneira, metodologias para a obtenção de enantiômeros puros vêm sendo desenvolvidas, seja por síntese assimétrica, seja por resolução de misturas racêmicas. Nesse artigo, nos deteremos ao processo de separação de misturas racêmicas. Na década de 1970, uma mistura racêmica de Talidomida foi separada em poliamida opticamente ativa, 7 o que impulsionou o desenvolvimento de outras fases estacionárias quirais.

Os métodos de separação quiral podem ser divididos em duas categorias: método direto, indireto. O método direto é baseado na formação de um diasteroisômero através da interação com a fase estacionária ou na fase móvel. O outro é um método indireto, onde há a formação de diastereoisômeros pela reação com um reagente quiral, e posterior separação da mistura diastereoisomérica formada. Classicamente, a separação de enantiômeros por cromatografia é feita pelo método indireto através da formação de misturas diastereoisoméricas que, devido às diferenças nas suas propriedades termodinâmicas, podem ser separadas por fases estacionárias aquirais. Embora essa metodologia tenha a vantagem de utilizar fases convencionais, a formação dos diastereoisômeros

nem sempre é tarefa fácil. Nos modos preparativo e semi-preparativo ainda tem o inconveniente de isolar os diastereoisômeros e então fornecer os enantiômeros iniciais, tornando o trabalho indireto penoso.

Uma alternativa na separação de enantiômeros é a separação direta, usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia por Fluído Supercrítico (CFS) com Fases Estacionárias Quirais (FEQ), tanto no modo analítico quanto no modo preparativo de maneira mais rápida, com alta robustez e eficiência, o que torna essas técnicas fundamentais no processo de desenvolvimento de novas drogas ^{9,10}. Desta forma, a separação direta usando FEQ's vem sendo preferida aos métodos indiretos, como derivatizações e adições de aditivos quirais à fase móvel, já que reduz etapas de manipulação das amostras. No decorrer deste trabalho trataremos especificamente de separações diretas utilizando as FEQ's mais utilizadas no processo de obtenção de descoberta de novas drogas.

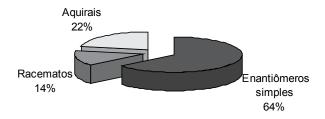


Figura 1: Distribuição de drogas aprovadas pelo FDA entre janeiroagosto de 2003⁶.

De maneira ampla, podemos classificar os métodos de cromatografia enantioseletiva em quatro categorias:¹¹

CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

A CG com fases quirais oferece vantagens como altas resolução e eficiência de coluna, além da simplicidade da fase móvel. Na indústria farmacêutica é útil na separação de compostos usados em síntese assimétrica que não são prontamente separados ou detectados por cromatografia líquida. A grande limitação de CG é que apenas compostos voláteis e termicamente estáveis podem ser analisados por essa técnica. No caso de CG quiral, há também que se relatar que, devido às altas temperaturas a que são expostas, as fases quirais racemizam, diminuindo a eficiência das separações. Outra séria limitação da CG

no desenvolvimento de fármacos é a dificuldade de se realizar separações em escala preparativa.

ELETROFORESE CAPILAR (EC)

Devido à alta resolução desta técnica, a mesma tem se estabelecido como importante ferramenta na separação analítica de misturas enantioméricas, sendo aplicada com sucesso a uma grande variedade de moléculas quirais^{12, 13}. Em EC, o seletor quiral é adicionado à fase móvel, formando uma pseudo-fase. Devido ao fato de tanto o analito quanto o seletor quiral terem diferentes mobilidades eletroforéticas na mesma fase, a separação é baseada na enantioseletividade das interações, que pode ser descrita como Cromatografia Eletrocinética Capilar¹⁴. As aplicações da EC em análises farmacêutica e biomédicas fizeram com que essa técnica fosse inserida nas farmacopéias americana e européia^{10, 15}.

No entanto, como acontece com a cromatografia gasosa, a EC necessita de ambientes capilares para se obter alta eficiência na separação. Assim, a utilização dessa técnica no modo preparativo é impraticável, o que exclui a EC nas fases iniciais do desenvolvimento de novas drogas, que necessitam de quantidades relativamente grandes dos enantiomeros puros para os ensaios farmacológicos.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Técnica mais amplamente utilizada na separação quiral de moléculas de importância na indústria farmacêutica, a CLAE-FEQ teve um grande desenvolvimento nas últimas duas décadas 16,17. A grande vantagem da CLAE para resolução de misturas de moléculas quirais é a flexibilidade na utilização dessa técnica tanto no modo analítico quanto no preparativo, sem variar a eficiência da técnica. A técnica permite redimensionamento da quantidade de analito a ser separada apenas pelo redimensionamento da coluna ou do uso de técnicas marginais, como CLAE reciclante, nas escalas de laboratório (< 100 g) ou em escala de processos (> 100 g de enantiômeros puros).

CROMATOGRAFIA POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO (CFS)

Nos últimos anos, a CFS com colunas empacotadas quirais têm tido um rápido avanço, que pode ser observado no grande crescimento da sua utilização industrial, bem

como pelo aumento substancial nas vendas desse tipo de equipamento¹⁸. Nesse modo de cromatografia é usado fluído no estado supercrítico ou próximo ao supercrítico como fase móvel, como CO₂. Isso proporciona separações de três a cinco vezes mais rápidas do que em CLAE, devido à alta difusibilidade (velocidade linear ótima) e à menor viscosidade da fase móvel¹⁹. Essa diminuição no tempo de separação tem conseqüências positivas tanto em separações analíticas quanto preparativas na descoberta de novas drogas.

Sendo uma opção na separação e purificação de misturas enantioméricas, os principais benefícios dessa técnica frente as acima citadas são¹⁰:

- Alta resolução por unidade de tempo, rápido re-equiilíbrio da coluna, composição simples da fase móvel, o que resulta no desenvolvimento mais rápido de método e análise em comparação com CLAE;
- Habilidade única de se modificar a força da fase móvel variando apenas pressão e temperatura (viscosidade);
- Compatibilidade com todos os seletores quirais usados em CLAE e CG, sendo boa técnica complementar;
- iv. Maior compatibilidade do CO₂ com solventes polares em comparação com hexano, gerando maior flexibilidade na escolha de solvente para fase móvel;
- v. Alta taxa de produção cromatográfica associado à baixa utilização de solventes orgânicos, tornando a técnica ambientalmente favorável;
- vi. A combinação das vantagens da CG associado à não limitação a altas temperaturas;
- vii. Compatível com todos os detectores de CLAE e CG.

Como exposto acima, CLAE e CFS são as técnicas mais amplamente utilizadas para se fazer separações enantioseletivas. A discriminação quiral nas FEQ's em CLAE e CFS são resultado das diferenças de energia entre os complexos diasteroisoméricos formados pelas interações entre os solutos e as FEQ. Há uma estimativa de que aproximadamente 1300 FEQ tenham sido preparadas, sendo que mais de 200 delas são encontradas comercialmente.²⁰ Portanto, o conhecimento e classificação das diferentes FEQ's é fundamental para selecionar a mais apropriada para resolver um dado problema. A Tabela 1 mostra os seis tipos de FEQ's mais utilizadas e suas capacidades de separação típicas, bem

Revista Processos Químicos Jan / Jun de 2008

como uma descrição suscinta de como cada uma atua no processo de separação.

Discussão

TIPO PIRKLE

Esse tipo de FEQ requer interações do tipo π - π entre o soluto e a FEQ. Simultaneamente, outros tipos de interações intermoleculares, como pontes de hidrogênio e dipolo—dipolo, atuam. Pelo fato dessas interações serem favorecidas em solventes apolares, essas FEQ são utilizadas no modo normal, apesar de também poderem ser utilizadas no modo reverso, particularmente para compostos iônicos e altamente polares. Os seletores quirais são ligados a uma superfície porosa e essa fase estacionária é responsável pela separação. Inovações têm sido apresentadas quanto às fases utilizadas em CFS, especialmente colunas à base de polisiloxanas, com alta seletividade, eficiência e reduzido tempo de retenção para CFS. Colunas a base de zircônio não poroso, estáveis a diversos pH's, têm-se mostrado boas alternativas na redução de tempo de análise em CFS.

POLISSACARÍDEOS DERIVATIZADOS

Derivados γ-aminopropil da celulose e da amilose suportados em sílica silanizada (Chiralcel® e Chiralpack®,

respectivamente) são as FEQ mais populares. Devido a suas altas capacidades, eficiência na separação e versatilidade, elas dominam a aplicações de FEQ's na indústria farmacêutica¹⁰. Basicamente quatro tipos de derivados podem ser preparados por modificação dos grupos hidroxila livres do polissacarídeo: ésteres orgânicos, nitratos, carbamatos e éteres. Os carbamatos e éteres são os derivados mais promissores como FEO's²¹.

Essas FEQ's atuam tanto no modo normal quanto no reverso em CLAE e CFS. No modo normal, diferentes álcoois ou diferentes concentrações de álcoois resultam em diferentes enantioseletividades. No modo reverso, moléculas altamente polares e compostos biológicos são os principais analitos. As misturas binárias entre acetonitrila-álcool e álcool-alcool são as fases móveis mais utilizadas neste modo, gerando boas resoluções com baixo tempo de análise aliados a uma larga faixa de solubilidades.

O principal inconveniente desses polissacarídeos como FEQ é que eles são ligados à superficie de sílica, sendo compatíveis com apenas alguns solventes. Novas fases derivadas da amilose tri-(3,5-dimetil-fenil)-carbamato tem mostrado alta durabilidade em todos os solventes orgânicos, aumentando a faixa de seleção de fases móveis para essas FEQs.

Tabela 1: Tipos de fases quirais e suas capacidades de separação usuais9

Tipo de Fase Estacionária Quiral (FEQ)	Capacidade Média (mg soluto/ g FEQ)
Pirkle	1-50
Derivados de polisacarídeos	5-150
Macrocíclicos	
Ciclodextrinas (naturais e derivatizadas)	0,1-5
Glicopeptídeos	0,1-5
Éteres coroa quirais	0,1-5
Ligante de troca	0,1-1
Proteínas	0,1-0,2
Outros polímeros	1-100

Jan / Jun de 2008 Revista Processos Químicos 49

MACROCÍCLICOS

Ciclodextrinas (CD), glicopeptídeos e éteres coroaquirais são os principais representantes dessa classe de FEQ's. Ciclodextrinas e glicopeptídeos são os seletores mais utilizados em eletroforese capilar, enquanto ciclodextrinas em cromatografia gasosa. Porém, esses macrocíclicos são pouco utilizados em CLAE e CFS.

As CD derivatizadas foram introduzidas por Armstrong, 22 e hoje temos uma grande variedade de CD derivatizadas que são utilizadas como FEQ multi-modais. As mais utilizadas são hidroxipropil- β -CD e derivados aromáticos de CD. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos derivados do amido e podem ser obtidas contendo de seis a doze unidades de glicose. Porém, apenas as CD com seis (α), sete (β) e oito (γ) unidades de glicose são encontradas comercialmente. A molécula de ciclodextrina tem uma cavidade hidrofóbica e uma superfície hidrofílica com número variado de unidades hidroxila 21 .

Os glicopeptideos também foram introduzidos por Armstrong e colaboradores e, hoje, quatro tipos de FEQ's são encontradas comercialmente: *Vancomycin, ristocetin, teicoplanin e teicoplanim aglycon* ¹⁰. Essas quatro FEQ's são utilizadas de maneira complementar na separação de várias moléculas quirais, em qualquer modo de eluição²³. Uma das mais notáveis vantagens dos glicopeptídeos como FEQ's é a capacidade de separar amino-ácidos *in natura* (sem derivatização) apenas com sistemas binários simples. Na prática *teicoplanin* e *teicoplanim aglycon* tem mostrado maior enantioseletividade nas separações do que *vancomycin* e *ristocetin*.

Os éteres coroa-quirais são ferramentas na separação de moléculas quirais contendo grupos amino primários (modo reverso e fase móvel acidificada). O reconhecimento quiral nessa FEQ é baseado na formação de um complexo de inclusão entre o grupo amino primário (na forma de iônica) e o éter quiral. Compostos com grupos amino secundários, como bloqueadores β, têm sido resolvidos com sucesso usando essas FEQ΄s.²4

LIGANTE DE TROCA

Esse tipo de FEQ consiste em um ligante bidentado quiral ligado à coluna. Para haver separação, é necessário que a molécula quiral forme um complexo

de coordenação com um metal de transição presente na fase móvel como aditivo (Cu²+ é o mais usado). Essas FEQ's geram excelentes separações para amino-ácidos, derivados de amino-ácidos e amino-álcoóis. Tendo em vista que os complexos entre o soluto e o cobre absorvem na região do UV-visível não há necessidade do composto ter grupos cromóforos para ser detectado neste tipo de detectores. Porém, a sensibilidade na detecção é bastante comprometida devido a ruídos gerados pela fase móvel.

PROTEÍNAS

Proteínas são usadas como FEQ's em separações analíticas. Devido ao sua baixa estabilidade e altos preços em relação a outras FEQ's, elas tem sido pouco usadas. Outro aspecto negativo é que essas FEQ's podem ser utilizadas apenas no modo reverso, além de ter uma baixa capacidade de separação (Tabela 1).

OUTROS POLÍMEROS

Outros polímeros quirais como dialiltartrinine amide e poliacrilamida também vem sendo utilizadas, especialmente para fins preparativos.

Considerações finais

Cromatografia enantioseletiva, especialmente CLAE e CFS com fases estacionárias quirais, é uma ferramenta indispensável no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas, seja pela análise da quiralidade, seja na preparação de novas moléculas. Há de se salientar ainda a maior rapidez no acesso a enantiômeros puros em relação aos processos de síntese tradicionais. É indiscutível que a cromatografia enantioseletiva quiral preparativa tome cada vez mais espaço nas linhas de produção da indústria farmacêutica, tendo em vista a alta capacidade para se obter enantiômeros puros. Para isso ainda são necessárias disponibilidade (menores preços) e robustez dos equipamentos em relação aos métodos clássicos. Com o desenvolvimento de novas FEO's o reconhecimento de discriminação quiral a nível molecular fica indispensável para que, num futuro próximo, tenhamos maior agilidade na escolha de uma FEQ para separar um dado enantiômero, ganhando em agilidade e seletividade.

50 Revista Processos Químicos Jan / Jun de 2008

REFERÊNCIAS

- 1. Ahuja, S. Em *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*; Aboul-Enein, H.Y.; Wainer, I.W., eds, Wiley, New York, **1997.**
- 2. Caldwell, J.; J. Chromatogr. A. 1996, 719, 3.
- 3. FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs May 1, 1992; Update July 6, **2005**; http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm, acessado em 07/11/2007.
- 4. Ahuja, S.; *Chiral Separations: Applications and Technology*, Oxford University Press, Oxford, **1996.**
- 5. Ahuja, S.; *Chiral Separation by Chromatography*, Oxford University Press, Oxford, **2000.**
- 6. Agranat, I. Caner, H.; Groner, E.; Levy, L.; *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 105.
- 7. Blaschke, G.; H.P. Kraft, K. Fickentscher, F. Kohler, *Arzneim.-Forsch.* **1979**, *29*, 1640.
- 8. Haginaka, J.; Em *Encyclopedia of Separation Science*; I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole, eds, Academic Press, New York, **2000**.
- 9. Francotte, E.R.; J. Chromatogr. A. 2001, 906, 379.
- 10. Zhang, Y.; Wu, D-R.; Wang-Iverson, D. B.; Tymiak, A. A.; *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 571.
- 11. Ying, L.; Lantz, A.W.; Armstrong, D.W.; J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2004, 27, 1121.
- 12. Camilleri, P.; *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, **1998.**
- 13. Kang, J.; Wistuba, D.; Schurig, V.; *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4005.
- 14. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.; *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111.

- 15. Scriba, G.K.W.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 373.
- 16. Krstulovic, A.M. *Chiral Separations By HPLC, Application To Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood Series, **1989.**
- 17. Subramanian, G.; A Practical Approach To Chiral Separations By Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, New York, 1994.
- 18. Terfloth, G.; J. Chromatogr. A. 2001, 906, 301.
- 19. Phinney, K.W.; Anal. Chem. 2000, 72, 204A.
- 20. Francotte, E.R. (2003) Enantioselective chromatography for the preparation of drug enantiomers, ISCD-15 (Chirality 2003), Shizuoka, Japan, Oct **2003.**
- 21. Cass, Q.B.; Degani, A.L.G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação, 1ª Ed., Edufscar, Série Apontamentos, São Carlos, 2001.
- 22. Armstrong, D.W.; Chen, S.; Chang, C.; Chang, S.; *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, *15*, 545.
- 23. Xiao, T.L. Zhang, B.; Lee, J. T.; Hui, F. J.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24*, 2673.
- 24. Steffeck, R.J.; Zelechonok Y.; Gahm K.H.; *J. Chromatogr. A.* **2002**, *947*, 301.

Fernando Petacci*¹ e Silvia de Sousa Freitas¹

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão, avenida Lamartine P. Avelar, 1120, Setor Universitário, Catalão-GO 75701-020.

*E-mail: petacci f@hotmail.com

Jan / Jun de 2008 Revista Processos Químicos 51