

RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA DO SECNIDAZOL

Ana Carolina Nascimento (UNICAMP) E-mail: ana_carol_tb@hotmail.com

César Costapinto Santana (UNICAMP) E-mail: cesarsantana@gmail.com

Resumo: A atividade de fármacos quirais pode variar entre os enantiômeros, podendo um dos deles mostrar-se mais ativo para uma ação específica, enquanto o outro poderia apresentar diferentes efeitos ou até mesmo ser tóxico. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais empregada para essa técnica de separação. A resolução enantiomérica do (\pm)-secnidazol foi alcançada com uma coluna Chiralpak AD (100 x 10 mm, 20 μ m de diâmetro da partícula). A fase móvel utilizada foi isopropanol: acetonitrila (60:40%, v/v). A vazão da fase móvel utilizada foi de 1,0 e 2,5 mL/min. Os valores de α dos enantiômeros do secnidazol ficaram numa faixa de 7,2 a 8,3 enquanto os valores do fator de resolução variaram de 4,7 a 7,3.

Palavras-chave: Separação quiral, secnidazol, enantiômeros.

ENANTIOMERIC RESOLUTION OF SECNIDAZOLE

Abstract: The activity of chiral drugs can vary between the enantiomers, one of them may prove to be more active for a specific action, while the other could have different effects or even be toxic. The high performance liquid chromatography (HPLC) is the most common technique for this separation technique. The enantiomeric resolution of (\pm)-secnidazole was achieved with a Chiralpak AD column (100 x 10 mm, 20 mm in particle diameter). The mobile phase was isopropyl alcohol: acetonitrile (60:40% v / v). The flow of mobile phase was 1.0 and 2.5 mL / min. The α values of the enantiomers of secnidazole were a range from 7.2 to 8.3 while the resolution factor values ranged from 4.7 to 7.3.

Keywords: chiral separation, secnidazole, enantiomers.

1. INTRODUÇÃO

A questão da quiralidade tem muita importância no processo de pesquisa farmacêutica e desenvolvimento de novas drogas, tornando-se essencial para a geração dos enantiômeros (ANDERSSON, 2002). Fármacos quirais apresentam diferenças estereosseletivas significativas em relação à potência, toxicidade, absorção e metabolismo (ORLANDO, 2007).

O secnidazol (1-(hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol) é um dos derivados nitroimidazólicos mais recentes que possui espectro de atividade contra microorganismos anaeróbicos e eficácia no tratamento de amebíase, giardíase, tricomoníase e vaginose bacteriana (GILLIS, 1996). Pode ser uma valiosa alternativa para o metronidazol devido à maior meia-vida e menores efeitos colaterais (BACKER, 2009).

Pesquisas demonstram que os 5-nitroimidazóis apresentam propriedades mutagênica, carcinogênicas e tóxicas (CAPITAN-VALLVEY, 2007). Alguns dos efeitos colaterais mais comuns do secnidazol são: gosto metálico, glossite, estomatite e distúrbios digestivos (SLIM, 2010). Estudos comprovam que o secnidazol é mais eficiente que o metronidazol e pode ser utilizado em doses menores (NÚÑEZ, 2005). É bem conhecido que os enantiômeros podem diferir em suas atividades farmacológicas e toxicológicas. Estas propriedades dos enantiômeros têm criado um interesse no estudo especialmente de fármacos e agroquímicos.

O US Food and Drug Administration (FDA) tem estabelecido regulamentações para as indústrias farmacêuticas e agroquímicas para especificar a pureza enantiomérica de todos os compostos opticamente ativos previamente à sua comercialização (ABOUL-ENEIN, 2001). O secnidazol é comercializado na forma racêmica de seus enantiômeros R e S e ainda não é oficial em nenhuma farmacopéia. A purificação dos enantiômeros do secnidazol é especialmente motivada por estudos que mostram que alguns nitroimidazóis possuem um enantiômero farmacologicamente ativo, enquanto o outro é tóxico ou inativo. Dentre os métodos mais utilizados para a separação, identificação e quantificação de enantiômeros está

à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com fase estacionária quiral (FEQ) (BAKSHI, 2004). A resolução enantiomérica de compostos quirais tornou-se uma necessidade urgente. A demanda de resolução quiral de medicamentos, produtos farmacêuticos e defensivos agrícolas está aumentando diariamente.

A resolução quiral de enantiômeros por cromatografia líquida é uma das áreas emergentes. Separações cromatográficas líquidas de produtos farmacêuticos e agroquímicos racêmicos tem conseguido uma grande reputação na ciência de separação. Muitos racematos têm sido resolvidos em várias fases estacionárias quirais (FEQs) (ALI, 2009). Até o presente momento não há estudos realizados sobre a sua separação enantiomérica. O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento da separação cromatográfica dos enantiômeros do secnidazol em escala semi-preparativa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O secnidazol racêmico foi gentilmente cedido pela empresa EMS (São Bernardo dos Campos, SP). A Figura 1 apresenta a estrutura química do secnidazol. A fase estacionária quiral utilizada é a tris-3,5-difenilcarbamato de amilose (comercialmente conhecida como Chiralpak AD) e foi adquirida da empresa Daicel Chemical Industries em coluna semi-preparativa de aço inoxidável (100 x 10 mm). O diâmetro médio de partícula da fase estacionária é de 20 μm . A estrutura desta fase estacionário quiral é apresentada na Figura 2. Soluções de secnidazol ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparadas na fase móvel (isopropanol: acetonitrila). Acetonitrila de grau HPLC foi adquirida da J.T.Baker (México) e isopropanol de grau HPLC foi adquirido da Tedia (EUA).

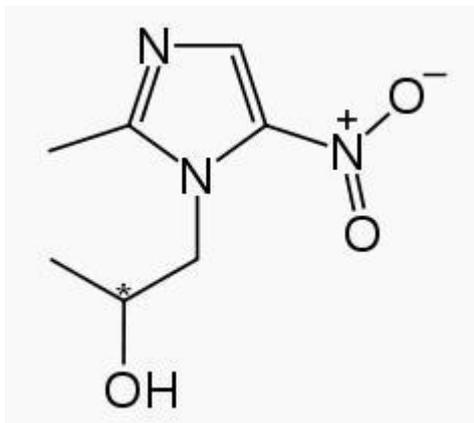


Figura 1 – Estrutura química do secnidazol. O símbolo (*) indica o estero centro da molécula.

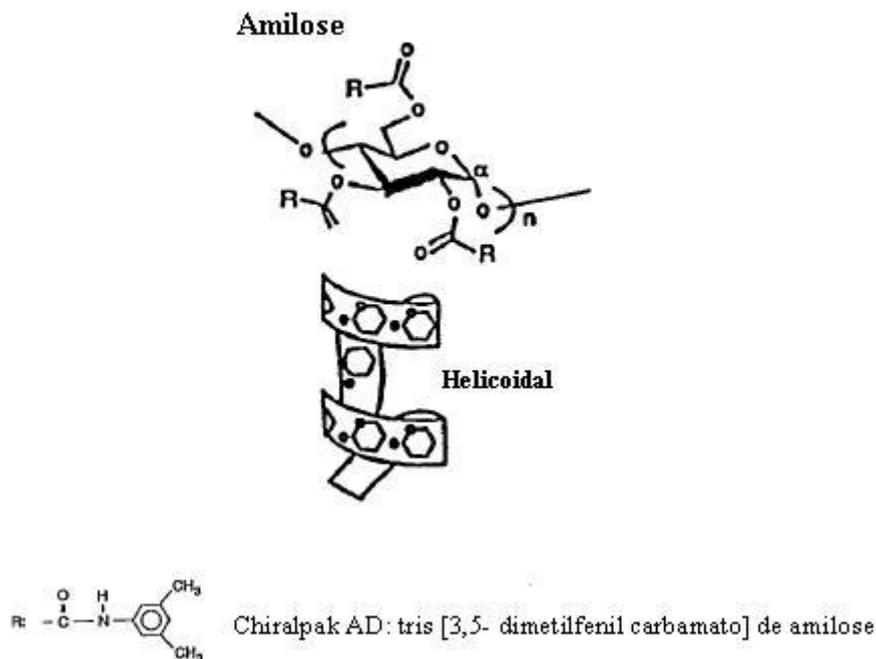


Figura 2 – Estrutura química da fase estacionária quiral amilose.

2.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

20 μL da solução de secnidazol foi injetada no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 3) constituído por uma bomba da marca Shimadzu Corporation/ Modelo IC-20 AT (Japão) e por um detector da marca Shimadzu Corporation/ Modelo SPD-20^a (Japão) com detecção UV-Vis. A ordem de eluição dos enantiômeros foi confirmada com um detector polarimétrico da marca Jasco/ Modelo CD-2095 Plus (Japão), com detecção acoplado em série a um dicroísmo circular. A coluna utilizada foi a Chiralpak AD (100 mm x 10 mm, com diâmetro de partícula=20 μm) e foi adquirida da Daicel Chemical Industries (Tóquio, Japão). A fase móvel utilizada neste estudo foi isopropanol: acetonitrila (60%: 40%, v/v). A fase móvel foi filtrada antes de ser utilizada. As vazões da fase móvel foram 1,0, e 2,5 mL min^{-1} . Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 25 e 35°C. A detecção foi conduzida a 320 nm. Os parâmetros cromatográficos como fator de retenção (k), fator de separação (α) e fator de resolução (R_s) foram calculados.

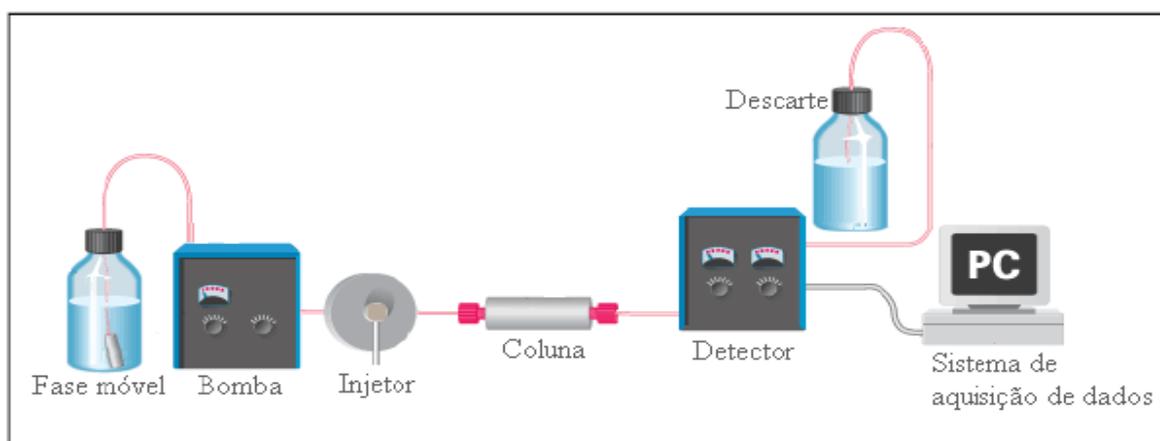


Figura 3 – Esquema clássico de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

O tempo de retenção (t_R) engloba todo o tempo do percurso das moléculas do soluto em movimento com a fase móvel a partir do injetor até a sua detecção. O fator de retenção é a razão entre o número de moléculas do soluto na fase estacionária e o número de moléculas do soluto na fase móvel. Pode ser adquirido entre a razão do tempo de retenção do componente i ($t_{R,i}$) e o tempo das moléculas da fase móvel percorrerem a coluna (t_M), como mostra a equação 1.

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

Outro termo útil para cromatografia é o fator de separação, que mede a seletividade de separação entre duas bandas adjacentes. A equação 2 é utilizada para calcular esse fator.

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

O fator de resolução (R_s) é outra medida quantitativa de separação do sistema de cromatografia em coluna. É calculado a partir da distância entre dois picos adjacentes dividido pela média das larguras de suas respectivas bases, conforme apresentado na Equação 3.

$$R_s = 1,177 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{h,1} + w_{h,2}} \quad (3)$$

3. RESULTADOS

Os parâmetros cromatográficos, fator de retenção (k), fator de separação (α) e fator de resolução (R_s) foram medidos para os enantiômeros resolvidos de (\pm)-secnidazol a 1,0 e 2,5 mL min⁻¹ e nas temperaturas de 25 e 35°C e são dados nas Tabelas 1 e 2. A ordem de eluição foi confirmada com a utilização de um detector polarimétrico acoplado ao dicroísmo circular. Na Figura 4 podemos observar que o (+) enantiômero elui primeiro que o (-) enantiômero. A variação dos parâmetros cromatográficos foi realizada para obter a melhor resolução. Para aperfeiçoar as condições cromatográficas, diferentes misturas de isopropanol e acetonitrila foram testadas, mas não obtiveram melhores resoluções. Esta otimização extensa produziu as melhores condições cromatográficas que estão relatadas neste trabalho.

Os enantiômeros do secnidazol foram resolvidos com sucesso usando vazões de 1,0 e 2,5 mL min⁻¹ e temperaturas de 25 e 35°C, como mostrado nas Tabelas 1 e 2. Cromatogramas típicos dos enantiômeros resolvidos de secnidazol na coluna Chiralpak AD nas condições descritas são mostrados nas Figuras 5 e 6.

Tabela 1 – Dados cromatográficos – fator de retenção (k), fator de separação (α) e fator de resolução (R_s) – para resolução dos enantiômeros do secnidazol em fase estacionária quiral de amilose com isopropanol: acetonitrila 60: 40% (v/v) como fase móvel e vazão de 1,0 mL min⁻¹

	$k_1 (+)$	$k_2 (-)$	α	R_s
Secnidazol – 25°C	0,2330	1,6994	7,2935	6,6199
Secnidazol – 35°C	0,2173	1,7999	8,2840	7,3259

Tabela 2 – Dados cromatográficos – fator de retenção (k), fator de separação (α) e fator de resolução (RS)- para resolução dos enantiômeros do secnidazol em fase estacionária quiral de amilose com isopropanol: acetonitrila 60: 40% (v/v) como fase móvel e vazão de 2,5 mL min⁻¹

	$k_1 (+)$	$k_2 (-)$	α	R_s
Secnidazol – 25°C	0,2290	1,6727	7,3032	4,7835
Secnidazol – 35°C	0,2134	1,7730	8,3087	5,3622

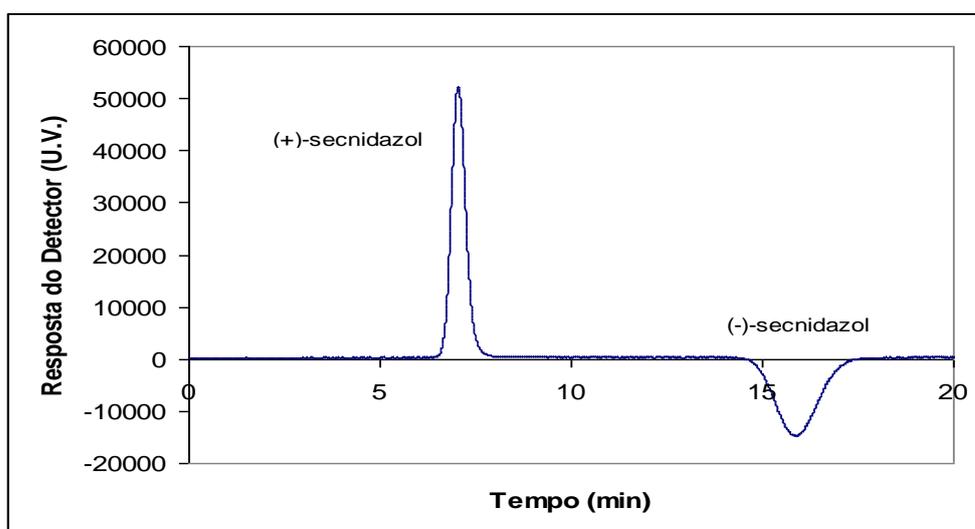


Figura 4 – Ordem de eluição dos enantiômeros do secnidazol em tris 3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (Chiralpak AD) com fase móvel isopropanol:acetonitrila 60:40 (v/v), respectivamente.

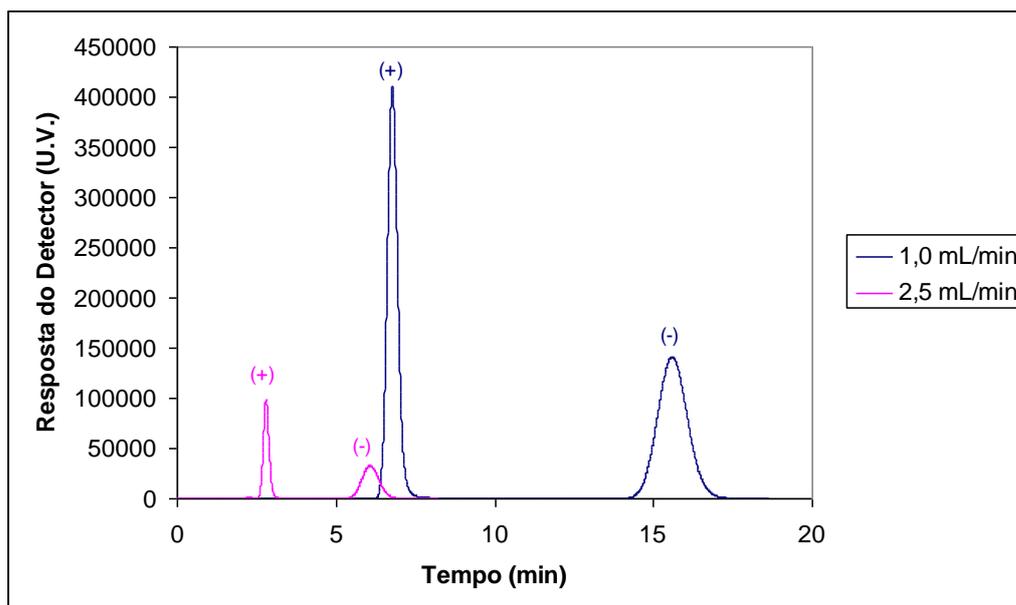


Figura 5 – Separação Cromatográfica de secnidazol em tris-3-5-dimetilfenilcarbamato de amilose a $T=25^{\circ}\text{C}$ e 320 nm. Para 1,0 mL/min: $t_0=5,591$ min, $t_{(+)}=6,907$ min e $t_{(-)}=15,134$ min. Para 2,5 mL/min: $t_0=2,263$ min, $t_{(+)}=2,787$ min e $t_{(-)}=6,061$ min.

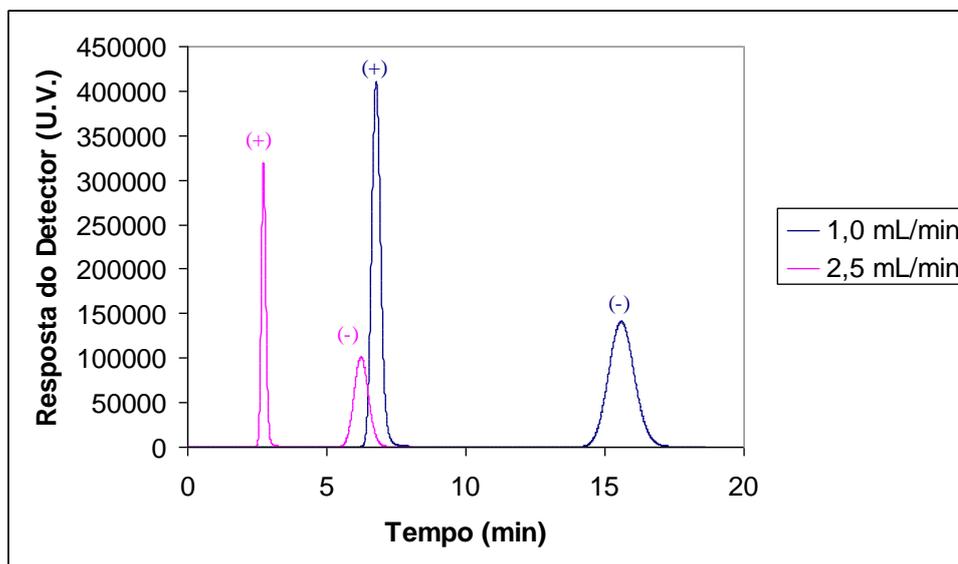


Figura 6 – Separação Cromatográfica de secnidazol em tris-3-5-dimetilfenilcarbamato de amilose a $T=35^{\circ}\text{C}$ e 320 nm. Para 1,0 mL/min: $t_0=5,554$ min, $t_{(+)}=6,768$ min e $t_{(-)}=15,577$ min. Para 2,5 mL/min: $t_0=2,239$ min, $t_{(+)}=2,722$ min e $t_{(-)}=6,226$ min.

4. DISCUSSÕES

Os enantiômeros do secnidazol foram resolvidos com sucesso na coluna Chiralpak AD. Podemos observar que a vazão exerce influência no fator de retenção. À medida que se aumenta a vazão o fator de resolução diminui. Isso se explica pelo fato que quanto maior a vazão menor é o tempo de retenção dos enantiômeros na coluna.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência reportado é simples, rápido, reprodutível e pode ser usado para a resolução enantiomérica do (\pm)-secnidazol. O (+) enantiômero de secnidazol elui primeiro que o (-) enantiômero, o que indica que a estabilidade do complexo envolvendo o (+) isômero é menor que a do (-) isômero. A resolução foi melhor na vazão de 1,0 ml min⁻¹ comparada com a 2,5 mL min⁻¹, e a 35°C comparada com a 25°C.

Polissacarídeos como celulose e amilose são os polímeros disponíveis mais ativos opticamente e são conhecidos por possuírem capacidade de discriminação quiral. Estes são facilmente convertidos em uma variedade de derivados, por exemplo tris-ésteres e tris-carbamatos, pela reação de grupos hidroxilas ativos com reagentes apropriados. Várias fases estacionárias quirais baseadas em celulose e amilose estão disponíveis e tem sido utilizadas para a resolução de enantiômeros de uma vasta variedade de racematos por cromatografia líquida (ABOUL-ENEIN, 2001).

O mecanismo de reconhecimento quiral, em nível molecular, de FEQs baseadas em celulose ainda não é muito claro, tem sido reportado que a resolução quiral por essas FEQs é encontrada como um resultado de diferentes pontes de hidrogênio, interações π - π e interações dipolo-dipolo entre a fase estacionária quiral (FEQ) e os enantiômeros. A estrutura do secnidazol (Figura 1) contém átomos eletronegativos – nitrogênio e oxigênio- e um anel aromático. A resolução dos enantiômeros foi, portanto, realizada devido às diferentes magnitudes destas pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo entre a fase estacionária amilose e os átomos eletronegativos. As interações π - π ocorrem entre a metade fenil substituída da fase estacionária quiral de amilose e o anel aromático do secnidazol

5. CONCLUSÃO

Este estudo reportou a resolução quiral do secnidazol em coluna Chiralpak AD. Os parâmetros cromatográficos obtidos na coluna quiral avaliada demonstraram uma satisfatória separação dos enantiômeros do secnidazol podendo ser utilizada na separação em escala preparativa com condições extremas de vazão de fase móvel, temperatura e concentração. Os efeitos da vazão e da temperatura atuam diretamente na resolução da separação. A resolução dos enantiômeros de secnidazol nesta fase estacionária quiral é governada por pontes de hidrogênio e interações π - π e dipolo-dipolo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, H.Y. & ALI, I. *Enantiomeric Resolution of Some Imidazole Antifungal Agents on Chiralpak WH Chiral Stationary Phase Using HPLC*. Chromatographia Vol. 54, p.200-202, 2001.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; GAITONDE, V.D.; SINGH, P.; RAWAT, M.S.S.; SHARMA, B. *Chiral Separations of Imidazole Antifungal Drugs on Amycoat RP Column in HPLC*. Chromatographia Vol.70, p.223-227, 2009.

ANDERSSON, S.; ALENMARK, S.G.J. *Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery*. J. Biochem. Biophys. Methods Vol.54, p.11-23, 2002.

BACKER, E.; DUBREUIL, L.; BRAUMAN, M.; ACAR, J. & VANEECHOUTTE, M. *In vitro activity of secnidazole against Atopobium vaginae, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis*. Clin. Microbial Infect Vol.16, p.470-472, 2010.

CAPITAN-VALLVEY, L.F.; ARIZA, A.; CHECA, R. & NAVAS, N. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Determination of Six 5-Nitroimidazole in Animal Feedstuff*. Chromatographia, 2007.

DANTUS, M.M. & WELLS, M.L. *Regulatory issues in chromatography analysis in the pharmaceutical industry.* J. Liq.Chrom, & Rel. Techn., Vol 27, p. 1413-1442, 2004.

GILLIS, J.C. & WISEMAN, L.R. *Secnidazole- A Review of its Antimicrobial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in the Management of Protozoal Infections and Bacterial Vaginosis.* Drug Evaluation Vol 51, p. 621-638, 1996.

NÚÑEZ, J.T. & GÓMEZ, G. *Low-dose secnidazole in treatment of bacterial vaginosis.* Int. J. Gynec. And Obstet. Vol 88, p. 281-285, 2005.

ORLANDO, R.M.; FILHO, N.C.; GIL, E.S.; STRINGHETA, J.P.S. *Revista Eletrônica Farmácia, IV,08, 2007.*

SLIM, R.; SALEM, C.B.; ZAMY, M.; FATHALLAH, N.; RAYNAUD, J.J.; BOUROULI, K.; BIOUR, M. *Secnidazole- Induced acute Pancreatitis: A New Side-Effect for na Old Drug?.* J. Pancreas Vol. 11, p.85-86, 2010.