

Maressa Danielli Dolzan

**Estudo da separação cromatográfica quiral do citalopram e  
análogos e o desenvolvimento de uma nova fase estacionária  
baseada em partículas superficialmente porosas modificadas com  
ciclofrutano**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação  
em Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de Doutor  
em Química com ênfase em Química  
Analítica.

Orientador: Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.  
Supervisor: Prof. Daniel W. Armstrong, Dr.

Florianópolis, SC  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dolzan, Maressa Danielli

Estudo da separação cromatográfica quiral do citalopram e análogos e o desenvolvimento de uma nova fase estacionária baseada em partículas superficialmente porosas modificadas com ciclofrutano / Maressa Danielli Dolzan ; orientador, Gustavo Amadeu Micke - Florianópolis, SC, 2016. 126 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. cromatografia líquida de alta eficiência. 3. separações enantioméricas. 4. cromatografia líquida de interação hidrofílica. 5. partículas superficialmente porosas. I. Micke, Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Maressa Danielli Dolzan

**Estudo da separação cromatográfica quiral do citalopram e análogos e o desenvolvimento de uma nova fase estacionária baseada em partículas superficialmente porosas modificadas com ciclofrutano**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutora em Química com ênfase em Química Analítica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 1º de abril de 2016.

---

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.  
Coordenador do Programa

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.  
Orientador  
(DQ-UFSC)

---

Prof. Fernando Gustavo Tonin, Dr.  
Relator  
(FZEA-USP)



---

Profa. Cristiane Luisa Jost, Dra.  
(DQ-UFSC)

---

Prof. Luciano Vitali, Dr.  
(DQ-UFSC)

---

Prof. Luiz Augusto dos Santos Madureira, Dr.  
(DQ-UFSC)

---

Prof. Marcel Piovezan, Dr.  
(IFSC)



Dedico este trabalho ao Juliano  
Vicente e à sua energia maravilhosa.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, e sempre, agradeço a Natureza e Essência de tudo o que existe e é real. Ao Amor e a Paz, Fontes inesgotáveis dentro de nós. ☺ ♡

Agradeço ao sol, ao mar, ao céu, à lua e todas as estrelas, às árvores (que tornaram possível também a impressão deste trabalho), ao vento... por toda a beleza e energia que me impulsiona e dá sentido. Nada seria possível, não fosse esta presença. \*

Agradeço à todos os mestres, por quem a energia e o conhecimento fluem através; gratidão por despertarem a luz para que eu possa perceber tudo – a única coisa – que existe. ✨

Agradeço à todos aqueles que fazem parte de mim e vibram neste momento. Sentimento de gratidão indescritível aos meus pais, Jaime e Dóris, e à minha irmã, Mayra, por me darem a própria vida e serem parte daquilo que sou. Pra vocês, não há palavras. Transbordam o meu Amor! ∞

Agradeço à Lola, por me ensinar tanto sobre Eu mesma, por todo o companheirismo e Amor, e pela atenciosa contribuição com esta tese. Um agradecimento carinhoso ao Fábio, por compartilhar tantos momentos; ao Vicente, pela essência que vejo e me sinto parte; e ao Juliano, por me ensinar sobre a brevidade e eternidade da vida. Às pessoas maravilhosas, verdadeiros presentes da Arte de Viver, Jai Gurudev! ॐ “Amor, Amor, Amor...” 🎵

Gratidão à todos que contribuem para a beleza deste momento! Jacque e Luciano, por todo o auxílio sempre que precisei; Mônia, pelo carinho grandioso; Luiza, por me pegar pelas mãos e me mostrar a luz; Gerson, pelas manhãs incríveis de sorrisos e cuidados. Aos que não nomeio aqui, mas fazem igualmente parte de mim. Gratidão!

Agradeço ao prof. Dr. Daniel W. Armstrong, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos, pela atenção, incentivo e entusiasmo. Pelo ser humano admirável que é! Aprendi que o sucesso só faz sentido quando é insignificante para nós mesmos; quando deixa de ser um objetivo e torna-se apenas uma consequência dos atos que realizamos com integridade e amor. Agradeço à todo o seu grupo, especialmente ao Zach, por tudo que contribuiu, e ao Dr. Al (Alain Berthod), pelo lar incrível, por proporcionar tanto conforto e tornar a vida nos EUA ainda mais agradável. Agradeço imensamente ao prof. Dr. Faruk José Nome

Aguilera, pela confiança em abrir esta porta, e me proporcionar aprendizados incomensuráveis.

Ao professor Gustavo A. Micke, obrigada pela oportunidade e pela orientação ao longo destes seis anos, entre os cursos de mestrado e doutorado. Obrigada pela confiança! Obrigada por quando em mim houve dúvida, você acreditou e incentivou.

Obrigada ao prof. Dr. Fernando G. Tonin por aceitar ser o relator desta tese, e acreditar neste trabalho. Obrigada à banca examinadora, desde já, à profa. Cristiane, ao prof. Luciano, prof. Madureira e ao prof. Marcel, pelo aceite em contribuir para a concretização deste trabalho.

Obrigada à University of Texas at Arlington, ao Programa Ciência sem Fronteiras e ao CNPq, por possibilitarem uma experiência pessoal e profissional transformadora; à CAPES pelo auxílio financeiro; ao Departamento de Química, à UFSC, aos professores e funcionários, ao Governo Federal e todos os cidadãos que me proporcionaram uma formação acadêmica de extrema qualidade. Desejo retribuir com amor, dedicação e competência!

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”*

*Carl G. Jung*



## RESUMO

O principal objetivo desta tese foi explorar a técnica de HPLC na resolução de separações que compreendem dois desafios ainda hoje enfrentados pela Química Analítica: as separações enantioméricas e a separação de compostos altamente polares por cromatografia líquida, com resolução adequada e eficiência máxima. No Capítulo 1 será apresentado o desenvolvimento de métodos individuais para a separação enantiomérica do citalopram (CIT) e 28 novos análogos sintéticos. O desenvolvimento das metodologias para a separação destes racematos, utilizando HPLC em escala analítica, foi realizado utilizando-se 9 fases estacionárias quirais (baseadas em ciclodextrinas e glicopeptídeos macrocíclicos) em modos de fase reversa, polar-orgânico e/ou polar-iônico. Vinte e cinco do total de misturas foram separadas com resolução ( $R_s$ ) de até 2,9 e enantiosseletividade de até 1,33. Um total de 18 separações completas ( $R_s \geq 1,5$ ) e 7 separações parciais ( $0,6 \leq R_s \leq 1,5$ ) foram obtidas. A coluna baseada em vancomicina operada em modo polar-iônico resultou no maior número e na melhor qualidade das separações. As discussões foram fundamentadas na natureza química dos analitos, das fases estacionárias, bem como dos modos cromatográficos empregados. No Capítulo 2 será apresentado o desenvolvimento de uma nova coluna cromatográfica a base de ciclofrutano-6 nativo (CF6) ligado à partículas de sílica superficialmente porosas (SPPs) para aplicação em cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC). As SPPs compreendem o Estado da Arte em materiais de suporte para fases estacionárias utilizadas em HPLC para obtenção de análises rápidas e eficientes. Outras duas colunas cromatográficas similares foram preparadas com partículas de sílica totalmente porosas (FPPs) com diâmetros de 3  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$  (FRULIC-N). A presença de um núcleo sólido no interior destas partículas proporcionou análises extremamente rápidas e eficientes quando comparadas às obtidas pelas FPPs. O processo de síntese das fases estacionárias foi idêntico, e a caracterização das mesmas foi realizada por análise de CHN, a qual permitiu a obtenção do grau de substituição absoluto e relativo, sendo 0,86  $\mu\text{mol m}^{-2}$  e 12,8% (m/m), respectivamente, para a fase estacionária a base de SPPs. Dentre os parâmetros cromatográficos avaliados, incluiu os parâmetros de van Deemter, eficiência de pico, tempo de análise e seletividade. A avaliação de desempenho no modo HILIC demonstrou que a coluna proposta forneceu separações até 85% mais rápidas e eficiências até 3,7 vezes superiores às demais colunas. As colunas foram também avaliadas sob condições de fase normal. Observou-se que, em HILIC, o processo de transferência de massa é influenciado pela camada de água adsorvida na superfície da fase estacionária e, portanto, as vantagens das SPPs sob velocidades de fluxo elevadas, foram pronunciadas em modo fase normal. No entanto, a coluna a base de CF6 ligado a SPPs mostrou nítidas vantagens em termos de eficiência e tempo de análise em ambos os modos cromatográficos avaliados.

**Palavras-chave:** separações enantioméricas; glicopeptídeos macrocíclicos; ciclodextrinas; cromatografia líquida de interação hidrofílica; *core-shell*.



## ABSTRACT

The main goal of this thesis was to explore the HPLC technique for the separation of compounds, comprising two big challenges still faced by the Analytical Chemistry: the enantiomeric separations and the separation of highly polar compounds by liquid chromatography, with suitable resolution and extreme efficiency. In Chapter 1, the development of methods for the separation of the chiral drug Citalopram (CIT) and its twenty eight novel synthetic analogues is presented. The development of the methodologies for the separation of each racemate, using HPLC on analytical scale, was performed using nine chiral stationary phases (cyclodextrin and macrocyclic antibiotics based) on reversed phase, polar-organic and/or polar-ionic mode. Twenty five of the total racemic mixtures were separated with resolution ( $R_s$ ) up to 2,9 and enantioselectivity ( $\alpha$ ) up to 1,33. A total of 18 baseline separations ( $R_s \geq 1,5$ ) and 7 partial separations ( $0,6 \leq R_s \leq 1,5$ ) were achieved. Vancomycin based columns carried on polar ionic mode provided the greatest number the best quality of separations. All discussion were justified by the chemical nature of the analytes, stationary phases, as well as by the employed chromatographic modes. In Chapter 2, the development of a novel chromatographic column using native cyclofructan chemically bonded to superficially porous silica particles (SPPs) for the application in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) will be presented. SPPs comprise the State of Art in support material for HPLC stationary phases for obtaining fast and efficient analyses. Other two similar chromatographic columns were prepared with fully porous silica particles (FPPs) with diameter of 3  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  (FRULIC-N). The presence of a solid core within these particles provided extremely fast and efficient analyses when compared to those obtained by FPPs. The synthetic process of the stationary phases was identical and their characterization was performed by CHN elemental analysis, allowing to obtain the absolute and relative substitution degrees for the new SPPs based column, which were 0,86  $\mu\text{mol m}^{-2}$  and 12,8% (w/w), respectively. Among the evaluated chromatographic parameters, van Deemter parameters, peak efficiency, analysis time and selectivity were included. Performance evaluation in the HILIC mode showed that the proposed column presented separations up to 85% faster and efficiencies up to 3.7 times higher than those obtained by the FPPs based columns. All columns were also evaluated under normal phase conditions. It was observed that, in the HILIC mode, the mass-transfer process is influenced by the adsorbed water layer on the stationary phase and, thus, the SPPs advantages under high flow velocities are pronounced in the normal phase mode. However, the column prepared by cyclofructan-6 chemically bonded to SPPs showed clear advantages in terms of efficiency and analysis time in both the evaluated chromatographic modes.

**Keywords:** enantiomeric separations; macrocyclic glycopeptides; cyclodextrin; hydrophilic interaction liquid chromatography; core-shell.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** A porcentagem (eixo  $y$ ) e o número absoluto (mostrado acima das barras) dos novos fármacos aprovados pela (A) *US Food and Drug Administration* (FDA) de acordo com as suas quiralidades são mostradas para os anos de 2002-2011 e (B) o mesmo é apresentado para as aprovações nos demais países no período de 2001-2010. .... 37
- Figura 1.2** Estrutura química dos isômeros R e S da talidomida e o número de casos de bebês que nasceram com malformação na Alemanha entre os anos 1957 e 1963. As colunas representam a incidência mensal de casos (Botting 2002). .... 40
- Figura 1.3** Representação do modelo de “interação de três pontos” (Tang, Zhang et al. 2012). .... 43
- Figura 1.4** Estruturas químicas propostas para os glicopeptídeos macrocíclicos teicoplanina, teicoplanina aglicona, ristocetina A e vancomicina. Legenda: A-D compreendem os macrocíclicos ou as cavidades de inclusão; grupo R na teicoplanina corresponde, geralmente, ao ácido metil-decanóico (Ward & Farris 2001, Chirobiotic-Handbook 2004). .... 46
- Figura 1.5** Representações da estrutura química das ciclodextrinas (Supelco 2013). .... 50
- Figura 1.6** Estrutura do Citalopram (CIT) e dos 28 racematos analisados por HPLC neste trabalho. .... 56
- Figura 1.7** Influência da A) natureza do sal e das concentrações de B) HOAc e C) TEA utilizados como aditivo em modo polar-iônico, bem como da D) natureza do modificador orgânico em modo de fase reversa. Cromatogramas obtidos para o analito 1 (ver Figura 1.6) na coluna Chirobiotic V2, baseada em vancomicina, e fluxo de fase móvel  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . .... 60
- Figura 1.8** Número total de separações parciais e totais obtidas utilizando HPLC com diferentes CSPs. Nota: “em PI” significa que as separações foram obtidas apenas em modo polar-iônico, enquanto as demais separações foram obtidas em modos PI/PO e RP. As definições das abreviações utilizadas para as fases estacionárias quirais (CSPs) estão apresentadas na sessão Experimental)63
- Figura 1.9** Comparação entre a separação de compostos que apresentam o anel de isobenzofurano aberto (14-17) e fechado (1-4), substituído com hidrogênio ou halogênios (Cl, Br e I). Condições experimentais: A) CSP: Chirobiotic-V2; fase móvel: MeOH/HOAc/TEA 100/0,06/0,06,  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; T  $\sim 23 \text{ }^\circ\text{C}$  e; B)

Cyclobond-I-2000; fase móvel: ACN/MeOH/HOAc/TEA 90/10/0,3/0,2, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C. ....65

**Figura 1.10** Comparação entre a separação de compostos contendo diferentes substituintes no anel isobenzofurano (14-17) utilizando Cyclobond-I-2000 como CSP nos modos A) PO (polar-orgânico) e B) RP (fase reversa). Ilustrações dos fenômenos que ocorrem nos diferentes modos cromatográficos também são apresentadas (Cyclobond-Handbook 2002). Condições experimentais A) fase móvel: ACN/MeOH/HOAc/TEA 90/10/0,3/0,2, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C; B) fase móvel: MeOH/0,1 % TEAA pH 4, 15/85, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C. Nota: TEAA, acetato de trietilamônio. ....66

**Figura 1.11** Comparação entre a separação de compostos contendo diferentes substituintes (1-8) utilizando Chirobiotic-V2 como CSP nos modos A) PI e B) RP. Condições experimentais: A) fase móvel: MeOH/HOAc/TEA 100/0,02/0,03, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C; B) fase móvel: MeOH/0,1% TEAA pH 5, 60/40, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C. Nota, PI e RP correspondem aos modos polar-iônico e fase reversa, respectivamente; TEAA, acetato de trietilamônio. 67

**Figura 1.12** Comparação entre as separações dos compostos 21, 22 e Citalopram (CIT). Condições experimentais: A) CSP: Chirobiotic V2; fase móvel: MeOH/HOAc/TEA 100/0,06/0,06, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C e; B) CSP: Cyclobond-RSP; fase móvel: MeOH/0,1% TEAA pH 5, 25/75, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C. Nota, PI e RP correspondem aos modos polar-iônico e fase reversa, respectivamente; TEAA, acetato de trietilamônio. ....69

**Figura 2.1** Dados obtidos do *Web of Science* para (A) publicação (B) e citação utilizando a palavra-chave *Superficially Porous Particles* (filtro: *high performance liquid chromatography*) durante o período de 2005-2015. .... 77

**Figura 2.2** Imagens de uma partícula de sílica superficialmente porosa. À esquerda, uma ilustração e, à direita, imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). .... 78

**Figura 2.3** Representação esquemática dos caminhos múltiplos em colunas cromatográficas preenchidas com (A) partículas superficialmente porosas (B) e partículas totalmente porosas (Guillarme & Fekete 2013). .... 80

**Figura 2.4** Dados obtidos do *Web of Science* para (A) publicação (B) e citação utilizando a palavra-chave “*hydrophilic interaction liquid chromatography*” durante o período de 1990-2015. .... 83

**Figura 2.5** HILIC como resultado da combinação entre os três principais modos em cromatografia líquida: fase reversa (RP), fase normal (NP) e troca-iônica (IC). .... 84

<b>Figura 2.6</b> Esquema do mecanismo de partição no sistema HILIC (Neue). ....	85
<b>Figura 2.7</b> Estrutura básica dos ciclofrutanos onde $n$ é 1, 2 ou 3, para CF6, CF7 ou CF8, respectivamente. ....	87
<b>Figura 2.8</b> Esquema de síntese das fases estacionárias. ....	91
<b>Figura 2.9</b> Perfis cromatográficos obtidos sob as mesmas condições HILIC por colunas baseadas em FPPs <i>Glantreo</i> 3 $\mu\text{m}$ 204 preparadas utilizando ACN como <i>push solvent</i> e <i>slurry</i> composto por (A) ACN/aquosa de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ e; (B) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80/20. Ordem crescente de eluição: uracil, adenosina, adenina e citosina. Os valores apresentados acima dos picos correspondem ao número de pratos ( $N$ ). ....	98
<b>Figura 2.10</b> Gráficos de van Deemter e os termos $A$ , $B$ e $C$ obtidos para o 1,3-dinitrobenzeno para diferentes colunas cromatográficas. ....	99
<b>Figura 2.11</b> Separação de diferentes compostos em modo HILIC utilizando colunas baseadas em CF6 nativo, ligados a diferentes tipos de partículas de sílica. Os valores apresentados acima dos picos correspondem ao número de pratos ( $N$ ). Condições gerais: dimensões das colunas, 150 mm $\times$ 4,6 mm d.i.; fase móvel composta pelo componente A = ACN e, B = 25 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ ou C = 100 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; 0,75 mL $\text{min}^{-1}$ ; 30 $^\circ\text{C}$ . Condições específicas: A) fase móvel 75/25 ( $V_A/V_B$ ), $\lambda$ 254 nm; B) 85/15 ( $V_A/V_B$ ), $\lambda$ 210 nm; C) 75/25 ( $V_A/V_B$ ), $\lambda$ 280 nm; D) 70/30 ( $V_A/V_C$ ), $\lambda$ 254 nm. 1-4 representam os picos em ordem crescente de eluição. ....	103
<b>Figura 2.12</b> Dependência da eficiência (em termo de <i>HETP</i> ) com o fluxo da fase móvel sob condições HILIC para os compostos e colunas indicadas. Para uma melhor compreensão visual acerca da influência da natureza das partículas, os gráficos D, E e F apresentam apenas os dados obtidos para as colunas preparadas com SPPs e FPPs 3 $\mu\text{m}$ . Condições experimentais: ver Figura 2.11. ...	106
<b>Figura 2.13</b> Dependência do número de pratos por minuto com a velocidade de fluxo da fase móvel (HILIC). Condições experimentais: ver Figura 2.11. ....	109
<b>Figura 2.14</b> Valores de seletividade entre picos adjacentes para todos os analitos apresentados na Figura 2.11. ....	110
<b>Figura 2.15</b> Dependência da eficiência (em termos de <i>HETP</i> ) com o fluxo de fase móvel (fase normal) para os compostos e colunas indicados. Condições: A	

e B) Hep/IPA 98/2,  $\lambda = 280$  nm; C) Hep/EtOH 80/20,  $\lambda = 254$  nm; D)  
Hep/EtOH 0,1% TFA,  $\lambda = 280$  nm. .... 111

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Exemplos de fármacos quirais e atividades biológicas exercidas pelos respectivos enantiômeros puros. ....	41
<b>Tabela 1.2</b> Seletores quirais e principais interações com analitos quirais (Lourenco, Cassiano et al. 2010). ....	45
<b>Tabela 1.3</b> Propriedades físico-químicas dos seletores quirais glicopeptídeos macrocíclicos disponíveis comercialmente (Ward & Farris 2001, Berthod 2009). ....	47
<b>Tabela 1.4</b> Características físico-químicas das ciclodextrinas nativas (Cyclobond-Handbook 2002, Supelco 2013). ....	50
<b>Tabela 1.5</b> Resumo das condições cromatográficas ótimas utilizadas nas separações enantioméricas de 28 análogos do Citalopram. ....	61
<b>Tabela 2.1</b> Relação atual das colunas comerciais para HPLC preparadas com SPPs incluindo as mais recentes SPPs sub-2 µm. ....	74
<b>Tabela 2.2</b> Resultado das análises de CHN e parâmetros físicos das partículas de sílica utilizadas como material de suporte e o grau de substituição de CF6 nas fases estacionárias desenvolvidas. ....	95
<b>Tabela 2.3</b> Efeito da concentração do <i>slurry</i> preparado com proporções idênticas de ACN e NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> aquoso. ....	101



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- A* – Termo da equação de van Deemter que descreve a difusão turbulenta do analito, ou caminhos múltiplos, no interior de um coluna cromatográfica
- ACN – Acetonitrila
- B* – Termo da equação de van Deemter que descreve a difusão longitudinal do analito no interior de um coluna cromatográfica
- C* – Termo da equação de van Deemter que descreve a transferência de massa do analito na coluna cromatográfica
- cAMP – Adenosina 2',3'-monofosfato cíclico
- cCMP – Citidina 2',3'-monofosfato cíclico
- CDs – Ciclodextrinas
- CF – Ciclofrutano
- CF-6 – Ciclofrutano com seis unidades de D-frutofuranose
- CF-7 – Ciclofrutano com sete unidades de D-frutofuranose
- CF-8 – Ciclofrutano com oito unidades de D-frutofuranose
- CFTase – Enzima cicloinulo-oligossacarídeo frutanotransferase
- cGMP – Guanosina 2',3'-monofosfato cíclico
- Chirobiotic-R (Chiro-R) – Coluna cromatográfica comercial a base de ristocetina-A
- Chirobiotic-T (Chiro-T) – Coluna cromatográfica comercial a base de teicoplanina
- Chirobiotic-TAG (Chiro-TAG) – Coluna cromatográfica comercial a base de teicoplanina aglicona
- Chirobiotic-V (Chiro-V) – Coluna cromatográfica comercial a base de vancomicina com menor grau de substituição
- Chirobiotic-V2 (Chiro-V2) – Coluna cromatográfica comercial a base de vancomicina com maior grau de substituição
- CHN – Técnica elementar de carbono, hidrogênio de nitrogênio
- CIT – Citalopram ou 1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-carbonitrila
- $C_m$  – Termo que descreve a transferência de massa do analito no seio da fase móvel
- $C_s$  – Termo que descreve a transferência de massa do analito na fase estacionária
- $C_{sm}$  – Termo que descreve a transferência de massa do analito na fase pseudo-estacionária de fase móvel
- CSPs – Fases estacionárias quirais (do inglês, *chiral stationary phases*)
- cTMP – Timidina 3',5'-monofosfato cíclico
- Cyclobond-AC ( $\beta$ -CD-AC) – Coluna cromatográfica comercial a base de  $\beta$ -CD acetilada
- Cyclobond-DMP ( $\beta$ -CD-DMP) – Coluna cromatográfica comercial a base do derivado dimetilfenil carbamato de  $\beta$ -CD
- Cyclobond-I-2000 – Coluna cromatográfica comercial a base de  $\beta$ -CD nativa

Cyclobond-RSP ( $\beta$ -CD-RSP) – Coluna cromatográfica comercial a base do derivado R,S-hidroxipropil éter de  $\beta$ -CD

$d_{\text{CHCl}_3}$  – Densidade do clorofórmio

DCIT – Desmetilcitalopram

DDCIT – Didesmetilcitalopram

$d_{\text{MeOH}}$  – Densidade do MeOH

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DOPA – 3,4-dihidroxifenilalanina

$d_p$  – Diâmetro total da partícula

d90/d10 – Razão utilizada como parâmetro para avaliar a qualidade de distribuição dos tamanhos das partículas. d90 corresponde ao diâmetro no qual 90% das partículas possuem diâmetro inferior e d10, ao diâmetro no qual 10% das partículas possuem diâmetro inferior

EtOH – Etanol

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

FPPs – Partículas totalmente porosas (do inglês, *fully porous particles*)

FRULIC-N – Coluna cromatográfica comercial a base de ciclofrutano-6 nativo

$h$  – Altura reduzida equivalente a um prato teórico

Hep – Heptano

*HETP* – Altura equivalente à um prato teórico (do inglês, *height equivalent to a theoretical plate*)

*HETP*<sub>min</sub> – Valor mínimo de *HETP*

HILIC – Cromatografia líquida de interação hidrofílica (do inglês, *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HOAc – Ácido acético glacial

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

IC – Cromatografia de troca iônica (do inglês, *ion exchange chromatography*)

IPA – Isopropanol (do inglês, *isopropyl alcohol*)

$k'$  – Fator de retenção

$k'_1$  – Fator de retenção referente ao primeiro pico cromatográfico

$k'_n$  – Fator de retenção referente ao último cromatográfico

LARIHC-P – Coluna cromatográfica comercial a base do derivado isopropílico de ciclofrutano-6

LARIHC-RN – Coluna cromatográfica comercial a base do derivado R-naftílico de ciclofrutano-6

MCI-2554 – Cepa do *Bacillus circulans*

MeOH – Metanol

m/m – Razão massa/massa

$n$  – Capacidade de pico

$N$  – Número de pratos

NH<sub>4</sub>OAc – Acetato de amônio

NP – Fase normal (do inglês, *normal phase*)  
OKUMZ31B – Cepa do *Bacillus circulans*  
PI – Modo cromatográfico polar-iônico  
PO – Modo cromatográfico polar-orgânico  
R-NOBIN - (R)-(+)-2'-amino-1,1'-binaftalen-2-ol  
RP – Fase reversa (do inglês, *reversed phase*)  
 $R_s$  – Resolução  
SPPs – Partículas superficialmente porosas (do inglês, *superficially porous particles*)  
*t*-BOC – *t*-butoxicarbonil  
TEA – Trietilamina  
TEAA – Tampão formado por ácido acético e trietilamina (ácido acético/acetato de trietilamônio)  
TEM – Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, *transmission electron microscopy*)  
TFA – Ácido trifluoracético (do inglês, *trifluoroacetic acid*)  
UPLC – Cromatografia líquida de ultra performance (do inglês, *ultra performance liquid chromatography*)  
UTA – Universidade do Texas em Arlington (do inglês, *University of Texas at Arlington*)  
UV – Ultravioleta  
 $v$  – Velocidade da fase móvel  
 $v/v$  – Razão volume/volume  
ZIC-HILIC – Coluna cromatográfica comercial a base de sulfobetaina  
1,3-DNB – 1,4-dinitrobenzeno  
 $\alpha$  – Seletividade ou enantioseletividade  
 $\alpha$ -CD – Ciclodextrina com seis unidades de glicose  
 $\beta$ -CD – Ciclodextrina com sete unidades de glicose  
 $\gamma$ -CD – Ciclodextrina com oito unidades de glicose  
 $\rho$  - Razão entre o diâmetro do núcleo sólido e o diâmetro total de uma SPP



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>35</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>35</b>
<b>1. Revisão bibliográfica .....</b>	<b>36</b>
<b>1.1 A estereoseletividade da vida e a quiralidade dos fármacos .....</b>	<b>36</b>
<b>1.2 Métodos analíticos para a separação de enantiômeros .....</b>	<b>42</b>
<i>1.2.1 Fases estacionárias quirais para HPLC.....</i>	<i>44</i>
<i>1.2.1.1 CSPs a base de glicopeptídeos macrocíclicos .....</i>	<i>45</i>
<i>1.2.1.2 CSPs a base de ciclodextrinas .....</i>	<i>49</i>
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>53</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>53</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>53</b>
<b>3 Experimental .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1 Materiais .....</b>	<b>54</b>
<b>3.2 Instrumentação .....</b>	<b>54</b>
<b>3.3 Analitos.....</b>	<b>55</b>
<b>4 Resultados e Discussão .....</b>	<b>58</b>
<b>5 Conclusões .....</b>	<b>70</b>
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>71</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>71</b>
<b>1 Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>72</b>
<b>1.1 Partículas superficialmente porosas: o Estado da Arte em material de suporte para colunas de HPLC .....</b>	<b>72</b>
<i>1.1.1 Morfologia das SPPs e o aumento da eficiência do sinal analítico .....</i>	<i>78</i>
<b>1.2 Cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC).....</b>	<b>82</b>
<b>1.3 Ciclofrutanos (CFs).....</b>	<b>86</b>
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>89</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>89</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>89</b>
<b>3 Experimental .....</b>	<b>90</b>
<b>3.1 Materiais .....</b>	<b>90</b>
<b>3.2 Síntese das fases estacionárias .....</b>	<b>90</b>

<b>3.3 Instrumentação .....</b>	<b>91</b>
<b>3.3.1 Obtenção das colunas cromatográficas .....</b>	<b>91</b>
<b>3.3.2 Avaliação de desempenho .....</b>	<b>93</b>
<b>4 Resultados e Discussões.....</b>	<b>94</b>
<b>4.1 Preparo das fases estacionárias .....</b>	<b>94</b>
<b>4.2 Obtenção das colunas cromatográficas .....</b>	<b>96</b>
<b>4.3 Avaliação do desempenho cromatográfico das colunas otimizadas .....</b>	<b>103</b>
<i>4.3.1 Avaliação de desempenho das colunas em modo HILIC.....</i>	<b>103</b>
<i>4.3.2 Avaliação das colunas cromatográficas em condições de fase normal .....</i>	<b>111</b>
<b>5 Conclusões .....</b>	<b>113</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>116</b>

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As técnicas analíticas de separação desempenham papéis fundamentais em diversas áreas da ciência, incluindo os ramos da química, engenharias, ciências médicas e farmacêuticas. Abrangem desde o acompanhamento de reações e desenvolvimento de novos materiais, até a compreensão metabólica de compostos em diferentes organismos, análises forenses e controle de qualidade de produtos (Pieters, Dejaegher et al. 2010, Dolzan, Spudeit et al. 2013, Baciú, Botello et al. 2015, Guo, Dolzan et al. 2015, Vistuba, Dolzan et al. 2015).

Os mecanismos envolvidos nos processos de separação devem ser compreendidos e planejados de acordo com a natureza físico-química dos analitos, cujas características podem acarretar misturas altamente complexas, de difícil separação. Essa complexidade junto a diversidade de compostos e novos materiais em desenvolvimento, exige que o avanço das técnicas e métodos de separação química seja foco constante de pesquisas, de modo a atender as necessidades de maneira ampla e eficiente.

Uma vez que a separação de componentes de uma mistura só é possível devido as diferenças estruturais entre os analitos, as suas similaridades podem tornar o procedimento bastante desafiador. Nestes termos, as misturas enantioméricas podem ser descritas como os sistemas de maior dificuldade de separação. O interesse em separações dessa natureza é decorrente, principalmente, da relação entre isomeria e bioatividade dos enantiômeros junto às dificuldades em se estabelecer sínteses orgânicas assimétricas, ou enantiosseletivas (McConathy & Owens 2003, Nguyen, He et al. 2006). Atualmente, a quiralidade dos compostos é considerada um dos principais focos no planejamento, desenvolvimento, e comercialização de novos medicamentos (Nguyen, He et al. 2006).

Por muitos anos a farmacopeia foi descrita para racematos, entretanto, após a “tragédia da talidomida”, no início dos anos 1960, iniciou-se uma busca incessante pela segurança dos tratamentos que utilizam medicamentos alopáticos estereoisoméricos. De forma dramática, foi descoberto que frequentemente a atividade biológica de racematos reside em um único enantiômero, enquanto o outro pode apresentar-se, não apenas inativo, mas tóxico (Brown & Davies 1989, Sarfati 1998, Nguyen, He et al. 2006).

Com o aparecimento de novas tecnologias que permitiram o isolamento de enantiômeros em quantidades substanciais e,

principalmente, após a declaração da política da FDA (Agência reguladora dos EUA, *US Food and Drug Administration*) para formulações estereoisoméricas, em 1992, iniciou-se a era dos fármacos enantiomericamente puros (FDA 1992, Gellad, Choi et al. 2014).

O Citalopram (CIT) é um exemplo de um fármaco quiral, originalmente comercializado na forma racêmica, que logo após a política da FDA, tornou-se disponível, também, na forma enantiomericamente pura (S-CIT). O enantiômero de conformação R, neste caso, não apresenta qualquer atividade tóxica, no entanto a atividade farmacológica desejada foi atribuída, majoritariamente, ao enantiômero de conformação S (Gellad, Choi et al. 2014). Devido a eficácia do CIT e ampla atividade contra distúrbios patológicos de natureza comportamental, como depressão severa, ansiedade e síndrome do pânico, novos compostos com estruturas químicas semelhantes são de interesse da pesquisa farmacêutica (Mandrioli, Fanali et al. 2003). Algumas metodologias são reportadas para a separação dos enantiômeros do CIT bem dos seus metabólitos, desmetilcitalopram (DCIT) e didesmetilcitalopram (DDCIT) (Kosel, Eap et al. 1998), entretanto diversos novos análogos racêmicos foram sintetizados e os seus enantiômeros devem ser adequadamente separados para garantir a confiabilidade dos estudos farmacológicos.

Historicamente e ainda hoje, a técnica mais bem estabelecida para a separação de misturas enantioméricas é HPLC utilizando fases estacionárias quirais (CSPs), ou, simplesmente, HPLC quiral (Ward & Ward 2010). A técnica de HPLC quiral em escala preparativa apresenta, ainda, a vantagem de permitir a obtenção dos produtos enantiomericamente puros (Meyer 1987, Kusters 1996, Smuts, Na et al. 2014). As ciclodextrinas (CDs) correspondem a classe mais antiga de CSPs, introduzida pelo grupo de pesquisa do professor Daniel W. Armstrong, em 1984 (Armstrong & Demond 1984). Dez anos mais tarde, o mesmo grupo introduziria também os glicopeptídeos macrocíclicos (Armstrong, Tang et al. 1994). Atualmente, estas apresentam-se entre as principais classes de CSPs disponíveis comercialmente (Lourenco, Cassiano et al. 2010). Dada a ampla diversidade e aplicabilidade, a técnica de HPLC e nove CSPs a base de glicopeptídeos macrocíclicos e CDs foram selecionadas para o desenvolvimento de métodos analíticos para separação do CIT e vinte e oito análogos racêmicos de interesse farmacológico (Capítulo 1).

Em 2009, o grupo de pesquisa do professor Armstrong desenvolveu a mais recente classe de CSPs comerciais, as quais são

baseadas em macrocíclicos ciclofrutanos (CFs), pertencentes à classe dos oligossacarídeos (Sun, Wang et al. 2009).

Além das separações enantioméricas, compostos a base de CFs, principalmente CF nativo, têm sido empregados como fases estacionárias polares para aplicação em HILIC (Padivitage & Armstrong 2011, Qiu, Loukotkova et al. 2011), a qual também apresenta-se bastante recente quando comparada aos tradicionais modos de operação em HPLC. De maneira similar a origem da HPLC quiral, que surgiu para tornar possível a resolução de misturas racêmicas, a HILIC, foi introduzida em 1990 para resolver separações de compostos altamente polares, que até então não eram possíveis nos modos de fase reversa (RP), fase normal (NP) ou em cromatografia de troca iônica (IC) (Pesek, Matyska et al. 2011, Buszewski & Noga 2012).

Experimentalmente, o modo HILIC consiste na utilização de uma fase estacionária com característica polar, como ocorre em NP, e fase móvel aquosa-orgânica, como utilizada em RP. Para a garantia de um mecanismo HILIC, porém, é necessária a utilização de acetonitrila (ACN) como modificador orgânico em concentrações geralmente entre 50 e 95% (Pesek, Matyska et al. 2011). A técnica é aplicada para uma gama de compostos de diferentes naturezas: analitos orgânicos, inorgânicos, neutros ou ionizados, com interesses nas mais diversas áreas do conhecimento, destacando-se, as ciências biológicas e farmacêuticas (Liu, Chen et al. 2008, Jandera 2011).

Além de ampliar as aplicações da técnica de HPLC com o desenvolvimento de novos modos cromatográficos, muitas pesquisas estão sendo realizadas em busca de metodologias mais rápidas e eficientes. Com esta perspectiva, destaca-se atualmente a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com a utilização de colunas cromatográficas preparadas com partículas de sílica tradicionais (FPPs) de sub-2  $\mu\text{m}$  (diâmetro,  $d_p$ ). A desvantagem da técnica, no entanto, é a necessidade de um equipamento diferenciado, o qual deve suportar pressões elevadas de até 600 bar (Pieters, Dejaegher et al. 2010, Walter & Andrews 2014). Uma alternativa é a utilização SPPs de sílica, que são capazes de fornecer eficiências cromatográficas similares e até superiores às fases estacionárias preparadas com FPPs sub-2  $\mu\text{m}$ , com a vantagem de utilizar equipamentos tradicionais de HPLC (DeStefano, Langlois et al. 2008, Wang, Barber et al. 2012).

As SPPs compreendem o Estado da Arte em material de suporte para colunas de HPLC (Bell & Majors 2015). O procedimento de preparo dessas colunas, no entanto, é extremamente desafiador (Blue &

Jorgenson 2015). Quando obtidas colunas cromatográficas preenchidas adequadamente, a morfologia dessas partículas favorece o aumento da eficiência do sinal analítico a partir da diminuição dos termos  $A$ ,  $B$  e  $C$  descritos na equação de van Deemter, os quais descrevem a contribuição dos caminhos múltiplos, da difusão longitudinal e do processo de transferência de massa, no alargamento dos picos cromatográficos (Hayes, Ahmed et al. 2014). Outros fatores também afetam a eficiência cromatográfica, dentre eles, os modos cromatográficos e os mecanismos de separação dos analitos (Gritti & Guiochon 2007, Gritti & Guiochon 2007, Gritti, Kazakevich et al. 2007, DeStefano, Langlois et al. 2008, McCalley 2008, Gritti, Bell et al. 2014).

Estudos que relacionam o desempenho das SPPs sob diferentes condições cromatográficas são escassos. Os trabalhos reportados na literatura apresentam, na sua maioria, sistemas em modo RP utilizando colunas C18, as quais correspondem as principais colunas a base de SPPs disponíveis comercialmente (Gritti, Leonardis et al. 2010, Kirkland J. J. 2013, Fekete, Guillarme et al. 2014, Bell & Majors 2015). Por outro lado, as colunas SPPs-HILIC são, geralmente, baseadas em sílica não modificada, apresentando desempenho cromatográfico limitado e comportamento característico quando comparadas a outros seletores de estrutura química mais elaborada, como os CFs, o que impossibilita a extrapolação das constatações para outros sistemas cromatográficos (Heaton & McCalley 2014). Dessa forma, o desenvolvimento de novas fases estacionárias para aplicação em HILIC preparadas com SPPs se faz necessário, não apenas como uma alternativa às colunas atualmente disponíveis, mas do ponto de vista analítico, também para a compreensão do comportamento dessas partículas em sistemas que apresentam características distintas. Sob estas perspectivas e devido ao extraordinário desempenho apresentado pela coluna comercial FRULIC-N (baseada em CF nativo ligado à FPPs de sílica) (Padivitage, Dissanayake et al. 2013, Shu, Lang et al. 2015), o mesmo seletor foi escolhido neste trabalho para o desenvolvimento de uma nova fase estacionária HILIC preparada com SPPs (Capítulo 2).

O desenvolvimento desta tese ocorreu em colaboração com o grupo de pesquisa do professor Daniel W. Armstrong na *University of Texas at Arlington* (UTA), nos EUA, onde e permaneci pelo período de um ano, referente ao doutorado sanduíche realizado pelo Programa Ciência Sem Fronteiras.

Tudo o que foi descrito e que será apresentado ao longo desta tese, demonstra o poder das colaborações e trocas de conhecimento entre pesquisadores, estudantes e demais interessados, sobre o avanço da

ciência. Demonstra, principalmente, que cada grupo de pesquisa e cada ser é parte indissociável de um grande grupo, de um todo, movido por um único e imenso objetivo que é contribuir, *com-sciência*, para um mundo cada vez melhor para todos.



# Capítulo 1

## **Separação enantiomérica de análogos do Citalopram utilizando a técnica de HPLC com fases estacionárias quirais baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos e ciclodextrinas**

### **Resumo**

Este capítulo descreve a separação de vinte e oito misturas racêmicas de análogos do citalopram utilizando a técnica de HPLC quiral. Devido a efetividade do citalopram como agente antidepressivo, e ação contra outros distúrbios comportamentais patogênicos, surgiu o interesse em desenvolver novos compostos inspirados na sua estrutura química. A separação enantiomérica desses compostos é fundamental para o desenvolvimento de estudos farmacológicos e consequente compreensão das suas (in)atividades biológicas e toxicidade. O total de nove fases estacionárias quirais baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos e ciclodextrinas (nativa e derivatizadas) foram avaliadas de acordo com a sua habilidade em separar esta série de compostos por HPLC em escala analítica. Os modos de fase reversa, polar-orgânico e polar-iônico, foram testados. Vinte e cinco do total de misturas racêmicas foram separadas  $R_s$  e  $\alpha$  de até 2,9 e 1,33, respectivamente. Um total de dezoito separações completas ( $R_s > 1,5$ ) foram obtidas, enquanto que sete pares de enantiômeros foram separados parcialmente. Colunas baseadas em vancomicina e operadas em modo polar-iônico resultaram no maior número de separações, apresentando-se uma excelente alternativa para futuros procedimentos em escala preparativa. Todas as discussões deste trabalho foram fundamentadas em observações acerca das estruturas químicas dos compostos avaliados, bem como dos seletores quirais e modos cromatográficos utilizados.

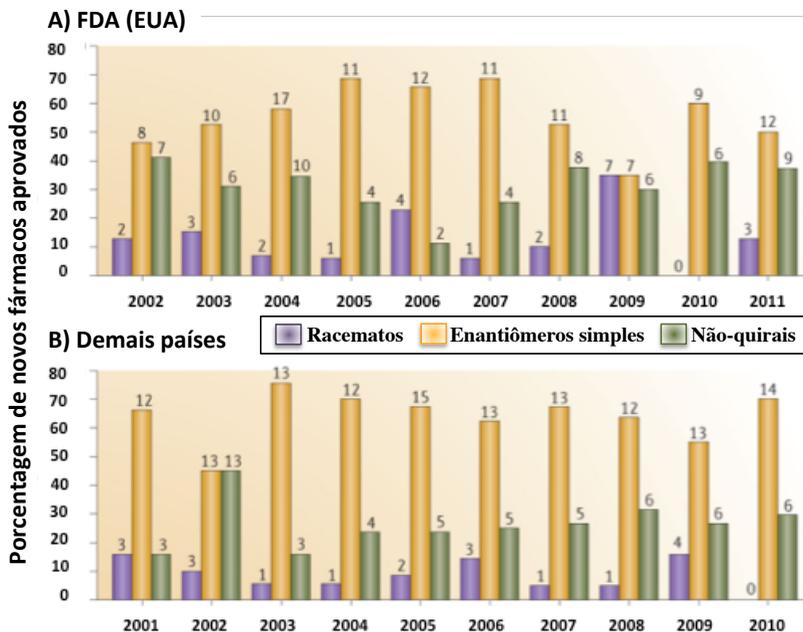
## 1. Revisão bibliográfica

### *1.1 A estereoseletividade da vida e a quiralidade dos fármacos*

Dentre os mistérios que envolvem a origem da vida e a perfeição bioquímica, o fenômeno da "homoquiralidade" é, particularmente, fascinante (Rodrigues 2010). As macrobiomoléculas tendem a ser homoquirais, o que implica serem construídas a partir de unidades de mesma quiralidade: a dupla-hélice do DNA, por exemplo, rotaciona sempre para o lado direito, ou sentido horário (Sarfati 1998). Os aminoácidos proteinogênicos e, conseqüentemente, as proteínas, presentes em eucariotos, possuem a configuração L, enquanto que seu enantiômero D é necessário para formar as paredes das células das bactérias. Outro exemplo de biomoléculas homoquirais são os açúcares, os quais estão presentes sempre na forma D-sacarídeo, e formando os ribonucleosídeos, fornecem a homoquiralidade também à molécula de RNA (Rodrigues 2010). Apesar da razão para essa assimetria da vida permanecer incompreendida, o fenômeno da homoquiralidade, ou quiralidade em si, implica na natureza estereosseletiva das interações bioquímicas (Sarfati 1998). É incontestável que a ação de xenobióticos quirais, inclusive fármacos, que é o foco deste trabalho, depende de uma estrutura tridimensional que permita o reconhecimento deste pela biomolécula-alvo.

A Figura 1.1 apresenta um gráfico informativo dos novos medicamentos aprovados pela FDA, agência reguladora dos Estados Unidos, e nos demais países, em cada ano ao longo de uma década (Agranat, Wainschtein et al. 2012).

**Figura 1.1** A porcentagem (eixo *y*) e o número absoluto (mostrado acima das barras) dos novos fármacos aprovados pela (A) *US Food and Drug Administration* (FDA) de acordo com as suas quiralidades são mostradas para os anos de 2002-2011 e (B) o mesmo é apresentado para as aprovações nos demais países no período de 2001-2010.



[Fonte: *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, 11:972-973]. (Agranat, Wainschtein et al. 2012)

Como pode ser observado, os fármacos aprovados são apresentados de acordo com a sua quiralidade, e os dados evidenciam o desenvolvimento majoritário, não apenas de compostos quirais, mas de produtos enantiomericamente puros, tendência que decorre do fato de enantiômeros de um mesmo fármaco quiral serem discriminados pelo organismo em todos os processos farmacocinéticos envolvidos, desde a absorção até a eliminação (Lima 1997).

A biodisponibilidade, taxa de metabolismo, natureza e ação dos metabólitos, potencial e seletividade para receptores, transportadores e/ou enzimas, e toxicidade, podem diferenciar significativamente entre enantiômeros de um mesmo fármaco. Por exemplo, em alguns casos, um enantiômero pode ser responsável pelos efeitos terapêuticos (eutômero) enquanto o outro pode apresentar-se inativo ou tóxico (distômero). Há

ainda a possibilidade de um enantiômero diminuir ou potencializar o efeito do outro e, ainda, de serem ambos ativos em proporções bastante distintas ou similares. Este último caso é bastante raro, uma vez que, como descrito anteriormente, espera-se que os receptores e as enzimas atuem seletivamente frente a diferentes arranjos espaciais (Lima 1997). Em todos os casos é fundamental que, nas diversas etapas de desenvolvimento de um fármaco, cada enantiômero seja avaliado individualmente, bem como em sua forma racêmica. Quando um dos enantiômeros apresenta-se inativo, é preciso atentar as diferentes dosagens se disponibilizado na forma pura e/ou racêmica e, ainda, aos efeitos colaterais advindos de cada enantiômero. Quando um dos enantiômeros apresentar efeitos adversos, obviamente, deve-se garantir a pureza do enantiômero farmacologicamente ativo. A utilização de enantiômeros simples, de maneira geral, pode permitir um perfil farmacológico mais simples e seletivo, e, ainda, diminuir as interações medicamentosas, no entanto, é importante considerar a viabilidade econômica dos processos de desenvolvimento, de forma a garantir, além da segurança, a acessibilidade do medicamento por qualquer ser humano que necessita do mesmo. Este deveria ser um dos principais propósitos das diversas áreas de pesquisa que atuam no desenvolvimento de fármacos.

Atualmente, não existe uma regulamentação para que novos medicamentos sejam desenvolvidos exclusivamente como enantiômeros simples. Em 1992 (atualizada em 2011), a FDA declarou uma política em relação aos fármacos quirais, que permite ao próprio desenvolvedor a decisão sobre uma formulação racêmica ou pura. No entanto, a escolha por uma formulação racêmica deve ser justificada (FDA 1992, Gellad, Choi et al. 2014). Após o posicionamento da FDA, houve um crescimento da busca por fármacos enantiomericamente puros, que é demonstrado pelo número cada vez maior de trabalhos publicados nas mais diversas áreas relacionadas como a farmacodinâmica, a farmacocinética, a síntese assimétrica e o desenvolvimento de métodos analíticos (Lima 1997). Os gráficos apresentados na Figura 1.1 também ilustram essa tendência. No entanto, devido à inviabilidade econômica causada principalmente pelas dificuldades em obter sínteses assimétricas, a maioria permanece comercializada na forma de racematos.

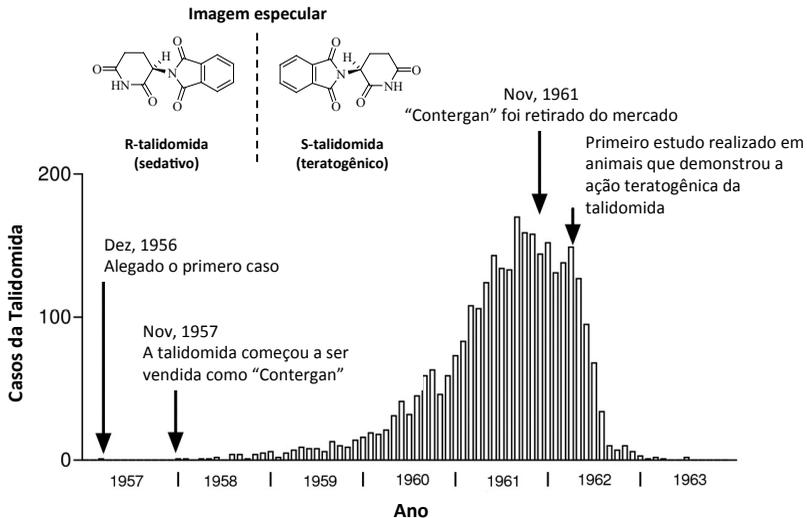
Em 2014, Gellad e colaboradores publicaram um artigo crítico acerca da questão que envolve a recente tendência na utilização de medicamentos baseados em enantiômeros simples e, mais especificamente, sobre a denominada *Chiral Switch*, que ocorre no

mercado farmacêutico quando um fármaco já comercializado na forma racêmica é substituído pelo eutômero puro (essa está frequentemente associada à uma expiração de patente) (Nguyen, He et al. 2006, Gellad, Choi et al. 2014). Entre os anos de 2001 e 2011, por exemplo, a FDA aprovou nove fármacos enantiomericamente puros, os quais eram anteriormente comercializados na forma racêmica. Os custos envolvidos neste período ultrapassaram o valor de 6 bilhões de dólares, tendo sido 85% destinado apenas aos novos Esomeprazol e Escitalopram, ou S-omeprazol e S-citalopram, aprovados em 2001 e 2002, respectivamente. Após a aprovação destes dois novos fármacos, foi observado um novo perfil mercadológico, em que o número de receitas médicas para a formulação enantiomericamente pura ultrapassou substancialmente às prescrições que indicavam a formulação racêmica (Gellad, Choi et al. 2014). A questão abordada por Gellad e colaboradores, é de que não há evidências sobre os malefícios da utilização destes fármacos racêmicos, omeprazol e CIT, e tampouco sobre uma possível diminuição das atividades dos respectivos S-enantiômeros, o que sugere uma reflexão sobre o(s) propósito(s) da indústria farmacêutica com a *Chiral Switch*. Por exemplo, uma revisão sistemática realizada pela *Cochrane* (Cochrane.org) sobre a eficácia do Escitalopram em relação a sua forma racêmica mostrou que, dentre os seis estudos avaliados, três demonstraram vantagens estatisticamente significativas do Escitalopram no resultado primário da resposta ao tratamento (Gellad, Choi et al. 2014). Outros estudos atribuíram este mesmo resultado à uma possível inibição do enantiômero ativo pelo R-enantiômero quando a formulação racêmica é testada (Jacquot, David et al. 2007). No entanto, muitos destes estudos foram financiados por empresas farmacêuticas e, portanto, Gellad e colaboradores atentam para uma potencial “superestimação do efeito do tratamento devido a parcialidade do patrocínio” (Gellad, Choi et al. 2014).

Por outro lado, há muitos exemplos em que o desenvolvimento de uma formulação enantiomericamente pura e a substituição do fármaco racêmico já comercializado pelo seu enantiômero simples, foi fundamental para garantir a eficácia e, principalmente, a segurança do tratamento. Entre o final dos anos 1950 e início dos anos 1960, a comercialização da talidomida racêmica e a ingestão por gestantes resultou no nascimento de milhares de crianças com malformação, além dos natimortos (Botting 2002, Leandro & Santos 2015). A Figura 1.2 apresenta a estrutura química da talidomida e um gráfico com a incidência dos casos de bebês que nasceram com malformação devido a

atividade teratogênica do enantiômero de conformação S, na Alemanha, país onde foi desenvolvido o fármaco (Botting 2002).

**Figura 1.2** Estrutura química dos isômeros R e S da talidomida e o número de casos de bebês que nasceram com malformação na Alemanha entre os anos 1957 e 1963. As colunas representam a incidência mensal de casos (Botting 2002).



Como pode ser visto, cerca de um ano após a retirada da talidomida racêmica do mercado alemão, a incidência dos casos decaiu abruptamente. No Brasil, as primeiras notícias acerca dos malefícios da droga ocorreram tardiamente, apenas três meses após divulgação na imprensa alemã e inglesa (Leandro & Santos 2015). Na mesma época foram reportados os primeiros resultados científicos comprovando a ação teratogênica da talidomida que seria, mais tarde, atribuída ao S-enantiômero (Barreiro, Ferreira et al. 1997). A partir de então, iniciou-se um novo processo de desenvolvimento de fármacos quirais, atentando-se não apenas à atividade do eutômero, mas ao comportamento biológico e aos efeitos causados pelo segundo enantiômero. Outro exemplo, dentre os inúmeros que podem ser citados, é o fármaco DOPA (3,4-dihidroxi-fenilalanina), utilizado para o tratamento do Parkinson, e atualmente comercializado apenas sob a forma enantiomericamente pura, L-dopa ou Levodopa. Enquanto a sua forma racêmica causou efeitos adversos significativos ao paciente, a substituição pelo

enantiômero simples reduziu estes efeitos e permitiu ainda a utilização de uma dose mais elevada do fármaco ativo (Gellad, Choi et al. 2014). A Tabela 1.1 apresenta a relação de alguns fármacos e as atividades dos seus respectivos enantiômeros (Lima 1997, Jacquot, David et al. 2007, Gellad, Choi et al. 2014).

**Tabela 1.1** Exemplos de fármacos quirais e atividades biológicas exercidas pelos respectivos enantiômeros puros.

<b>Fármaco</b>	<b>Ação</b>
Etambutol <sup>a</sup>	SS: tuberculostático RR: pode provocar cegueira
Penicilamina	S: anti-artrítico R: extremamente tóxico
Bupivacaína	Ambos os isômeros possuem atividade anestésica local, mas apenas o R-enantiômero apresenta ação vasoconstritora, capaz de prolongar a ação anestésica local
Clorfeniramina	A atividade histamínica é atribuída essencialmente a configuração S
Salbutamol	R-enantiômero é 80 vezes mais ativo que a configuração S
Omeprazol	Maior biodisponibilidade oral apresentada pelo S-omeprazol e atividade superior a apresentada pelo R-enantiômero
Citalopram	A ação antidepressiva do S-citalopram é 30-40 vezes superior a ação do enantiômero R-

As informações apresentadas na Tabela 1.1, e a “tragédia da talidomida” por si só, evidenciam a necessidade de estudos aprofundados acerca dos efeitos biológicos causados por cada enantiômero presente em uma mistura farmacológica racêmica. Essa necessidade se dá tanto para fármacos racêmicos já comercializados, quanto nos processos de desenvolvimento de novos fármacos. Quando a segurança do uso de ambos os enantiômeros e a eficácia do tratamento é assegurada, é importante considerar a viabilidade econômica de cada processo de produção, garantindo a acessibilidade pelo paciente, que deve ser respeitado como um ser humano que necessita destes conhecimentos e cuidados, e não apenas como a fonte que mantém o mercado farmacêutico.

Recentemente a empresa farmacêutica dinamarquesa Lundbeck, a qual atua com pesquisa e desenvolvimento, produção e comercialização de medicamentos, vem realizando pesquisas na busca por novas alternativas para o tratamento de distúrbios comportamentais. Para isso, uma série de novos compostos foi desenvolvida a partir da estrutura química do CIT, o qual é largamente utilizado de maneira

aparentemente segura e eficaz no tratamento contra depressão severa, ansiedade, síndrome do pânico e distúrbio obsessivo-compulsivo (Mandrioli, Fanali et al. 2003). Como descrito anteriormente, o CIT foi originalmente disponível na sua forma racêmica, no entanto, devido ao seu efeito farmacológico ser atribuído principalmente ao enantiômero de conformação S, a formulação enantiomericamente pura já é disponível comercialmente (Mandrioli, Fanali et al. 2003, Gellad, Choi et al. 2014). Devido a dificuldade em obter rotas sintéticas assimétricas, todos os produtos desenvolvidos pela empresa apresentam-se na sua forma racêmica. No entanto, para garantir a eficácia e segurança dos novos compostos, os estudos farmacológicos deverão ser realizados para cada enantiômero individualmente.

Neste contexto, cresce a necessidade em desenvolver técnicas e métodos analíticos que permitem a separação não apenas dessas, mas de quaisquer misturas racêmicas de interesse farmacológico (ou outros). Essas técnicas devem possibilitar, ainda, o isolamento dos enantiômeros puros (Meyer 1987, Kusters 1996), tanto para garantir um processo de desenvolvimento seguro, quanto para a comercialização do fármaco, sempre que se fizer necessária.

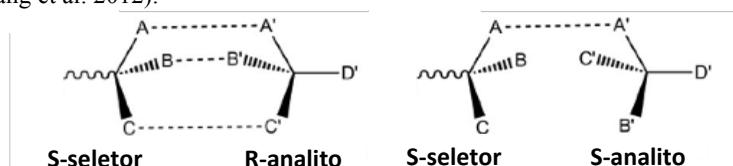
## *1.2 Métodos analíticos para a separação de enantiômeros*

A ciência e a indústria farmacêutica são, de fato, as principais responsáveis pela crescente busca por metodologias analíticas que possibilitem a separação de enantiômeros. No entanto, as indústrias agroquímicas, bioquímicas, biotecnológicas, e a ciência e tecnologia dos alimentos, também contribuem significativamente para este avanço (Cavazzini, Pasti et al. 2011, Rocco, Aturki et al. 2013, Smuts, Na et al. 2014). A garantia de processos eficientes exige um trabalho minucioso que abrange desde o planejamento, que envolve a escolha de um seletor quiral ou desenvolvimento do mesmo, até a escolha da técnica analítica adequada para o sistema. Para isso é fundamental que as interações analito-seletor, e os mecanismos de reconhecimento molecular específicos dos seletores quirais sejam investigados e compreendidos.

O modelo original de interação enantiômero-seletor quiral, onde o seletor pode ser uma fase estacionária ou uma biomolécula *in vivo*, foi proposto por Dalgliesh, em 1952. O modelo sugere que, para que haja reconhecimento quiral, são necessárias três interações simultâneas entre apenas um dos enantiômeros e o seletor e, pelo menos uma delas deve ser dependente da estereoquímica do analito. O outro enantiômero deve interagir com até dois sítios do seletor. Além disso, as interações devem

ser entre sítios distintos tanto no enantiômero quanto no seletor quiral (Dalgliesh 1952). Esse modelo é conhecido como “interação de três pontos”, cujo esquema é demonstrado na Figura 1.3 (Lourenco, Cassiano et al. 2010, Tang, Zhang et al. 2012).

**Figura 1.3** Representação do modelo de “interação de três pontos” (Tang, Zhang et al. 2012).



O modelo original considera que apenas as interações atrativas são responsáveis pela discriminação quiral, no entanto sabe-se atualmente que as interações repulsivas também participam do mecanismo de resolução enantiomérica, embora seja fundamental pelo menos uma interação de natureza atrativa. Anos mais tarde, em 1986, Pirkle e Pochapsky demonstraram que para sistemas com interação  $\pi$ - $\pi$ , a rigidez conformacional dos anéis aromáticos participa da formação do complexo diastereoisomérico, sendo essa uma das três interações ocorrentes no sistema. Topiol e Sabio, em 1989, denominaram esse modelo como “interação pseudo-dois-pontos” (Lourenco, Cassiano et al. 2010, Kalikova, Riesova et al. 2012, Tang, Zhang et al. 2012).

Os processos envolvidos na formação dos complexos diastereoisoméricos transitórios analito-seletor quiral, não são simples, visto que várias interações simultâneas são requeridas para discriminar um enantiômero do outro. Os principais tipos de interações responsáveis pela discriminação quiral são: interação coulômbica ou eletrostática, ligação de hidrogênio e interação estérica (muito fortes), interação  $\pi$ - $\pi$  e íon-dipolo (fortes), interação dipolo-dipolo (força intermediária), interação dipolo-dipolo induzido (fraca) e dispersão de London (muito fraca). É importante ressaltar que nos mecanismos enantiosseletivos, muitas vezes as interações fracas podem desempenhar um papel tão decisivo quanto as interações fortes (Lourenco, Cassiano et al. 2010).

Apesar dos modelos propostos, um por Dalgliesh, em 1952, e outro por Pirkle e Pochapsky, em 1986, serem aceitos pela comunidade científica, o número expressivo de seletores quirais conhecidos atualmente fornece complexidade e singularidades mecanísticas. O modelo de “interação de três pontos”, por exemplo, é pouco expressivo

para se entender interações com seletores quirais proteicos. Devido à complexa estrutura tridimensional das macromoléculas, o mecanismo de discriminação quiral não é completamente conhecido, sendo considerado estéreo-específico para cada mistura racêmica (Lourenco, Cassiano et al. 2010).

Com relação às técnicas analíticas reportadas para separações enantioméricas, estão a cromatografia gasosa, HPLC, cromatografia de fluido supercrítico, a cromatografia em camada fina e a eletroforese capilar (Ward & Ward 2010, Kalikova, Riesova et al. 2012, Tang, Zhang et al. 2012). A técnica de HPLC, no entanto, corresponde a principal técnica empregada, apresentando, dentre outras vantagens, a possibilidade de realizar separações em escala preparativa, que permite o isolamento de cada enantiômero logo após a cromatografia (Meyer 1987, Kusters 1996, Ward & Ward 2010, Smuts, Na et al. 2014). Dois principais métodos são descritos por HPLC: método indireto e direto. No método indireto, raramente empregado, os enantiômeros são convertidos a compostos diastereoisoméricos a partir da reação com um reagente quiral, e são tipicamente separados em uma fase estacionária típica, não quiral. Esse método apresenta o inconveniente de ser necessária a manipulação da amostra (derivatização), além de depender um longo intervalo de tempo. Já no método direto, a formação de um diastereoisômero ocorre através da interação do analito quiral com a fase estacionária, também quiral, ou com a fase móvel. Essa última pode interferir diretamente na detecção dos analitos e limita a utilização de determinados detectores, dentre os quais, o espectrômetro de massas, cuja fase móvel deve ser necessariamente volátil. O processo de isolamento dos enantiômeros puros também é dificultado (Ward & Ward 2010, Kalikova, Riesova et al. 2012, Tang, Zhang et al. 2012). Portanto, a técnica de HPLC utilizando CSPs é, de longe, a técnica mais poderosa e largamente empregada para essa finalidade (Kalikova, Riesova et al. 2012).

### *1.2.1 Fases estacionárias quirais para HPLC*

Atualmente são reportadas inúmeras CSPs baseadas em seletores quirais de diversas naturezas, cujas interações e mecanismos de separação são extremamente peculiares. A Tabela 1.2 apresenta as principais classes de CSPs junto as principais interações envolvidas no processo de reconhecimento quiral e separação enantiomérica (Lourenco, Cassiano et al. 2010).

**Tabela 1.2** Seletores quirais e principais interações com analitos quirais (Lourenco, Cassiano et al. 2010).

<b>Seletor quiral</b>	<b>CSPs</b>	<b>Principais interações</b>
Natural	Proteínas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas
	Ciclodextrinas	Complexo de inclusão e ligação de hidrogênio
	Glicopeptídeos Macrocíclicos	Interações coulômbicas, ligação de hidrogênio, efeitos estéricos, interações $\pi$ - $\pi$ , íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dispersão de London
	Polissacarídeos	Complexo de inclusão e interações atrativas
Sintético	Cinchona	Interações eletrostáticas
	Tipo Pirkle	Interação $\pi$ - $\pi$ e ligação de hidrogênio
	Troca de ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo
	Éteres de coroa	Complexo de inclusão e íon-dipolo
	Polímeros sintéticos	Interação $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo
	Polímeros impressos molecularmente	Específico para cada analito

Dentre as CSPs apresentadas na Tabela 1.2, estão destacadas as classes dos glicopeptídeos macrocíclicos (antibióticos) e das CDs, que correspondem, além dos polissacarídeos, as classes mais amplamente empregadas, apresentando eficiência e seletividade para a separação de misturas enantioméricas de diversas naturezas (Armstrong & Demond 1984, Armstrong, Tang et al. 1994, Ward & Ward 2010, Kalikova, Riesova et al. 2012). Sendo estas as classes de CSPs utilizadas neste trabalho, ambas serão detalhadamente descritas a seguir.

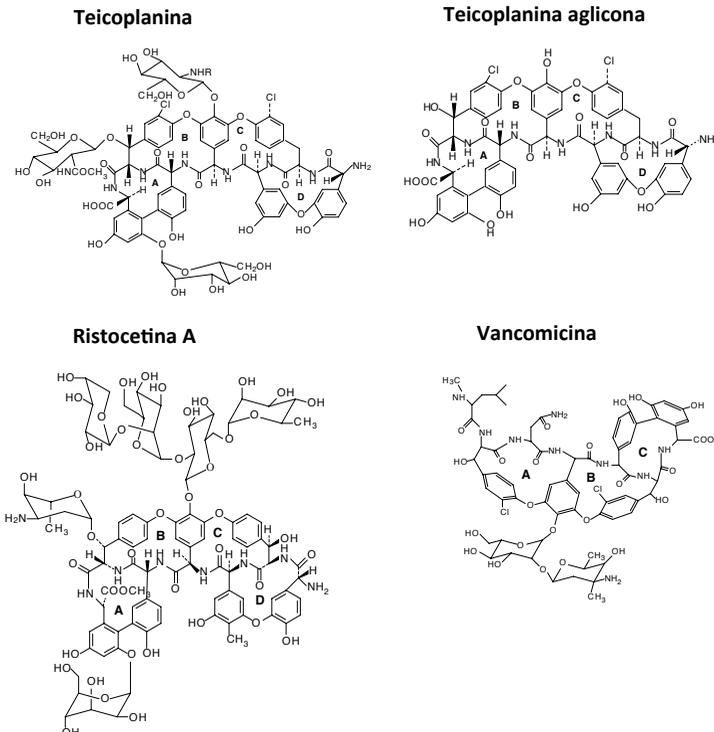
### *1.2.1.1 CSPs a base de glicopeptídeos macrocíclicos*

Desde a sua introdução por Armstrong, em 1994, a classe dos glicopeptídeos macrocíclicos representam um poderoso grupo de CSPs (Armstrong, Tang et al. 1994). Essa classe permite a utilização de diferentes modos cromatográficos RP, NP, polar-orgânico (PO) com 100% de solvente polar não-aquoso e, polar-iônico (PI), com solvente orgânico não-aquoso contendo, principalmente, ácido e/ou base, adicionados para ajustar o estado de ionização do seletor. A

enantiosseletividade, no entanto, é diferente em cada um destes modos cromatográficos (Berthod 2009).

Quatro seletores quirais baseados em glicopeptídeos macrocíclicos são disponíveis comercialmente. São eles: teicoplanina (Chirobiotic T e T2); teicoplanina aglicona (Chirobiotic TAG); ristocetina A (Chirobiotic R) e; vancomicina (Chirobiotic V e V2) (Berthod 2009). As estruturas químicas destes seletores incluem porções peptídicas, carboidratos e ácidos carboxílicos ionizáveis ou grupamentos amínicos, que interagem com enantiômeros através das diversas interações moleculares possíveis (Ahuja 2008). Essas estruturas estão representadas na Figura 1.4 e uma comparação entre as suas características físico-químicas é apresentada na Tabela 1.3.

**Figura 1.4** Estruturas químicas propostas para os glicopeptídeos macrocíclicos teicoplanina, teicoplanina aglicona, ristocetina A e vancomicina. Legenda: A-D compreendem os macrocíclicos ou as cavidades de inclusão; grupo R na teicoplanina corresponde, geralmente, ao ácido metil-decanóico (Ward & Farris 2001, Chirobiotic-Handbook 2004).



**Tabela 1.3** Propriedades físico-químicas dos seletores quirais glicopeptídeos macrocíclicos disponíveis comercialmente (Ward & Farris 2001, Berthod 2009).

Parâmetros	Teicoplanina	Teicoplanina aglicona	Ristocetina A	Vancomicina
Fórmula química	C <sub>88</sub> H <sub>95</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>33</sub>	C <sub>58</sub> H <sub>45</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>7</sub> O <sub>18</sub>	C <sub>95</sub> H <sub>110</sub> N <sub>8</sub> O <sub>44</sub>	C <sub>66</sub> H <sub>75</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>
Massa molar	1878 g mol <sup>-1</sup>	1198 g mol <sup>-1</sup>	2066 g mol <sup>-1</sup>	1448 g mol <sup>-1</sup>
Obtenção	Fermentação com <i>Actinoplanis teicomycetus</i>	Hidrólise química da Teicoplanina	Fermentação com <i>Nocardia lurida</i>	Fermentação com <i>Streptomyces orientalis</i>
Centros quirais	23	8	38	18
Macrociclos	4	4	4	3
Unidades de açúcar	3	0	6	2
Grupos-OH (fenólicos)	15 (4)	8 (6)	21 (4)	9 (3)
Grupos amínicos	1	1	2	2
Grupos carboxílicos	1	1	0	1
Anéis aromáticos	7	7	7	5
Ponto isoelétrico	4,2	6,5	7,5	7,2
CSP comercial	Chirobiotic T ou T2	Chirobiotic TAG	Chirobiotic R	Chirobiotic V ou V2

Como pode ser observado na Figura 1.4 e nos dados da Tabela 1.3, o menor dentre os seletores é a aglicona da teicoplanina com 130 átomos e 1198 g mol<sup>-1</sup>. A ristocetina A compreende o maior dentre os macrocíclicos descritos, com massa molar de 2066 g mol<sup>-1</sup>, e não apresenta átomos de cloro nem grupos ácidos carboxílicos em sua estrutura. Todos eles apresentam, no entanto, grupamentos fenólicos, amínicos e anéis aromáticos, bem como macrociclos ou núcleos de inclusão.

Os grupamentos amínicos e ácidos carboxílicos presentes nas quatro estruturas representadas na Figura 1.4, são ionizáveis, com valores de pK<sub>a</sub> entre 7-9 e 2,8-4,4, respectivamente. Os grupamentos fenólicos possuem pK<sub>a</sub> superior à 10 e, portanto, apresentam-se sempre na sua forma neutra, uma vez que as condições experimentais em HPLC exigem valores de pH mais brandos.

A variedade e complexidade estrutural dos seletores glicopeptídeos macrocíclicos permitem que todas as interações moleculares possíveis sejam responsáveis tanto pela retenção dos enantiômeros e seletividade, quanto pela conformação espacial do seletor devido as interações intramoleculares.

Com relação as interações analito-seletor quiral, as mais fortes ocorrem a partir de forças coulômbicas, que podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo das cargas presentes nas estruturas envolvidas num dado pH. As ligações de hidrogênio, sempre atrativas e muito fortes, ocorrem principalmente a partir das hidroxilas presentes na estrutura do glicopeptídeo. As interações  $\pi$ - $\pi$  também podem ser atrativas ou repulsivas e, embora não sejam as principais interações envolvidas no mecanismo de reconhecimento quiral destes seletores, elas ocorrem, principalmente, devido a presença de sistemas aromáticos. De maneira geral, a interação é mais frequente quando um grupo  $\pi$ -acceptor ou  $\pi$ -ácido do enantiômero interage com um grupo  $\pi$ -doador ou  $\pi$ -básico do seletor, ou vice-versa. Os efeitos estéricos também são importantes nos mecanismos de retenção e reconhecimento quiral, apresentando natureza forte e repulsiva. As forças íon-dipolo, dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido são sempre atrativas e ocorrem entre moléculas que apresentam um momento dipolo. Por fim, complexos de inclusão são possíveis, embora fracos, devido às cavidades apresentarem-se bastante superficiais. As forças de London (ou interações de Van der Waals) são as mais fracas dentre as forças intermoleculares envolvidas. No entanto, são responsáveis pelo efeito hidrofóbico e/ou pelas forças dirigidas por entropia (Ahuja 2008, Berthod 2009). Como descrito anteriormente, atualmente sabe-se que as interações de natureza fraca são tão importantes quanto as interações mais fortes, e as forças repulsivas são consideradas tão produtivas quanto as forças de atração no mecanismo de formação do complexo diastereoisomérico enantiômero-seletor.

É importante destacar que cada interação descrita é favorecida, ou não, pela natureza da fase móvel utilizada na análise por HPLC e, portanto, pelo modo cromatográfico empregado. Como descrito anteriormente, as CSPs a base de glicopeptídeos macrocíclicos podem ser utilizadas em RP, NP, PO e PI. No entanto, os modos RP e PI são os mais eficientemente empregados nesta classe de seletores quirais. No modo RP, ligações de hidrogênio ocorrem entre o seletor e as moléculas de água presentes na fase móvel, portanto as interações estéricas, hidrofóbicas e coulômbicas são dominantes no processo de retenção e

reconhecimento quiral. Por outro lado, em modo polar-iônico, em que não há a presença de água, as interações de hidrogênio tornam-se bastante importantes junto às interações coulômbicas e de efeito estérico. A quantidade de ácido e/ou base contida na fase móvel é responsável pelos estados de ionização dos analitos e do seletor quiral. Essa é uma forma bastante sutil de ajustar a enantiosseletividade cromatográfica.

Com relação a polaridade, as CSPs baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos não podem ser classificadas como fases apolares, como a clássica C18, ou polares, como as fases de sílica não modificada, nem iônicas, como as fases estacionárias de troca-iônica. Todas as quatro CSPs apresentam polaridade similar intermediária com sítios ionizáveis, no entanto, a ordem de polaridade obtida a partir de uma ampla variedade de pares enantioméricos é: vancomicina > ristocetina A > teicoplanina > teicoplanina aglicona. A polaridade das CSPs afeta, de maneira geral, a retenção dos enantiômeros, mas não é considerada para o reconhecimento quiral (e sim outras características físico-químicas das diferentes CSPs). Enantiosseletividade e fatores de retenção não estão necessariamente relacionados. Diminuir as interações hidrofóbicas, portanto, permite uma eluição mais rápida e aumenta as cinéticas de adsorção-dessorção, melhorando a eficiência cromatográfica, que por sua vez, pode contribuir para uma melhor resolução entre os picos cromatográficos.

As CSPs baseadas em seletores do tipo glicopeptídeos macrocíclicos têm apresentado enantiosseletividade para uma gama de compostos, dentre os quais, destacam-se os inúmeros aminoácidos e derivados. No entanto, foi observada seletividade também para a separação de diversos enantiômeros neutros, amidas, ácidos, ésteres e aminas cíclicas. Outros tipos de aminas também foram separadas com diferentes resoluções. Dentre os fármacos enantioméricos resolvidos em colunas baseadas em CSPs dessa natureza, inclui-se o benoxaprofeno, ibuprofeno, fenoterol, mefobarbital, naproxeno, warfarina, albuterol, citrulina, DOPA, fenilalanina, bupivacaína, temazepam, verapamil e CIT (Armstrong, Tang et al. 1994, Kosel, Eap et al. 1998, Ahuja 2008).

### *1.2.1.2 CSPs a base de ciclodextrinas*

Obtidas naturalmente a partir da enzima ciclodextrina-transglicosilase, a classe das CDs corresponde a terceira principal classe de CSPs reportadas na literatura (Ward & Ward 2010, Kalikova, Riesova et al. 2012).

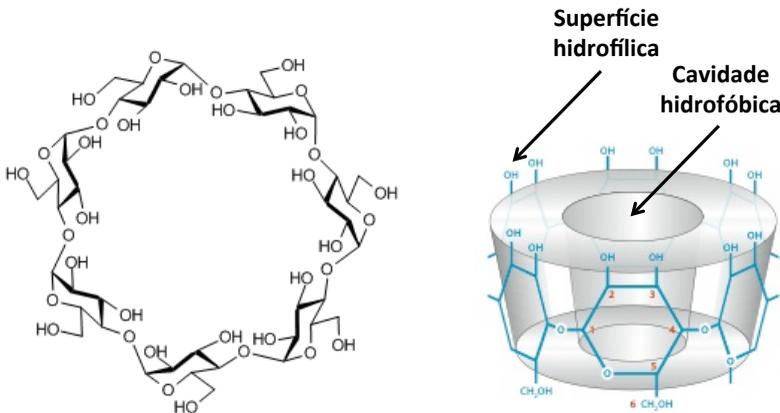
A estrutura química das ciclodextrinas é formada por unidades de glicose unidas pela ligação  $\alpha$ -1,4, formando um carboidrato cíclico de estrutura toroidal cristalina e inúmeros centros estereogênicos. A ciclização entre 6, 7 e 8 unidades de glicose fornecem a estrutura da  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente, as quais apresentam dimensões e, conseqüentemente, propriedades físico-químicas distintas (Tabela 1.4).

**Tabela 1.4** Características físico-químicas das ciclodextrinas nativas (Cyclobond-Handbook 2002, Supelco 2013).

Características	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidades de glicose	6	7	8
Massa molar ( $\text{g mol}^{-1}$ )	972	1135	1297
Diâmetro da cavidade (nm)	0,47-0,52	0,60-0,65	0,75-0,85
Profundidade da cavidade (nm)	0,78	0,78	0,78
Solubilidade em água ( $\text{g L}^{-1}$ )	145	18,5	232
Centros quirais	30	35	40

A Figura 1.5 apresenta a estrutura química geral das ciclodextrinas sob diferentes perspectivas.

**Figura 1.5** Representações da estrutura química das ciclodextrinas (Supelco 2013).



Como pode ser observado na Figura 1.5, as ciclodextrinas apresentam uma estrutura peculiar e simples, quando comparadas aos glicopeptídeos macrocíclicos descritos anteriormente. Uma cavidade de caráter hidrofóbico é formado pelos átomos de oxigênio glicosídicos e átomos de hidrogênio metilênicos, enquanto o caráter hidrofílico da

superfície externa é consequência das hidroxilas presentes nas posições 2, 3 e 6 de cada unidade de glicose (Cyclobond-Handbook 2002, Ahuja 2008, Supelco 2013).

Desde a sua introdução, em 1984, as ciclodextrinas correspondem a uma das classes de seletores quirais mais antigos empregados em métodos de separação, sendo a  $\beta$ -CD a mais amplamente utilizada (Armstrong & Demond 1984, Ahuja 2008, Lourenco, Cassiano et al. 2010, Ward & Ward 2010)

Para o desenvolvimento das CSPs a base de CDs, um ou dois grupos hidroxílicos primários são ligados covalentemente à sílica gel. Os grupos hidroxílicos secundários, por sua vez, podem ser derivatizados seletivamente, geralmente primeiro aqueles em posição 2 e, então, os demais em posição 3. Muitos derivados de ciclodextrinas nativas tem sido desenvolvidos de forma a alterar as suas propriedades físico-químicas e ampliar a gama de aplicação desta classe de CSPs, dentre as quais são reportadas  $\beta$ -CDs acetiladas, além de  $\beta$ -CDs modificadas com grupos hidroxipropil éter e dimetilfenilcarbamato.

Inicialmente as CSPs a base de CDs eram utilizadas apenas nos modo de fase normal e fase reversa. No entanto, atualmente é reconhecido o seu desempenho sob condições de fase normal e fase móvel polar-orgânica (Armstrong & Demond 1984, Cyclobond-Handbook 2002). Podem, ainda, ser utilizadas em cromatografia líquida de interação hidrofílica, devido a polaridade da sua superfície externa (Wang, Jiang et al. 2008, Jandera 2011).

O modo RP é o mais utilizado em separações quirais utilizando essa classe de CSPs. Todas as colunas cromatográficas disponíveis comercialmente, nativas e derivatizadas, são compatíveis com esse modo de operação. Quando são utilizadas sob condições de fases móveis aquosas, o mecanismo básico de retenção dos enantiômeros se dá através da formação de um complexo de inclusão. Neste caso, um analito apolar, ou apenas uma porção apolar do mesmo, é atraído pela cavidade hidrofóbica, enquanto as moléculas de água presentes na fase móvel interagem com as hidroxilas livres presentes na superfície externa do seletor. O modificador orgânico também irá tornar os sítios de interação mais ou menos disponíveis. Por exemplo, a acetonitrila é capaz de ocupar a cavidade hidrofóbica das CDs e diminuir significativamente os tempos de retenção dos analitos, bem como a possibilidade de formação de complexos de inclusão. Por outro lado, o metanol, por ser um solvente prótico de alta polaridade, atua de maneira semelhante à água, favorecendo as interações hidrofóbicas entre

enantiômero-seletor quiral e, portanto, a formação de complexos de inclusão. O efeito da natureza e concentração do tampão bem como pH, afetam a retenção dos analitos e o grau de resolução dos pares enantioméricos e, portanto, compreendem uma forma sutil de ajustar a seletividade do processo de separação.

Quando um grupo aromático está presente na estrutura do analito, a orientação na cavidade ocorre seletivamente devido ao compartilhamento de elétrons entre os grupos metilênicos aromáticos e os oxigênios glicosídicos. Hidrocarbonetos lineares ou acíclicos, por outro lado, ocupam posições aleatórias no interior da cavidade. Desta forma, para a enantiosseletividade das CDs em condições de fase reversa, é fundamental que o analito apresente pelo menos um anel aromático na sua estrutura. A única exceção observada até o momento foi a separação de alguns analitos heterocíclicos e amino ácidos protegidos com grupos *t*-butoxicarbonil (*t*-BOC).

Em condições de fase normal, a enantiosseletividade é dirigida por ligações de hidrogênio e, portanto, pelas interações que ocorrem na superfície externa no seletor, bem como por interações  $\pi$ - $\pi$  em CDs derivatizadas com grupamentos naftil ou 3,5-dimetilfenil (Chang, Reid et al. 1993).

O modo polar-orgânico compreende o mais recente e poderoso avanço nas aplicações desta classe de CSPs (Chang, Reid et al. 1993, Cyclobond-Handbook 2002). A metodologia permite a separação de compostos que não contém anéis aromáticos e muitas outras separações, as quais não eram possíveis nos modos cromatográficos tradicionais, também puderam ser separadas de maneira rápida e eficiente no modo PO.

Os mecanismos de retenção e enantiosseletividade são dirigidos pelas interações entre os analitos e as hidroxilas secundárias presentes na superfície externa da CD, que podem ocorrer através de ligações de hidrogênio e/ou interações dipolares. Além disso, os efeitos estéricos também demonstram-se relevantes. Uma vez que a acetonitrila (componente majoritário da fase móvel polar-orgânica) não compete com os analitos pelos sítios de ligação de hidrogênio presentes no seletor, algumas moléculas poderão ficar fortemente retidas na CSP. Neste caso, pequenas quantidades de metanol e/ou ácido acético e/ou trietilamina podem ser adicionadas para se obter níveis desejáveis de retenção. Por outro lado, foi observado que quantidades elevadas destes aditivos podem prejudicar significativamente o processo de reconhecimento quiral.

Uma vez que pelo menos três pontos de interação são necessários para o reconhecimento quirál, o preenchimento da cavidade pela ACN decorrente das interações hidrofóbicas atrativas é visto como uma das interações presentes. Portanto, pelo menos dois grupos funcionais devem estar contidos na estrutura do analito para que o reconhecimento quirál seja possível sob essas condições. É necessário, ainda, que pelo menos um grupo polar disponível para fazer ligação de hidrogênio esteja próximo ao centro estereogênico e, particularmente em CSPs a base de CD nativa, a presença de um segundo sítio para ligação de hidrogênio é bastante vantajosa, embora não seja fundamental.

Dentre as inúmeras aplicações, as misturas farmacológicas racêmicas apresentam-se como os principais alvos para a separação utilizando CDs como CSPs em modo PO. Dentre elas inclui-se a warfarina, o oxazepam e diversos  $\beta$ -bloqueadores, como propranolol, atenolol, timolol, etc, além de outras moléculas com características estruturais particulares (Chang, Reid et al. 1993, Cyclobond-Handbook 2002, Ahuja 2008).

## **2 Objetivos**

### *2.1 Objetivo Geral*

Separar misturas racêmicas do Citalopram e vinte e oito análogos sintéticos utilizando a técnica de HPLC com fases estacionárias quirais a base de glicopeptídeos macrocíclicos e ciclodextrinas.

### *2.2 Objetivos Específicos*

- Explorar e comparar as peculiaridades de nove fases estacionárias quirais comerciais baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos (teicoplanina, ristocetina A e vancomicina) e ciclodextrinas ( $\beta$ -CD nativa,  $\beta$ -CD acetilada e derivatizada com dimetilfenilcarbamato e hidroxipropil éter);
- Utilizar os modos cromatográficos de fase reversa, fase polar-orgânica e polar-iônica para separação das misturas racêmicas;
- Obter as condições ótimas de separação de cada mistura racêmica a partir da avaliação de parâmetros cromatográficos como fator de retenção, resolução e enantiosseletividade;

- Comparar o desempenho das diferentes fases estacionárias utilizadas;
- Discutir e compreender os mecanismos envolvidos a partir das semelhanças e diferenças estruturais dos analitos junto a natureza das fases estacionárias quirais e dos modos cromatográficos utilizados;
- Indicar as condições mais adequadas para futuras separações em escala preparativa.

### 3 Experimental

#### 3.1 Materiais

Metanol (MeOH) e ACN grau HPLC foram comprados da empresa *EMD* (Gibbstown NJ, EUA) e a água utilizada foi purificada utilizando o sistema *Milli-Q* (Millipore, Billerica MA, EUA). Ácido acético glacial (HOAc), dimetilsulfóxido (DMSO), trietilamina (TEA), trifluoroacetato de amônio (NH<sub>4</sub>TFA), nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), acetato de amônio (NH<sub>4</sub>OAc) e nitrato de tetrametil amônio ((CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>N) foram obtidos da empresa *Sigma-Aldrich* (Milwaukee, WI, EUA). Todas as colunas cromatográficas utilizadas foram de dimensões analíticas (250 mm × 4,6 mm d.i, 5 µm) obtidas da *Advanced Separation Technologies* (Wippany, NJ, EUA). As colunas utilizadas foram as seguintes: Cyclobond-I-2000 (β-CD), Cyclobond-RSP (R,S-hidroxiopropil éter β-CD; β-CD-RSP), Cyclobond-AC (β-CD acetilada; β-CD-AC), Cyclobond-DMP (dimetilfenil carbamato β-CD; β-CD-DMP), Chirobiotic-V e -V2 (vancomicina), Chirobiotic-T (teicoplanina), Chirobiotic-TAG (teicoplanina aglicona) e Chirobiotic-R (ristocetina A).

#### 3.2 Instrumentação

As separações cromatográficas foram conduzidas em um sistema HPLC *Agilent* série 1200 (*Agilent Technologies*, Santa Clara CA, EUA), equipado com bomba quaternária, um auto-amostrador e detector com arranjo de diodos. Para aquisição dos dados e monitoramento das análises foi utilizado o *software Chemstation* versão Rev.B.03.02 [341]. Para as análises, todas as misturas racêmicas foram dissolvidas em MeOH, exceto o composto 19, o qual apresentou solubilidade em DMSO, possivelmente devido à uma forte interação

intramolecular entre uma das hidroxilas livres e o grupo carbonila do ácido carboxílico, presentes na sua estrutura química. Foram utilizadas concentrações de aproximadamente 50 mg L<sup>-1</sup>. A detecção UV foi realizada em 230 nm e 254 nm e as separações conduzidas em temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C) e 0 °C para algumas otimizações específicas. O volume de injeção variou entre 0,3 e 5,0 µL e o fluxo de fase móvel entre 0,5 e 1,5 mL min<sup>-1</sup>.

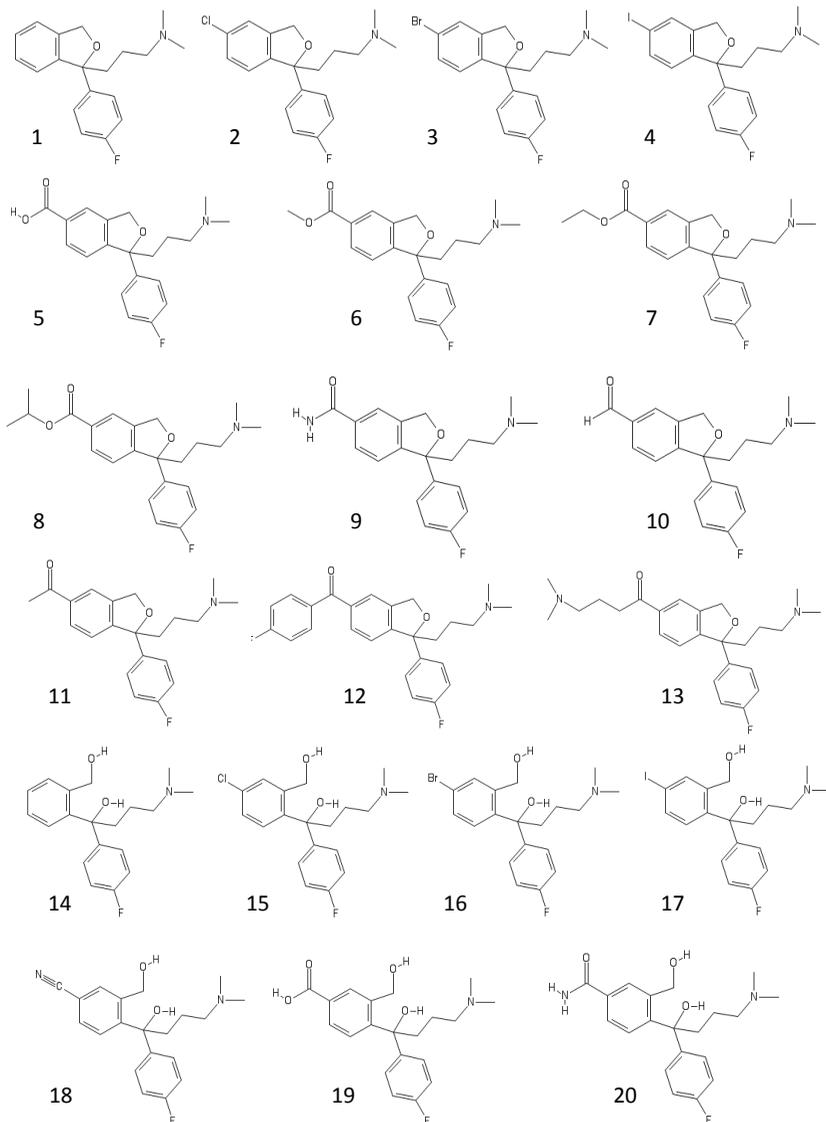
As separações enantioméricas foram avaliadas e otimizadas de em modo PO e fase reversa RP. O modo PI foi utilizado em colunas a base de glicopeptídeos macrocíclicos e consistiram em fases móveis compostas por MeOH e misturas variadas de TEA e HOAc diluídos. O modo fase reversa consistiu de uma mistura binária de MeOH e tampão composto por HOAc e TEA (descrito como TEAA) com ajuste de pH. As composições da fase móvel descritas ao longo deste trabalho apresentam-se em termos de razão v/v. Todas as soluções utilizadas como fase móvel foram previamente desgaseificadas utilizando banho ultrassônico e vácuo.

### 3.3 Analitos

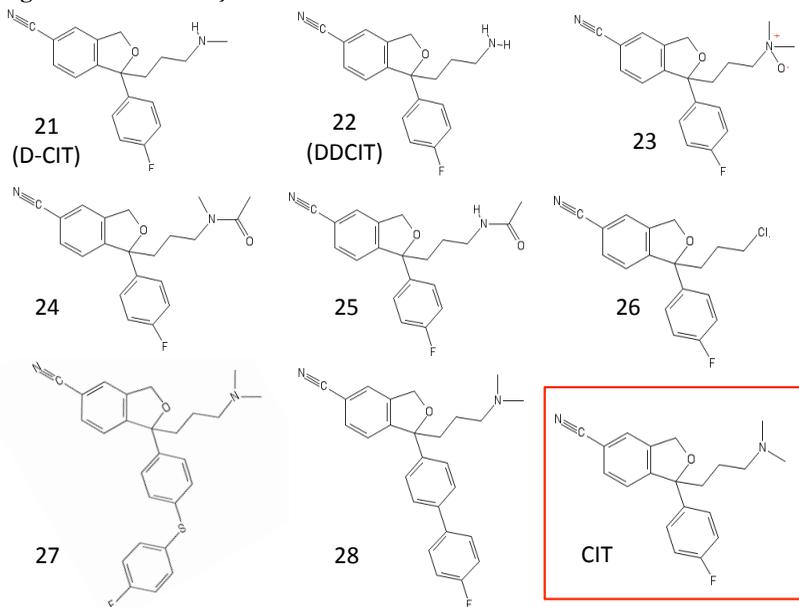
Todas as misturas racêmicas utilizadas foram desenvolvidas e fornecidas pela companhia farmacêutica Lundbeck (sede em Copenhagen – Dinamarca).

A Figura 1.6 apresenta as estruturas dos analitos utilizados neste trabalho. Como pode ser observado, todos são estruturalmente análogos do CIT (1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-carbonitrila), o qual é também mostrado na Figura 1.6.

**Figura 1.6** Estrutura do Citalopram (CIT) e dos 28 racematos analisados por HPLC neste trabalho.



**Figura 1.6 Continuação**



Todos os compostos possuem o mesmo centro estereogênico presente no CIT. A maioria deles são derivados de ftalatos bicíclicos (Sidhu, Priskorn et al. 1997), porém alguns possuem diferentes substituintes no anel benzênico, como halogênios, ácido carboxílico, ésteres, amidas, aldeídos e cetonas (compostos 1-13). Os compostos 21-25 são os únicos que apresentam diferentes grupos amínicos em substituição a amina terciária presente no CIT e demais análogos. Outros compostos apresentam ainda a abertura do anel ftalato (14-20) enquanto outros dois análogos são tricíclicos (27, 28). A maioria destes analitos são ionizáveis devido a presença de um grupamento amínico, entretanto os compostos 5 e 19 possuem grupos carboxílicos e podem apresentar-se na forma zwitteriônica. Os analitos 21 e 22 são os metabólitos DCIT e DDCIT, respectivamente, os quais resultam do metabolismo oxidativo com desmetilação do CIT (Sidhu, Priskorn et al. 1997, Kosel, Eap et al. 1998, Rochat, Kosel et al. 1998, Mandrioli, Fanali et al. 2003).

## 4 Resultados e Discussão

Alguns parâmetros experimentais foram avaliados para otimização dos métodos cromatográficos, dentre os quais: natureza e concentração dos aditivos utilizados em modo PI; pH e concentração de tampão, natureza e proporção do modificador orgânico em modo RP; velocidade de fluxo da fase móvel e; o efeito da temperatura também foi considerado para aperfeiçoar algumas separações químicas.

Inicialmente foi realizada uma triagem mantendo condições iniciais de fases móveis no modo PO (ACN/MeOH/HOAc/TEA 95/5/0,3/0,2), PI (MeOH/HOAc/TEA 100/0,1/0,1) e RP (MeOH/NH<sub>4</sub>OAc 0,1% pH 4) escolhidas com base nas condições indicadas pela empresa *Advanced Separation Technologies* para colunas Cyclobond e Chirobiotic (Cyclobond-Handbook 2002, Chirobiotic-Handbook 2004). A partir de então, foi estudada a influência dos parâmetros descritos acima nas separações químicas de interesse.

Os aditivos estudados em modo PI foram diferentes sais (NH<sub>4</sub>TFA, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OAc, (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>N), TEA e HOAc. A escolha deste último foi devido as diferentes seletividades, resolução e eficiência fornecidas por diferentes contra-íons, sendo reportada a seguinte ordem de desempenho: acetato > fosfato > nitrato > sulfato (Cyclobond-Handbook 2002).

Mantendo-se a concentração de 0,06% de sal em MeOH, foi observada a influência da natureza química dos sais na retenção, eficiência, resolução e seletividade dos picos cromatográficos (testados os analitos 1, 8, 15 e 21). Picos mais eficientes e melhores resoluções foram obtidas utilizando-se (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>N. Os tempos de retenção seguiram a ordem NH<sub>4</sub>OAc > (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>N > NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> > NH<sub>4</sub>TFA. Diferentes concentrações de (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>N foram, então, avaliadas: 0,06%, 0,02%, 0,01% e 0,0075%. Os valores *R<sub>s</sub>* e a retenção dos analitos aumentaram com a diminuição da concentração, porém foram acompanhadas pelo alargamento dos picos cromatográficos. Os resultados indicam que uma maior concentração de aditivos presentes na fase móvel, diminui os sítios das CSPs disponíveis para interação com os analitos. Por fim, a influência da presença do HOAc e TEA foi avaliada, constatando-se que misturas entre HOAc/TEA fornecem os melhores resultados quando comparados aos obtidos com a utilização de sais, dada a possibilidade de ajuste do pH, o qual afeta a ionização das CSPs baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos bem como dos analitos. Novamente os tempos de retenção dos analitos foram diminuídos com o aumento da concentração de TEA, no entanto, o aumento na concentração de HOAc pouco influenciou a retenção dos analitos. Por

outro lado, a seletividade e eficiência dos picos cromatográficos foram diretamente afetadas pela concentração de HOAc e TEA, apresentando uma ambos concentrações e proporções ótimas (compostos 1, 8, 15 e 21 avaliados utilizando a coluna cromatográfica Chirobiotic V2, baseada em vancomicina).

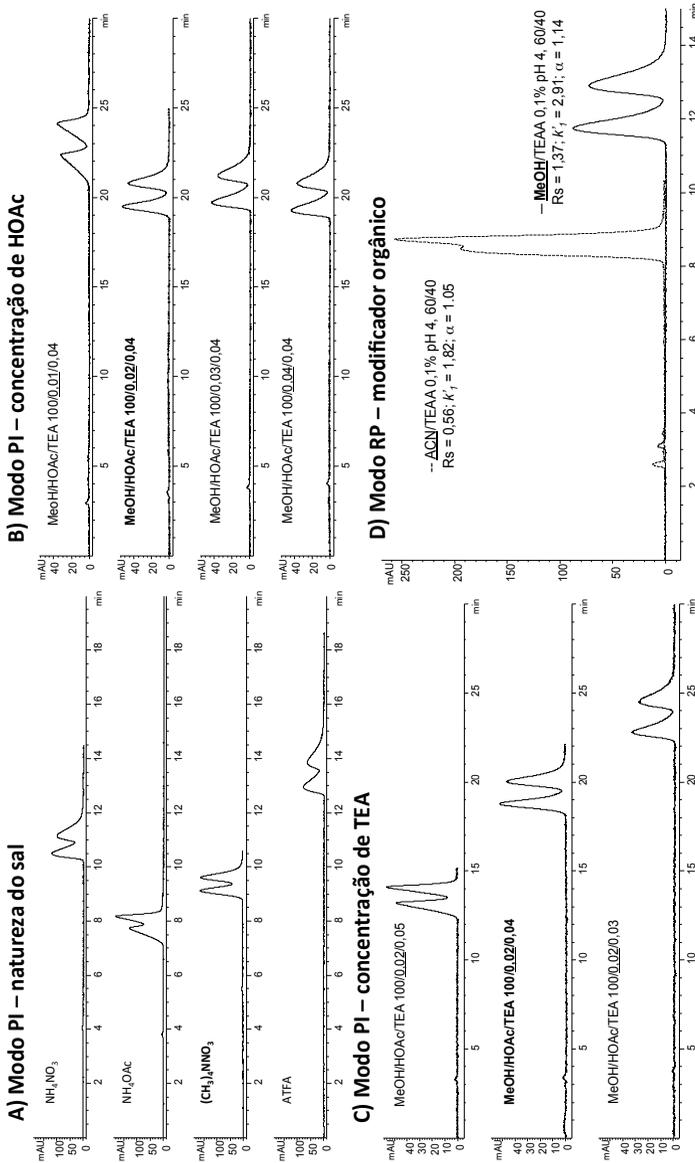
Em modo RP foram testados ACN e MeOH como modificadores orgânicos, mantendo-se a proporção solvente/tampão, sendo que a presença de ACN não apenas diminuiu os tempos de análise como também a seletividade foi substancialmente prejudicada. Desta forma, MeOH foi selecionado como modificador orgânico para todas as análises em RP.

Em seguida foram estudadas diferentes proporções MeOH/tampão utilizando apenas o composto 1 e a coluna a base de vancomicina. Como esperado, a retenção dos analitos foi favorecida com o aumento da concentração de MeOH, porém o alargamento dos picos cromatográficos prejudicou a resolução e enantiosseletividade dos sistemas estudados. O mesmo perfil foi observado nos estudos acerca das velocidades de fluxo da fase móvel.

Por fim, foram testados diferentes pHs (4, 5 e 6) do tampão, respeitando a faixa de pH a qual as CSPs podem ser operadas (Cyclobond-Handbook 2002, Chirobiotic-Handbook 2004). Constatou-se que a diminuição do pH e, portanto, a maior concentração de íons  $H_3O^+$  diminui consideravelmente a retenção dos analitos, além de que resolução e seletividade são significativamente afetadas. No entanto, o pH ótimo para análise varia para cada sistema, dados os diferentes pontos isoelétricos das CSPs baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos (Tabela 1.3) e  $pK_{as}$  dos analitos.

Após estas constatações, diferentes proporções de solvente/tampão e de velocidades de fluxo foram utilizadas para aperfeiçoar tempos de análise, enquanto que a natureza do modificador orgânico e do pH foram preferencialmente ajustados para melhorar resolução e seletividade durante o processo de desenvolvimento dos métodos para separação do CIT e seus vinte e oito análogos sintéticos. A Figura 1.7 apresenta os cromatogramas obtidos para o analito 1 em coluna Chirobiotic V2, baseada em vancomicina, obtidas variando-se alguns parâmetros descritos acima.

**Figura 1.7** Influência da A) natureza do sal e das concentrações de B) HOAc e C) TEA utilizados como aditivo em modo polar-iônico, bem como da D) natureza do modificador orgânico em modo de fase reversa. Cromatogramas obtidos para o analito 1 (ver Figura 1.6) na coluna Chirobiotic V2, baseada em vancomicina, e fluxo de fase móvel  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .



A Tabela 1.5 apresenta, de maneira resumida, as condições cromatográficas otimizadas para cada separação cromatográfica e apresenta as melhores condições de separação obtidas para cada analito. Foram consideradas ótimas as condições que forneceram os maiores valores de  $R_s$  mantendo os fatores de retenção ( $k'$ ) satisfatoriamente baixos. Foi observada enantiosseletividade para 25 dos 28 compostos relacionados. Os valores de  $\alpha$  variaram de 1,05 (composto 18) à 1,33 (composto 5). Os valores de  $R_s$  para os pares enantioméricos variaram de 0,6 (composto 24) à 2,9 (composto 8). Os analitos 19, 23 e 26 não foram separados sob as diversas condições avaliadas ( $R_s < 0,4$ ). O primeiro possivelmente devido a repulsão eletrostática. Um total de 18 compostos apresentaram valores de  $R_s$  superiores a 1,5 e foram considerados completamente separados.

**Tabela 1.5** Resumo das condições cromatográficas ótimas utilizadas nas separações enantioméricas de 28 análogos do Citalopram.

Analito	CSP <sup>a</sup>	$k'_1$	$\alpha$	$R_s$	Fase móvel (modo cromatográfico)
1	Chiro-V2	7,56	1,08	1,6	MeOH/HOAc/TEA 100/0,01/0,02, 0,75 mL/min (PI)
2	Chiro-V2	7,62	1,08	1,5	MeOH/ HOAc /TEA 100/0,01/0,02, 0,75 mL/min (PI)
3	Chiro-V2	7,60	1,08	1,5	MeOH/HOAc /TEA 100/0,02/0,03, 0,50 mL/min (PI)
4	Chiro-V2	9,12	1,06	0,9	MeOH/HOAc /TEA 100/0,01/0,02, 1,0 mL/min (PI)
5	$\beta$ -CD-AC	2,98	1,33	1,8	MeOH/0,1% TEAA pH 5 30/70, 1,0 mL/min (RP)
6	Chiro-V2	11,5	1,08	1,3	MeOH/0,1% TEAA pH 5 60/40, 1,0 mL/min (RP)
7	Chiro-V2	9,16	1,12	1,8	MeOH/0,1% TEAA pH 5 60/40, 1,0 mL/min (RP)
8	Chiro-V2	9,91	1,21	2,9	MeOH/ 0,1% TEAA pH 5, 40/60, 1,0 mL/min (RP)
9	Chiro-TAG	7,33	1,18	1,5	MeOH/HOAc /TEA 100/0,2/0,3, 1,0 mL/min (PI)
10	$\beta$ -CD-DMP	9,50	1,26	1,5	MeOH/0,1% TEAA pH 4.1 20/80, 1,0 mL/min (RP)
11	Chiro-V2	16,5	1,10	1,4	MeOH/HOAc /TEA 100/0,01/0,02, 1,0 mL/min, T= 0°C (PI)
12	Chiro-TAG	4,96	1,21	1,7	MeOH/HOAc /TEA 100/0,2/0,3, 1,5 mL/min (PI)
13	Chiro-V2	13,0	1,12	1,3	MeOH/HOAc /TEA 100/0,2/0,4, 1,0 mL/min (PI)

**Tabela 1.5 Continuação**

14	$\beta$ -CD-RSP	1,37	1,22	1,7	MeOH/0,1 % TEAA pH 5 15/85, 1,0 mL/min (RP)
15	$\beta$ -CD	3,86	1,10	1,7	ACN/MeOH/HOAc /TEA 90/10/0,3/0,2, 1,0 mL/min (PO)
16	$\beta$ -CD	4,26	1,16	2,6	ACN/MeOH/HOAc /TEA 90/10/0,3/0,2, 1,0 mL/min (PO)
17	$\beta$ -CD-RSP	1,10	1,25	1,7	MeOH/0,1% TEAA pH 4,1 40/60, 1,0 mL/min (RP)
18	$\beta$ -CD	3,38	1,05	0,8	ACN/MeOH/HOAc /TEA 90/10/0,3/0,2, 1,0 mL/min (PO)
19	N/A <sup>a</sup>	-	-	-	-
20	$\beta$ -CD-AC	1,25	1,23	1,6	MeOH/0,1% TEAA pH 5 10/90, 1,0 mL/min (RP)
21	Chiro-V2	1,73	1,27	2,4	MeOH/HOAc/TEA 100/0,2/0,3, 1,0 mL/min (PI)
22	Chiro-V2	1,63	1,21	1,8	MeOH/HOAc/TEA 100/0,2/0,3, 1,0 mL/min (PI)
23	N/A	-	-	-	-
24	Chiro-T	6,07	1,07	0,6	MeOH/0,1% TEAA pH 4,1 30/70, 1,0 mL/min (RP)
25	$\beta$ -CD-RSP	8,08	1,12	1,1	MeOH/0,1% TEAA pH 4,1 30/70, 1,0 mL/min (PO)
26	N/A	-	-	-	-
27	Chiro-V2	9,90	1,10	1,6	MeOH/HOAc /TEA 100/0,01/0,02, 1,0 mL/min (PI)
28	Chiro-V2	18,1	1,14	1,5	MeOH/HOAc /TEA 100/0,01/0,02, 1,0 mL/min, T = 0°C (PI)

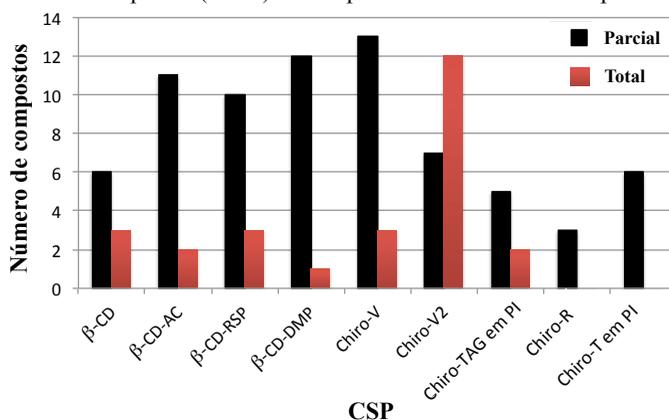
<sup>a</sup> Os espaços não preenchidos da tabela indicam que não foi observada separação ( $R_s < 0,4$ ) sob nenhuma das condições testadas. Legenda: Chiro-V2, vancomicina; Chiro-T, teicoplanina; Chiro-TAG, aglicona de teicoplanina;  $\beta$ -CD,  $\beta$ -ciclodextrina nativa;  $\beta$ -CD-AC,  $\beta$ -CD-RSP e  $\beta$ -CD-DMP correspondem a  $\beta$ -CD derivatizada com grupamento acetil, R,S-hidroxipropil éter e dimetilfenil carbamato, respectivamente.

Como pode ser observado na Tabela 1.5, as CSPs baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos (Chiro-) forneceram 16 das melhores separações obtidas, sendo 11 separações completas, enquanto os seletores a base de ciclodextrinas forneceram 9 separações ótimas, sendo 7 separações completas. Dentre as CSPs utilizadas, a coluna Chirobiotic-V2, baseada em vancomicina, foi considerada a coluna mais favorável para as separações cromatográficas testadas, fornecendo as melhores separações para 13 dos 28 compostos, sendo 9 separações completas. Os modos PO e PI compreenderam 15 dos melhores resultados listados na Tabela 1.5, os quais apresentam-se vantajosos

para futuras separações em escala preparativa (Beesley 2004, Smuts, Na et al. 2014, Woods, Patel et al. 2014).

O desempenho de cada CSP é mostrado no gráfico da Figura 1.8, o qual apresenta o número total de separações parciais ( $0,4 \leq R_s \leq 1,5$ ) e totais ( $R_s \geq 1,5$ ) obtidas utilizando cada seletor quiral.

**Figura 1.8** Número total de separações parciais e totais obtidas utilizando HPLC com diferentes CSPs. Nota: “em PI” significa que as separações foram obtidas apenas em modo polar-iônico, enquanto as demais separações foram obtidas em modos PI/PO e RP. As definições das abreviações utilizadas para as fases estacionárias quirais (CSPs) estão apresentadas na sessão Experimental)



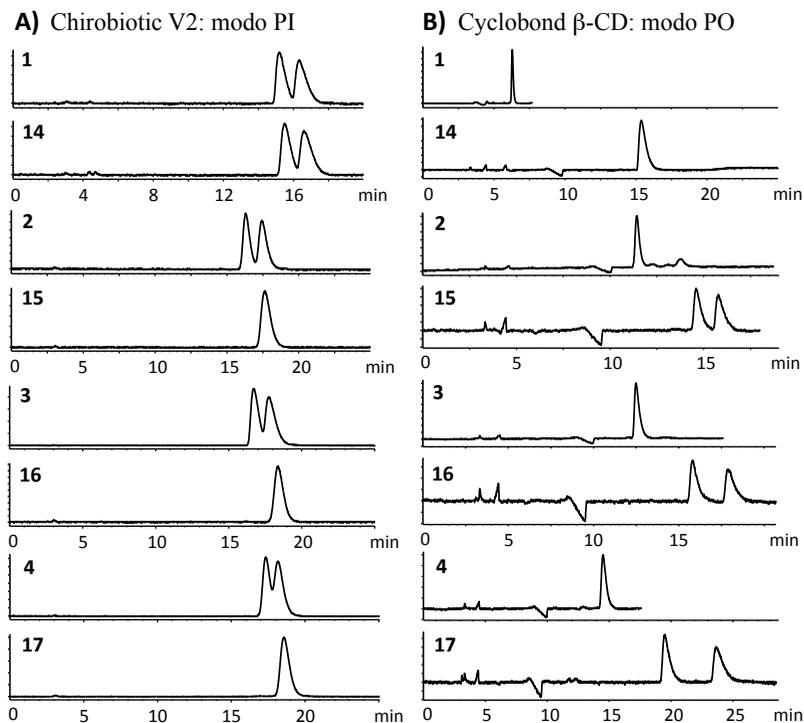
Setenta e três separações parciais obtidas pelas nove colunas cromatográficas avaliadas e vinte e seis separações completas. Para as colunas cromatográficas baseadas em teicoplanina (Chirobiotic-T e -TAG), os dados da Figura 1.8 foram obtidos apenas em modo PI, uma vez que o modo RP favoreceu a interação analito-CSP e a maioria dos compostos não foram eluídos em intervalos até cerca de 50 minutos. É possível observar ainda, que as CSPs a base de vancomicina são as mais eficientes para a separação enantiomérica de análogos do CIT. Sob as mesmas condições, Chirobiotic-V2 apresentou melhores resultados quando comparados aos obtidos pela Chirobiotic-V, fornecendo maiores tempos de retenção e melhor seletividade, o que pode ser explicado pelo maior grau de substituição do seletor quiral na CSP V2 (Bosakova, Curinova et al. 2005, Smuts, Na et al. 2014). O sucesso das CSPs a base de vancomicina quando utilizado o modo PI demonstrou que as interações iônicas atuam definitivamente no processo de reconhecimento quiral. Por outro lado, para os compostos separados utilizando ciclodextrinas, o modo RP produziu os melhores resultados,

indicando que as interações hidrofóbicas e formação de um complexo de inclusão são fundamentais para a enantiosseletividade deste tipo de seletor quiral para a maioria dos analitos estudados (exceto para aqueles que apresentavam a abertura do anel isobenzofurano e, portanto, a presença de duas hidroxilas livre para interação – ver Figura 1.9).

Embora todos os analitos apresentem arquiteturas moleculares similares e possuam o mesmo centro estereogênico, diferenças entre as estruturas de cada analito produzem efeitos significativos tanto no processo de retenção quanto de reconhecimento quiral. Alguns resultados comparativos são apresentados e discutidos a seguir, considerando-se a natureza do seletor quiral, do analito e as condições cromatográficas. Para os cromatogramas apresentados nas figuras 1.9 à 1.12, os números indicados se referem ao número do analito apresentado na Figura 1.6 e as definições das abreviações utilizadas para CSPs estão apresentadas na sessão Experimental.

Exceto para os compostos 14-20, todos os demais apresentam um centro estereogênico na posição 1 do anel isobenzofurano. Nos compostos 14-20, este anel apresenta-se aberto, fornecendo uma estrutura mais flexível e mais hidrofílica devido a presença de dois grupos hidroxila livres próximos ao centro estereogênico. A Figura 1.9 apresenta uma comparação entre a separação enantiomérica de compostos com estruturas similares, os quais diferenciam-se entre si pela abertura ou não do anel de isobenzofurano.

**Figura 1.9** Comparação entre a separação de compostos que apresentam o anel de isobenzofurano aberto (14-17) e fechado (1-4), substituído com hidrogênio ou halogênios (Cl, Br e I). Condições experimentais: A) CSP: Chirobiotic-V2; fase móvel: MeOH/HOAc/TEA 100/0,06/0,06, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C e; B) Cyclobond-I-2000; fase móvel: ACN/MeOH/HOAc/TEA 90/10/0,3/0,2, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C.

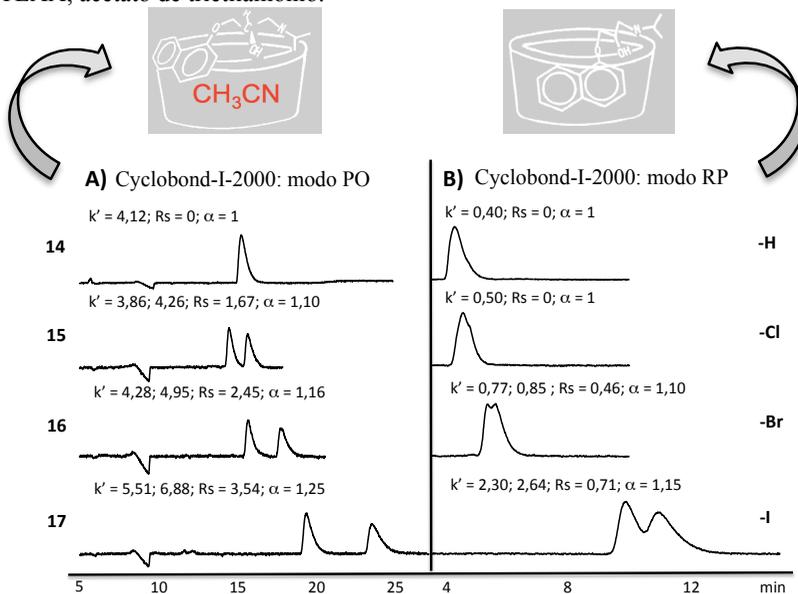


Em geral, como pode ser observado nos cromatogramas da Figura 1.9 e nos dados da Tabela 1.5, colunas a base de ciclodextrinas demonstraram uma melhor seletividade enantiomérica para os compostos que apresentam o anel de isobenzofurano aberto (5 das 7 separações ótimas completas). Já as CSPs baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos demonstraram melhor seletividade para os analitos que contém o anel isobenzofurano em suas estruturas. Este interessante comportamento indica que mecanismos enantiosseletivos complementares são apresentados por estas duas classes de seletores quirais. Evidentemente, os seletores a base de glicopeptídeos macrocíclicos dependem de algum efeito estérico proporcionado pelo anel fechado para diferenciar dois enantiômeros. Por outro lado, os

resultados sugerem que as ligações de hidrogênio adicionais presentes nos compostos que apresentam a ruptura deste anel, favorecem as interações responsáveis pelo reconhecimento quiral quando ciclodextrinas são utilizadas em modo PO (Chang, Reid et al. 1993, Cyclobond-Handbook 2002).

A Figura 1.10 apresenta os cromatogramas obtidos para os compostos 14-17 utilizando  $\beta$ -CD nativa como seletor quiral em ambos os modos PO e RP. Os resultados enfatizam a influência dos substituintes halogênicos no grupamento fenila tanto na retenção quanto na seletividade destes analitos.

**Figura 1.10** Comparação entre a separação de compostos contendo diferentes substituintes no anel isobenzofurano (14-17) utilizando Cyclobond-I-2000 como CSP nos modos A) PO (polar-orgânico) e B) RP (fase reversa). Ilustrações dos fenômenos que ocorrem nos diferentes modos cromatográficos também são apresentadas (Cyclobond-Handbook 2002). Condições experimentais A) fase móvel: ACN/MeOH/HOAc/TEA 90/10/0,3/0,2, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C; B) fase móvel: MeOH/0,1 % TEAA pH 4, 15/85, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C. Nota: TEAA, acetato de trietilamônio.

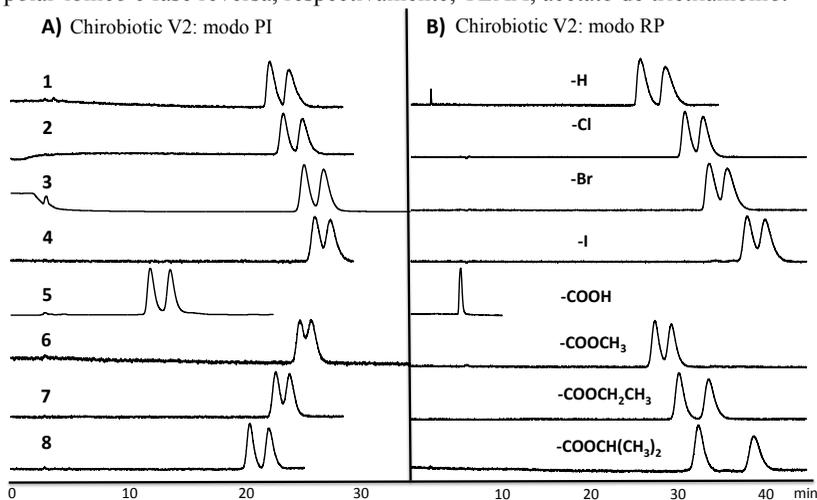


Considerando apenas os substituintes halogênicos, tanto para o sistema PO quanto RP, a retenção, resolução e seletividade apresentam-se na ordem -I > -Br > -Cl. No modo PO (Figura 1.10 A), a cavidade da ciclodextrina é completamente preenchida pela ACN (Wang, Jiang et al.

2008) e as interações com os analitos ocorrem nas porções externas do seletor quiral. Por outro lado, no modo RP (Figura 1.10 B), a inclusão do analito quiral na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina é, frequentemente, a interação majoritária com este tipo de seletor (2002). Neste caso, o aumento da hidrofobicidade do analito (ex., o substituinte iodo torna o analito mais hidrofóbico) aumenta a retenção e a complexação enantiosseletiva por inclusão. Este resultado está de acordo com os estudos previamente realizados por Guo e colaboradores, que demonstraram que a constante de associação para a formação do complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD e benzenos monossustituídos com halogênio segue a ordem  $-I > -Br > -Cl$  (Guo, Luo et al. 1998).

A influência dos substituintes também pode ser observada na Figura 1.11 para a separação dos compostos 1-8 utilizando vancomicina como seletor quiral nos modos PI e RP. No modo RP, a concentração do modificador orgânico bem como a concentração de TEAA na fase aquosa (0,1%, 0,3% e 0,5%) e o pH (4, 5 e 6) foram avaliados. Para comparação, foi utilizada uma fase móvel composta por MeOH/0,1% TEAA pH 5, 60/40.

**Figura 1.11** Comparação entre a separação de compostos contendo diferentes substituintes (1-8) utilizando Chirobiotic-V2 como CSP nos modos A) PI e B) RP. Condições experimentais: A) fase móvel: MeOH/HOAc/TEA 100/0,02/0,03, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C; B) fase móvel: MeOH/0,1% TEAA pH 5, 60/40, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C. Nota, PI e RP correspondem aos modos polar-iônico e fase reversa, respectivamente; TEAA, acetato de trietilamônio.



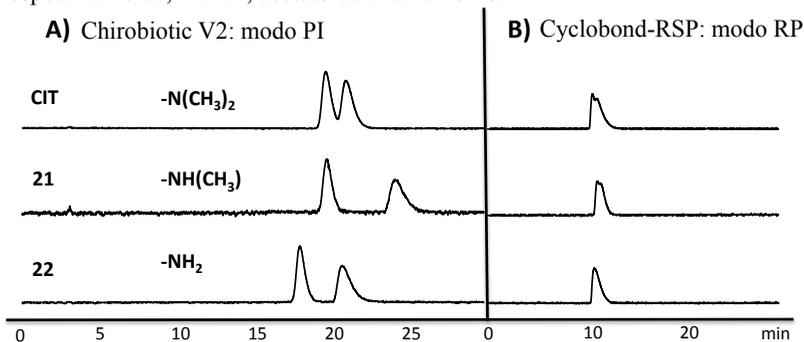
Como pode ser observado na Figura 1.11, a influência dos substituintes halogênicos (1-4) nos fatores de retenção é evidente quando o modo RP é utilizado e segue a ordem  $-I > -Br > -Cl > -H$ . Por outro lado, apenas uma suave mudança nos tempos de retenção é observado no modo PI, seguindo a mesma ordem de eluição. Para ambos os modos de operação, os valores de  $R_s$  e seletividade enantiomérica são melhores para os analitos menos retidos. Considerando os compostos 1-4, a diferença entre os resultados obtidos em PI e RP para um mesmo composto não foi pronunciada, o que se apresenta contrário ao comportamento observado para a separação dos compostos 14-17 em CSP a base de  $\beta$ -CD (Figura 1.8). A razão volumétrica de HOAc e TEA, 0,01/0,02%, utilizado no modo PI, corresponde a estequiometria 1,22:1 (pH  $\sim$  5,3 se presente em solução aquosa), enquanto que o pH da fase aquosa no modo RP foi ajustado para 5. Ambas as condições permitem interações entre o grupo amino protonado do analito e o ácido carboxílico ionizado da CSP (Takacsnovak, Noszal et al. 1993, Berthod 2009), explicando o comportamento similar observado na Figura 1.11 para as separações dos compostos 1-4.

A Figura 1.11 mostra ainda um efeito pronunciado da presença de um substituinte ácido carboxílico na estrutura do analito 5. No modo PI, a retenção deste foi significativamente diminuída, porém sem perda em seletividade ou resolução. Entretanto, no modo RP, a diminuição da retenção foi acompanhada pela perda completa da seletividade. A fraca retenção apresentada pelos compostos com grupos carboxílicos quando utilizada vancomicina como CSP, foi reportada anteriormente por Bosakova e colaboradores na separação de profenos em modo RP (Bosakova, Curinova et al. 2005). De maneira interessante, quando o modo PI foi utilizado neste trabalho, um aumento da retenção e seletividade foram obtidos para o composto 5 quando comparado ao modo RP. Os resultados indicam uma repulsão eletrostática entre a CSP e o analito, o que, surpreendentemente, não afeta a seletividade no modo PI. O composto 19, o qual também apresenta um grupo ácido carboxílico como substituinte do anel benzênico, não foi retido na CSP a base de vancomicina sob qualquer condição estudada, o que está de acordo com a explicação descrita acima, além de possivelmente apresentar forte interação intramolecular entre a hidroxila livre e a carbonila do grupo ácido carboxílico. Quando o ácido carboxílico presente no composto 5 é esterificado (compostos 6, 7 e 8), não ocorre repulsão eletrostática e a retenção é observada. Enquanto no modo PI a retenção seguiu a ordem  $-CH_3 > -CH_2CH_3 > -CH(CH_3)_2$ , a seletividade aumentou de maneira contrária,  $-CH(CH_3)_2 > -CH_2CH_3 > -CH_3$ .

Entretanto, no modo RP, maiores seletividades foram encontradas para todos os três ésteres, aumentando significativamente com o aumento da hidrofobicidade do éster. É evidente que efeitos estéricos são importantes para o reconhecimento quiral tanto no modo PI quanto RP, enquanto efeitos hidrofóbicos são críticos no modo RP.

A Figura 1.12 apresenta os cromatogramas obtidos para a separação do CIT e seus metabólitos DCIT e DDCIT (compostos 21 e 22, respectivamente).

**Figura 1.12** Comparação entre as separações dos compostos 21, 22 e Citalopram (CIT). Condições experimentais: A) CSP: Chirobiotic V2; fase móvel: MeOH/HOAc/TEA 100/0,06/0,06, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C e; B) CSP: Cyclobond-RSP; fase móvel: MeOH/0,1% TEAA pH 5, 25/75, 1,0 mL min<sup>-1</sup>; T ~ 23 °C. Nota, PI e RP correspondem aos modos polar-iônico e fase reversa, respectivamente; TEAA, acetato de trietilamônio.



Pode-se observar que a seletividade na coluna Chirobiotic-V2 (Figura 1.12 A) aumenta na ordem DCIT (amina secundária) > DDCIT (amina primária) > CIT (amina terciária). A mesma ordem de seletividade e retenção foi encontrada por Kosel e colaboradores utilizando Chirobiotic-V e fase móvel similar (Kosel, Eap et al. 1998). O impacto significativo da mudança no grupamento amino sobre a enantioseletividade e retenção em CSPs baseadas em vancomicina é evidente, no entanto outros estudos devem ser realizados para uma compreensão mais detalhada acerca da influência destes grupos no mecanismo de retenção e reconhecimento quiral em CSPs desta natureza (Kosel, Eap et al. 1998, Smuts, Na et al. 2014). Contraditoriamente, quando uma CSP a base de ciclodextrina foi utilizada no modo RP (Figura 1.12 B), uma seletividade modesta foi observada na ordem CIT (amina terciária) > DCIT (amina secundária) > DDCIT (amina primária), evidenciando, mais uma vez, a formação de um complexo de

inclusão, o qual é favorecido pela presença de fase móvel típica de fase reversa (rica em água) e analitos mais hidrofóbicos.

## 5 Conclusões e recomendações

Neste capítulo foi apresentada a separação enantiomérica do CIT e vinte e oito análogos sintéticos por HPLC quiral. Os métodos apresentaram enantiosseletividade para vinte e cinco dentre o total de análogos avaliados, dentre os quais dezoito separações completas e sete separações parciais. As colunas cromatográficas quirais a base de glicopeptídeos macrocíclicos apresentaram cerca de 90% das separações ótimas obtidas, sendo os melhores resultados apresentados pelo sistema envolvendo a coluna Chirobiotic-V2, a base de vancomicina com elevado grau de substituição, empregada em modo PI, apresentando-se promissor para futuras separações em escala preparativa. Estes resultados indicaram a relevância das interações iônicas no processo de separação das misturas racêmicas avaliadas. As CSPs a base de CDs, por outro lado, apresentaram melhores enantiosseletividades em sistemas operados em modo RP, indicando a formação de complexos de inclusão no processo de reconhecimento quiral dos compostos analisados. De maneira geral, as classes das CDs e dos macrocíclicos glicopeptídeos demonstraram desempenhos complementares na resolução das separações do CIT e dos vinte e oito análogos sintéticos apresentados neste trabalho.

Recomendações: utilizar as condições otimizadas no desenvolvimento de análises em escala preparativa (especialmente em modo PO/PI), para obtenção dos enantiômeros puros em quantidades suficientes para que seja dada continuidade aos estudos farmacológicos destes compostos e, possivelmente, para comercialização segura do(s) novo(s) fármaco(s).

# Capítulo 2

## **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de uma nova fase estacionária utilizando ciclofrutano-6 quimicamente ligado à partículas de sílica superficialmente porosas para aplicação em HILIC**

### **Resumo**

Este capítulo descreve o desenvolvimento de uma nova fase estacionária HILIC composta por ciclofrutano-6 nativo quimicamente ligado à partículas de sílica superficialmente porosas com  $d_p$  de 2,7  $\mu\text{m}$ . A caracterização foi realizada por análise elementar de CHN, a qual permitiu a obtenção do grau de substituição absoluto, de 0,86  $\mu\text{mol m}^{-2}$ , e relativo, de 12,8%. As condições ótimas para o preenchimento da coluna cromatográfica proposta envolveram um *slurry* composto por uma mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  com concentração de partículas de cerca de 15  $\text{mg mL}^{-1}$ , volume adequado de tolueno atuando como *push solvent*, e sistema operado sob pressão constante de 12000 psi. O desempenho cromatográfico da coluna foi, então, avaliado e comparado com fases estacionárias preparadas com o mesmo seletor ligado à partículas de sílica totalmente porosas com  $d_p$  de 3  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$  (FRULIC-N), ambas desenvolvidas neste trabalho. Os resultados obtidos pela coluna a base de SPPs demonstraram separações até 85% mais rápidas e eficiências até 3,7 vezes superior às obtidas pelas colunas a base de FPPs no modo HILIC. A nova coluna cromatográfica foi também avaliada sob condições de NP. Dentre os parâmetros avaliados inclui-se eficiência de pico, tempo de análise, seletividade e capacidade de pico. A partir dos gráficos de van Deemter, foi possível observar que a nova fase estacionária a base de SPPs apresentou velocidades de fluxo ótimas superiores às apresentadas pelas colunas cromatográficas a base de FPPs. Observou-se, ainda, que em velocidades de fluxo elevadas, as vantagens das SPPs foram mais pronunciadas em modo NP do que em modo HILIC, demonstrando claramente a influência do modo cromatográfico e do mecanismo de separação no alargamento dos picos. No entanto, a coluna a base de CF6 ligado a SPPs mostrou nítidas vantagens em termos de frequência analítica e eficiência de separação de compostos polares em ambos os modos cromatográficos avaliados.

## 1 Revisão Bibliográfica

### 1.1 Partículas superficialmente porosas: o Estado da Arte em material de suporte para colunas de HPLC

As SPPs, também denominadas *core-shell*, *porous-shell*, *fused-core* ou *solid-core* (DeStefano, Langlois et al. 2008, Wang, Barber et al. 2012, Bell & Majors 2015), foram introduzidas às técnicas de separação com o intuito de fornecer cromatografias rápidas e eficientes em meio líquido. Na época, o desenvolvimento destas partículas surgiu com o propósito de separar compostos biológicos de elevada massa molar utilizando resina de troca-iônica (Horvath, Preiss et al. 1967). A sua morfologia é bastante interessante, consistindo basicamente em um núcleo sólido envolto por uma camada porosa, que será detalhadamente descrita adiante (DeStefano, Langlois et al. 2008, Bell & Majors 2015).

A literatura apresenta uma série de materiais com a mesma denominação, que podem apresentar, numa mesma partícula, núcleos e superfícies de natureza química distintas, como desenvolvido inicialmente por Horváth (Horvath, Preiss et al. 1967).

Atualmente são as partículas preparadas exclusivamente com sílica que compõem o principal material de suporte utilizado em fases estacionárias para HPLC (Bell & Majors 2015). SPPs de sílica com 50  $\mu\text{m}$  de  $d_p$ , foram comercializadas por Kirkland nos anos 1970, atingindo 5  $\mu\text{m}$  em meados de 1990. Essas foram desenvolvidas com a intenção de fornecer cromatografias eficientes também para compostos de menor massa molar (Kirkland 1969, Kirkland 1971, Kirkland 1992). Apesar do notável avanço tecnológico na produção das partículas *core-shell* ao longo destas décadas (entre os anos 1960 e 1990), o sucesso das colunas cromatográficas preparadas com as partículas desenvolvidas por Kirkland foi inibido pelo avanço na manufatura de partículas tradicionais, FPPs, as quais já eram disponíveis com diâmetros de 3  $\mu\text{m}$  nos anos 1990 e sub-2,0  $\mu\text{m}$  no início dos anos 2000 (Chauve, Guillarme et al. 2010, Gritti & Guiochon 2012).

Em 2007, finalmente, uma nova geração de SPPs de sílica foi desenvolvida e comercializada pela *Advanced Materials Technology*, com a denominação de Halo, e tornou-se a principal tendência em materiais de suporte para colunas utilizadas em HPLC (Gritti, Leonardis et al. 2010, Kirkland J. J. 2013, Walter & Andrews 2014, Bell & Majors 2015). Essa nova geração de partículas foi resultado dos avanços na tecnologia do processo de obtenção, que forneceu aumento da área

superficial e distribuição bastante estreita e homogênea do tamanho das partículas (Wang, Barber et al. 2012, Hayes, Ahmed et al. 2014). Essas novas partículas apresentaram, ainda, menores diâmetros e espessuras mais finas da superfície porosa quando comparadas as partículas core-shell desenvolvidas anteriormente. Com  $2,7 \mu\text{m}$  de  $d_p$  e camada porosa com  $0,5 \mu\text{m}$  de espessura, essa nova geração de partículas apresentou-se capaz de fornecer eficiências equivalentes e até superiores às colunas cromatográficas preparadas com FPPs sub- $2 \mu\text{m}$  (Fekete, Olah et al. 2012, Wang, Barber et al. 2012). Esse foi o marco de uma nova era em materiais de suporte para cromatografias líquidas altamente eficientes, uma vez que as SPPs sub- $3 \mu\text{m}$  podem ser operadas sob condições moderadas de contra-pressão ( $< 400 \text{ bar}$ ), as quais são suportadas por instrumentos convencionais de HPLC, enquanto que as FPPs sub- $2 \mu\text{m}$  necessitam de sistemas UPLC (Gritti & Guiochon 2012, Walter & Andrews 2014).

A Tabela 2.1 apresenta uma relação das principais colunas cromatográficas preparadas com SPPs comercializadas atualmente, e algumas características físicas e químicas dessas colunas (Kirkland J. J. 2013, Fekete, Guillarme et al. 2014, Bell & Majors 2015, Blue & Jorgenson 2015).

**Tabela 2.1** Relação atual das colunas comerciais para HPLC preparadas com SPPs incluindo as mais recentes SPPs sub-2  $\mu\text{m}$ .

Desenvolvedor	Partículas – denominação	$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	Tamanho de poro ( $\text{\AA}$ ) <sup>a</sup>	$\rho^b$	Fases estacionárias disponíveis
<i>Advanced Chromatography Technologies (Escócia)</i>	ACE UltraCore	2,5	90	0,64	SuperC18, SuperPhenylHexyl
		5		0,72	
<i>Advanced Materials Technology (EUA)</i>	Halo	2	90		C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, ES-CN, HILIC, Penta-HILIC
		2,7	90	0,63	C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, ES-CN, HILIC, Penta-HILIC, RP-amide
		4,7	90	0,74	C18, PFP
	Halo Peptide-ES	2,7	160	0,63	C18, CN
		3,4	160	0,88	C18, C4
		4,6	400	0,74	C18, CN
	Halo Protein 400	3,4	400	0,88	ND
<i>Agilent Technologies (Estados Unidos)</i>	Poroshell 120	2,7	120	0,63	C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC
		4	120	0,62	SP-C18, SB-C8, SB-Aq, EC-C18, EC-C8, Phenyl-Hexyl, EC-CN, Bonus-RP, Peptide-Mapping, HILIC, PFP, HPH-C18, HPH-C8 (high pH)
	Poroshell 300	5	300	0,90	C18, Extend-C18, C8, C3
	AdvanceBio	3,5	450	ND	C8, C4, Diphenyl
<i>Chromanik Technologies (Japão)</i>	SunShell	2,6	90	0,62	C18, C8, PFP, Phenyl-Hexyl, HILIC-amide
			160	0,62	C18, RP-Aqua
			300	0,62	C18, C8, C4
<i>Diamond Analytics (Estados Unidos)</i>	Flare Diamond	3,6	120	0,94	C18, C18-MM (mixed mode), C18+, HILIC
	Coreshell				
	Flare C18 Wide Pore		250	0,94	C18
<i>Fortis Technologies (Inglaterra)</i>	SpeedCore	2,6	80	0,69	C18, Diphenyl, PFP, HILIC

**Tabela 2.1 Continuação**

Desenvolvedor	Partículas – denominação	$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	Tamanho de poro ( $\text{\AA}$ ) <sup>a</sup>	$\rho^b$	Fases estacionárias disponíveis
<i>Knauer (Alemanha)</i>	<i>BlueShell</i>	2,6	80	0,62	C18, C18A, PFP, Phenyl-Hexyl
	<i>BlueShellClassic</i>	4,5	80		C18, C8
<i>Macherey Nagel (Alemanha)</i>	<i>Nucleoshell</i>	2,7	90	0,63	RP-18, RP-18 Plus, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC
		5	90	0,76	RP-18, RP-18 Plus
<i>Nacalai (Japão)</i>	<i>Tesque Cosmocore</i>	2,6	90		C18, Cholesterol
<i>PerkinElmer (Estados Unidos)</i>	<i>Brownlee SPP</i>	2,7	90	0,63	C18, C8, Phenyl-Hexyl, RP-amide, PFP, ES-CN, HILIC
	<i>Brownlee SPP Peptide-ES</i>		160	0,50	C18, C8, Phenyl-Hexyl, RP-amide, PFP, PFP, ES-CN, HILIC
<i>Phenomenex (Estados Unidos)</i>	<i>Kinetex</i>	1,3	100	0,69	C18
		1,7	100	0,73	C18, XB-C18, EVO-C18, C8, Phenyl-Hexyl, Biphenyl, PFP HILIC
		2,6		0,73	
		5		0,76	
	<i>Aeris Peptide</i>	1,7		0,73	C18
		3,6		0,72	
<i>Aeris Widepore</i>	3,6	200	0,89	C18, C8, C4	
<i>Restek (Estados Unidos)</i>	<i>Raptor</i>	2,7	90	0,63	C18, ARC-C18, Biphenyl
		5			
<i>Supelco (Estados Unidos)</i>	<i>Ascentis Express</i>	2	90	0,60	C18, F5, HILIC, OH5, ES-CN, C8, Phenyl-Hexyl
		2,7	90	0,63	C18, C8, Phenyl-Hexyl, RP-amide, F5, ES-CN, HILIC, OH5
		5		0,60	

Tabela 2.1 Continuação

Desenvolvedor	Partículas – denominação	$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	Tamanho de poro ( $\text{\AA}$ ) <sup>a</sup>	$\rho^b$	Fases estacionárias disponíveis
<i>Supelco</i> (Estados Unidos)	<i>Ascentis Express</i>	2,7	160	0,63	C18, CN
	<i>Peptide</i>	4,6	160	0,74	
	<i>BIOshell</i>	3,4	400	0,88	C4
<i>Thermo Scientific</i> (Estados Unidos)	<i>Fisher Accucore XL</i>	1,5	80	ND	C18
	<i>Accucore</i>	2,6	80	0,62	C18, C8, RP-MS, aQ, Phenyl-Hexyl, Phenyl X, PFP, Polar Premium (RP-Amide), HILIC, HILIC-urea (mesmos abaixo)
	<i>Accucore XL</i>	4	80	0,75	C30, C18, C8, C4, Phenyl-Hexyl, PFP, RP-MS, AQ, HILIC, HILIC-Amide
	<i>Accucore 150</i>	2,6	150	0,62	C18, C4, HILIC-Amide
<i>Waters</i> (Estados Unidos)	<i>Cortecs</i>	1,6	90	0,70	C18, C18+, HILIC
		2,7		0,70	
<i>YMC</i> (Alemanha)	<i>Meteoric Core</i>	2,7	80	0,63	C18, C18-Bio, C8
			160	ND	C18

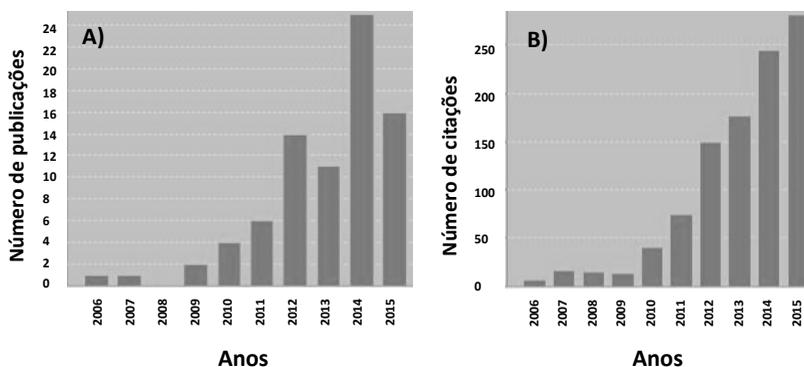
<sup>a</sup> Valores dados em média; <sup>b</sup>  $\rho$  é a razão diâmetro do núcleo sólido/diâmetro total da partícula ( $d_p$ ); <sup>c</sup> ND, dados não disponíveis.

FONTE: (Kirkland J. J. 2013, Fekete, Guillarme et al. 2014, Bell & Majors 2015).

É possível observar, nos dados apresentados na Tabela 2.1, um avanço e propagação evidentes na utilização dessas partículas em colunas cromatográficas para HPLC. Demonstração disso é a variedade de  $d_p$  e  $\rho$  disponíveis, bem como as mais recentes colunas preenchidas com SPPs sub-2  $\mu\text{m}$ . Vale informar que colunas preparadas com SPPs sub-2  $\mu\text{m}$ , também necessitam de instrumentação UPLC (Walter & Andrews 2014).

A Tabela 2.1 mostra, ainda, que as colunas com fases estacionárias C18 são disponibilizadas por todas as empresas listadas. Muitas colunas HILIC também são comercializadas, no entanto a maior parte do material disponível é simplesmente sílica não modificada (Fekete, Olah et al. 2012), a qual nem sempre oferece separações eficientes no modo HILIC (Qiu, Loukotkova et al. 2011, Padivitage, Dissanayake et al. 2013). Assim, além da expansão dos tamanhos das SPPs, modificações químicas da superfície das partículas e a expansão das aplicações para além das análises de moléculas pequenas em modo de fase reversa, foram recentemente apontadas como as principais tendências nas pesquisas envolvendo SPPs como material de suporte para colunas cromatográficas (Bell & Majors 2015). Para ilustrar essa tendência, a Figura 2.1 apresenta dados obtidos do *Web of Science* que demonstram o número de publicações e citações envolvendo SPPs utilizadas em fases estacionárias para HPLC no período entre 2005 e 2015.

**Figura 2.1** Dados obtidos do *Web of Science* para (A) publicação (B) e citação utilizando a palavra-chave *Superficially Porous Particles* (filtro: *high performance liquid chromatography*) durante o período de 2005-2015.

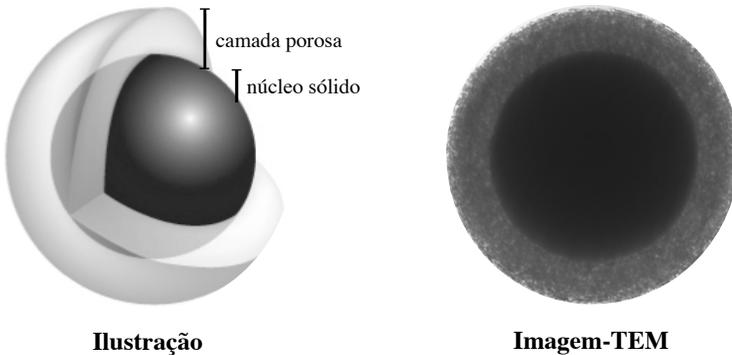


### 1.1.1 Morfologia das SPPs e o aumento da eficiência do sinal analítico

Para entender as vantagens apresentadas pelas SPPs sobre as FPPs, principalmente em termos de eficiência e tempo de análise em cromatografia, é preciso conhecer a sua morfologia e compreender a sua influência ao longo de uma separação cromatográfica.

Como descrito anteriormente, as SPPs consistem em um núcleo sólido envolto por uma camada porosa, ambos com a mesma natureza química, ou seja, sílica (DeStefano, Langlois et al. 2008, Gritti & Guiochon 2012). A Figura 2.2 apresenta um desenho ilustrativo dessas partículas, bem como uma imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão.

**Figura 2.2** Imagens de uma partícula de sílica superficialmente porosa. À esquerda, uma ilustração e, à direita, imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).



O desempenho cromatográfico de SPPs depende das propriedades da camada porosa, como a sua espessura e volume em relação ao volume total da partícula, tamanho de poro e estrutura do poro. Por exemplo, a razão entre o diâmetro do núcleo sólido e  $d_p$  varia de 0,63 à 0,74 e a fração do volume da camada porosa varia de 75% à 60% nas partículas disponíveis atualmente. Ambos, tamanho e estrutura dos poros, são fortemente afetados pelo processo de obtenção dessas partículas, que pode ser através do revestimento camada-por-camada (*layer-by-layer*), ainda pela tecnologia sol-gel ou pelo método de coacervação (GLANTREO 2012, Wang, Barber et al. 2012, Agilent-Technologies 2015). O tamanho dos poros presentes em partículas SPPs disponíveis comercialmente varia de 80-120 Å para separação de

moléculas pequenas e, em menor quantidade, de 160-400 Å para moléculas de maior massa molecular (Fekete, Guillarme et al. 2014, Bell & Majors 2015).

Para um melhor entendimento de como a morfologia das partículas com núcleo sólido afetam os parâmetros cromatográficos em termos de eficiência, seletividade/resolução e tempos de análise, é necessário investigar individualmente os termos da equação de van Deemter. Esses termos estão relacionados a dispersão das moléculas de soluto ao longo da coluna cromatográfica e, portanto, ao alargamento dos picos cromatográficos (Van Deemter, Zuiderweg et al. 1956, Gritti & Guiochon 2013).

A Equação 2.1 foi proposta por van Deemter em 1956, e é bastante utilizada ainda hoje para avaliação de desempenho de colunas cromatográficas (Van Deemter, Zuiderweg et al. 1956).

$$HETP = \frac{B}{v} + A + Cv \quad (2.1)$$

onde  $HETP$  é a altura equivalente a um prato teórico,  $v$  é a velocidade da fase móvel (ex.  $\text{mm s}^{-1}$ ),  $A$ ,  $B$  e  $C$ , são as constantes determinadas pela magnitude do alargamento de pico devido a dispersão turbulenta ou caminhos múltiplos (*eddy dispersion*), difusão longitudinal, e transferência de massa, respectivamente.

Atualmente há diferentes modelos elaborados a partir da equação de van Deemter, que consideram sistemas cromatográficos mais modernos. Um exemplo é o modelo baseado na equação de van Deemter e na equação padrão de Giddings (Giddings 2002), o qual é representado pela Equação 2.2 (Patel, Breitbach et al. 2015).

$$HETP = \frac{B}{v} + C_s v + C_{sm} v + \left( \frac{1}{\frac{1}{A} + \frac{1}{C_m v}} \right) \quad (2.2)$$

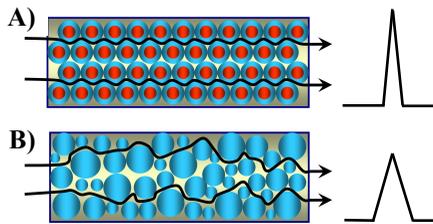
onde  $C_s$ ,  $C_{sm}$  e  $C_m$  são constantes determinadas pela transferência de massa na fase estacionária, na camada pseudo-estacionária de fase móvel e no seio da fase móvel, respectivamente. Apesar de fornecer informações mais detalhadas acerca das contribuições para o alargamento do pico, a equação original de van Deemter (Equação 2.1), por ser simples e fornecer resultados conclusivos, permanece o principal modelo utilizado na avaliação de desempenho de colunas utilizadas em HPLC.

De acordo com a teoria que envolve as SPPs, e evidências

práticas, os três parâmetros da equação de van Deemter ( $A$ ,  $B$  e  $C$ ) podem ser minimizados, o que resulta em um aumento substancial da eficiência dos picos cromatográficos. É importante ressaltar que essa afirmação é geralmente centrada apenas na morfologia dessas partículas e que outros parâmetros, embora relevantes, não são considerados.

O termo  $A$ , referente aos múltiplos caminhos que o analito percorre ao longo da coluna cromatográfica, é influenciado pelo tamanho da partícula e qualidade de preenchimento da coluna. A Figura 2.3 apresenta uma ilustração desse fenômeno no interior de uma coluna preenchida com SPPs (Figura 2.3 A) e FPPs (Figura 2.3 B).

**Figura 2.3** Representação esquemática dos caminhos múltiplos em colunas cromatográficas preenchidas com (A) partículas superficialmente porosas (B) e partículas totalmente porosas (Guillarme & Fekete 2013).



A minimização dos caminhos múltiplos pela utilização de partículas SPPs foi inicialmente atribuído à uma distribuição mais homogênea do tamanho dessas partículas ( $d_{90/10} < 1,20$ ) quando comparadas as partículas totalmente porosas ( $d_{90/10} < 1,3-2,0$ ), o que proporciona um preenchimento também mais homogêneo (Wang, Barber et al. 2012, Hayes, Ahmed et al. 2014). Outro fator determinante para a minimização do termo  $A$  está relacionado a maior rugosidade da superfície dessas partículas quando comparadas as FPPs (DeStefano, Langlois et al. 2008, Hayes, Ahmed et al. 2014). Embora seja muito mais difícil preencher colunas cromatográficas utilizando partículas de núcleo sólido (Blue and Jorgenson 2015), uma vez que ocorre o preenchimento, as forças de atrito entre as partículas são tão grandes que o deslizamento entre elas é praticamente eliminado. Por outro lado, por apresentarem superfícies mais lisas, o deslizamento das FPPs é intensificado durante o processo de consolidação da fase estacionária no interior da coluna, resultando em um preenchimento menos homogêneo (Hayes, Ahmed et al. 2014).

A redução do termo  $B$ , correspondente a difusão longitudinal, é

explicada devido a redução do volume intersticial, ou seja, do espaço vazio, que existe no interior de uma coluna cromatográfica quando essa é preenchida com SPPs. Acredita-se que o volume ocupado por essas partículas é cerca de 20-30% superior àquele ocupado pelas FPPs, o que resulta numa menor difusão longitudinal ao longo de uma corrida cromatográfica. Além disso, a redução do volume acessível no interior de uma coluna cromatográfica acarreta uma diminuição significativa do volume morto da coluna, diminuindo, assim, o tempo de análise. Essa, junto ao aumento da eficiência do sinal analítico, correspondem as grandes vantagens da utilização das SPPs como material de suporte em colunas para HPLC (Hayes, Ahmed et al. 2014).

O modelo descrito por Hayes e colaboradores demonstra claramente a influência da redução do volume poroso das partículas sobre a difusão longitudinal no interior da coluna cromatográfica (Hayes, Ahmed et al. 2014), e descreve que um valor mínimo de  $B$  é obtido quando o analito apresenta menor retenção ou, ainda, quando a partícula utilizada como suporte não apresenta qualquer porosidade (volume acessível mínimo) (Hayes, Ahmed et al. 2014).

Além da redução dos caminhos múltiplos (termo  $A$ ) e da difusão longitudinal no interior da coluna (termo  $B$ ), a presença do núcleo sólido em SPPs proporciona a diminuição do termo  $C$  da equação de van Deemter, o qual corresponde a contribuição da transferência de massa no processo de alargamento do pico cromatográfico. A minimização ocorre principalmente devido a diminuição do caminho de difusão, causada pela presença do núcleo sólido impenetrável nas SPPs, quando comparada as FPPs de diâmetros similares, e até menores. Essa característica implica na diminuição da difusão intra-particular, ou processo de adsorção-desorção e, principalmente, na diminuição da resistência à transferência de massa no filme externo de fase móvel que se forma em torno da superfície da fase estacionária (Gritti, Leonardis et al. 2010, Wang, Barber et al. 2012, Lambert, Kiss et al. 2014).

A intenção inicial do desenvolvimento das partículas SPPs era, de fato, reduzir o caminho de difusão (distância correspondente a espessura da camada porosa) em relação as tradicionais FPPs, reduzindo assim a resistência à transferência de massa interna (Wang, Barber et al. 2012). Esse caminho reduzido na morfologia das SPPs permitiria uma difusão mais rápida do soluto de dentro para fora da estrutura porosa. Esse fenômeno resulta numa perda de eficiência menos acentuada quando a velocidade da fase móvel é aumentada, ou seja, permite tempos de análise extremamente reduzidos pelo aumento do fluxo da fase móvel, sem perdas representativas da eficiência dos picos

cromatográficos. Essa corresponde a uma das vantagens mais evidentes da utilização de SPPs como material de suporte em colunas de *HPLC* (DeStefano, Langlois et al. 2008). No entanto, é importante adicionar que esse ganho é acentuado principalmente para moléculas maiores, em geral com massa molecular  $> 600 \text{ g mol}^{-1}$ , as quais foram as principais inspirações para o surgimento das SPPs nos final dos anos 1960 (Horvath, Preiss et al. 1967, DeStefano, Langlois et al. 2008, Gritti & Guiochon 2013, Gritti & Guiochon 2014, Spudeit, Dolzan et al. 2014).

Além da massa molar dos analitos, da velocidade da cinética de adsorção-desorção, do tamanho e da morfologia das partículas utilizadas como material de suporte nas colunas cromatográficas, a literatura reporta ainda a influência de outros fatores como temperatura e natureza de algumas fases móveis no processo de transferência de massa dos analitos (Gritti & Guiochon 2007, DeStefano, Langlois et al. 2008, Gritti & Guiochon 2013, Gritti & Guiochon 2014). No entanto, o sistema sob condições de RP e coluna C18 é o mais aplicado e estudado quando se refere às SPPs (Gritti, Leonardis et al. 2010), o que limita as muitas informações acerca do comportamento destas partículas nas diversas condições experimentais. Outros modos operacionais, como HILIC, são raramente explorados, sendo, os dados disponíveis, insuficientes para a sua compreensão. Esse fato junto a vasta aplicabilidade da HILIC atualmente, demonstram uma necessidade urgente em estudos que auxiliem na compreensão dos fenômenos que ocorrem em sistemas HILIC-SPPs e, assim, possa ser ampliada de maneira eficaz a gama de aplicação desses sistemas.

Para uma melhor compreensão do que foi exposto acima, bem como dos resultados obtidos neste trabalho, o próximo item irá abordar os principais aspectos relacionados à HILIC.

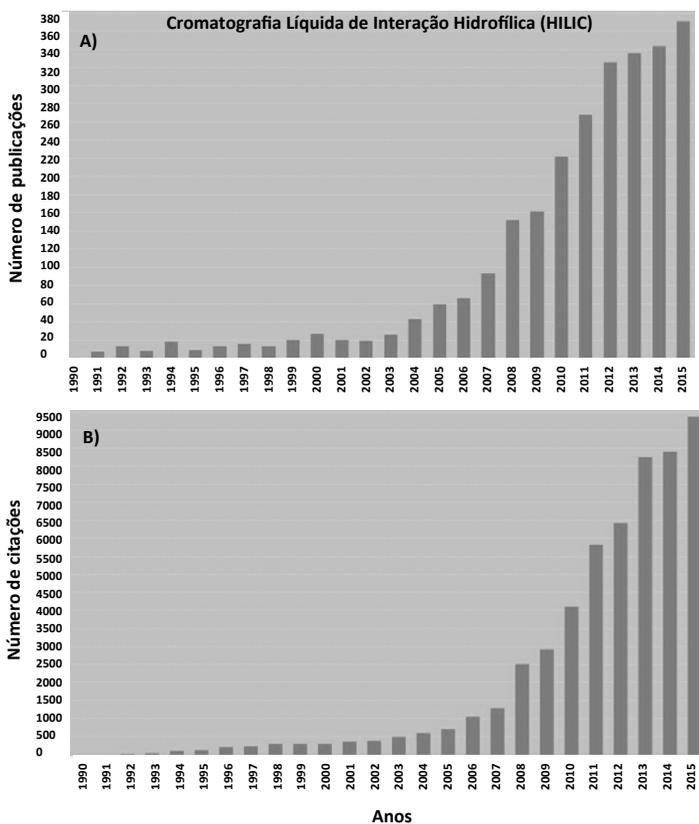
## *1.2 Cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC)*

Quando se trata da análise de compostos muito polares, como íons inorgânicos, aminoácidos, açúcares, dentre outros, as técnicas de cromatografia líquida tradicionais (RP, NP e IC) apresentam limitações: em RP os analitos não são suficientemente retidos na fase estacionária; em NP, os analitos podem apresentar-se insolúveis na fase móvel, que é altamente apolar ou fracamente polar e; em IC os analitos devem apresentar-se necessariamente ionizados (Buszewski & Noga 2012). Uma alternativa abrangente é, então, a utilização do modo HILIC, cuja denominação foi introduzida em 1990, quando, de fato, começou a receber atenção de pesquisadores em todo o mundo (Pesek, Matyska et

al. 2011, Buszewski & Noga 2012). Inicialmente sua aplicação foi na determinação de carboidratos, peptídeos e aminoácidos, tendo se estendido, nos últimos anos, para análises de fármacos polares e compostos biologicamente importantes estudados em diversas ciências “ômicas” (metabolômica, proteômica, genômica) (Liu, Chen et al. 2008, Jandra 2011).

Quando comparado aos demais modos de operação em cromatografia líquida, o modo HILIC é considerado recente, no entanto a sua atual relevância, dada pela sua vasta aplicabilidade, pode ser observada através dos gráficos apresentados na Figura 2.4, obtidos do *Web of Science* com dados registrados entre os anos 1990 e 2015.

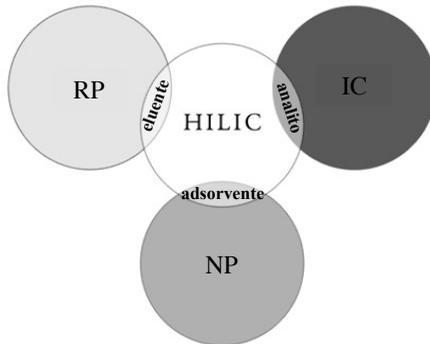
**Figura 2.4** Dados obtidos do *Web of Science* para (A) publicação (B) e citação utilizando a palavra-chave “*hydrophilic interaction liquid chromatography*” durante o período de 1990-2015.



Como pode ser observado na Figura 2.4, tanto o número de publicações quanto de citações envolvendo a palavra-chave “*hydrophilic interaction liquid chromatography*” demonstram a relevância atual e ascendente desde a sua introdução, em 1990.

A HILIC é considerada, por alguns autores, uma ponte entre a RP e a NP, por outros uma subdivisão especial da NP e, ainda, a HILIC é descrita como “cromatografia de compostos polares e iônicos sob condições de RP” (Wang, Jiang et al. 2008). Isso se deve ao fato de que, em HILIC, as fases estacionárias são, principalmente, modificações polares da sílica ou de polímeros (SiOH, amino, diol, compostos zwitteriônicos, etc), como ocorre em NP; os eluentes, ou fases móveis, são misturas de soluções aquosas e um modificador orgânico, como em RP, porém com concentrações elevadas de ACN e; os campos de aplicação incluem íons orgânicos e inorgânicos, como em IC, além de compostos polares neutros. O diagrama da Figura 2.5 é uma ilustração da HILIC como resultado da combinação entre características presentes nos três modos cromatográficos citados (Buszewski & Noga 2012).

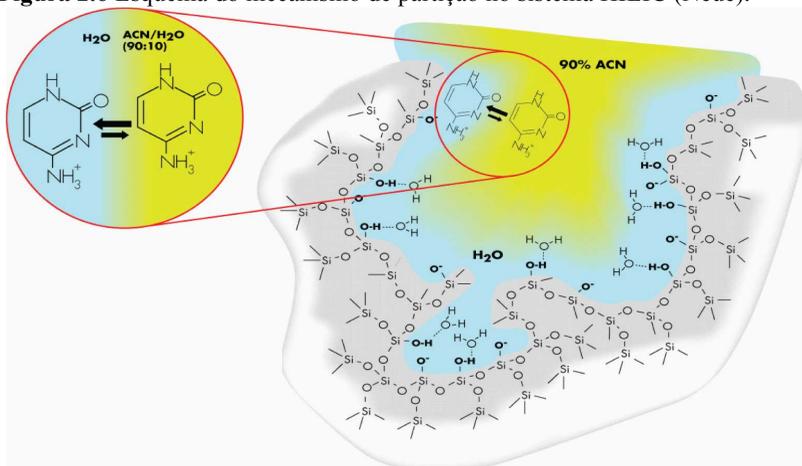
**Figura 2.5** HILIC como resultado da combinação entre os três principais modos em cromatografia líquida: fase reversa (RP), fase normal (NP) e troca-iônica (IC).



No entanto, para um mecanismo HILIC, é necessária a utilização de uma fase móvel composta por água e elevadas concentrações de um solvente orgânico miscível, tipicamente ACN, em concentrações entre 50-95% (Pesek, Matyska et al. 2011, Buszewski & Noga 2012).

Diferente dos mecanismos que regem as separações por RP e NP, os quais já são bem estabelecidos, no modo HILIC os mecanismos de separação permanecem sendo discutidos na literatura. Sabe-se, no entanto, que a partição e a adsorção podem ocorrer individual ou simultaneamente (Gritti, Holtzel et al. 2015). Além disso, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, íon-dipolo, dentre outras, podem fazer parte do equilíbrio entre fase estacionária-analito-fase móvel, o que irá depender do revestimento da coluna, da proporção e natureza dos componentes da fase móvel e da natureza dos analitos (Buszewski & Noga 2012). O principal aspecto de um mecanismo HILIC, porém, decorre da partição do analito no filme aquoso semi-estacionário, o qual é formado pela adsorção da água na superfície da fase estacionária. Esse fenômeno é ilustrado na Figura 2.6 (Qiu, Loukotchova et al. 2011, Buszewski & Noga 2012).

**Figura 2.6** Esquema do mecanismo de partição no sistema HILIC (Neue).



Há inúmeras fases estacionárias que podem ser aplicadas em HILIC, desde fases simples como superfícies de sílica pura ou hidretos de sílica, ou modificadas com grupamentos ciano, diol, amino, amida, dentre outros, até polímeros altamente complexos, surfactantes iônicos, não iônicos e compostos zwitteriônicos. Todas essas variedades apresentadas são preparadas utilizando, principalmente, FPPs de sílica como material de suporte (Jandera 2011). Como descrito anteriormente, quando trata-se de fases estacionárias HILIC preparadas com SPPs, a maior parte do material estudado e disponível comercialmente é simplesmente sílica não modificada (Fekete, Olah et al. 2012).

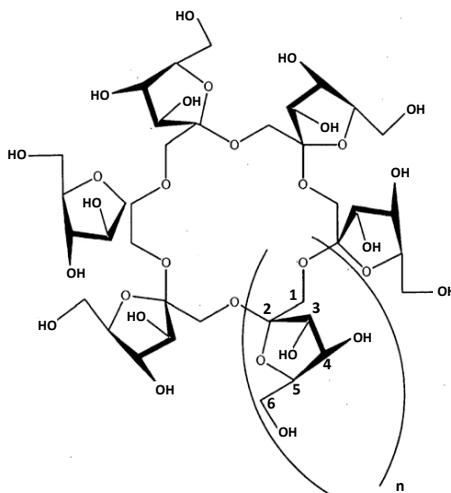
Em 2011, uma nova classe de seletores para separações de compostos polares utilizando HILIC foi introduzida pelo grupo de pesquisa do professor Daniel W. Armstrong (Qiu, Loukotkova et al. 2011). Baseadas em CF6 quimicamente ligado a FPPs de sílica, as novas colunas apresentaram vantagens na separação de diferentes grupos de compostos, quando comparadas a outras colunas largamente utilizadas no modo HILIC.

### 1.3 Ciclofrutanos (CFs)

A obtenção de CFs foi reportada pela primeira vez por Kawamura e Uchiyama, em 1989. De acordo com os autores, os produtos foram obtidos a partir da fermentação da inulina utilizando uma enzima extracelular denominada cicloinulo-oligossacarídeo frutanotransferase (CFTase), a partir do microrganismo *Bacillus circulans* (OKUMZ31B) (Kawamura, Uchiyama et al. 1989). Mais tarde, em 1994, Kushibe e colaboradores reportaram uma segunda cepa do *Bacillus circulans* (MCI-2554), que demonstrou maior eficiência na produção de CFs. Atualmente, os modos de obtenção são diversos, incluindo a incubação da inulina com CFTase isolada ou ainda a incorporação do gene específico da CFTase em células de leveduras comuns, como *Saccharomyces cerevisiae*, o que diminuiu consideravelmente os custos do procedimento.

Os CFs pertencem à classe de oligossacarídeos cíclicos, junto às bem estabelecidas CDs, entretanto com estrutura e comportamento bastante distintos. A estrutura química dos CFs consiste em seis ou mais unidades de D-frutofuranose ligadas pelas posições  $\beta$ -(2,1) à uma estrutura central que se apresenta idêntica aos respectivos éteres de coroa. São denominados CF<sub>x</sub>, onde *x* é o número de unidades de D-frutofuranose, sendo normalmente 6, 7 ou 8. Cada uma dessas unidades contém quatro centros estereogênicos e três grupos hidroxilas, que apresentam papel importante nas suas propriedades físico-químicas. A estrutura molecular básica dos CF<sub>x</sub> é mostrada na Figura 2.7.

**Figura 2.7** Estrutura básica dos ciclofrutanos onde  $n$  é 1, 2 ou 3, para CF6, CF7 ou CF8, respectivamente.



Dentre os CFs, o CF6 tem atraído maior atenção principalmente devido a sua disponibilidade na forma pura e sua geometria bem definida. Portanto, utilizando como exemplo a estrutura do CF6, apresentada na Figura 2.7, das seis hidroxilas ligadas nas posições 3, uma metade está direcionada para fora do ciclo, enquanto a outra metade direcionada para dentro da coroa, de maneira intercalada. Essas últimas se apresentam muito próximas umas das outras ( $\sim 3 \text{ \AA}$ ), fazendo com que o acesso ao núcleo 18-coroa-6 de um dos lados do macrocíclico seja bloqueado pelas ligações de hidrogênio formadas entre os grupos hidroxilas. Dados cristalográficos e computacionais confirmam a natureza hidrofílica de um dos lados do CF, e lado oposto, hidrofóbico (Sun, Wang et al. 2009). Tal característica faz com que o comportamento dos CFs seja extremamente distinto do comportamento apresentado pelos respectivos éteres de coroa, bem como pelas CDs, cuja cavidade hidrofóbica é capaz de acomodar analitos da mesma natureza. Outra importante característica estrutural dos CFs é a possibilidade de derivatizações diversas, o que os torna ainda mais interessantes e lhes possibilita uma gama de aplicações (Sun, Wang et al. 2009, Padivitage & Armstrong 2011, Qiu, Loukotkova et al. 2011).

Durante muitos anos, CFs nas suas formas nativas foram largamente utilizados como aditivos em diversos produtos industriais, como agentes em formulações de tintas, preservativo de escurecimento e

aditivos alimentares. No entanto, e apesar de já serem conhecidos há mais de 20 anos, apenas recentemente despertou-se o interesse em utilizá-los como seletores em técnicas de separação e, com isso, também o interesse no desenvolvimento de derivados de CFs capazes de fornecer características distintas para separação de compostos de diferentes naturezas.

Em 2009, o grupo de pesquisa do professor Daniel W. Armstrong desenvolveu fases estacionárias a base de CFs para separações enantioméricas por HPLC (Sun, Wang et al. 2009). Dentre os seletores quirais mais eficientes, destacaram-se os derivados isopropílico e R-naftil, os quais são atualmente comercializados como as colunas cromatográficas LARIHC-P e LARIHC-RN, respectivamente. Os CFs foram ainda utilizados em separações quirais por cromatografia gasosa (Zhang, Breitbach et al. 2010) e eletroforese capilar (Jiang, Tong et al. 2009). Apenas mais tarde, em 2011, Armstrong e colaboradores reportaram a utilização de fases estacionárias a base de CF6 nativo e do derivado sulfonado em separações de compostos polares utilizando *HILIC* (Padivitage & Armstrong 2011, Qiu, Loukotkova et al. 2011).

No trabalho pioneiro, realizado por Qiu e colaboradores, os autores desenvolveram três diferentes colunas cromatográficas a base de CF6, duas a base de CF6 nativo com maior e menor grau de substituição. As características dessas três fases foram avaliadas e comparadas com três diferentes colunas polares disponíveis comercialmente: Diol, Cyclobond I 2000 (a base de  $\beta$ -CD) e ZIC-HILIC (a base de sulfobetaina). Os resultados obtidos para a separação de bases de ácidos nucleicos, nucleosídeos, xantinas,  $\beta$ -bloqueadores, carboidratos, além do ácido salicílico e seus derivados, demonstraram vantagens, como estabilidade, eficiência e reprodutibilidade, das novas colunas desenvolvidas sobre as colunas comerciais avaliadas (Qiu, Loukotkova et al. 2011).

Dado o excelente desempenho das novas fases estacionárias desenvolvidas por Qiu e colaboradores, a coluna a base de CF6 nativo ligado a FPPs de sílica foi patenteada, e comercializada pelas empresas *AZYP* e *Supelco Sigma-Aldrich*, como FRULIC-N (Padivitage, Dissanayake et al. 2013). Essa coluna pode, ainda, ser utilizada em outros modos de separação cromatográfica, o que amplia ainda mais a sua aplicabilidade.

Dessa forma, este trabalho descreve o desenvolvimento de uma coluna cromatográfica a base de CF6 nativo, quimicamente ligado à SPPs, para um estudo comparativo acerca das vantagens de se utilizar

partículas dessa natureza como material de suporte. Ainda, considerando a escassez de informações sobre o comportamento do sistema HILIC utilizando SPPs, este trabalho busca ampliar os conhecimentos e a compreensão dos fenômenos que ocorrem ao longo de uma corrida cromatográfica realizada sob as condições abordadas.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma nova coluna cromatográfica baseada em CF6 nativo quimicamente ligado em SPPs de sílica para aplicação em HILIC e comparar o desempenho cromatográfico com aqueles apresentados por colunas similares desenvolvidas com FPPs.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar fases estacionárias para HPLC baseadas em CF6 nativo quimicamente ligados a FPPs 5  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$ , e SPPs sub-3  $\mu\text{m}$ ;
- Caracterizar as fases estacionárias desenvolvidas através da análise elemental de CHN;
- Calcular o grau de substituição de CF6 nas fases estacionárias através da porcentagem em massa bem como do grau de substituição efetivo ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) considerando a área superficial média de cada tipo de partícula utilizada como material de suporte;
- Desenvolver a coluna cromatográfica a base de FPPs 5  $\mu\text{m}$ , utilizando as condições estabelecidas pela empresa AZYP para obtenção das colunas FRULIC-N;
- Otimizar as condições experimentais para preenchimento das colunas baseadas em SPPs avaliando a composição química e concentração do *slurry*, volume e composição do *push solvent* e pressão exercida;
- Avaliar o desempenho das colunas desenvolvidas, em termos de número de pratos ( $N$ ) e altura equivalente a um prato teórico ( $HETP$ ), simetria de pico e construir gráficos de van Deemter utilizando diferentes grupos de compostos e composições de fase móvel utilizando o modo HILIC;
- Obter o fluxo ótimo de fase móvel, em termos de eficiência ( $HETP_{min}$ ), para cada sistema avaliado (fase móvel/analito);
- Calcular parâmetros cromatográficos como  $k'$ ,  $R_s$ ,  $\alpha$  e capacidade de pico para as colunas cromatográficas otimizadas;
- Comparar o desempenho das colunas desenvolvidas a base de FPPs 5  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$  e SPPs;
- Avaliar o desempenho das colunas sob condições de NP;

- Comparar os resultados em termo de eficiência e o perfil dos gráficos de van Deemter obtidos no modo HILIC e no modo de NP;
- Discutir os resultados com base nas diferentes morfologias das partículas utilizadas como material de suporte bem como nos diferentes modos cromatográficos avaliados.

### 3 Experimental

#### 3.1 Materiais

N,N-dimetilformamida anidro (DMF), tolueno, piridina anidra, 3-(trietoxisilil)propil isocianato, acetato de amônio (NH<sub>4</sub>OAc), nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), ácido trifluoracético (TFA) e todos os analitos utilizados neste trabalho (ácido 5-fenilvalérico, ácido ferúlico, piridoxina, ácido L-ascórbico, uracil, adenosina, citosina, adenosina 2',3'-monofosfato cíclico (cAMP), citidina 2',3'-monofosfato cíclico (cCMP), guanosina 2',3'-monofosfato cíclico (cGMP), timidina 3',5'-monofosfato cíclico (cTMP), 1,3-dinitrobenzeno (1,3-DNB),  $\alpha$ -tocoferol, (R)-(+)-2'-amino-1,1'-binaftalen-2-ol (*R-NOBIN*) e 1,3,5-tri-*t*-butilbenzeno) foram obtidos da empresa *Sigma-Aldrich* (Milwaukee WI, EUA). O CF6 nativo foi fornecido pela *AZYP, LLC* (Arlington TX, EUA). ACN, acetona, clorofórmio, diclorometano, etanol (EtOH), éter etílico, heptano (Hep), isopropanol (IPA), MeOH e tolueno foram obtidos da empresa *EMD* (Gibbstown NJ, EUA). A água utilizada foi purificada utilizando o sistema *Milli-Q* (Millipore, Billerica MA, EUA).

As FPPs com 5  $\mu\text{m}$  de  $d_p$  foram compradas da Daiso (Osaka, Japão); as FPPs com 3  $\mu\text{m}$  foram obtidas da empresa Daiso (Osaka, Japão) e Glantreo (Cork, Irlanda); e as SPPs foram fornecidas pelas empresas Glantreo (Cork, Irlanda), com  $d_p$  de 2,6  $\mu\text{m}$ , e Agilent Technologies (Santa Clara CA, EUA), com  $d_p$  de 2,7  $\mu\text{m}$ .

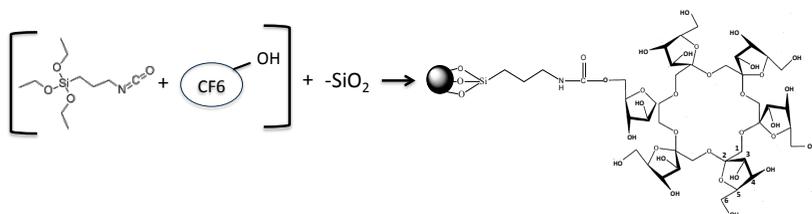
#### 3.2 Síntese das fases estacionárias

CF6 nativo foi quimicamente ligado a sílica gel utilizando procedimento descrito na literatura (Qiu, Loukotkova et al. 2011). 50 mL de DMF anidro foram adicionados à 3,34 g de CF6 (972,84 g mol<sup>-1</sup>; 97%) previamente pesados e transferidos para um balão de fundo redondo de duas bocas. Sob agitação foram adicionados 3,58 mL do ligante 3-(trietoxisilil)propil isocianato (247 g mol<sup>-1</sup>; 0,999 g mL<sup>-1</sup>; 95%) previamente dissolvidos em 15 mL de piridina anidra. A mistura foi mantida sob atmosfera inerte e aquecimento (90-95 °C) por 5 horas.

Cerca de uma hora antes de finalizar essa etapa do procedimento, uma mistura de 5 g de sílica anidra em 125 mL de tolueno foi mantida sob refluxo para retirada da água residual em forma de mistura azeotrópica tolueno-água (25 mL), para o qual foi utilizado um coletor do tipo Dean-stark. Após finalizados os processos, as misturas mantiveram-se sob agitação até atingirem a temperatura ambiente. A solução contendo o produto da reação CF6-ligante foi então adicionada ao segundo balão contendo as partículas de sílica (FPPs, SPPs) em tolueno anidro. Esta mistura foi mantida sob refluxo em atmosfera inerte, por cerca de 12 horas (*overnight*). Finalmente, o aquecimento foi interrompido e a temperatura ambiente atingida naturalmente. O produto final foi filtrado com auxílio de vácuo em filtro com porosidade adequada para cada tipo de partícula utilizada, e lavado com aproximadamente 100 mL de tolueno, seguido pelo mesmo volume de diclorometano, éter etílico, IPA, MeOH, água e, por fim, acetona. Por fim, foi seco sob vácuo por no mínimo 12 horas antes de ser utilizado para o preparo das colunas cromatográficas.

O mesmo procedimento foi empregado para desenvolver todas as fases estacionárias utilizadas neste trabalho. Os produtos foram caracterizados por análise elementar de CHN, realizada pela *Interlek Pharmaceutical Services* (Nova Jersey, EUA) em duplicata, e o grau de substituição de CF6 na sílica foram calculados com base na porcentagem de carbono obtidas. Um esquema das etapas da síntese das fases estacionárias desenvolvidas neste trabalho é apresentado na Figura 2.8.

**Figura 2.8** Esquema de síntese das fases estacionárias.



### 3.3 Instrumentação

#### 3.3.1 Obtenção das colunas cromatográficas

Todas as colunas cromatográficas preparadas neste trabalho foram de dimensões 150 mm × 4,6 mm d.i.

A instrumentação utilizada para o preenchimento das colunas, pertencente a empresa AZYP, consistiu em uma bomba de líquido de alta pressão (HASKEL DSTV-122), com acionamento pneumático e pressão constante. Um reservatório de ar comprimido e outro para o *push solvent*; um conjunto de válvulas para controle de pressão, bem como da entrada e saída de ar e de líquido; e uma torre cilíndrica oca de aço inoxidável em posição vertical, formaram o sistema. A extremidade de entrada das colunas cromatográficas a serem preenchidas foram devidamente encaixadas na parte inferior da torre, permanecendo em posição vertical. Imediatamente abaixo da extremidade de saída (adicionada à frita e à peça terminal de aço inoxidável), um reservatório graduado foi posicionado para coleta dos resíduos e controle do volume de sucção do *push solvent*.

Para todas as colunas cromatográficas desenvolvidas, foi realizado o seguinte procedimento: foi realizado o preparo do *slurry* (o qual corresponde a uma mistura heterogênea formada por partículas de fase estacionária e uma fase líquida) e este mantido por 10 minutos em banho ultrassônico; em seguida, foi adicionado cuidadosamente ao sistema de preenchimento através da extremidade superior da torre e com o auxílio de um funil (nota: essa etapa deve ser realizada de forma rápida, para evitar a sedimentação das partículas do *slurry* e, cuidadosa, para evitar a formação de bolhas de ar no interior da coluna cromatográfica e da torre); imediatamente após a adição de todo o volume ao sistema, a torre foi preenchida com *push solvent* e, em seguida, a extremidade superior da torre foi devidamente vedada. As válvulas para controle de pressão e volume de ar e líquido foram, então, acionadas para dar início ao processo de preenchimento da coluna. A pressão de 12000 psi foi mantida durante todo o procedimento, ou seja, até a passagem do volume pré-estabelecido de solvente ao longo da coluna. Em seguida a aplicação da pressão foi interrompida e, apenas após atingir a pressão atmosférica, o sistema foi aberto para retirada da coluna sem perdas significativas de fase estacionária. Nesse momento foi importante observar se a coluna estava, de fato, completamente preenchida. Após o procedimento, a extremidade superior da coluna foi tampada adequadamente e iniciado o processo de lavagem e condicionamento. Finalizada essa etapa, as colunas foram completamente vedadas com terminal de PEEK (poliéter éter cetona) e estocadas até serem utilizadas.

A coluna FRULIC-N foi obtida de acordo com o protocolo estabelecido pela empresa AZYP. A partir de algumas modificações das

condições utilizadas para a FRULIC-N, foi obtida a coluna cromatográfica baseada em FPPs de 3  $\mu\text{m}$ . As condições experimentais para obtenção da nova coluna preparada com SPPs foram otimizadas considerando-se o grau de dispersão das partículas, o qual é influenciado pela polaridade e viscosidade dos solventes do *slurry*; a concentração do mesmo; volume e densidade do *push solvent* e miscibilidade deste último no *slurry*; e pressão exercida no processo de preenchimento.

O processo de lavagem, realizado após o preenchimento, envolveu cerca de 10 volumes de água deionizada, para retirada de todo o sal presente no interior da coluna, seguido de 10 volumes de IPA. Em seguida cerca de 500 mL de solução contendo ACN/NH<sub>4</sub>OAc 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi utilizado para o condicionamento. Tanto o processo de lavagem quanto o de condicionamento foram realizados utilizando bombas de HPLC.

As condições experimentais ótimas para obtenção da coluna a base de SPPs desenvolvida neste trabalho consistiram em um *slurry* composto por uma mistura de CHCl<sub>3</sub>/MeOH, com elevada concentração de CHCl<sub>3</sub>, concentração de partículas de cerca de 15 mg mL<sup>-1</sup>, e um volume adequado de tolueno utilizado como *push solvent*. As SPPs *Agilent* com  $d_p$  de 2,7  $\mu\text{m}$  apresentaram resultados mais satisfatórios e foram, então, selecionadas para obtenção da coluna final utilizada nos demais estudos realizados neste trabalho.

O processo de lavagem da coluna a base de SPPs foi similar ao aplicado para as colunas FPPs 5  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$ , porém utilizando cerca de 10 volumes de MeOH foram inicialmente utilizados para retirada de todo o tolueno. Em seguida foi dada continuidade ao procedimento mantendo as mesmas condições de lavagem e condicionamento descritas anteriormente.

### 3.3.2 Avaliação de desempenho

As separações cromatográficas foram conduzidas em um sistema HPLC *Agilent* série 1200 (*Agilent Technologies*, Santa Clara CA, EUA), equipado com bomba quaternária, um auto-amostrador e detector com arranjo de diodos. Para aquisição dos dados e monitoramento das análises foi utilizado o *software Chemstation* versão Rev.B.03.02 [341]. O volume de injeção foi de 0,5  $\mu\text{L}$  e a temperatura mantida à 30 °C durante todas as análises. A concentração dos analitos foi entre 30 e 60 mg L<sup>-1</sup>. As fases móveis usadas no modo HILIC foram

compostas por 75-95% de ACN e 5-25% de solução aquosa contendo 25 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OAc, exceto para os nucleotídeos cíclicos, para os quais se utilizou fase móvel composta por ACN/100 mM de NH<sub>4</sub>OAc (70/30, v/v). Para as análises realizadas em condições de NP, Hep/IPA e Hep/EtOH foram utilizados em diferentes proporções e 0,1% de TFA foi adicionado ao EtOH para a determinação do ácido ferúlico. Para o cálculo das eficiências foram utilizadas as larguras dos picos obtidas à meia altura.

## 4 Resultados e Discussões

Primeiramente, para o desenvolvimento de novos materiais e, no caso deste trabalho, de novas colunas cromatográficas, é importante trabalhar com materiais que atuem como referência, para que estudos comparativos possam ser realizados. Portanto, para garantir uma melhor compreensão acerca da nova coluna cromatográfica desenvolvida a base de SPPs, todo o desenvolvimento e discussões deste trabalho foram realizados comparando-se os resultados obtidos com aqueles apresentados pelas colunas a base de FPPs.

Para isso, as partículas de sílica utilizadas para o preparado das fases estacionárias foram escolhidas cuidadosamente. As SPPs com cerca de 2,7 µm de  $d_p$ , e não menores, foram escolhidas para que instrumentos tradicionais de HPLC pudessem ser utilizados. A partir daí, para manter valores similares de  $d_p$ , foram escolhidas as FPPs de 3 µm, o que permitiu que informações exclusivamente acerca da influência da natureza das partículas pudessem ser obtidas. Por fim, as FPPs de 5 µm foram escolhidas pois compõem a única coluna comercial (FRULIC-N) desenvolvida com o seletor, CF6 nativo, utilizado neste trabalho.

### 4.1 Preparo das fases estacionárias

Os resultados obtidos para a análise elementar dos materiais de preenchimento são importantes para o entendimento do desempenho das colunas cromatográficas, bem como para avaliar possíveis implicações causadas pelas diferentes morfologias das partículas de sílica no processo de síntese. A partir da porcentagem de carbono obtida na análise elementar de CHN foi possível calcular os graus de substituição, relativo e absoluto, das fases estacionárias desenvolvidas neste trabalho. A Tabela 2.2 apresenta algumas características referentes as partículas

de sílica utilizadas como material de suporte e as respectivas fases estacionárias.

**Tabela 2.2** Resultado das análises de CHN e parâmetros físicos das partículas de sílica utilizadas como material de suporte e o grau de substituição de CF6 nas fases estacionárias desenvolvidas.

FASE ESTACIONÁRIA – Ciclofrutano-6 nativo							
Partículas	C %	N %	$d_p$ - $\mu\text{m}^b$	Porosidade <sup>b</sup>	Área superficial - $\text{m}^2 \text{g}^{-1b}$	CF6 <sup>a</sup> - $\mu\text{mol m}^{-2}$	CF6 <sup>a</sup> - % m/m
<i>FPPs 5<math>\mu\text{m}</math> Daiso</i>	14,14	1,1	4,3	100 %	465	0,72	32,2
<i>FPPs 3 <math>\mu\text{m}</math> Daiso</i>	14,98	1,1	3,1	100 %	444	0,61	34,1
<i>FPPs 3 <math>\mu\text{m}</math> 204 Glantreo</i>	6,45	0,32	3,1	100 %	204	0,59	14,7
<i>FPPs 3 <math>\mu\text{m}</math> 300 Glantreo</i>	12,28	0,69	3,0	100 %	300	0,91	27,9
<i>SPPs 2,6 <math>\mu\text{m}</math> Glantreo</i>	4,04	0,32	2,6	67 %	139	0,51	9,2
<i>SPPs 2,7 <math>\mu\text{m}</math> Agilent</i>	5,62	0,23	2,7	75%	120	0,86	12,8

<sup>a</sup> valores obtidos a partir da porcentagem de carbono. Legenda: FPPs e SPPs, correspondem as partículas totalmente porosas e superficialmente porosas, respectivamente;  $d_p$  é o diâmetro total da partícula. Em destaque (fundo cinza) estão as fases estacionárias utilizadas na obtenção das colunas cromatográficas selecionadas para este trabalho; <sup>b</sup> Dados fornecidos pelo fabricante.

Como pode ser visto na Tabela 2.2, o grau de substituição efetivo obtido para as fases estacionárias selecionadas para o desenvolvimento deste trabalho, variou de 0,72  $\mu\text{mol m}^{-2}$  para as FPPs de 5  $\mu\text{m}$  e 0,91  $\mu\text{mol m}^{-2}$  para o sistema com FPPs 3  $\mu\text{m}$  300. O material a base de SPPs teve uma substituição efetiva de 0,86  $\mu\text{mol m}^{-2}$ , a qual apresentou-se levemente superior a apresentada pela fase estacionária utilizada na coluna FRULIC-N e similar a apresentada pelas FPPs de 3  $\mu\text{m}$  300. Esses resultados demonstram que a metodologia reportada para a síntese de CF6 nativo ligado a FPPs de 5  $\mu\text{m}$  (Qiu, Loukotkova et al. 2011) pode ser aplicado também para partículas FPPs de diâmetros menores e SPPs. Os graus de substituição relativos, obtidos em porcentagem m/m de CF6, apresentaram-se de acordo com o esperado para essas três partículas, considerando as suas áreas superficiais: uma maior substituição ocorreu nas FPPs 5  $\mu\text{m}$  Daiso, seguida pelas FPPs 3  $\mu\text{m}$  300 Glantreo e, por fim, a menor % de CF6 foi apresentada pela fase estacionária preparada com SPPs 2,7  $\mu\text{m}$  Agilent.

É importante atentar ao grau de substituição absoluto das fases estacionárias selecionadas, uma vez que a sílica remanescente, não modificada, influencia significativamente no processo de separação, especialmente em modo HILIC. Como é observado na Tabela 2.2, a fase estacionária a base de SPPs apresenta menos da metade da quantidade absoluta de CF6 presente nas fases preparadas com FPPs de 5  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$  300. O recobrimento absoluto certamente pode afetar as propriedades cromatográficas observadas para essas colunas.

Os resultados obtidos para as demais fases estacionárias desenvolvidas, em termos de substituição efetiva, foram significativamente inferiores quando comparadas as demais com  $d_p$  similar. Essa característica pode ter influenciado nos resultados obtidos nas avaliações de desempenho das colunas preparadas com essas partículas, os quais serão descritos adiante.

#### 4.2 Obtenção das colunas cromatográficas

##### 1ª etapa) FPPs 5 $\mu\text{m}$ (FRULIC-N)

Para o desenvolvimento da coluna preparada com FPPs 5  $\mu\text{m}$  foram utilizadas as condições experimentais já estabelecidas pela empresa AZYP para obtenção da coluna FRULIC-N. Os parâmetros experimentais utilizados estão descritos na sessão Experimental. As condições detalhadas, como volume do *slurry* e do *push solvent*, bem como a massa de fase estacionária utilizada, não serão informadas, devido a política de sigilo da empresa.

Após devidamente lavada e condicionada, o desempenho da coluna foi inicialmente avaliado mantendo o protocolo estabelecido pela empresa AZYP (analitos: uracil, adenosina, adenina e citosina; modo isocrático; fase móvel ACN/ NH<sub>4</sub>OAc 25 mM 75/25; 1 mL min<sup>-1</sup>; 20 °C;  $\lambda = 254$  nm), e os resultados em termos de retenção ( $k'$ ) e eficiência ( $N$ ) foram comparados aos obtidos por uma coluna comercial idêntica, indicando um preenchimento adequado da coluna desenvolvida. Foram obtidas eficiências dos picos cromatográficos entre 37000 e 56000 pratos m<sup>-1</sup>, simetria entre 0,87 e 0,96 e contra-pressão de aproximadamente 60 bar.

### 2ª etapa) FPPs 3 µm

Para obtenção das colunas baseadas em FPPs 3 µm, partiu-se das mesmas condições utilizadas para as FPPs 5 µm. Foram preparadas fases estacionárias com três partículas distintas provenientes de duas marcas: *Daiso* e *Glantreo* (204 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> e 300 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), cujas características estão apresentadas na Tabela 2.2.

As duas colunas preenchidas com partículas *Glantreo* de maior e menor área superficial, apresentaram um volume vazio na extremidade de entrada (*inlet*) e, portanto, não foram completamente preenchidas sob as condições experimentais aplicadas. As fases estacionárias foram, então, coletadas, devidamente secas e reutilizadas para um novo processo de preenchimento, em que a concentração das partículas no *slurry* foi aumentada para cerca de 84 mg mL<sup>-1</sup>. Após os procedimentos de lavagem e condicionamento, foram feitas as avaliações iniciais mantendo o protocolo estabelecido pela *AZYP*. Os resultados apresentados pelas FPPs 3 µm *Daiso* e *Glantreo 300* foram promissores: picos com simetria adequada (0,85-0,96) e eficiências superiores a 56000 pratos m<sup>-1</sup>. Já os cromatogramas obtidos pela *Glantreo 204* apresentaram picos com caudas acentuadas (simetria << 1), baixa eficiência (< 36000 pratos m<sup>-1</sup>) e seletividade comprometida. Essa última foi atribuída à baixa eficiência e ao baixo grau de substituição obtido do processo de síntese dessa fase estacionária (Tabela 2.2).

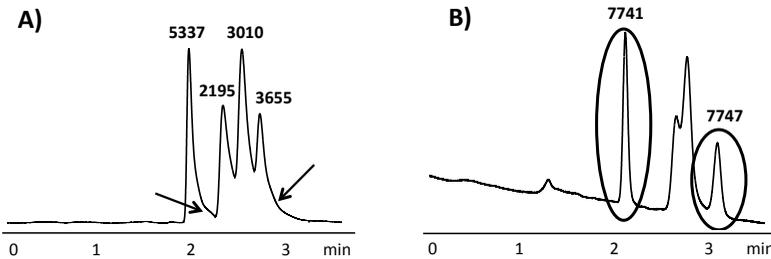
A presença de caudas nos picos cromatográficos pode indicar que a fase estacionária não foi suficientemente comprimida no interior da coluna ou, ainda, que há presença de um volume não preenchido ou bolhas de ar. Essas possibilidades foram acentuadas devido a baixa *backpressure* apresentada pela coluna preparada com *Glantreo* 3 µm 204, a qual foi de cerca de 75 bar enquanto as outras duas colunas preparadas com FPPs 3 µm apresentaram pressões de 130-140 bar sob as mesmas condições testadas.

Diferentes condições experimentais foram então testadas, com o intuito de aumentar a densidade e melhorar o desempenho da coluna cromatográfica preparada com FPPs 3 µm 204 *Glantreo*. Dentre elas a utilização de diferentes composições e volumes de *push solvent*, bem como diferentes composições do *slurry* (CH<sub>3</sub>Cl em MeOH), as quais foram ajustadas de forma a aumentar o grau de agregação e, possivelmente, a velocidade de sedimentação das partículas. Porém, apesar do perfil cromatográfico observado ter sido bastante distinto do observado nas condições anteriormente utilizadas, os resultados ainda

demonstraram-se bastante inferiores aos previamente obtidos pelas colunas preparadas com *Daiso* e *Glantreo 300*.

A Figura 2.9 apresenta perfis cromatográficos obtidos mantendo-se a fase estacionária preparada com FPPs 3  $\mu\text{m}$  204 *Glantreo* e ACN como *push solvent*, alterando tão somente a composição do *slurry*, o que demonstra a extrema importância desse parâmetro experimental no processo de preenchimento e consequente desempenho da coluna cromatográfica.

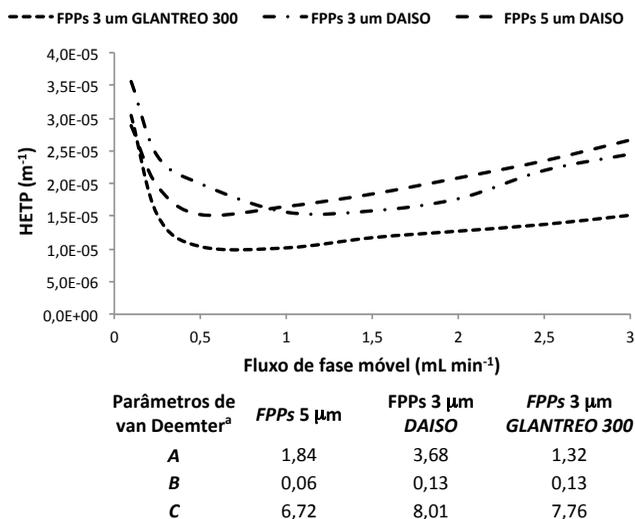
**Figura 2.9** Perfis cromatográficos obtidos sob as mesmas condições HILIC por colunas baseadas em FPPs *Glantreo* 3  $\mu\text{m}$  204 preparadas utilizando ACN como *push solvent* e *slurry* composto por (A) ACN/aquosa de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e; (B)  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  80/20. Ordem crescente de eluição: uracil, adenosina, adenina e citosina. Os valores apresentados acima dos picos correspondem ao número de pratos ( $N$ ).



Com base nos resultados obtidos até o momento, três colunas foram selecionadas para seguir os estudos de avaliação de desempenho: FRULIC-N (utilizado como referência), FPPs 3  $\mu\text{m}$  *Daiso* e FPPs 3  $\mu\text{m}$  *Glantreo 300*.

Para obter informações mais detalhadas acerca da qualidade de preenchimento das colunas selecionadas até o momento, foram realizadas análises cromatográficas sob diferentes fluxos de fase móvel (0,1-3,0  $\text{mL min}^{-1}$ ). Os perfis dos gráficos de van Deemter foram avaliados e os parâmetros  $A$ ,  $B$  e  $C$  calculados a partir das alturas reduzidas equivalente ao prato teórico ( $h = \text{HETP}/d_p$ ) utilizando o *software* Excel. Para esse estudo foi selecionado o composto 1,3-DNB e o modo NP, uma vez que é considerado sistema padrão da *AZYP* para avaliação da qualidade de preenchimento de novas colunas cromatográficas (Figura 2.10).

**Figura 2.10** Gráficos de van Deemter e os termos *A*, *B* e *C* obtidos para o 1,3-dinitrobenzeno para diferentes colunas cromatográficas.



<sup>a</sup> valores obtidos a partir da altura de prato reduzida,  $h$  ( $HETP/d_p$ ), e da velocidade da fase móvel em  $\text{cm s}^{-1}$  utilizando o *software* Excel. Legenda: *FPPs*, partículas totalmente porosas; *HETP*: altura equivalente de um prato teórico.

Como pode ser observado, o perfil apresentado pela coluna cromatográfica preparada com FPPs 3 µm *Daiso* não foi adequado. O elevado valor encontrado para o termo *A*, que corresponde aos caminhos múltiplos, indicou uma baixa qualidade de preenchimento da coluna. Já a coluna preparada com FPPs 3 µm *Glantreo 300* apresentou uma boa qualidade de preenchimento, junto a coluna baseada em FPPs 5 µm. No entanto, os termos *B* e *C*, relacionados a difusão longitudinal e transferência de massa, respectivamente, foram ligeiramente superiores aos encontrados para a coluna FRULIC-N. Essas sutis diferenças tornam-se irrelevantes quando considera-se que os cálculos foram realizados utilizando os valores de  $h$ . Ou seja, sabendo que  $h = HETP/d_p$ , quanto menores os valores de  $d_p$ , mais acentuados os valores de  $h$  e, conseqüentemente, mais acentuados podem apresentar-se os termos *A*, *B* e *C*.

O gráfico da Figura 2.10 mostra, principalmente, a importância dos estudos de van Deemter no processo de desenvolvimento de novas

colunas cromatográficas, uma vez que os resultados preliminares apresentados anteriormente para as FPPs 3  $\mu\text{m}$  *Daiso* poderiam ter acarretado conclusões errôneas acerca da qualidade dessa coluna.

Com base nos resultados obtidos até o momento, as colunas baseadas em FPPs 5  $\mu\text{m}$  e FPPs 3  $\mu\text{m}$  *Glantreo* 300 foram consideradas adequadas e selecionadas para atuarem como referência para o preparo das colunas preparadas com SPPs.

### 3ª etapa) SPPs sub-3 $\mu\text{m}$

Sabe-se que o grau de dificuldade do processo de preenchimento de colunas cromatográficas cresce significativamente a medida que diminui o  $d_p$  e, ainda mais, quando se utiliza partículas com núcleo sólido e densidade elevada. O processo de otimização para obtenção da coluna a base de SPPs, portanto, foi extremamente exaustivo e desafiador.

Nessa etapa do trabalho foram preparadas fases estacionárias utilizando SPPs provenientes de duas marcas: *Glantreo* ( $d_p = 2,6 \mu\text{m}$ ) e *Agilent* ( $d_p = 2,7 \mu\text{m}$ ) (ver outras características na Tabela 2.2).

Inicialmente, devido a disponibilidade, trabalhou-se apenas com as partículas *Glantreo*. Diversos procedimentos foram avaliados: diferentes solventes e concentrações do *slurry*, diferentes volumes e natureza dos solventes carreadores, além da variação das pressões exercidas durante o processo de preenchimento (8000-12000 psi).

Embora a maioria dos resultados tenham se apresentado aleatórios com relação às alterações experimentais avaliadas, algumas tendências puderam ser constatadas: pressões mais elevadas forneceram os melhores resultados nas condições estudadas e; quando utilizado ACN e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  aquoso como componentes do *slurry*, as melhores eficiências de pico foram obtidas para menores concentrações de fase estacionária, como pode ser observado nos dados apresentados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** Efeito da concentração do *slurry* preparado com proporções idênticas de ACN e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  aquoso.

	Massa - g	Solvente - <i>slurry</i>	Concentração do <i>slurry</i> – $\text{mg mL}^{-1}$	<i>Push</i> <i>solvent</i>	Eficiência - $\text{N m}^{-1}$	Observações
A	2,0	ACN/ $\text{NH}_4\text{NO}_3$	67	ACN	-	Preenchimento incompleto
B	2,5	aquoso	83		30300-43000	Cauda suave
C	2,5		125		27300-40000	Cauda acentuada
D	2,5		62,5		65500-76700	Cauda suave

Dentre outras observações, a utilização de solventes carreadores e componentes do *slurry* miscíveis entre si, além de um *push solvent* menos denso, resultou em colunas com desempenho mais satisfatórios. Isso pode ser explicado devido ao fato de que, após a adição do *slurry* ao sistema de preenchimento, um volume de *push solvent* é adicionado até preencher todo o volume da torre e, apenas após preenchido, o sistema é vedado e a pressão acionada para o empacotamento da coluna. Dessa forma, a utilização de solventes carreadores mais densos que o *slurry*, implicam na mistura antecipada de ambos, o que altera as propriedades do *slurry*, como por exemplo o grau de agregação das partículas, quando o sistema ainda está sob pressão atmosférica.

Apesar desta etapa do estudo ter contribuído com algumas conclusões interessantes, o melhor desempenho obtido foi, ainda, insatisfatório em termos de eficiência. Sob as mesmas condições de análise, o parâmetro *A* foi substancialmente reduzido com relação a coluna preparada com FPPs 3  $\mu\text{m}$  *Glantreo* 300, o que indicou a qualidade do preenchimento da coluna, no entanto, os parâmetros *B* e *C* foram consideravelmente maximizados. Além disso, as eficiências dos picos cromatográficos foram apenas ligeiramente superiores a coluna preparada com FPPs 3  $\mu\text{m}$  *Glantreo* 300.

Já disponíveis as SPPs fornecidas pela *Agilent Technologies*, e adequadamente preparada e caracterizada a fase estacionária (Tabela 2.2), decidiu-se manter as condições experimentais de preenchimento (massa de partículas, composição e volume do *slurry*, composição e volume do *push solvent* e pressão aplicada) utilizadas para obtenção da coluna a base de SPPs *Glantreo* de melhor desempenho cromatográfico. Os resultados demonstraram um desempenho substancialmente superior da coluna preparada com SPPs *Agilent*, em termos de eficiência, simetria de pico e resolução.

As eficiências dos picos cromatográficos foram cerca de 50% superiores às apresentadas pela coluna preparada com SPPs *Glantreo*,

ou seja, um pico cromatográfico com cerca de 80.000 pratos  $m^{-1}$  passou a apresentar cerca de 120000 pratos  $m^{-1}$  na nova coluna desenvolvida. Esse resultado foi relacionado a distribuição mais estreita do tamanho das partículas *Agilent* ( $d_{90/10} = 1,16$ ) quando comparada as *SPPs Glantreo* utilizadas neste trabalho ( $d_{90/10} = 1,45$ ). Além disso, enquanto as *SPPs Agilent* são obtidas a partir de um método similar à coacervação, que envolve uma única etapa (Agilent-Technologies 2015), as partículas *Glantreo* são obtidas a partir da tecnologia sol-gel (GLANTREO 2012). Como descrito anteriormente, o método utilizado para o preparo das *SPPs* influencia na rugosidade da superfície dessas partículas, e essa, por sua vez, na homogeneidade e qualidade do preenchimento das colunas cromatográficas e, conseqüentemente, nos parâmetros que influenciam no alargamento dos picos cromatográficos. Trabalhos anteriores já haviam apresentado diferenças no desempenho de colunas preparadas com *SPPs* similares provenientes de diferentes marcas (Ruta, Zurlino et al. 2012, Wang, Barber et al. 2012). Por fim, o ganho na resolução entre os picos foi atribuído ao maior grau de substituição de CF6 obtido pelas partículas *Agilent* quando comparadas às similares *Glantreo*.

A partir de então, a fase estacionária preparada com *SPPs Agilent* foi escolhida para dar continuidade aos estudos. Finalmente, as condições experimentais que forneceram a coluna a base de *SPPs* utilizada neste trabalho consistiram em um *slurry* composto por uma mistura de  $CHCl_3$  e MeOH, com elevada concentração de  $CHCl_3$  e concentração de partículas de cerca de 15  $mg mL^{-1}$ , e um volume adequado de tolueno utilizado como *push solvent*. A proporção de  $CHCl_3$  e MeOH foram ajustadas considerando a viscosidade da solução e conseqüente velocidade de sedimentação das partículas no *slurry*, uma vez que essa deve ser lenta o suficiente para que possa ser dado início ao processo de preenchimento da coluna com as partículas ainda em suspensão.

Após otimizado o procedimento utilizando as partículas *SPPs Agilent*, algumas constatações puderam ser confirmadas acerca dos parâmetros experimentais que fornecem melhores desempenhos cromatográficos, dentre eles: concentrações baixas do *slurry* mantendo massa de partículas suficiente para o preenchimento completo da coluna; miscibilidade entre os componentes do *slurry* e o *push solvent* (Organização-Erowid 2004) e; uma densidade desse último (0,867  $g mL^{-1}$ ) menor do que a densidade final da mistura de solventes utilizadas no preparo do *slurry* ( $d_{MeOH} = 0,791 g mL^{-1}$ ;  $d_{CHCl_3} = 1,479 g mL^{-1}$ ) (Organização-Erowid 2015).

### 4.3 Avaliação do desempenho cromatográfico das colunas otimizadas

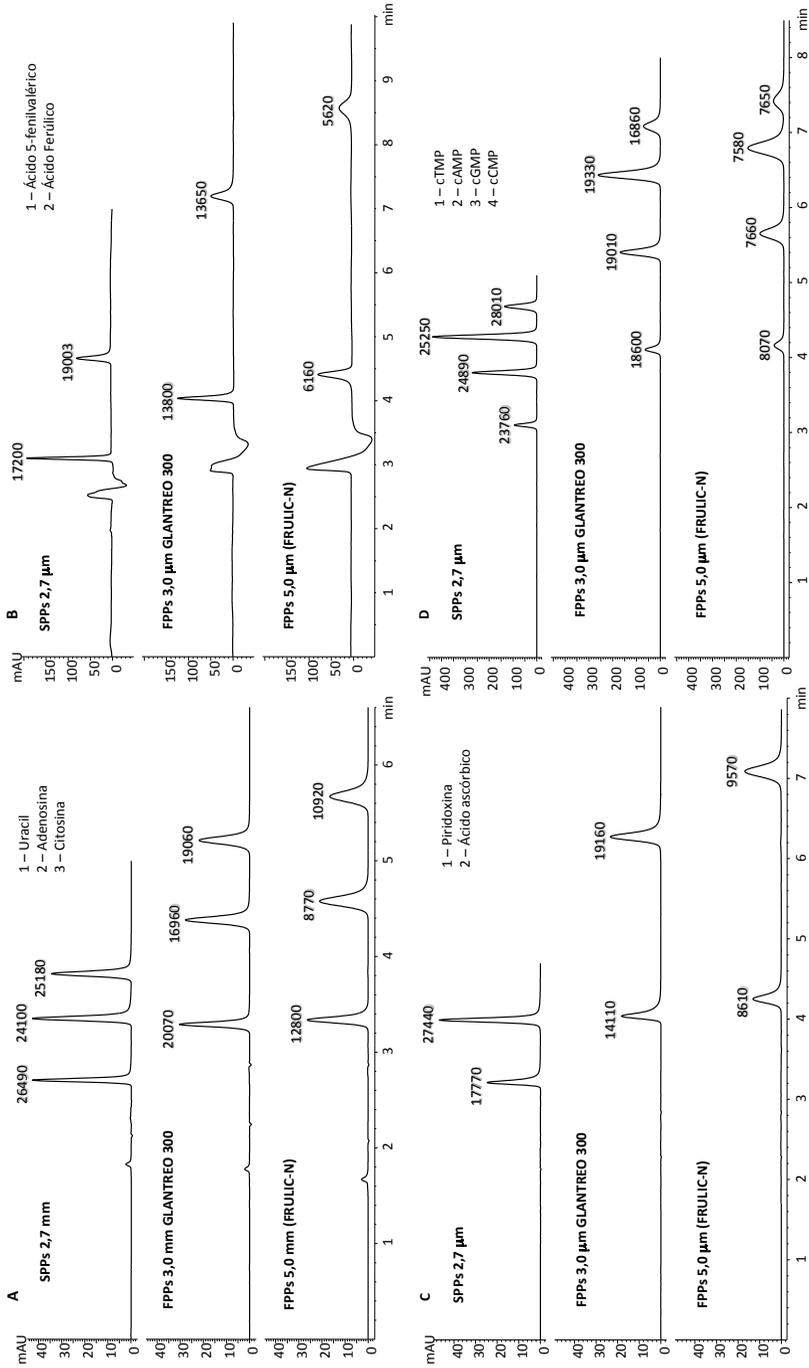
O principal objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho cromatográfico, no modo HILIC, da coluna preparada a partir de CF6 nativo ligado às SPPs com base nos desempenhos apresentados pela FRULIC-N e pela coluna cromatográfica preparada com FPPs 3  $\mu\text{m}$ . Para isso, um total de 11 compostos polares foram investigados sob condições HILIC e, por fim, diferentes compostos foram também avaliados em condições de NP, de forma a obter informações acerca da influência dos modos cromatográficos no desempenho das SPPs.

#### 4.3.1 Avaliação de desempenho das colunas em modo HILIC

Para avaliar o desempenho cromatográfico das colunas no modo HILIC, 11 compostos foram selecionados, os quais estão subdivididos em 4 grupos: a) ácido 5-fenilvalérico e ácido ferúlico; b) uracil, adenosina e citosina; c) ácido L-ascórbico e piridoxina e; d) nucleotídeos cíclicos, cAMP, cCMP, cGMP e cTMP. A concentração dos analitos variou entre 30 e 60  $\text{mg L}^{-1}$ , e a mesma solução foi utilizada nas diferentes colunas cromatográficas, de modo a evitar a influência deste parâmetro na eficiência dos picos cromatográficos.

A Figura 2.11 apresenta cromatogramas obtidos para a separação dos quatro grupos de compostos avaliados.

**Figura 2.11** Separação de diferentes compostos em modo HILIC utilizando colunas baseadas em CF6 nativo, ligados a diferentes tipos de partículas de sílica. Os valores apresentados acima dos picos correspondem ao número de pratos (N). Condições gerais: dimensões das colunas, 150 mm  $\times$  4,6 mm d.i.; fase móvel composta pelo componente A = ACN e, B = 25 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  ou C = 100 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; 0,75  $\text{mL min}^{-1}$ ; 30  $^\circ\text{C}$ . Condições específicas: A) fase móvel 75/25 ( $V_A/V_B$ ),  $\lambda$  254 nm; B) 85/15 ( $V_A/V_B$ ),  $\lambda$  210 nm; C) 75/25 ( $V_A/V_B$ ),  $\lambda$  280 nm; D) 70/30 ( $V_A/V_C$ ),  $\lambda$  254 nm. 1-4 representam os picos em ordem crescente de eluição.



Como pode ser visto, todas as colunas apresentaram formatos de picos adequados, confirmando a qualidade do preenchimento das colunas selecionadas. As eficiências obtidas para a coluna a base de SPPs foi substancialmente superior para todos os analitos. O aumento da eficiência para essa coluna foi de 25-65% quando comparada com a coluna preparada com FPPs 3  $\mu\text{m}$  e 2-4 vezes superior às eficiências obtidas utilizando a coluna FRULIC-N. Por exemplo, o pico correspondente ao cCMP apresentou cerca de 7700 pratos (ou 51300 pratos  $\text{m}^{-1}$ ) na coluna comercial, enquanto que o mesmo composto apresentou uma eficiência de 28000 pratos (ou 186700 pratos  $\text{m}^{-1}$ ) na coluna desenvolvida utilizando SPPs.

Sob condições idênticas de fase móvel, os fatores de retenção foram sempre maiores para a FRULIC-N, seguida pela coluna FPPs 3  $\mu\text{m}$ , sendo os menores tempos de análise obtidos sempre pela coluna preparada com SPPs. Esses resultados já eram esperados, por duas razões: a) a caracterização das fases estacionárias indicou que a FRULIC-N contém 32% de CF6 (% m/m), enquanto que a coluna FPPs 3  $\mu\text{m}$  contém 28% e a SPPs apenas 13% de CF6 (% m/m); b) a morfologia das SPPs resulta em um menor volume intersticial no interior da coluna cromatográfica (volume morto), fornecendo, assim, análises mais rápidas (DeStefano, Langlois et al. 2008, Lomsadze, Jibuti et al. 2012, Ruta, Zurlino et al. 2012).

Por outro lado, foi observado que a maior capacidade de pico foi apresentada, na maioria dos sistemas, pela coluna preenchida com FPPs 3  $\mu\text{m}$ . Essa informação foi obtida a partir da Equação 2.3 proposta por Giddings para estimar a capacidade de pico em sistemas isocráticos (Horvath & Lipsky 1967, Pous-Torres, Baeza-Baeza et al. 2008).

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \times \ln \left( \frac{1+k'_n}{1+k'_1} \right) \quad (2.3)$$

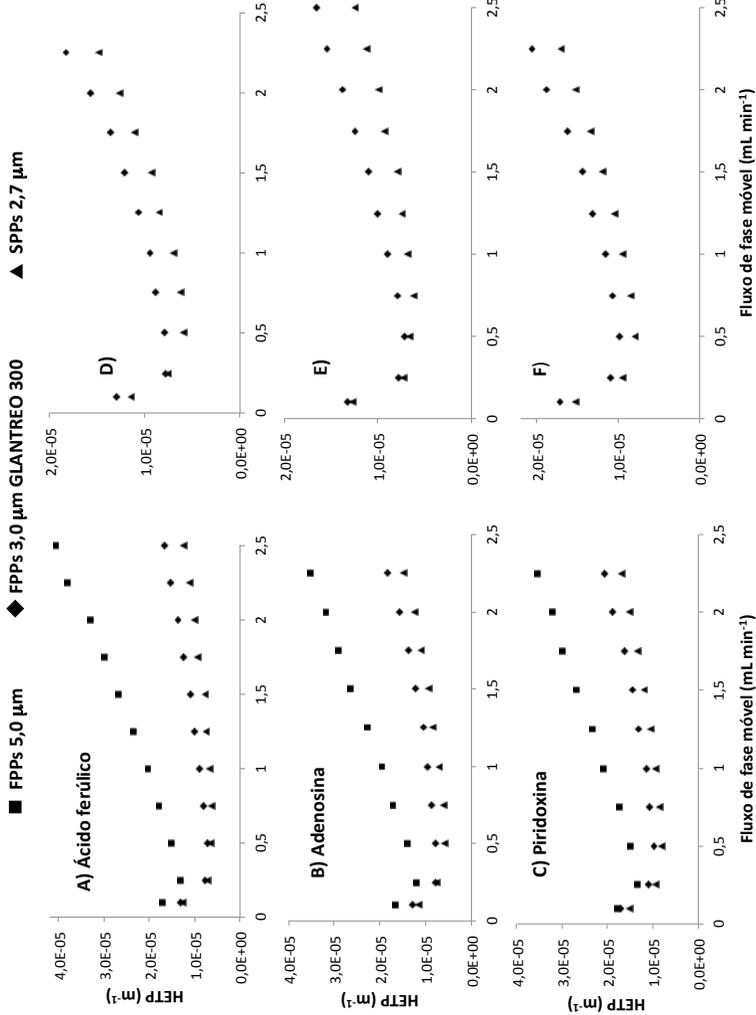
onde  $N$  é o número de pratos e  $k'_1$  e  $k'_n$  são os fatores de retenção para o primeiro e último picos, respectivamente.

Por outro lado, foi demonstrado que, se as condições de fase móvel (ex: razão eluente fraco/forte) são manipuladas de forma a manter constantes os tempos de retenção dos analitos nas diferentes colunas, a capacidade de pico das colunas preparadas com SPPs torna-se superior devido às eficiências substancialmente superiores (Spudeit, Dolzan et al. 2014).

Para informações mais detalhadas acerca das diferenças no alargamento dos picos cromatográficos em cada coluna, os perfis dos

gráficos de van Deemter foram avaliados. A dependência de *HETP* com o fluxo de fase móvel é apresentada na Figura 2.12 e discutida com base nas Equações 2.1 e 2.2 (página 79).

**Figura 2.12** Dependência da eficiência (em termo de *HETP*) com o fluxo da fase móvel sob condições HILIC para os compostos e colunas indicadas. Para uma melhor compreensão visual acerca da influência da natureza das partículas, os gráficos D, E e F apresentam apenas os dados obtidos para as colunas preparadas com SPPs e FPPs 3  $\mu\text{m}$ . Condições experimentais: ver Figura 2.11.



Como pode ser observado na Figura 2.12, o valor mínimo de  $HETP$  ( $HETP_{min}$ ) foi obtido em fluxo de fase móvel que variou de 0,50 à 0,75 mL min<sup>-1</sup> para a coluna preparada com SPPs, de 0,25 à 0,50 mL min<sup>-1</sup> para a coluna FPPs 3 µm e de 0,10 à 0,50 mL min<sup>-1</sup> para a coluna FRULIC-N. Em geral, para a coluna preparada com SPPs, o  $HETP_{min}$  foi obtido para maiores velocidades de fluxo quando comparada as demais colunas. Esses dados são consistentes com outros materiais SPPs (ex, fases estacionárias apolares utilizadas em modo RP) e demonstra a redução do termo  $B$  causada pela obstrução dos caminhos da fase móvel ao longo da coluna devido a presença do núcleo sólido (Gritti & Guiochon 2012).

Sob todas as velocidades de fluxo testadas, a eficiência da coluna preparada com SPPs foi a melhor dentre as demais colunas avaliadas. Entretanto, curvas de van Deemter mais planas em maiores velocidades de fluxo (diminuição do termo  $C$ ), as quais estão geralmente associadas as SPPs, não foram observadas nas proporções esperadas. Os ganhos de eficiência global observados para a coluna preparada com SPPs foram atribuídos, principalmente, a uma diminuição da difusão turbulenta (termo  $A$ ), em grande parte resultante de uma maior homogeneidade do preenchimento das colunas cromatográficas (Fekete, Olah et al. 2012, Gritti & Guiochon 2012, Lomsadze, Jibuti et al. 2012, Kirkland J. J. 2013).

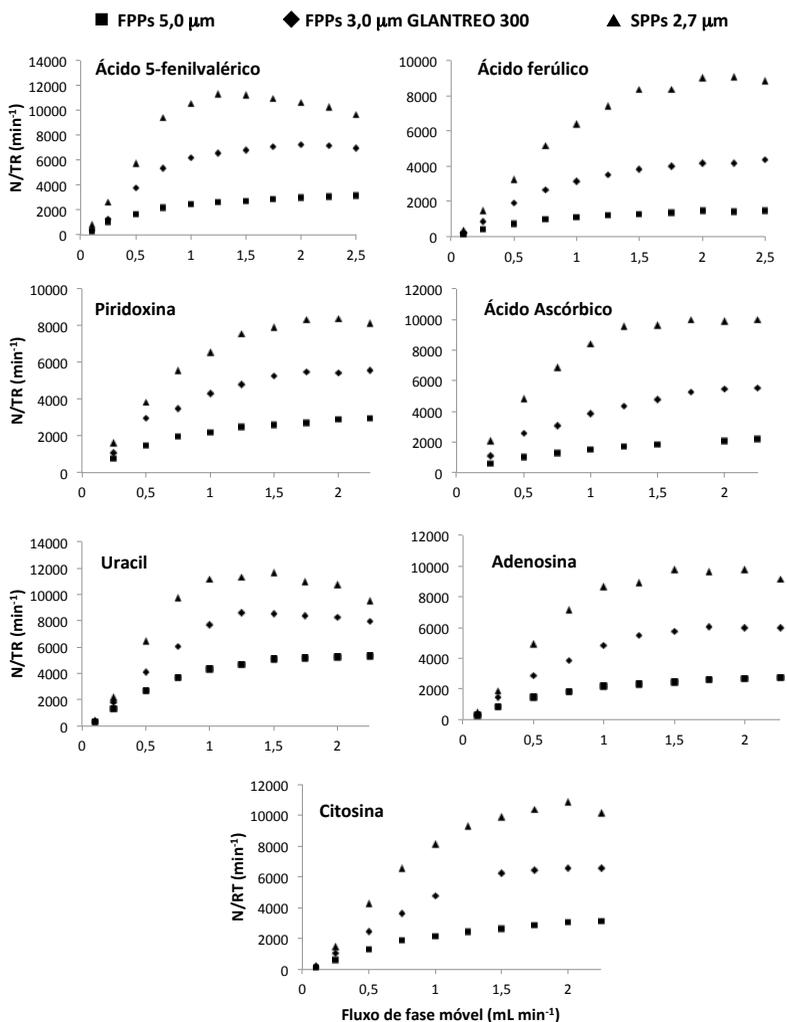
Trabalhos anteriores foram realizados utilizando colunas preparadas com FPPs em modo HILIC, e os resultados indicaram que a resistência à transferência de massa na fase estacionária (relacionado ao termo  $C_s$  da Equação 2.2) é maior em HILIC do que em RP (Gritti, Leonardis et al. 2010, Heaton, Wang et al. 2014, Song, Adams et al. 2014). Esse resultado está relacionado, principalmente, com a velocidade das cinéticas de adsorção-desorção, a qual é mais lenta em HILIC. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que essa característica se mantém verdadeira quando SPPs são utilizadas. Essa constatação é suportada, também, pelos estudos realizados por Gritti e colaboradores (Gritti, Pereira et al. 2010), os quais sugerem que as vantagens da transferência de massa em SPPs podem ser afetadas pela camada de água adsorvida proveniente da fase móvel. Sabe-se, ainda, que a espessura dessa camada de água é mais substancial em fases estacionárias preparadas com CF6 do que em sílica não modificada, a qual compreende o sistema HILIC mais estudado e discutido na literatura (Dinh, Jonsson et al. 2013). Portanto, os resultados reportados

não podem ser simplesmente extrapolados para outros sistemas, como este estudado no presente trabalho, CF6-HILIC.

Dessa forma, existem, pelo menos, três possíveis fatores que contribuem para a cinética de transferência de massa em colunas HILIC a base de CF6: a) a molécula de CF6 pode interagir fortemente com os analitos através de múltiplas interações simultâneas; b) a fase estacionária é essencialmente “aumentada” pela camada de água estagnada (nota:  $C_s$  é diretamente proporcional ao quadrado da espessura do filme de fase estacionária) e, além disso; c) essa irá apresentar uma maior viscosidade quando comparada a água presente no seio da fase móvel. Todos esses fatores contribuem para uma diminuição da velocidade de difusão dos analitos no modo HILIC. A primeira contribuição pode ocorrer em todos os modos de separação, no entanto, os outros dois fatores,  $b$  e  $c$ , ocorrem tão somente em HILIC. A idéia de que a camada de água adsorvida na fase estacionária efetivamente afeta os ganhos relacionados ao termo  $C_s$  quando utilizadas SPPs será discutido adiante na seção 4.3.2.

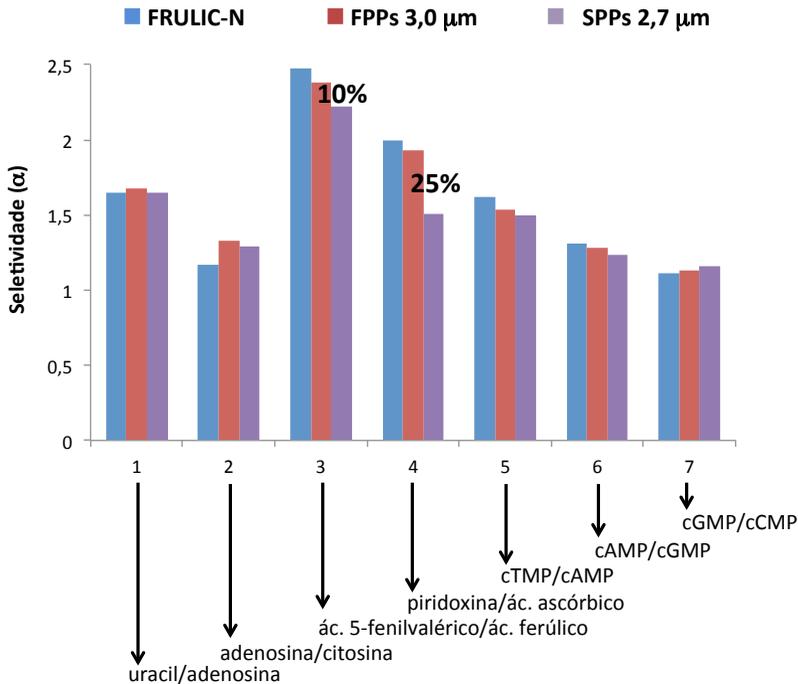
Como descrito anteriormente, colunas preenchidas com SPPs acarretam, ainda, a diminuição do tempo instrumental de análise. De forma a demonstrar mais claramente esse fenômeno, a Figura 2.13 apresenta, para cada analito, um gráfico que demonstra o perfil do número de pratos por unidade de tempo *versus* o fluxo da fase móvel. Como pode ser visto, os valores obtidos são substancialmente superiores na coluna a base de SPPs quando comparada às demais colunas preparadas com FPPs.

**Figura 2.13** Dependência do número de pratos por minuto com a velocidade de fluxo da fase móvel (HILIC). Condições experimentais: ver Figura 2.11.



Por fim, o gráfico da Figura 2.14 apresenta os valores de  $\alpha$  obtidos para as três colunas avaliadas, os quais foram calculados para todos os picos adjacentes presentes nos cromatogramas da Figura 2.11.

**Figura 2.14** Valores de seletividade entre picos adjacentes para todos os analitos apresentados na Figura 2.11.

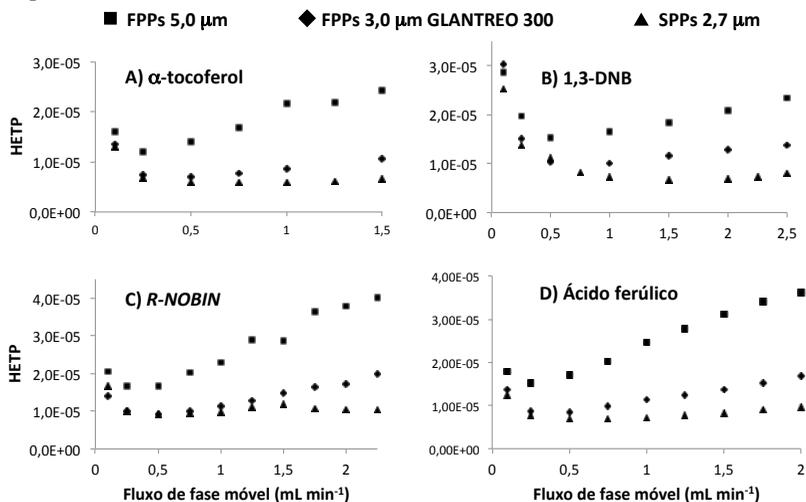


Os resultados indicam que os valores de  $\alpha$  são essencialmente os mesmos para a maioria das separações, quando comparadas as colunas FRULIC-N, FPPs 3  $\mu\text{m}$  e SPPs. Esses resultados indicam que fases estacionárias SPPs-HILIC que apresentam substituição efetiva de seletor equivalente às análogas preparadas com FPPs, produzem seletividades também equivalentes. Apenas para o par piridoxina/ácido ascórbico pôde ser constatada uma diferença mais pronunciada, sendo cerca de 25% inferior para a coluna preparada com SPPs, atribuída a presença de cerca da metade da porcentagem de seletor, na fase estacionária preparada com SPPs (Tabela 2.2). No entanto, como descrito anteriormente, Spudeit e colaboradores demonstraram que, quando a composição da fase móvel é manipulada de maneira a obter tempos de retenção semelhantes para as colunas a base de SPPs e FPPs, a seletividade observada para as colunas preenchidas com SPPs são substancialmente superiores, dado o expressivo ganho de eficiência observado para estas colunas (Spudeit, Dolzan et al. 2014).

### 4.3.2 Avaliação das colunas cromatográficas em condições de fase normal

Para comprovar o que foi constatado anteriormente, de que as inclinações das curvas de van Deemter obtidas para maiores fluxos de fase móvel podem estar sendo afetadas pela presença da camada de água formada em sistemas HILIC, as colunas foram também avaliadas sob condições não-aquosas, utilizando NP. Os seguintes compostos foram avaliados:  $\alpha$ -tocoferol, R-NOBIN, 1,3-DNB e ácido ferúlico, o qual foi também analisado no modo HILIC. A dependência de *HETP* com a velocidade do fluxo, para esses analitos, é mostrada na Figura 2.15.

**Figura 2.15** Dependência da eficiência (em termos de *HETP*) com o fluxo de fase móvel (fase normal) para os compostos e colunas indicados. Condições: A e B) Hep/IPA 98/2,  $\lambda = 280$  nm; C) Hep/EtOH 80/20,  $\lambda = 254$  nm; D) Hep/EtOH 0,1% TFA,  $\lambda = 280$  nm.



Como pode ser visto, as separações cromatográficas realizadas sob condições de NP resultaram numa menor perda de eficiência quando o fluxo de fase móvel foi aumentado. Ou seja, as curvas de van Deemter apresentaram-se menos inclinadas para a coluna a base de SPPs, indicando uma minimização do termo *C* global quando comparada as demais colunas FPPs avaliadas. Esses eram, de fato, os resultados esperados no início deste trabalho, uma vez que a minimização do termo

*C* é influenciada pela diminuição do caminho de difusão dentro das partículas, o qual é inerente às SPPs (K. Broeckhoven 2013). No entanto, o comportamento observado nos modos HILIC e NP, utilizando a mesma fase estacionária, foi bastante distinto. Os resultados indicam que as constatações descritas anteriormente acerca da influência da fase móvel e dos mecanismos de separação no processo de transferência de massa não podem ser descartados quando se discute o comportamento de SPPs em análises cromatográficas.

Para excluir a influência da natureza do analito nos efeitos do termo *C*, o ácido ferúlico, anteriormente analisado em HILIC, foi também avaliado em condições de NP. Observando as curvas de van Deemter obtidas em modo HILIC (Figura 2.12-A) e NP (Figura 2.15-D) é possível constatar uma menor inclinação da curva apresentada pela SPPs em NP quando comparadas as demais colunas cromatográficas. Comparando apenas as colunas preparadas com FPPs 3  $\mu\text{m}$  e SPPs, constatou-se que sob condições HILIC o termo *C* da segunda coluna foi apenas 47% inferior ao apresentado pela primeira, enquanto que essa diferença aumentou para 70% sob condições de NP.

Os resultados indicam que condições de NP permitem um melhor aproveitamento das vantagens das SPPs sobre o termo *C* quando comparados aos resultados obtidos pelo sistema HILIC estudado. Isso implica que, dentre outros fatores, o aumento da viscosidade e espessura da fase estacionária resultante da camada de água adsorvida apresentam efeito significativo no alargamento de pico quando utilizadas velocidades de fluxo mais elevadas. Uma implicação de uma camada de água adsorvida na fase estacionária pode ser, simplesmente, o aumento no caminho de difusão do analito quando utilizado o modo HILIC, o qual é capaz de afetar uma das principais vantagens apresentadas pelos materiais preparados com SPPs.

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho indicam que a transferência de massa ao longo de um processo cromatográfico é dependente de uma série de fatores, como natureza da fase móvel, mecanismo de separação, natureza do analito, morfologia das partículas utilizadas como material de suporte no preparo da fase estacionária e, possivelmente, outros fatores ainda desconhecidos (Gritti & Guiochon 2007, DeStefano, Langlois et al. 2008, Gritti & Guiochon 2013, Gritti & Guiochon 2014).

## 5 Conclusões e recomendações

Este capítulo apresentou o desenvolvimento de uma nova coluna cromatográfica preparada com ciclofrutano nativo quimicamente ligado a SPPs de sílica com 2,7  $\mu\text{m}$  para separação de compostos polares utilizando HPLC no modo HILIC. Colunas a base de FPPs de 5  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$  também foram obtidas. A caracterização das fases estacionárias desenvolvidas indicou que o mesmo procedimento de síntese pode ser utilizado para diferentes partículas de sílica utilizadas como material de suporte.

O processo de preenchimento das colunas cromatográficas demonstrou-se exaustivo e desafiador, uma vez que a literatura dispõe de informações mínimas acerca da ciência e dos parâmetros que influenciam nestes processos. No entanto, foi observado que a utilização de menores concentrações do *slurry, push solvent* de menor densidade e miscível no *slurry*, bem como a utilização de pressões mais elevadas favoreceu a obtenção de colunas a base de CF6 ligado a SPPs mais homogêneas e de melhor desempenho cromatográfico. A nova coluna foi obtida a partir de um *slurry* composto por  $\text{CHCl}_3$  e MeOH, com elevada concentração de  $\text{CHCl}_3$  e concentração de partículas de cerca de 15  $\text{mg mL}^{-1}$ , e um tolueno foi utilizado como *push solvent*.

A presença do núcleo sólido nas SPPs forneceu nítidas vantagens em termos de eficiência de pico e tempo de análise sem perda significativa de seletividade. Análises 85% mais rápidas e picos cromatográficos 3,7 vezes mais eficientes foram obtidos pela nova coluna quando comparada as similares preparadas com FPPs de 3  $\mu\text{m}$  e a coluna comercial FRULIC-N (5  $\mu\text{m}$ ). Essas vantagens podem acarretar um aumento na sensibilidade dos métodos, além de uma maior frequência analítica, diminuindo consideravelmente os custos da análise e a geração de resíduos tóxicos. É importante destacar que esta última apresenta-se como uma das principais desvantagens da técnica de HPLC quando comparadas as demais técnicas de separação como cromatografia gasosa e eletroforese capilar, e deve ser priorizada durante a escolha de um método de separação adequado.

Não foram constatadas perdas expressivas da seletividade para a maioria dos sistemas avaliados. No entanto, as perdas observadas foram atribuídas ao baixo grau de substituição relativo de CF6 quando comparado as demais colunas baseadas em FPPs avaliadas.

Os estudos de van Deemter apresentaram-se fundamentais para a avaliação da qualidade de preenchimento e desempenho das colunas

cromatográficas. Foi possível constatar que a coluna desenvolvida a base de SPPs apresentou velocidades ótimas de fluxo superiores às apresentadas pelas colunas a base de FPPs, as quais foram atribuídas a diminuição da difusão longitudinal (termo *B*). Foi determinado, ainda, que os ganhos da eficiência no modo HILIC utilizando a fase estacionária baseada em SPPs resultou principalmente de um melhor preenchimento da coluna quando comparada as demais a base de FPPs, o que acarretou numa diminuição dos caminhos múltiplos (termo *A*).

As análises realizadas em modo NP demonstraram a influência, não apenas da morfologia das partículas utilizadas como material de suporte, mas dos modos cromatográficos empregados e dos mecanismos que regem a separação, no processo de alargamento dos picos cromatográficos. A camada de água adsorvida na fase estacionária quando operada em modo HILIC afetou consideravelmente o processo de transferência de massa dos analitos. Desta forma, as vantagens da utilização de SPPs sob elevadas velocidades de fluxo da fase móvel foram pronunciadas em modo NP. No entanto, é incontestável o ganho na eficiência global apresentado pelas SPPs quando comparada as demais colunas avaliadas neste trabalho em ambos os modos cromatográficos avaliados.

Recomendações: Estudar o processo de síntese buscando o aumento da % de CF6 presente na FE a base de SPPs para obtenção de seletividade máxima e; diminuir ou, preferencialmente, eliminar a toxicidade do processo de obtenção para viabilizar a produção em maiores escalas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de HPLC demonstrou-se eficaz e extremamente vantajosa na resolução de diversas misturas racêmicas desenvolvidas para fins farmacológicos, reafirmando-se como a principal técnica destinada a separação de sistemas extremamente complexos, como as misturas estereoisoméricas.

A utilização de SPPs de sílica para desenvolvimento de uma nova coluna cromatográfica a base de CF6 nativo apresentou-se uma excelente alternativa na busca por análises extremamente rápidas e eficientes de compostos polares utilizando HPLC nos modos HILIC e NP.

Por fim, esta tese demonstra a importância das colaborações e trocas de conhecimento entre diferentes grupos de pesquisa, para o avanço consciente da ciência.

## REFERÊNCIAS

Agilent-Technologies (2015). Agilent Poroshell 120 Columns for HPLC and UHPLC: Perform Rugged, Fast LC with Confidence.

Agranat, I., S. R. Wainschein & E. Z. Zusman (2012). "The predicated demise of racemic new molecular entities is an exaggeration." Nature Reviews Drug Discovery **11**(12).

Ahuja, S. (2008). "A strategy for developing HPLC methods for chiral drugs." Lc Gc North America: 70-79.

Armstrong, D. W. & W. Demond (1984). "Cyclodextrin Bonded Phases for the Liquid-Chromatographic Separation of Optical, Geometrical, and Structural Isomers." Journal of Chromatographic Science **22**(9): 411-415.

Armstrong, D. W., Y. B. Tang, S. S. Chen, Y. W. Zhou, C. Bagwill & J. R. Chen (1994). "Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid-Chromatography." Analytical Chemistry **66**(9): 1473-1484.

Baciu, T., I. Botello, F. Borrull, M. Calull & C. Aguilar (2015). "Capillary electrophoresis and related techniques in the determination of drugs of abuse and their metabolites." TrAC-Trends in Analytical Chemistry **74**: 89-108.

Barreiro, E. J., V. F. Ferreira & P. R. R. Costa (1997). "Pure enantiomeric substances: The question of chiral drugs." Química Nova **20**(6): 647-656.

Beesley, T. E. (2004). "Preparative purification of basic chiral racemates." Lc Gc North America **20**: 31.

Bell, D. S. & R. E. Majors (2015). "Current State of Superficially Porous Particle Technology in Liquid Chromatography." Lc Gc North America **33**(6): 386-+.

Berthod, A. (2009). "Chiral Recognition Mechanisms with Macrocyclic Glycopeptide Selectors." Chirality **21**(1): 167-175.

Blue, L. E. & J. W. Jorgenson (2015). "1.1  $\mu\text{m}$  Superficially porous particles for liquid chromatography Part II: Column packing and chromatographic performance." Journal of Chromatography A **1380**: 71-80.

Bosakova, Z., E. Curinova & E. Tesarova (2005). "Comparison of vancomycin-based stationary phases with different chiral selector coverage for

enantioselective separation of selected drugs in high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1088**(1-2): 94-103.

Botting, J. (2002). "The history of thalidomide." Drug News & Perspectives **15**(9): 604-611.

Brown, J. M. & S. G. Davies (1989). "Chemical Asymmetric-Synthesis." Nature **342**(6250): 631-636.

Buszewski, B. & S. Noga (2012). "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique." Analytical and Bioanalytical Chemistry **402**(1): 231-247.

Cavazzini, A., L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti & F. Dondi (2011). "Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review." Analytica Chimica Acta **706**(2): 205-222.

Chang, S. C., G. L. Reid, S. Chen, C. D. Chang and D. W. Armstrong (1993). "Evaluation of a New Polar Organic High-Performance Liquid-Chromatographic Mobile Phase for Cyclodextrin-Bonded Chiral Stationary Phases." TrAC-Trends in Analytical Chemistry **12**(4): 144-153.

Chauve, B., D. Guillarme, P. Cleon & J. L. Veuthey (2010). "Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds." Journal of Separation Science **33**(6-7): 752-764.

Chirobiotic-Handbook (2004). "A Guide to Using Macrocyclic Glycopeptide Bonded Phases for Chiral LC Separations". Advanced Separation Technologies Inc: 1-59.

Cochrane.org. "Rede global independente de pesquisadores, profissionais, pacientes, cuidadores e pessoas interessadas em saúde." <http://www.cochrane.org>, acesso em 18/01/2016.

Cyclobond-Handbook (2002). "A Guide to Using Cyclodextrin Bonded Phases for Chiral LC Separations". Advanced Separation Technologies Inc 1-58.

Dalgliesh, C. E. (1952). "The Optical Resolution of Aromatic Amino-Acids on Paper Chromatograms." Journal of the Chemical Society(Oct): 3940-3942.

DeStefano, J. J., T. J. Langlois & J. J. Kirkland (2008). "Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: Some performance comparisons with sub-2- $\mu\text{m}$  particles." Journal of Chromatographic Science **46**(3): 254-260.

DeStefano, J. J., T. J. Langlois & J. J. Kirkland (2008). "Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: Some performance comparisons with sub-2- $\mu$ m particles." Journal of Chromatographic Science **46**(3): 254-260.

Dinh, N. P., T. Jonsson & K. Irgum (2013). "Water uptake on polar stationary phases under conditions for hydrophilic interaction chromatography and its relation to solute retention." Journal of Chromatography A **1320**: 33-47.

Dolzan, M. D., D. A. Spudeit, M. S. Azevedo, A. C. O. Costa, M. A. L. de Oliveira & G. A. Micke (2013). "A fast method for simultaneous analysis of methyl, ethyl, propyl and butylparaben in cosmetics and pharmaceutical formulations using capillary zone electrophoresis with UV detection." Analytical Methods **5**(21): 6023-6029.

Dolzan, M. D., D. A. Spudeit, Z. S. Breitbach, W. E. Barber, G. A. Micke & D. W. Armstrong (2014). "Comparison of superficially porous and fully porous silica supports used for a cyclofructan 6 hydrophilic interaction liquid chromatographic stationary phase." Journal of Chromatography A **1365**: 124-130.

FDA (1992). "FDA Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs." Chirality **4**(5): 338-340.

Fekete, S., D. Guillarme & M. W. Dong (2014). "Superficially Porous Particles: Perspectives, Practices, and Trends." Lc Gc North America **32**(6): 420-+.

Fekete, S., E. Olah & J. Fekete (2012). "Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles." Journal of Chromatography A **1228**: 57-71.

Gellad, W. F., P. Choi, M. Mizah, C. B. Good & A. S. Kesselheim (2014). "Assessing the Chiral Switch: Approval and Use of Single-Enantiomer Drugs, 2001 to 2011." American Journal of Managed Care **20**(3): E90-E97.

Giddings, J. C., Ed. (2002). Dynamics of Chromatography: Principles and Theory, CRC Press.

GLANTREO. (2012). "EIROSHELL: Superficially Porous Silica." <http://www.glantreo.com/wp-content/uploads/2014/02/EIROSHELL-SPEC-SHEET-HPLC-MAY-2012.pdf>, acesso em 07/12/2015.

- Gritti, F., D. S. Bell & G. Guiochon (2014). "Particle size distribution and column efficiency. An ongoing debate revived with 1.9  $\mu\text{m}$  Titan-C-18 particles." Journal of Chromatography A **1355**: 179-192.
- Gritti, F. & G. Guiochon (2007). "Comparative study of the performance of columns packed with several new fine silica particles Would the external roughness of the particles affect column properties?" Journal of Chromatography A **1166**(1-2): 30-46.
- Gritti, F. & G. Guiochon (2007). "Unusual behavior of the height equivalent to a theoretical plate of a new poroshell stationary phase at high temperatures." Journal of Chromatography A **1169**(1-2): 125-138.
- Gritti, F. & G. Guiochon (2012). "Facts and Legends About Columns Packed with Sub-3-um Core-Shell Particles." LC GC North America **30**(7): 586-595.
- Gritti, F. & G. Guiochon (2013). "Mass transfer mechanism in hydrophilic interaction chromatography." Journal of Chromatography A **1302**: 55-64.
- Gritti, F. & G. Guiochon (2013). "The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1302**: 1-13.
- Gritti, F. & G. Guiochon (2014). "Impact of the nature and composition of the mobile phase on the mass transfer mechanism in chiral reversed phase liquid chromatography. Application to the minimization of the solvent cost in chiral separations." Journal of Chromatography A **1327**: 57-65.
- Gritti, F. & G. Guiochon (2014). "Mass transfer mechanism in chiral reversed phase liquid chromatography (vol 1332, pg 35, 2014)." Journal of Chromatography A **1342**: 92-92.
- Gritti, F., A. Holtzel, U. Tallarek & G. Guiochon (2015). "The relative importance of the adsorption and partitioning mechanisms in hydrophilic interaction liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1376**: 112-125.
- Gritti, F., Y. V. Kazakevich & G. Guiochon (2007). "Effect of the surface coverage of endcapped C-18-silica on the excess adsorption isotherms of commonly used organic solvents from water in reversed phase liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1169**(1-2): 111-124.
- Gritti, F., I. Leonardis, J. Abia & G. Guiochon (2010). "Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for

chromatography Relationships between particle characteristics and column performance." Journal of Chromatography A **1217**(24): 3819-3843.

Gritti, F., I. Leonardis, D. Shock, P. Stevenson, A. Shalliker & G. Guiochon (2010). "Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C-18." Journal of Chromatography A **1217**(10): 1589-1603.

Gritti, F., A. D. Pereira, P. Sandra & G. Guiochon (2010). "Efficiency of the same neat silica column in hydrophilic interaction chromatography and per aqueous liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1217**(5): 683-688.

Guillarme, D. & S. Fekete (2013). Fast and Efficient HPLC Separations With Superficially Porous Particles, PerkinElmer Inc: 1-9.

Guo, H. Y., M. D. Dolzan, D. A. Spudeit, C. D. Xu, Z. S. Breitbach, U. Sreeniyasan & D. W. Armstrong (2015). "Sensitive detection of anionic metabolites of drugs by positive ion mode HPLC-PIESI-MS." International Journal of Mass Spectrometry **389**: 14-25.

Guo, Q. X., S. H. Luo & Y. C. Liu (1998). "Substituent effects on the driving force for inclusion complexation of alpha- and beta-cyclodextrin with monosubstituted benzene derivatives." Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry **30**(2): 173-182.

Hayes, R., A. Ahmed, T. Edge & H. F. Zhang (2014). "Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1357**: 36-52.

Heaton, J. C. & D. V. McCalley (2014). "Comparison of the kinetic performance and retentivity of sub-2 um core-shell, hybrid and conventional bare silica phases in hydrophilic interaction chromatography." Journal of Chromatography A **1371**: 106-116.

Heaton, J. C., X. L. Wang, W. E. Barber, S. M. C. Buckenmaier & D. V. McCalley (2014). "Practical observations on the performance of bare silica in hydrophilic interaction compared with C18 reversed-phase liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1328**: 7-15.

Horvath, C. G. & S. R. Lipsky (1967). "Peak Capacity in Chromatography." Analytical Chemistry **39**(14): 1893.

Horvath, C. G., B. A. Preiss & S. R. Lipsky (1967). "Fast Liquid Chromatography - an Investigation of Operating Parameters and Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers." Analytical Chemistry **39**(12): 1422.

Jacquot, C., D. J. David, A. M. Gardier & C. Sanchez (2007). "Escitalopram and citalopram : the unexpected role of the R-enantiomer." Encephale-Revue De Psychiatrie Clinique Biologique Et Therapeutique **33**(2): 179-187.

Jandera, P. (2011). "Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review." Analytica Chimica Acta **692**(1-2): 1-25.

Jiang, C. X., M. Y. Tong, Z. S. Breitbach & D. W. Armstrong (2009). "Synthesis and examination of sulfated cyclofructans as a novel class of chiral selectors for CE." Electrophoresis **30**(22): 3897-3909.

K. Broeckhoven, D. C., G. Desmet (2013). "Kinetic performance comparison of fully and superficially porous particles with sizes ranging between 2.7  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$ : Intrinsic evaluation and application to a pharmaceutical test compound." Journal of Pharmaceutical Analysis **3**(5): 11.

Kalikova, K., M. Riesova & E. Tesarova (2012). "Recent chiral selectors for separation in HPLC and CE." Central European Journal of Chemistry **10**(3): 450-471.

Kawamura, M., T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura & K. Mizutani (1989). "Formation of a Cycloinulo-Oligosaccharide from Inulin by an Extracellular Enzyme of Bacillus-Circulans Okumz-31b." Carbohydrate Research **192**: 83-90.

Kirkland J. J., S. S. A., Johnson W. L. & Boyes B. E. (2013). "Fused-core particle technology in high-performance liquid chromatography: An overview." Journal of Pharmaceutical Analysis **3**(5): 303-312.

Kirkland, J. J. (1969). "Controlled Surface Porosity Supports for High Speed Gas and Liquid Chromatography." Analytical Chemistry **41**(1): 218-220.

Kirkland, J. J. (1971). "Columns for Modern Analytical Liquid Chromatography." Analytical Chemistry **43**(12): 36A-48A.

Kirkland, J. J. (1992). "Superficially Porous Silica Microspheres for the Fast High-Performance Liquid-Chromatography of Macromolecules." Analytical Chemistry **64**(11): 1239-1245.

Kosel, M., C. B. Eap, M. Amey & P. Baumann (1998). "Analysis of the enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites using chiral liquid chromatography." Journal of Chromatography B **719**(1-2): 234-238.

Kusters, E. (1996). "Preparative chromatographic separation of enantiomers on chiral stationary phases - Method development, scale-up and techniques." Chimica Oggi-Chemistry Today **14**(7-8): 39-43.

Lambert, N., I. Kiss & A. Felinger (2014). "Mass-transfer properties of insulin on core-shell and fully porous stationary phases." Journal of Chromatography A **1366**: 84-91.

Leandro, J. A. & F. L. Santos (2015). "History of Thalidomide in Brazil based on the print media (1959-1962)." Saúde e Sociedade **24**(3): 991-1005.

Lima, V. L. E. (1997). "Drugs and chirality: A brief overview." Quimica Nova **20**(6): 657-663.

Liu, M., E. X. Chen, R. Ji & D. Semin (2008). "Stability-indicating hydrophilic interaction liquid chromatography method for highly polar and basic compounds." Journal of Chromatography A **1188**(2): 255-263.

Lomsadze, K., G. Jibuti, T. Farkas & B. Chankvetadze (2012). "Comparative high-performance liquid chromatography enantioseparations on polysaccharide based chiral stationary phases prepared by coating totally porous and core-shell silica particles." Journal of Chromatography A **1234**: 50-55.

Lourenco, T. D., N. M. Cassiano & Q. B. Cass (2010). "Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography." Quimica Nova **33**(10): 2155-2164.

Mandrioli, R., S. Fanali, V. Pucci & M. A. Raggi (2003). "Enantiomeric separation of citalopram and its metabolites by capillary electrophoresis." Electrophoresis **24**(15): 2608-2616.

McCalley, D. V. (2008). "Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography." Journal of Chromatography A **1193**(1-2): 85-91.

McConathy, J. & M. J. Owens (2003). "Stereochemistry in Drug Action." Prim Care Companion J Clin Psychiatry **5**(2): 70-73.

Meyer, V. R. (1987). "Some Aspects of the Preparative Separation of Enantiomers on Chiral Stationary Phases." Chromatographia **24**: 639-645.

Neue, U. D. "Hydrophilic interaction chromatography (HILIC)." <http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/501-/Hydrophilic-interaction-chromatography-HILIC>, acesso em 17/01/2016.

Nguyen, L. A., H. He & C. Pham-Huy (2006). "Chiral drugs: an overview." International Journal of Biomedical Science **2**(2): 85-100.

Organização-Erowid. (2004). "Solvent Miscibility Table." <http://www.erowid.org/archive/rhodium/pdf/solvent.miscibility.pdf>, acesso em 18/09/2015.

Organização-Erowid. (2015). "Organic Solvents: Table of Properties." [http://www.erowid.org/psychoactives/chemistry/chemistry\\_info5.shtml](http://www.erowid.org/psychoactives/chemistry/chemistry_info5.shtml), acesso em 18/09/2015.

Padivitage, N. L. T. & D. W. Armstrong (2011). "Sulfonated cyclofructan 6 based stationary phase for hydrophilic interaction chromatography." Journal of Separation Science **34**(14): 1636-1647.

Padivitage, N. L. T., M. K. Dissanayake & D. W. Armstrong (2013). "Separation of nucleotides by hydrophilic interaction chromatography using the FRULIC-N column." Analytical and Bioanalytical Chemistry **405**(27): 8837-8848.

Patel, D. C., Z. S. Breitbach, M. F. Wahab, C. L. Barhate & D. W. Armstrong (2015). "Gone in Seconds: Praxis, Performance, and Peculiarities of Ultrafast Chiral Liquid Chromatography with Superficially Porous Particles." Analytical Chemistry **87**(18): 9137-9148.

Pesek, J. J., M. T. Matyska and C. E. W. Eugene P. Kadar, & Olga Kavetskaia (2011). Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications, CRC Press.

Pieters, S., B. Dejaegher & Y. V. Heyden (2010). "Emerging Analytical Separation Techniques with High Throughput Potential for Pharmaceutical Analysis, Part I: Stationary Phase and Instrumental Developments in LC." Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening **13**(6): 510-529.

Pous-Torres, S., J. J. Baeza-Baeza, J. R. Torres-Lapasio & M. C. Garcia-Alvarez-Coque (2008). "Peak capacity estimation in isocratic elution." Journal of Chromatography A **1205**(1-2): 78-89.

Qiu, H. X., L. Loukotkova, P. Sun, E. Tesarova, Z. Bosakova & D. W. Armstrong (2011). "Cyclofructan 6 based stationary phases for hydrophilic

interaction liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1218**(2): 270-279.

Rocco, A., Z. Aturki & S. Fanali (2013). "Chiral separations in food analysis." TrAC-Trends in Analytical Chemistry **52**: 206-225.

Rochat, B., M. Kosel, G. Boss, B. Testa, M. Gillet & P. Baumann (1998). "Stereoselective biotransformation of the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram and its demethylated metabolites by monoamine oxidases in human liver." Biochemical Pharmacology **56**(1): 15-23.

Rodrigues, J. A. R. (2010). "Homochiral Biomolecular Evolution. The Origin and the Amplification of Chirality in Life Molecules." Química Nova **33**(5): 1175-1185.

Ruta, J., D. Zurlino, C. Grivel, S. Heinisch, J. L. Veuthey & D. Guillarme (2012). "Evaluation of columns packed with shell particles with compounds of pharmaceutical interest." Journal of Chromatography A **1228**: 221-231.

Sarfati, J. (1998). "Origin of life: the chirality problem." Journal of Creation **12**(3): 263-266.

Shu, Y., J. C. Lang, Z. S. Breitbach, H. Qiu, J. P. Smuts, M. Kiyono-Shimobe, M. Yasuda & D. W. Armstrong (2015). "Separation of therapeutic peptides with cyclofructan and glycopeptide based columns in hydrophilic interaction liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1390**: 50-61.

Sidhu, J., M. Priskorn, M. Poulsen, A. Segonzac, G. Grollier & F. Larsen (1997). "Steady-state pharmacokinetics of the enantiomers of citalopram and its metabolites in humans." Chirality **9**(7): 686-692.

Smuts, J. P., Y. C. Na, R. Vallakati, A. Pribylka, J. A. May & D. W. Armstrong (2014). "Enantioseparation of flinderoles and borreverines by HPLC on Chirobiotic V and V2 stationary phases and by CE using cyclodextrin selectors." Analytical and Bioanalytical Chemistry **406**(6): 1813-1814.

Song, H. Y., E. Adams, G. Desmet & D. Cabooter (2014). "Evaluation and comparison of the kinetic performance of ultra-high performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography columns in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography conditions." Journal of Chromatography A **1369**: 83-91.

Spudeit, D. A., Z. S. Breitbach, M. D. Dolzan, G. A. Micke & D. W. Armstrong (2015). "Superficially Porous Particle Based Hydroxypropyl-cyclodextrin

Stationary Phase for High-Efficiency Enantiomeric Separations." Chirality **27**(11): 788-794.

Spudeit, D. A., M. D. Dolzan, Z. S. Breitbach, W. E. Barber, G. A. Micke & D. W. Armstrong (2014). "Superficially porous particles vs. fully porous particles for bonded high performance liquid chromatographic chiral stationary phases: Isopropyl cyclofructan 6." Journal of Chromatography A **1363**: 89-95.

Sun, P., C. L. Wang, Z. S. Breitbach, Y. Zhang & D. W. Armstrong (2009). "Development of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Native and Derivatized Cyclofructans." Analytical Chemistry **81**(24): 10215-10226.

Supelco (2013). "Chiral GC Columns: The Widest Variety of Derivatized Cyclodextrins". Sigma-Aldrich Co.: 1-11.

Takacsnovak, K., B. Noszal, M. Tokeskovesdi & G. Szasz (1993). "Acid-Base Properties and Proton-Speciation of Vancomycin." International Journal of Pharmaceutics **89**(3): 261-263.

Tang, M. L., J. Zhang, S. L. Zhuang & W. P. Liu (2012). "Development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation." TrAC-Trends in Analytical Chemistry **39**: 180-194.

Van Deemter, J. J., F. J. Zuiderweg & A. Klinkenberg (1956). "Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography." Chemical Engineering Science **5**(6): 271-289.

Vistuba, J. P., M. D. Dolzan, L. Vitali, M. A. L. de Oliveira & G. A. Micke (2015). "Sub-minute method for simultaneous determination of aspartame, cyclamate, acesulfame-K and saccharin in food and pharmaceutical samples by capillary zone electrophoresis." Journal of Chromatography A **1396**: 148-152.

Walter, T. H. & R. W. Andrews (2014). "Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation." TrAC-Trends in Analytical Chemistry **63**: 14-20.

Wang, C. L., C. X. Jiang & D. W. Armstrong (2008). "Considerations on HILIC and polar organic solvent-based separations: Use of cyclodextrin and macrocyclic glycopeptide stationary phases." Journal of Separation Science **31**(11): 1980-1990.

Wang, X. L., W. E. Barber & W. J. Long (2012). "Applications of superficially porous particles: High speed, high efficiency or both?" Journal of Chromatography A **1228**: 72-88.

Ward, T. J. & A. B. Farris (2001). "Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review." Journal of Chromatography A **906**(1-2): 73-89.

Ward, T. J. & K. D. Ward (2010). "Chiral Separations: Fundamental Review 2010." Analytical Chemistry **82**(12): 4712-4722.

Woods, R. M., D. C. Patel, Y. Lim, Z. S. Breitbach, H. Y. Gao, C. Keene, G. Q. Li, L. Kurti & D. W. Armstrong (2014). "Enantiomeric separation of biaryl atropisomers using cyclofructan based chiral stationary phases." Journal of Chromatography A **1357**: 172-181.

Zhang, Y., Z. S. Breitbach, C. L. Wang & D. W. Armstrong (2010). "The use of cyclofructans as novel chiral selectors for gas chromatography." Analyst **135**(5): 1076-1083.