

Daniel Alfonso Spudeit

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS
PREPARADAS COM PARTÍCULAS SUPERFICIALMENTE
POROSAS, QUIMICAMENTE MODIFICADAS COM
DERIVADOS DE CICLOFRUTANOS E CICLODEXTRINAS
PARA SEPARAÇÕES ENANTIOMÉRICAS POR HPLC**

Tese submetida ao Programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Química analítica

Orientador: Prof. Dr. Gustavo A. Micke

Coorientador: Prof. Dr. Daniel L. Borges.

Florianópolis
2016

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

Alfonso Spudeit, Daniel

Síntese e avaliação de fases estacionárias preparadas com partículas superficialmente porosas, quimicamente modificadas com derivados de ciclofrutanos e ciclodextrinas para separações enantioméricas por HPLC / Daniel Alfonso Spudeit ; orientador, Gustavo Amadeu Micke ; coorientador, Daniel Lazaro Gallindo Borges. - Florianópolis, SC, 2016.

106 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. HPLC. 3. Fase estacionária. 4. Separações enantioméricas. 5. Partículas Superficialmente Porosas. I. Amadeu Micke, Gustavo . II. Lazaro Gallindo Borges, Daniel. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Daniel Alfonso Spudeit

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS
PREPARADAS COM PARTÍCULAS SUPERFICIALMENTE
POROSAS, QUIMICAMENTE MODIFICADAS COM
DERIVADOS DE CICLOFRUTANOS E CICLODEXTRINAS
PARA SEPARAÇÕES ENANTIOMÉRICAS POR HPLC**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-graduação em Química.

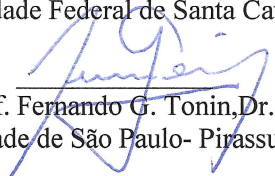
Florianópolis, 03 de Junho de 2016

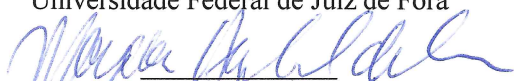
Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Curso de Pós Graduação em Química

Banca Examinadora:

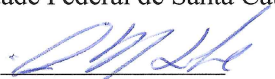
Prof. Gustavo A. Micke, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Daniel L.G. Borges, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof. Fernando G. Tonin, Dr.
Universidade de São Paulo- Pirassununga

Prof. Marcone A. L. De Oliveira, Dr.
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Luiz Augusto S. Madureira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Carasek da Rocha, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina


Dr. Andrey Martinez Rebelo
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina-
EPAGRI

Este trabalho é dedicado a todos que,
de alguma forma, fizeram parte desse
caminho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus familiares (tios, tias, primos, avó) pelo imenso apoio que sempre deram a mim e à minha família (mãe, pai, irmãos), pois a ajuda deles tornou nosso caminho mais fácil, ou ao menos, mais agradável.

Um agradecimento mais do que especial para os meus pais Vilmar e Maura por todo carinho, apoio e confiança que depositaram em mim. Também um agradecimento aos meus irmãos Willian e Samuel, que muitas vezes tiveram que abdicar dos seus divertimentos para cuidar do irmão caçula, e mesmo depois de eu tanto incomodá-los, ainda me defendem com unhas e dentes.

Aos frequentadores do apto 303, moradores ou não, por todo o carinho, atenção, divertimento e tudo o mais que só a gente sabe. Aos meus amigos Geovanni, Everton, Latino (Alex), Elder, Leandro, Diogo, Fabio (Dig) e Robert pela parceria de sempre.

A Juliana, por ser minha paciente companheira e parceira para todas as horas.

Aos amigos do LABEC *old School*: Marcel, Melina, Luciano, Michele, Samantha, Mônia, Andressa, Maressa e Ana por tudo que eu aprendi com eles e por todos os momentos de descontração que tivemos juntos.

Um agradecimento especial ao professor Dr. Daniel W. Armstrong que abriu as portas do seu laboratório e nos deu todas as condições para realizar um trabalho que não teríamos a oportunidade de realizar.

Ao professor Gustavo, todos os agradecimentos possíveis. Primeiro por ter me aceito lá em 2008 e, segundo, por ter acreditado em mim e me apoiado todos esses anos.

Por último, meu agradecimento a Deus, por permitir ter essas pessoas em minha vida para que eu possa aprender e crescer com elas, ajudando e sendo ajudado.

“Tente outra coisa. Tente ver as coisas de um modo diferente. Tente outra cor e se não for amor, outro tipo de gente. Tente ver além do que você já tem à sua frente. Tente um novo mundo, uma nova era! Tudo pode estar te esperando, tudo pode estar onde menos se espera.”

(Engenheiros do Hawaii)

RESUMO

Este trabalho apresenta uma comparação das separações enantiôméricas realizadas por HPLC com fases estacionárias quirais preparadas ligando quimicamente o ciclofrutano-6, funcionalizado com grupos isopropílico, e β -ciclodextrina, funcionalizada com grupos hidroxipropil, em partículas totalmente e superficialmente porosas (SPP). A fase estacionária quiral à base de partículas superficialmente porosas funcionalizadas com hidroxipropil- β -ciclodextrina foram produzidas e sua performance cromatográfica foi comparada com as colunas de fase quiral (CSP) a base de partículas totalmente porosas de 5 μm e 3 μm de diâmetro. O recobrimento relativo do seletor quiral HP- β -CD, foi equivalente para todas as fases, resultando em valores de seletividade (α) equivalentes, para condições de fase móvel constantes. Sob tais condições, a coluna à base de SPP apresentou tempos de análises reduzidos e eficiência até três vezes maior comparado com as colunas à base de partículas totalmente porosas (FPP). Quando fluxos elevados de fase móvel foram utilizados, o ganho em eficiência por tempo de análise foi cinco vezes maior para as colunas a base de SPP comparado com as colunas à base de FPP. Quando a composição da fase móvel foi alterada de modo que, para todas colunas, o analito tivesse o mesmo tempo de eluição, os valores de resolução foram o dobro para as SPP. Por fim, as novas fases estacionárias à base de SPP, provaram ser estáveis por 500 injeções com fluxo elevado (4,5 mL min^{-1}) e alta pressão (400 bar), condições usadas para separações ultrarrápidas (~ 45 seg.). Baseado nos excelentes resultados obtidos com as fases estacionárias quirais à base de SPP funcionalizadas com HP-B-RSP, novos estudos foram realizados utilizando outro seletor quiral: isopropil-ciclofrutano. A performance cromatográfica das colunas recheadas com SPP, foi comparada com as colunas recheadas com partículas totalmente porosas com diâmetro de 5 μm e 3 μm . Com o fluxo de fase móvel de 3,0 mL min^{-1} , o número de pratos alcançados com a coluna contendo SPP foi ~ 7 vezes maior que o número de pratos obtidos com a coluna, com mesmo comprimento, recheada com FPP de 5 μm . O fluxo ótimo de fase móvel, onde os maiores valores de eficiência foram obtidos, foi de 1 mL min^{-1} para colunas à base SPP e 0,5 mL min^{-1} para as colunas preparadas com FPP. Assim como no caso anterior, os valores de seletividade e resolução (sob condições de fase móvel constante), são comparáveis entre todas as colunas. Quando testadas sob condições de fase móvel que resultam em tempo de retenção constante para todas as colunas, as CSP à base de SPP, apresentaram ganho em resolução comparado com as CSP à base

de FPP. Por fim, com o aumento do fluxo da fase móvel as novas fases estacionárias apresentaram maior ganho em eficiência. Essa vantagem se torna mais clara observando os valores de número de prato e resolução em função do tempo de análise.

Palavras-chave: separações enantioméricas, partículas superficialmente porosas, β -ciclodextrina e ciclofrutano.

ABSTRACT

This work reports a comparison of HPLC separations of enantiomers with chiral stationary phases prepared by chemically bonding cyclofructan-6, functionalized with isopropyl carbamate groups, and β -cyclodextrin, functionalized with hydroxypropyl groups, on fully and superficially porous particles (SPPs). A superficially porous particle-based hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) chiral stationary phase was produced and its chromatographic performance was compared to both 5 μm and 3 μm fully porous particle (FPP)-based CSPs. The relative surface coverage of the HP-B-CD chiral selector on each particle was approximately equal, which resulted in equivalent enantiomeric selectivity (α) values on each phase when constant mobile phase conditions were used. Under such conditions, the SPP column resulted in greatly reduced analysis times and three times greater efficiencies compared to the FPP columns. When higher flow rates were used, efficiency gains per analysis times were five times greater for the SPP column compared to the FPP-based columns. When the mobile phases were altered to give similar analysis times on each column, resolution values were doubled for the SPP column. Finally, the novel SPP based HP-B-CD column proved to be stable for 500 injections under high flow rate (4.5 mL min⁻¹) and high pressure (400 bar) conditions used for an ultrafast (~45 sec) enantiomeric separation. Based on the grate results obtained with the superficially porous particle based hydroxypropyl- β -cyclodextrin chiral stationary phase, a new study was made using another well stabilised chiral selector: isopropyl-cyclofructan. The chromatographic performance of the superficially porous CSP based column was compared with columns packed with 5 μm and 3 μm FPPs. At a flow rate of 3.0 mL min⁻¹ the number of plates on column afforded by the SPP column was ~7 \times greater than the number of plates on column (same length) obtained when using the 5 μm FPP based column. The flow rate providing the highest efficiency separation was ~1.0 mL.min⁻¹ for the SPP column while it was ~0.5 mL.min⁻¹ for both FPP columns. It was found that the selectivity and resolution of the separations were comparable between fully porous and superficially porous based columns (under constant mobile phase conditions). When tested under constant retention conditions, the SPP based CSP greatly improved resolution compared to the FPP based columns. At high flow rates the efficiency gained by using superficially porous CSP was accentuated. The advantages of columns based on SPPs become more

obvious from the view point of plate numbers and resolution per analysis time.

Keywords: enantiomeric Separation; superficially porous particle, β -cyclodextrin and cyclofructan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1: Representação esquemática de um HPLC: (a) reservatório de fase móvel; (b) bombas; (c) injetor; (d) coluna; (e) detector e (f) registrador	33
Figura 2-2: Representação de uma partícula superficialmente porosa	41
Figura 2-3: Obtenção da fase quimicamente ligada: (A) reação de organossilanização com reagente mono funcional; e (B) reação de organossilanização com reagente bifuncional.....	44
Figura 2-4: Representação esquemática de um sistema de empacotamento de alta pressão.	46
Figura 2-5: Curva de altura de prato versus velocidade da fase móvel e as contribuições de cada termo da equação de van Deemter.....	48
Figura 3-1: Estrutura e tamanho dos três tipos mais comuns de ciclodextrinas.	49
Figura 3-1: Estrutura das CD com as hidroxilas reativas localizadas nas regiões externas. Imagem adaptada de (TANG; NG; SUN, 2013).....	54
Figura 3-1: Estrutura do HP-RSP-CD, seletor quiral utilizado nesse estudo.	63
Figura 3-1: Estruturas dos compostos testados A- clortalidona; B- hidrobencozína; C- ácido 2-fenilpropiónico e D- catalisador de Jacobsen.....	66
Figura 3-2: Separação dos enantiômeros de (A) clortalidona, (B) hidrobencozína, (C) ácido 2-fenilpropiónico e (D) catalisador de Jacobsen utilizando as colunas indicadas em cada cromatograma. A fase móvel utilizada em RPM (Reverse Phase Mode) foi acetonitrila /10 mM NH ₄ OAc pH 4.1: a composição da MP foi 25/75 (v/v) para o composto (A) e (C) e 15/85 para o composto (B). Para as separações em POM, a fase móvel foi acetonitrila/metanol e a composição foi 95/5 (v/v) para o composto (D).....	67
Figura 3-1: Dependência da altura de prato (baseada no primeiro enantiômero eluído) para os compostos testados. As condições de separação estão listadas na seção 3.3.2.	68
Figura 3-2: Dependência do número de prato por minuto <i>versus</i> fluxo da fase móvel (baseado no primeiro enantiômero eluído para todos os compostos testados). As condições de separação estão resumidas na seção 3.3.2.	69
Figura 3-1: Comparação da separação da 1,2-difenil-1,2-etanodiol realizada com fluxo de 1,2 mL min ⁻¹ . A fase móvel foi composta por ACN/10mM de NH ₄ OAc, sendo a composição de 36:64 para a coluna 1, 38:62 para a coluna 2 e 25:75 para a coluna 3.	72
Figura 3-2: Dependência da Rs min ⁻¹ <i>versus</i> o fluxo da fase móvel para os compostos testados. As condições de separação estão detalhadas na seção 3.2.2.	73
Figura 4-1: Estrutura molecular dos ciclofrutanos CF6, CF7 e CF8.....	75
Figura 4-2: Conformação adotada pelo éter de coroa no interior do CF6 alternando-se entre gauche e trans. Vermelho: átomos de oxigênio; cinza: átomos de Carbono.	77

Figura 4-3: Visão lateral do CF-6 derivatizado com: A) seis grupos metilcarbamato e B) dezoito grupos R-naftil carbamato. Vermelho: átomos de oxigênio; Azul: átomos de carbono.	78
Figura 4-4: Estrutura química do ligante 3-(trietilsilil) propil isocianato (A) e do seletor quiral IP-CF-6 (B) utilizados neste estudo.	86
Figura 4-5: Estrutura dos compostos testados A- Amlodipina; B-1-(1-naftil)etilamina; C- NOBIN e D- Fipronil.	89
Figura 4-6: Separação dos enantiômeros de (A) amlodipina, (B) 1-(1-naftil)etilamina, (C) NOBIN e (D) fipronil, utilizando as colunas indicadas em cada cromatograma. A fase móvel utilizada em POM foi ACN: metanol: 0,3%(v/v) ácido acético e 0,2 %(v/v) de trietilamina. A composição da MP foi 80:20 para o composto (A) e 60:40 para composto (B). Para separações em NPM, a fase móvel utilizada foi heptano: etanol, sendo a composição de 95:5 para os compostos (C) e (D).	90
Figura 4-7: Dependência da altura de prato (baseada no primeiro enantiômero eluído) para os compostos testados. As condições de separação estão listadas na seção 4.3.2.	91
Figura 4-8: Dependência do número de prato por minuto <i>versus</i> fluxo da fase móvel (baseado no primeiro enantiômero eluído para todos os compostos testados). As condições de separação estão resumidas na seção 4.3.2.	92
Figura 4-9: Comparação da separação da fipronil realizada com fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ . A fase móvel foi composta por heptano:etanol, sendo a composição de 92:8 para as colunas 1 e 2 e 95:5 para a coluna 3.	96
Figura 4-10: Dependência da Rs min ⁻¹ versus o fluxo da fase móvel para os compostos testados. As condições de separação estão detalhadas na seção 4.2.97	

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1 – Detectores empregados em cromatografia líquida (SKOOG et al., 2004).....	35
Tabela 3-1: Ciclodextrinas derivatizadas disponíveis comercialmente.....	56
Tabela 3-2: Propriedades das partículas e resultados da análise elementar para cada fase estacionária.	65
Tabela 3-3 : Resolução (R_s) (em parênteses) e seletividade enantiomérica (α). Valores obtidos para os compostos testados nas colunas empacotados FPP e SPP, num fluxo de 1mL min^{-1} . As condições de separação estão listadas na seção 3.2. As colunas 1 e 2 foram empacotados com FPP com diâmetro de $5\ \mu\text{m}$ e $3\ \mu\text{m}$ respectivamente. A coluna 3 foi empacotada com SPP com diâmetro de $2,7\ \mu\text{m}$	71
Tabela 4-1: Propriedades das partículas e resultados da análise elementar para cada fase estacionária.	88
Tabela 4-2: Resolução (R_s) e seletividade enantiomérica (α) (em parênteses). Valores obtidos para os compostos testados nas colunas empacotados FPP e SPP, num fluxo de 1mL min^{-1} . As condições de separação estão listadas na seção 4.2. As colunas 1 e 2 foram empacotados com FPP com diâmetro de $5\ \mu\text{m}$ e $3\ \mu\text{m}$ respectivamente. Coluna 3 foi empacotado com SPP com diâmetro de $2,7\ \mu\text{m}$	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila
 α – Seletividade
CDs – Ciclodextrinas
CE – Eletroforese Capilar (*do inglês Capillary Electrophoresis*)
CEC – Eletrocromatografia Capilar (*do inglês Capillary Electrochromatography*)
CSP – Fase estacionária quiral (*do inglês, Chiral Stationary Phase*)
DMF – Dimetilformamida
EMEA – (do inglês, *European Medicines Agency*)
FDA – (do inglês, *Food and Drug Administration*)
FE – Fase estacionária
FM – Fase móvel
FPP – Partículas totalmente porosas (*do inglês, Fully Porous Particles*)
GC – Cromatografia gasosa (*do inglês, Gas Chromatography*)
H – Altura dePrato
HILIC – Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (*do inglês, Hydrophilic Interaction liquid chromatography*)
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*do inglês, High Performance Liquid Chromatography*)
IV - Infravermelho
k – Constante de distribuição
k – Fator de Retenção
L- Comprimento da coluna
LC – Cromatografia Líquida (*do inglês, Liquid Chromatography*)
MeOH – Metanol
N –Número de Pratos Teóricos
NPM – Modo Fase Normal (*do inglês, Normal Phase Mode*)
POM – Modo Polar Orgânico (*do inglês, Polar Organic Mode*)
R_s – Resolução
SEC – Cromatografia por Exclusão (*do inglês, Size exclusion Chromatography*)
SFC – Cromatografia em fluido supercrítico (*do inglês, Supercritical Fluid Chromatography*)
SPE – Extração em fase sólida (*do inglês, Solid Phase Extraction*)
SPP – Partículas Superficialmente Porosas (*do inglês, Superficial Porous Particles*)
SQ – Seletor Quiral
t₀ – Tempo morto
TLC – Cromatografia em Camada Fina
t_R – Tempo de Retenção
UV – Ultravioleta
W_b – Largura do Pico

SUMÁRIO

Capítulo Sumário

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	23
CAPÍTULO 2 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	27
2.1 INTRODUÇÃO	27
2.2 CARACTERÍSTICAS DAS FASES ESTACIONÁRIAS EM HPLC....	28
2.3 CLASSIFICAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	29
2.3.1 Cromatografia de adsorção	29
2.3.2 Cromatografia por exclusão	30
2.3.3 Cromatografia por troca iônica.....	30
2.3.4 Cromatografia por afinidade	31
2.3.5 Cromatografia por partição.....	31
2.3.6 Cromatografia de interação hidrofílica	31
2.4 Parâmetros cromatográficos	32
2.5 Instrumentação	33
2.6 Colunas	36
2.6.1 Tipos de Suportes	37
2.6.2 Partículas Superficialmente Porosas.....	39
2.7 Preparo das fases estacionárias.....	43
2.8 Empacotamento das colunas.....	45
2.8.1 Avaliação da coluna	47
3.1- Introdução	49
3.1.1- Ciclodextrinas em Cromatografia líquida	51
3.1.2 Mecanismo de reconhecimento quiral	57
3.2.1 Objetivo geral.....	60
3.2.2 Objetivos específicos	60
3.3 Experimental	61
3.3.1 Materiais.....	61
3.3.2 Metodologia.....	61
3.3.3 Síntese da fase estacionária	62
3.4 Resultados e discussão	64
3.4.1 Análise elementar	64
3.4.2.Comparação cromatográfica	66

3.4.3 Dependência do número de pratos em função do fluxo da fase móvel.....	67
3.4.4. Seletividade	69
3.4.5. Resolução (R_s).....	72
3.5 Conclusões.....	74
4.1- Introdução.....	75
4.1.1Ciclofrutanos funcionalizados.....	77
4.1.2 Mecanismos	78
4.1.3 Aplicações	80
4.2 OBJETIVOS.....	83
4.2.1 Objetivo geral	83
4.2.2 Objetivos específicos.....	83
4.3 EXPERIMENTAL	84
4.3.1 Materiais	84
4.3.2 HPLC Método.....	84
4.3.3 Síntese da fase estacionária	85
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.4.1 Análise elementar	87
4.4.2 Comparação cromatográfica.....	89
4.4.3 – Dependência do número de pratos em função do fluxo da fase móvel.....	90
4.4.4 Seletividade (α).....	92
4.4.5 Resolução (R_s)	94
4.5 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS.....	99

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A descoberta e o desenvolvimento da estereoquímica teve seu início em meados do século 19, quando o pesquisador francês Louis Pasteur, que realizou pela primeira vez a separação de dois enantiômeros, percebeu que a degradação dos isômeros do sal de tartarato de amônio pelo fungo *Penicillium glaucum*, ocorria em velocidades diferentes e postulou “ A maioria dos produtos orgânicos naturais, os produtos vitais para a vida, são assimétricos e possuem tal assimetria que suas imagens não podem ser sobreponíveis” (MURAKAMI, 2006).

Mesmo com a descoberta de Pasteur, o interesse na estereoquímica dos fármacos recebeu maior atenção apenas na década de 60, quando ocorreu a tragédia da talidomida, onde o fármaco utilizado para reduzir o enjoo durante a gravidez, que provocou o nascimento de milhares de crianças com deformações. Estudos posteriores demonstraram que o enantiômero (R)-talidomida apresentava o efeito sedativo desejado e o enantiômero (S)-talidomida apresentava um efeito teratogênico em mulheres grávidas (BERTHOD, 2010; MURAKAMI, 2006).

Após a tragédia da talidomida, estabeleceu-se um rigoroso controle sobre a pureza dos enantiômeros utilizados na medicina. Em todo o mundo, agências governamentais reguladoras passaram a controlar a fabricação dos princípios ativos na indústria farmacêutica, com uma atenção especial para pureza enantiomérica no caso de fármacos quirais, fazendo com que ao passar dos anos, o número de medicamentos comercializados na forma racêmica fosse reduzido (BERTHOD, 2010). Ainda como consequência do maior controle das autoridades, as indústrias farmacêuticas foram encorajadas a investir mais em estudos que levassem a compreensão das atividades farmacológicas e toxicológicas de cada enantiômero de um determinado composto. O resultado desses esforços foi um avanço nas áreas de síntese, análise e separações de compostos quirais (LIMA, 1997).

Na década de 1980, outro fato contribuiu para alavancar as pesquisas a respeito da atividade enantiomérica, onde Ariens em seu trabalho fez a seguinte pergunta: “ *Porque devemos fornecer medicamentos aos nossos pacientes onde metade do conteúdo não apresenta atividade terapêutica ou ainda pior, apresenta o efeito contrário*”? Após esse importante fato ser ressaltado, mais informações acerca dos benefícios terapêuticos (eficácia e segurança) e em muitos o ciclo de vida do fármaco alvo passaram a ser um ímpeto para o

desenvolvimento de medicamentos a base de um único enantiômero (ARIENS, 1990).

Nos dias de hoje é de conhecimento pleno que a utilização de apenas um enantiômero como fármaco apresenta diversas vantagens em relação ao uso da forma racêmica, dentre as quais podemos destacar a maior seletividade nos alvos biológicos, o que contribui para aumentar a eficácia. Tais fatos contribuíram para que, nos últimos anos, a utilização destes medicamentos tivesse um crescimento constante, chegando a representar 37% das vendas de medicamentos no ano de 2005.

Tamanha repercussão fez com que o controle de qualidade na indústria farmacêutica ganhasse ainda mais importância não apenas para proteger as indústrias de um eventual pedido de indenização, como também para garantir ao paciente um produto seguro e eficaz. Atualmente, nenhuma das principais autoridades reguladoras do mundo como a americana FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e a europeia EMEA (do inglês, *European Medicines Agency*) têm uma exigência absoluta para o desenvolvimento de fármacos de enantiômeros individuais e a decisão sobre a forma estereoisomérica, ou seja, único enantiômero ou mistura racêmica a ser desenvolvido é deixada para o fabricante do composto. Entretanto, para que essa decisão seja tomada, o interessado em lançar no mercado uma nova droga deve fornecer justificativa científica detalhada baseada na qualidade, segurança e eficácia, juntamente com a razão risco benefício. Assim sendo, para que um novo medicamento seja aprovado, ele deve conter dados analíticos que garantam a identidade, a potência, a qualidade e a pureza. Dentre as técnicas analíticas mais utilizadas, estão os métodos de separação, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) uma das mais utilizadas devido a sua versatilidade, robustez e reprodutibilidade, com uma grande capacidade de separar, analisar e purificar praticamente qualquer tipo de amostra (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

Um dos fatores que pode ser atribuído ao sucesso desta técnica de separação é a grande quantidade de colunas cromatográficas e modos de separações disponíveis. Estima-se que haja mais de 100 tipos de colunas disponíveis comercialmente e outras tantas sendo desenvolvidas e aplicadas em laboratórios de pesquisas. Entretanto, mesmo com vasta gama de colunas e fases estacionárias (FE) disponíveis, o desenvolvimento destas é, ainda hoje, um ponto forte para o desenvolvimento da cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*).

O alto nível de desenvolvimento e expansão alcançados utilizando-se a técnica de HPLC ao longo das últimas décadas, deve-se principalmente a sua vasta aplicabilidade, que engloba o desenvolvimento de novos produtos, o controle da qualidade desses produtos e também as possíveis contaminações provenientes desses produtos e dos já disponíveis no mercado há anos (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). Dentro deste contexto estão envolvidas as indústrias farmacêuticas, alimentícias, agropecuárias e químicas, as agências reguladoras que tratam do meio ambiente e outras. A ampla aplicabilidade da HPLC foi o que impulsionou e continua impulsionando as pesquisas em busca do aprimoramento desta técnica, principalmente referente ao desenvolvimento de novas FE. Hoje a HPLC pode ser considerada uma técnica de análise (separação, confirmação e quantificação) bem difundida e empregada, em consequência das colunas cromatográficas e equipamentos de alta tecnologia que se encontram disponíveis (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

As FE empregadas em HPLC consistem de uma camada orgânica ligada quimicamente ou imobilizada ou apenas sorvida a um suporte cromatográfico. A forma de obtenção dessas camadas e a variedade de óxidos empregados como suportes cromatográficos resultam nos diferentes tipos de FE. O suporte a base de sílica é o mais utilizado devido as suas características como síntese reprodutível e as partículas obtidas possuem faixa estreita de distribuição de tamanho e alta área superficial (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). As partículas de sílica são empregadas em diferentes tamanhos dependendo da aplicação a qual a coluna foi destinada. Porém, nos dias atuais busca-se o desenvolvimento de tecnologias que levem a um aprimoramento das análises por LC, ou seja, que ocorra redução no tempo total de análise, mantendo-se a resolução e eficiência. Dentre os desenvolvimentos recentes podemos destacar o surgimento da nova geração de partículas superficialmente porosas (SPP, do inglês *superficially porous particle*), que será discutida nos capítulos seguintes (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010; MALDANER; JARDIM, 2012).

Além do avanço na implementação de novos materiais como suporte de FE podemos destacar também o desenvolvimento de novos seletores, principalmente para separações quirais, como o caso do ciclofrutano e seus derivados, que foram recentemente implementados com grande sucesso como seletores quirais (SQ) para a cromatografia líquida (KALÍKOVÁ; RIESOVÁ; TESAŘOVÁ, 2012).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi a preparação, caracterização e avaliação de colunas recheadas com partículas totalmente e superficialmente porosas, quimicamente modificadas com derivados de ciclofrutano e ciclodextrina para análises de separações enantioméricas e suas aplicações no desenvolvimento de metodologias de controle de qualidade de fármacos quirais.

CAPÍTULO 2 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

2.1 INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação, que teve sua origem na cromatografia de coluna, originalmente desenvolvida por Tswett em 1903, e é descrita como um método em que os componentes de uma mistura são separados com base numa fase estacionária em um sistema de fluxo, sendo utilizada para separar os componentes de uma solução (GUPTA et al., 2012).

Como descrito por Tswett, a separação ocorre por meio da distribuição do analito entre duas fases: uma fase fixa (fase estacionária) depositada sobre a superfície interna de uma coluna, determinado de suporte, e uma fase móvel líquida que atravessa a fase fixa contida na coluna, onde a fase móvel é empurrada através da coluna pelo auxílio de uma bomba (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009). A amostra, é carregada pela fase móvel. Ao entrar em contato com a fase estacionária, os componentes individuais da amostra irão interagir de forma diferenciada com as fases fazendo com que sejam separados (VIKRAM, K., BHARADWAJ, R., GUPTA, G., KUMAR, 2015).

A LC é uma das técnicas de separação mais difundidas, estando presente em laboratórios de análises clínicas, de controle de qualidade e de pesquisas. Porém, para que a cromatografia originalmente desenvolvida por Tswett, que utilizava colunas de vidro e partículas de tamanho não controlado alcançasse tamanha aceitação, esta precisou passar por diversas transformações. Dentre estas transformações podemos destacar a utilização de tubos de aço, que conferiam a coluna maior resistência a pressão, o desenvolvimento de partículas com diâmetros menores (10, 5, 3 e 2 μm) que gerassem análises com maior capacidade de separação e por fim, a possibilidade de se trabalhar com detectores em fluxo, reduzindo assim o limite de detecção das análises, tornando os métodos muito mais sensíveis.

2.2 CARACTERÍSTICAS DAS FASES ESTACIONÁRIAS EM HPLC

A fase estacionária, descrita por Tswett no início do século 21, vem tomando as mais variadas formas ao longo dos anos, incluindo papel, finas camadas de sólidos fixados em vidro, líquidos imobilizados, géis e partículas sólidas empacotadas em coluna. Por sua vez, a fase móvel do sistema pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico.

Apesar de existirem colunas recheadas com diferentes materiais para HPLC, a sílica é o suporte mais aplicado pelas características que possui, como: alta estabilidade mecânica e térmica, rigidez e a grande eficiência obtida nas separações cromatográficas (NEUE, 1998). Na década de 70, quando a HPLC começou a ser desenvolvida, a sílica utilizada apresentava forma irregular e tamanho de partícula de 40 μm (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009). Por volta de 1980, foi substituída por partículas menores e esféricas. O próximo avanço foi o uso de partículas com diâmetros cada vez menores, sendo que aquelas de 10 μm foram preferencialmente trocadas pelas de 5 e 3 μm . Atualmente, já existem colunas recheadas com partículas de sílica porosas de 1,6 μm (SILVA et al., 2004; SWARTZ, 2005; UNGER; LAMOTTE; MACHTEJEVAS, 2013).

Mudanças significativas quanto à pureza das sílicas, principalmente no método de obtenção destes materiais porosos, também foram importantes no desenvolvimento das novas FE. A sílica, que antes era obtida diretamente do silicato de sódio, agora passa a ser preparada por meio do processo sol-gel, empregando o tetraetoxissilano como fonte de SiO_2 . Com a utilização de solventes e agentes surfactantes apropriados, sílicas de diferentes tamanhos e porosidades são obtidas. Hoje é possível adquirir sílicas altamente puras, livres de contaminantes como ferro e alumínio. A presença desses metais e outros, como contaminantes na matriz de sílica, aumenta consideravelmente a acidez dos grupos silanóis (Si-OH), dificultando a análise de compostos básicos em condições de fase reversa (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009; UNGER; LAMOTTE; MACHTEJEVAS, 2013). Essas melhorias no suporte cromatográfico permitiram ganhos na eficiência, estabilidade e reprodutibilidade das colunas (SILVA et al., 2004).

Em relação as fases estacionárias, elas podem ser classificadas como fase estacionária normal e fase estacionária reversa. A cromatografia em fase normal, que tem esse nome pois foi a utilizada por Tswett em seus experimentos, a fase estacionária é polar e sua fase

móvel é de natureza apolar. Nesta técnica, compostos apolares eluem mais rapidamente e são detectados primeiro. Isto deve-se a baixa afinidade entre os compostos apolares e a fase estacionária, sendo que os compostos polares são retidos por mais tempo por causa de sua afinidade com a fase estacionária. Já a cromatografia em fase reversa é o modo mais popular utilizado para separações analíticas e preparativas de compostos de interesse químico, biológicos, farmacêutico, alimentício e ciências biomédicas. Neste modo, a fase estacionária é apolar hidrofóbica, funcionalizada com grupos funcionais como o octil ou octadecil e a fase móvel é uma mistura de solventes polares (metanol, acetona, água). Os compostos polares são eluídos primeiro neste modo e os apolares ficam mais retidos. Com a utilização de fases móveis aquosas, tem-se a possibilidade de utilizar alguns aditivos, que são compostos químicos como bases e ácidos, para o controle da ionização, supressão de íons, pareamento iônico e complexação para melhor controle da retenção e seletividade (SABIR; MOLOY; BHASIN, 2015).

Nos últimos anos, além da busca por novos materiais para utilização como suporte cromatográfico e novos procedimentos de síntese para bloquear os silanóis residuais, novas fases estacionárias vêm sendo desenvolvidas. Estas tem o objetivo de serem fases capazes de analisar diferentes compostos, incluindo os básicos, em uma ampla faixa de pH com considerável estabilidade química. Paralelamente ao desenvolvimento de novas fases estacionárias, novas tecnologias surgiram com o objetivo de analisar grupos específicos de analitos, bem como tornar as análises cromatográficas mais rápidas e mais eficientes (SILVA et al., 2004; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida pode ser classificada de acordo com o mecanismo de retenção, baseando-se na forma com que o analito interage com a fase estacionária. Sendo assim, existem seis mecanismos de separação: adsorção, exclusão, troca iônica, afinidade, partição e interação hidrofílica.

2.3.1 Cromatografia de adsorção

A cromatografia de adsorção baseia-se na competição entre as moléculas do soluto e do solvente pelos sítios ativos do adsorvente,

estando relacionada com a interação entre os grupos funcionais das partículas da fase estacionária e os grupos polares das moléculas do soluto. Para que a molécula do soluto possa ser adsorvida na fase estacionária, primeiro uma molécula da fase móvel deve ser deslocada da superfície. Assumindo-se que o adsorvente (FE) possui uma superfície polar (sílica ou alumina), grupos apolares (hidrocarbonetos) terão pouca afinidade por essa superfície, não irão deslocar a molécula da fase móvel e assim, não serão retidos. Por sua vez, grupos polares (álcoois, aminas, etc.) terão afinidade pela superfície, deslocando a molécula da fase móvel e assim, ficando retidos por mais tempo.

2.3.2 Cromatografia por exclusão

Geralmente utilizada na separação de componentes de alto peso molecular, a cromatografia por exclusão (SEC) baseia-se na separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. Pelo fato de não haver interações físicas ou químicas entre o soluto e a fase estacionária, a SEC se diferencia dos demais métodos cromatográficos. O principal mecanismo de retenção das moléculas do soluto é a permeação diferenciada destas no interior das partículas do gel. A coluna é empacotada com matéria inerte com poros de tamanho controlado. Ao entrar em contato com a fase estacionária, as moléculas pequenas percorrem um maior caminho no interior de seus poros, apresentando maior tempo de retenção e sendo eluídas mais lentamente pela fase móvel. Enquanto isso, as moléculas maiores, que não conseguiram permear nos poros, são carregadas pela fase móvel e apresentando menor tempo de retenção (SKOOG et al., 2004; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

2.3.3 Cromatografia por troca iônica

A cromatografia por troca iônica é um método de adsorção que se baseia na interação eletrostática entre o soluto e a fase estacionária, buscando o equilíbrio de troca entre íons em solução e íons de mesmo sinal na superfície de um sólido que deve ser insolúvel e de alto peso molecular (SKOOG et al., 2004; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

2.3.4 Cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade é baseada no mecanismo “chave-fechadura”, altamente aplicado em sistemas biológicos. O mecanismo de retenção é mais específico, mas a técnica consome um elevado tempo de análise, além de possuir custo elevado.

2.3.5 Cromatografia por partição

A cromatografia de partição consiste de uma fase estacionária líquida e de uma fase móvel líquida. A fase estacionária é retida na superfície do suporte cromatográfico por meio da adsorção física. A separação baseia-se na solubilidade da amostra em relação ao solvente (fase móvel) e à fase estacionária. Sendo assim, os componentes da amostra que são mais solúveis na fase móvel são eluídos primeiro, enquanto que aqueles que possuem maior afinidade com a fase estacionária são seletivamente retidos por ela (SKOOG et al., 2004; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

De acordo com a natureza das fases móvel e estacionária, é possível classificar o processo da cromatografia de partição como: cromatografia em fase normal e cromatografia em fase reversa.

Na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária é de sílica substituída por cadeias alquílicas (C8, C18, etc.) ou resina estireno-divinil-benzeno, sendo essas as principais. A fase móvel pode ser 100% aquosa ou uma mistura como metanol/água, acetonitrila/água, etc., desde que a fase móvel seja sempre mais polar que a fase estacionária. As leis de retenção são inversas às observadas sobre a fase estacionária polar: aumentando a porcentagem de água na fase móvel, aumenta-se o tempo de retenção. Esta técnica é utilizada para separar hidrocarbonetos, compostos aromáticos, substâncias ionizáveis que apresentem um caráter ácido/base, entre outros (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

2.3.6 Cromatografia de interação hidrofílica

Outro modo de cromatografia que vem ganhando destaque nos últimos anos é a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC). A cromatografia por interação hidrofílica é uma modalidade de separação na qual é empregada uma FE polar e uma fase móvel (FM) menos polar. Entretanto, ao contrário da cromatografia líquida em fase normal, a FM

em HILIC é composta por uma mistura contendo uma porcentagem alta de solvente orgânico (geralmente acetonitrila, podendo também ser usado metanol ou acetona) e uma porcentagem relativamente pequena de água, uma vez que, neste caso, a água é o solvente mais forte (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

2.4 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

A avaliação de uma coluna cromatográfica, bem como do método utilizado para a análise pode ser feita por meio de alguns dados obtidos com o cromatograma, dentre eles o tempo de retenção (t_R) e a largura do pico (W_b). Com esses dados é possível calcular os parâmetros como fator de retenção (k), seletividade (α), resolução (R_s) e eficiência da coluna, dada em números de pratos (N).

Fator de retenção (k): Este parâmetro está relacionado com a velocidade na qual um composto se desloca através da coluna e pode ser expresso pelo intervalo de tempo em que ele permanece na fase estacionária relativo ao tempo que permanece na fase móvel, como mostra a Equação 1:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Onde: t_R é o tempo de retenção e t_0 é o tempo que um composto não retido leva para atravessar o sistema desde a sua injeção até sua chegada ao detector, também definido como tempo morto (t_m).

Idealmente, os fatores de retenção para os analitos em uma amostra situam-se entre 1 e 5, mas aceita-se $1 < k < 20$, sendo que valores menores que 1 indicam pouca interação entre o analito e a fase estacionária, e maiores que 5 indica uma interação muito forte, resultando em tempos de análises muito longos (SKOOG et al., 2004).

Seletividade (α): O fator de seletividade (ou fator de separação) para dois compostos adjacentes em uma coluna fornece uma medida de quão bem a coluna vai separá-los. Ele é definido como a razão entre as constantes (K) de distribuição do composto mais retido e a constante de distribuição do composto menos retido. Este parâmetro também pode ser

relacionado aos fatores de retenção (k) de dois analitos vizinhos (a e b) (Equação 2) (SKOOG et al., 2004).

$$\alpha = \frac{k_b}{k_a} \quad (2)$$

Resolução (R_s): É a medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a Equação 3:

$$R_s = 2 \left[\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right] \quad (3)$$

Onde t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção de dois analitos, e w_{b1} e w_{b2} são as larguras dos respectivos picos na linha de base.

Número de pratos (N): Representa o número de etapas de equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, calculada por meio da Equação 4.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (4)$$

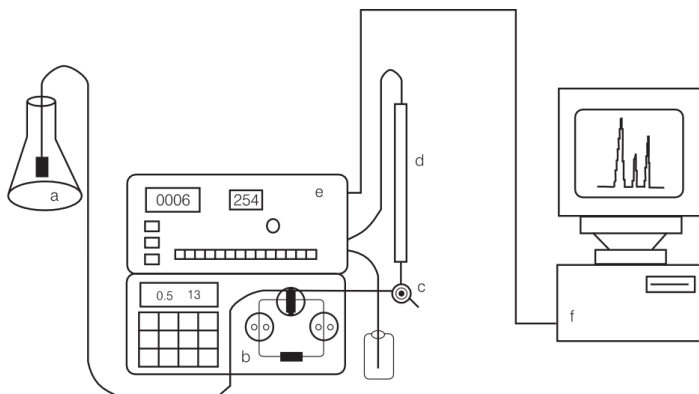
Altura do prato (H): É a razão entre o comprimento (L) da coluna, expresso em mm, e o número de pratos teóricos (N). Ela pode ser calculada pela Equação 5:

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

2.5 INSTRUMENTAÇÃO

A instrumentação básica de um cromatógrafo líquido consiste em um reservatório do solvente, uma bomba de alta pressão, um injetor, uma coluna, um detector, um registrador e *software* de controle, como mostra a Figura 2-1.

Figura 2-1: Representação esquemática de um HPLC: (a) reservatório de fase móvel; (b) bombas; (c) injetor; (d) coluna; (e) detector e (f) registrador



A bomba de alta pressão tem a função de enviar um fluxo constante de fase móvel para a coluna e apresenta algumas propriedades específicas, tais como:

- (1) Deve operar a pressões de 0,01 a 35 MPa (0,1 a 350 bar), com a mesma precisão e exatidão de operações a pressão quase ambiente.
- (2) Intervalo de vazões entre 0,01 e 5 mL min⁻¹ para aplicações analíticas, entre 0,05 e 200 µL min⁻¹ para uso com colunas microbore e capilar e até 100 mL min⁻¹ para aplicações preparativas.
- (3) Repetitividade e constância de vazão de 1%.
- (4) Elas não devem ser corroídas pelas fases móveis empregadas.
- (5) A bomba deve proporcionar ao sistema uma vazão contínua sem pulsos, fazendo com que a eluição da fase móvel seja contínua e a um fluxo adequado (SKOOG et al., 2004).

As colunas utilizadas em HPLC são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno entre 2 e 6 mm para separações analíticas e na faixa de 10 mm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 5 a 30 cm e preparativas maiores do que 20 cm. O tamanho das partículas utilizadas no preenchimento das colunas varia de 3 a 10 µm para colunas analíticas e maiores do que 10 µm para colunas preparativas. Essas colunas são reutilizáveis, sendo empacotadas com suporte de alta resolução, não

sendo necessária sua regeneração após cada separação (NEUE, 1998; SKOOG et al., 2004; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

Para muitas aplicações, um controle rigoroso da temperatura não é necessário e as colunas podem ser operadas à temperatura ambiente. Contudo, frequentemente obtêm-se análises com melhores desempenhos mantendo-se a coluna a temperatura constante em determinado valor, menor ou maior que a ambiente. Alguns instrumentos comerciais está equipada com aquecedores (fornos) que controlam a temperatura da coluna. A temperatura máxima para colunas de sílica é de 120 °C e para as colunas de fase quimicamente ligadas, a temperatura não deve exceder 80 °C. O pH é outro fator que deve ser controlado, normalmente o fabricante da coluna fornece a faixa de pH que cada coluna pode ser submetida. (SKOOG et al., 2004).

O detector é o componente mais dispendioso em um equipamento de cromatografia. Ele mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da solução que contém a amostra e envia um sinal diretamente proporcional à concentração da substância de interesse na amostra. Esse sinal é gerado assim que o efluente sai da coluna e chega ao detector e devem apresentar um volume morto pequeno de forma a minimizar o alargamento de banda extra-coluna. O detector a ser empregado depende da natureza da amostra. A Tabela 2-1 lista alguns dos detectores mais utilizados (SKOOG et al., 2004).

Tabela 2-1 – Detectores empregados em cromatografia líquida (SKOOG et al., 2004).

Detector	LD em massa (típico)
Absorbância	10 pg
Fluorescência	10 pg
Eletroquímico	100 pg
Índice de refração	1 pg
Condutividade	100 pg – 1 ng
Espectrometria de massas	61 pg
FTIR	1mg
Espalhamento de luz	1mg
Atividade óptica	1ng
Seletivo a elementos	1ng
Fotoionização	61 pg

Os detectores mais amplamente empregados em cromatografia líquida são baseados na absorção da radiação ultravioleta ou visível. Os fotômetros geralmente fazem uso das linhas a 254 e 280 nm de uma fonte de mercúrio, pois muitos grupos funcionais orgânicos absorvem nessa região. As fontes de deutério ou de filamento de tungstênio com filtros de interferência fornecem um meio simples de detectar as espécies absorventes. Alguns dos instrumentos modernos são equipados com discos que contêm vários filtros de interferência, os quais podem ser rapidamente trocados. Os detectores espectrofotométricos são consideravelmente mais versáteis que os fotômetros e são amplamente empregados nos instrumentos de alto desempenho. Os instrumentos modernos usam arranjos lineares de fotodiodos que podem adquirir um espectro completo à medida que o analito deixa a coluna (SKOOG et al., 2004; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

2.6 COLUNAS

As colunas, consideradas o coração da cromatografia líquida, passaram por inúmeras transformações desde o início do século 20, com sistema desenvolvido por Tsweet, até chegar nas colunas que conhecemos. As transformações ocorridas em mais de um século, resultaram em análises mais rápidas e eficientes, bem como fases estacionárias mais resistentes e reprodutíveis. As primeiras colunas eram feitas de vidro, porém, com o início da utilização de bombas para carrear a fase móvel e a necessidade de se trabalhar com pressões elevadas, fizeram com que o aço inox passasse a ser o material utilizado nas novas colunas. Assim como as partículas utilizadas como suporte da FE, as colunas também tiveram seu tamanho reduzido com o objetivo de se obter análises cada vez mais rápidas, sendo que hoje existem colunas de três cm disponíveis comercialmente (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010; NEUE, 1998; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

A base para o desenvolvimento dos modos de separação em HPLC é o suporte cromatográfico presente no interior da coluna. Assim, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de suporte cromatográfico e fases estacionárias para HPLC têm sido realizadas por pesquisadores com o objetivo de aprimorar a seletividade e diminuir o tempo de análise sem que a resolução cromatográfica seja comprometida.

2.6.1 Tipos de Suportes

Um bom suporte cromatográfico para HPLC deve possuir algumas características fundamentais como ser mecanicamente estável, ou seja, suportar alta pressão exigida no sistema HPLC, possuir grande concentração de grupos ativos na superfície, afim de promover melhor desempenho cromatográfico, ser inerte em relação aos compostos a serem analisados, possuir área superficial e diâmetro de poros adequados, fator esse dependente da aplicação (NAZARIO; LANÇAS, 2013; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

Em cromatografia líquida, os suportes cromatográficos podem ser feitos de polímeros inorgânicos, orgânicos ou híbridos (BERTHOD, 1991; NAZARIO; LANÇAS, 2013)(ARSHADY, 1991). Entre os polímeros inorgânicos pode-se destacar o óxido de silício (sílica), que é o suporte mais utilizado nas separações cromatográficas (BERTHOD, 1991). A sílica apresenta-se em unidades tetraédricas (SiO_4) aleatórias unidas por grupos siloxanos e sua superfície apresenta grupos silanóis. O destaque da sílica como suporte cromatográfico em HPLC ocorre devido às suas características favoráveis como, por exemplo, boa resistência mecânica, estabilidade química e térmica, área superficial e estrutura de poros controlável e grupos silanóis suscetíveis a posteriores modificações, que permite ligar quimicamente diferentes tipos de fases estacionárias (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010; NAZARIO; LANÇAS, 2013; QIU et al., 2011b).

As partículas, que desempenham papel de suporte da fase estacionária em cromatografia líquida, podem ser diferenciadas pelo tipo/configuração, diâmetro, o tamanho dos poros e a área superficial. Sendo a utilização de uma determinada partícula relacionada com o tipo de aplicação, por exemplo, a separação de moléculas com alta massa molar, como as proteínas, devem ser realizadas em colunas recheadas com partículas com tamanho de poro de 30 nm (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009). Hoje existem diferentes tipos de partículas disponíveis para a cromatografia líquida, sendo as partículas totalmente porosas (FPP) as mais comuns devido a suas características como: alta área superficial e disponibilidade em uma variedade de tamanhos de partículas e de poros.

Atualmente as FPP com diâmetro entre 1,5- 5,0 μm são as mais utilizadas (NAZARIO; LANÇAS, 2013). Porém, nem sempre se fez uso de partículas tão pequenas. No começo da cromatografia, as partículas para LC eram baseados em materiais porosos que possuíam diâmetro entre 100 μm e 200 μm e apresentavam um formato irregular. Já na

década de 1960 surgiram as partículas de sílica peliculares rígidas (30 μm -50 μm) mecanicamente resistentes e, dessa forma, próprias para serem usadas com alta pressão. Estas partículas ofereciam maiores eficiências, 6.600N m^{-1} , devido à elevada taxa de transferência de massa, resultante da camada porosa, porém, apresentavam baixa capacidade de amostra devido a sua área superficial reduzida (HENRY, 2009; NAZARIO; LANÇAS, 2013; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

A transição de partículas peliculares para partículas porosas com diâmetro menor teve início na década de 1970. Nesse período foram sintetizadas micropartículas de sílica irregular e porosa com diâmetro médio de 10 μm . Quando comparado às existentes até o momento, as colunas preenchidas com essas partículas, apresentaram um ganho em eficiência, obtendo resultados com eficiência de até 40.000 N m^{-1} . Porém, essas novas partículas, por possuírem forma irregular, tornavam o processo de empacotamento problemático e com pouca reprodutibilidade. Com o passar do tempo e com um melhor entendimento e aperfeiçoamento dos métodos de síntese, partículas esféricas e porosas foram desenvolvidas com sucesso, contribuindo para a reprodutibilidade do empacotamento de colunas (HENRY, 2009; NAZARIO; LANÇAS, 2013).

Com o desenvolvimento das partículas esféricas e o sucesso da reprodução de colunas empacotadas com essas partículas, o foco passou a ser então na redução do diâmetro das partículas, devido ao ganho em eficiência resultante da redução do diâmetro das partículas. As primeiras partículas esféricas desenvolvidas foram as de 5 μm e apresentavam eficiência de até 80.000 N m^{-1} . Posteriormente surgiram as partículas de 3,5 μm e 3,0 μm que apresentavam eficiência de até 145.000 N m^{-1} , tornando as análises 30-50% mais rápidas e eficientes (CHEONG, 2014; NAZARIO; LANÇAS, 2013).

Na década de 1990, as partículas esféricas não porosas de 1,5 μm também estavam disponíveis comercialmente, com as quais foram obtidas colunas com eficiências de $200.000\text{ N min}^{-1}$. Além da alta eficiência, estas partículas oferecem menor resistência à transferência de massa, facilitando o uso de uma faixa ampla de fluxo de fase móvel, sem que houvesse perda de desempenho cromatográfico. Entretanto, devido à área superficial baixa, estas partículas possuem uma menor capacidade de amostra que as partículas porosas e, por causa do tamanho pequeno, proporcionam tempos de retenção menores. Dessa forma, estes materiais são geralmente empregados para separação de

macromoléculas como, por exemplo, as proteínas que possuem difusão lenta (CHEONG, 2014).

Mais recentemente, no início do século 21, foram desenvolvidas as primeiras partículas FPP com diâmetros menores que 3 μm . As primeiras desenvolvidas possuíam diâmetro de 2,5 μm , com as quais são obtidas colunas com eficiências de até 165.000 N min^{-1} . As partículas de 1,7 μm foram desenvolvidas alguns anos mais tarde e chegam a produzir análises com até 200.000 N min^{-1} . Entretanto, a utilização das colunas em sistemas convencionais de HPLC, com pressões de até 6.000 psi (400 bar), reduzem o tempo de análise, porém, não exploram todo o potencial dessas partículas. Para tal, se faz necessário a utilização de pressões mais elevadas, tornando essencial a utilização de um equipamento especial, que suporte pressões de até 15.000 psi (1.035 bar). Essas novas partículas deram origem à cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*) (HAYES et al., 2014).

A UPLC, que surgiu com a síntese de partículas com diâmetro $\leq 2 \mu\text{m}$, representam um avanço na cromatografia tornando possível o desenvolvimento de análises até 20 vezes mais rápidas e mais eficientes. Porém, essa nova tecnologia tem um preço elevado. Uma alternativa a esse inconveniente foi encontrada no ressurgimento das partículas superficialmente porosas, primeiramente desenvolvidas por Horvath na década de 1960 (DESTEFANO; LANGLOIS; KIRKLAND, 2008; KIRKLAND et al., 2000; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

2.6.2 Partículas Superficialmente Porosas

As partículas superficialmente porosas (SPP), foram desenvolvidas pela primeira vez no final da década de 1960, por Horváth, que desenvolveu os primeiros materiais peliculares para troca iônica. O material desenvolvido consistia em esferas sólidas de vidro revestidas com uma camada fina de um polímero orgânico. Porém, estas novas partículas não apresentaram resultados satisfatórios, fato este atribuído as propriedades de transferência de massa da fase estacionária (KIRKLAND et al., 2000; SPUDEIT et al., 2014).

Posteriormente, Kirkland, apresentou um trabalho pioneiro que descrevia o desenvolvimento das SPP, que apresentavam melhores propriedades de transferência de massa. Essas novas partículas apresentavam diâmetro de 30 - 55 μm e eram feitas de um núcleo sólido de vidro rodeado por uma camada porosa de sílica ou alumina, de

espessura entre 1 e 3 μm . Entretanto, mesmo com a obtenção de resultados mais satisfatórios em separações realizadas em colunas contendo o novo suporte, as SPP não foram bem aceitas pelo mercado, que buscavam análises rápidas e eficientes, características essas alcançadas com as partículas porosas com diâmetros inferiores a 10 μm (CHEONG, 2014; KIRKLAND et al., 2000; LANÇAS, 2010; NAZARIO; LANÇAS, 2013).

As micropartículas não porosas, com diâmetro típico entre 1 e 3 μm , foram desenvolvidas no fim da década de 1980. A principal aplicação e enfoque desse material foi na separação de biopolímeros, devido à sua elevada resistência mecânica, aliada a uma melhora nas propriedades de transferência de massa. Isso ocorre principalmente devido à eliminação do processo lento de difusão dos biopolímeros, que ocorre nos materiais convencionais de empacotamento devido à presença de poros. As principais desvantagens desse tipo de suporte são a baixa capacidade e área superficial, além do fato de que, devido ao uso de partículas de diâmetro muito menor que as anteriormente descritas (tipicamente 1,5 μm), a queda de pressão das colunas era muito elevada, fazendo com que na prática, apenas colunas curtas fossem empregadas (CHEONG, 2014; LANÇAS, 2010).

O início do século 21 foi marcado por intensas pesquisas, que tinha como objetivo a redução do tempo de análise em HPLC, porém, sem que houvesse perdas significativas no poder de separação. Assim, durante o início da presente década, existiam basicamente dois tipos de partículas baseados em sílica e comercializados para HPLC: (a) partículas totalmente porosas de tamanho médio, entre 3 μm e 10 μm ; (b) partículas porosas ou não porosas de tamanho médio de 2 μm . Porém, como discutido anteriormente, quanto menor o tamanho da partícula maior a pressão. Estima-se que se houver uma redução de 50% no diâmetro da partícula o ganho em eficiência será o dobro, entretanto, a pressão quadriplica (Equação 6):

$$\Delta P = \frac{1}{d^2}(6)$$

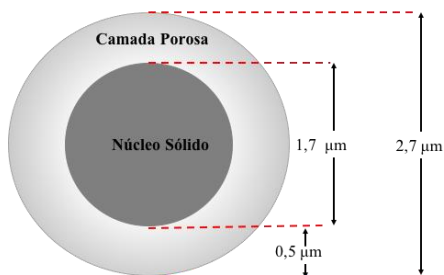
Como alternativa às limitações apresentadas pelas partículas com diâmetro sub-2 μm , Kirkland propôs o ressurgimento das partículas superficialmente porosas, demonstrando a síntese de partículas com diâmetro total entre 3 e 6 μm , contendo um núcleo sólido e uma camada porosa com diâmetro entre 0,1 e 1 μm . As colunas contendo essas novas partículas demonstraram resultados similares àquelas obtidas com

colunas preparadas com partículas totalmente porosas, porém, com redução no tempo de análise devido à camada porosa ser mais fina, resultando na redução da transferência de massa. Posteriormente, Kirkland descreveu o preparo de partículas superficialmente porosas com diâmetro total de $2,7 \mu\text{m}$, tendo a região sólida $1,7 \mu\text{m}$ de diâmetro e a camada porosa $0,5 \mu\text{m}$ de espessura, com poros de diâmetro igual a 90 \AA . Mesmo com uma fina camada superficial porosa, ela representa 70% do volume total da partícula, o que permite que uma maior quantidade de amostra seja injetada (KIRKLAND et al., 2000; LANÇAS, 2010; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009; WAGNER et al., 2012).

2.6.2.1 Característica das partículas superficialmente porosas

Colunas empacotadas com as partículas superficialmente porosas (Figura 2-2), apresentaram um desempenho surpreendente, com análises ultrarrápidas e com alta eficiência, principalmente para análises aquirais. Porém, esses resultados não são consequência apenas do diâmetro reduzido dessas partículas, mas, principalmente devido às suas características estruturais (SPUDEIT et al., 2014).

Figura 2-2: Representação de uma partícula superficialmente porosa.



A estrutura peculiar da SPP, constituída de um núcleo sólido e uma camada relativamente fina, são os responsáveis pelos resultados obtidos. Comparando-se as SSP com as partículas totalmente porosas com diâmetro semelhante, as novas partículas apresentam um caminho

de difusão muito menor, o que contribui para uma maior velocidade de separação. Essa característica é especialmente importante para análises de moléculas com alta massa molecular, onde uma transferência de massa lenta resulta em uma perda em eficiência em separações realizadas com as FPP.

As SPP são produzidas com sílica, e podem ser obtidas por diferentes métodos, sendo o mais comum o processo sol-gel, o qual permite melhor controle do tamanho e uniformidade das partículas, resultando num produto com uma menor variação de diâmetro (LANÇAS, 2010). Sendo este fator relacionado com o ganho em eficiência observado em separações de moléculas pequenas (massa molecular <500) em colunas a base de SPP (SPUDEIT et al., 2014).

Comparando colunas com mesmo comprimento, as colunas a base de SPP são capazes de manter a performance obtida com as colunas a base de FPP com diâmetro < 2 µm, porém, com pressão muito menor. Isso significa que, colunas maiores a base de SPP podem ser consideradas quando houver a necessidade de aumentar o poder de resolução da coluna. Os valores de altura de prato também demonstraram ser menos dependentes da velocidade da fase móvel, quando comparado com as FPP, sendo assim adequados para separações mais rápidas.

2.6.2.2 Partículas superficialmente porosas em separações enantioméricas

Separções enantioméricas têm atraído grande atenção nas últimas décadas e a cromatografia líquida, com fases estacionárias quirais (CSP, do inglês *Chiral Stationary Phase*), é de longe a técnica mais eficaz e mais utilizada para separações quirais em meio líquido, tanto em escala analítica quanto em escala preparativa. Até o momento em que o projeto foi desenvolvido, quase a totalidade dos estudos aplicando SPP reportavam separações aquirais utilizando os modos de fase reversa e HILIC. Tendo um único artigo reportando a avaliação experimental da performance das SPP em separações enantioméricas e um artigo teórico (GRITTI; GUIOCHON, 2012; LOMSADZE et al., 2012). Lomsadze e colaboradores avaliaram a viabilidade de se produzir colunas empacotadas com SPP revestidas com celulose tris(4-cloro-3-metilfenilcarbamato). A avaliação da performance cromatográfica dessas colunas foi feita por meio da separação de três compostos

neutros: óxido de trans-estilbeno, benzoína e 2,2'-dihidroxi-6,6'-dimetilbifenil.

Os estudos comparativos foram feitos com duas colunas diferentes, sendo uma disponível comercialmente e a outra produzida para o estudo. As duas colunas foram empacotadas com partículas totalmente porosas, mas com diferente quantidade de recobrimento. De acordo com os autores, as colunas a base de SPP demonstraram maior eficiência e uma menor perda de performance em análises com fluxo elevado. Porém, as análises apresentaram perda na seletividade, relacionada com o fato de que as SPP continham uma menor quantidade de seletor quirais, contrastando a análise teórica realizada por Gritti e Guiochon, que indicava que a seletividade, para o mesmo sistema utilizado por Lomsadze, seria constante (GRITTI; GUIOCHON, 2012; LOMSADZE et al., 2012).

Pelo fato de que, até o momento, haviam poucos estudos acerca da performance das SPP em separações enantioméricas, foram escolhidos dois seletores quirais amplamente utilizados e estudados em separações enantioméricas que são o Isopropil-ciclofrutano e Hidroxiisopropil- β -ciclodextrina. Colunas contendo esses seletores quirais, quimicamente ligados as FPP com diâmetro de 5 μm , estão disponíveis comercialmente. Para avaliar a performance das SPP em separações enantioméricas, esses seletores quirais foram quimicamente ligados as SPP. Os resultados obtidos serão discutidos posteriormente, nos capítulos 3 e 4.

Atualmente existem diversos trabalhos que reportam a aplicação das SPP em separações enantioméricas em cromatografia líquida e em cromatografia em fluídos supercríticos. Recentemente, Armstrong e colaboradores demonstraram ser possível obter separações enantioméricas sub-minuto por HPLC, sem que haja perda de seletividade. Esses resultados foram obtidos utilizando SPP de 2,7 μm de diâmetro em colunas de 3,0 cm (PATEL et al., 2015).

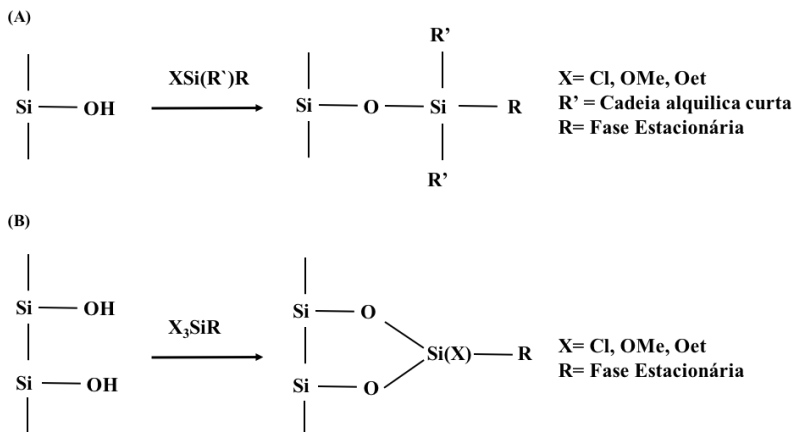
2.7 PREPARO DAS FASES ESTACIONÁRIAS

Existem diversos tipos de suportes cromatográficos disponíveis para cromatografia líquida, porém, devido as características da sílica como, por exemplo, resistência mecânica, estabilidade química, área superficial e tamanho de poros controláveis, bem como a presença de grupos silanóis suscetíveis a posteriores funcionalizações, fazem deste o material mais utilizado.

A fase estacionária (FE) de uma coluna determina a retenção e seletividade em uma separação, e deve possuir algumas características mínimas para que esses parâmetros não sejam comprometidos como, por exemplo, estabilidade, reprodutibilidade de preparo, simetria de pico, e eficiência das colunas. Em alguns casos, a própria sílica não modificada é utilizada como fase estacionária como, por exemplo, em separações no modo fase normal. Porém, a maioria das fases estacionárias são funcionalizadas com compostos que, na sua grande maioria, são orgânicos. As fases estacionárias podem ser classificadas em sorvidas, imobilizadas ou quimicamente ligadas, sendo o último o mais utilizado.

A modificação da superfície da sílica tem como objetivo principal unir, no mesmo material, as propriedades químicas dos grupos orgânicos com a rigidez e a estabilidade do óxido de silício. Este processo pode ocorrer de inúmeras formas, porém, a metodologia mais empregada atualmente no preparo das fases estacionárias quimicamente ligadas é a da reação de organossilanização que utiliza modificadores do tipo cloro (Cl) ou alcoxissilano, podendo ser mono, di ou trifuncional (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009). Essa reação deve ser realizada em meio anidro e com prévia ativação da sílica, que pode ocorrer por meio da destilação em meio orgânico.

Figura 2-3: Obtenção da fase quimicamente ligada: (A) reação de organossilanização com reagente mono funcional; e (B) reação de organossilanização com reagente bifuncional



As fases quimicamente ligadas, obtidas por esse processo, são reprodutíveis e apresentam boa eficiência cromatográfica, fato esse relacionado com a velocidade de difusão do analito na FE. Entretanto, nesse processo, a silanização ocorre em até no máximo 50 % dos grupos silanóis. Os demais grupos residuais, que permanecem na forma de silanol, podem promover interações/reações secundárias com os analitos e resultar em perda de eficiência. Além disso, o uso dessas fases em pH extremos pode resultar na hidrólise do grupo funcionalizador resultando na perda de seletividade da coluna. Esses problemas podem ser amenizados por meio da técnica conhecida como *endcapping*, que consiste em realizar mais uma etapa com um reagente silanizante (ex. trimetilclorossilano). Outras estratégias para bloquear os grupos silanóis residuais, como a utilização de ligante com maior volume (impedimento estérico), ou ainda a utilização de ligantes bidentados também vêm sendo empregados (Figura 2-3) (NAZÁRIO; LANÇAS, 2013).

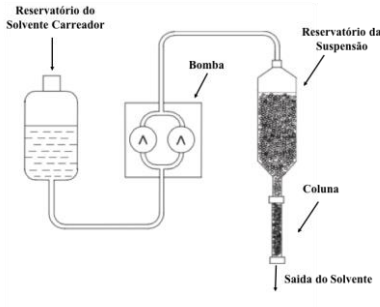
Independentemente da estratégia utilizada para a síntese, após essa etapa as FE são submetidas a análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio para obtenção do grau de substituição e posterior empacotamento da coluna cromatográfica.

2.8 EMPACOTAMENTO DAS COLUNAS

A maior parte das separações realizadas em HPLC utilizam colunas recheadas com partículas de sílica, pois estas apresentam uma melhor performance e resistência a pressões elevadas. Porém, a parte do processo que consiste em colocar as partículas dentro de um tubo de aço, aqui denominado de empacotamento, representa o maior desafio do processo. Dessa forma, a produção de colunas cromatográficas é descrita como uma arte, uma vez que conseguir a reprodutibilidade do método utilizado não é uma tarefa simples.

Dentre os métodos de empacotamentos desenvolvidos, o que utiliza suspensão e alta pressão é o mais utilizado por apresentar melhores resultados. O processo em questão é relativamente simples e consiste em: preparar a suspensão, adicionar a suspensão no reservatório do sistema, conectar o reservatório a uma fonte de alta pressão e forçar a suspensão para dentro da coluna conforme ilustrado na Figura 2-4. (KIRKLAND; DESTEFANO, 2006; UNGER; LAMOTTE; MACHTEJEVAS, 2013).

Figura 2-4: Representação esquemática de um sistema de empacotamento de alta pressão.



Mesmo o processo sendo relativamente simples, algumas questões técnicas devem ser consideradas para que se obtenham colunas altamente eficientes, estáveis e reproduzíveis, dentre os quais podemos destacar:

- As partículas devem ser esféricas e possuir uma faixa estreita de distribuição do tamanho de partícula;
- O tipo de solvente utilizado;
- Densidade e a viscosidade do solvente utilizado na suspensão;
- A pressão utilizada durante o enchimento;
- O solvente utilizado como carreador (*pushing solvente*);

Mesmo com os avanços nas técnicas de empacotamento de colunas que ocorreram nas últimas décadas, essa continua sendo uma etapa que desprende mais tempo, e em alguns casos, leva-se mais tempo otimizando um sistema ideal para empacotamento da coluna que realizando a síntese da nova fase estacionária (KIRKLAND; DESTEFANO, 2006).

2.8.1 Avaliação da coluna

A coluna cromatográfica pode ser avaliada utilizando os parâmetros cromatográficos (seção 2.4) como, por exemplo, resolução, número de pratos, altura de prato, etc. Outra forma de avaliar o desempenho de uma coluna é por meio da equação de van Deemter (Eq 7), que demonstra que a altura de prato teórico é dependente das características da coluna e pela vazão da fase móvel.

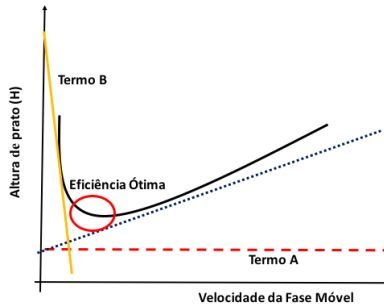
$$H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x \quad (7)$$

Onde, H é altura de prato, A é o termo de caminhos múltiplos, B é o termo de difusão longitudinal, C é o termo de transferência de massa e u_x é a velocidade linear média da fase móvel.

O termo A, caminhos múltiplos, está ligado ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto. Esse termo pode ser minimizado reduzindo o diâmetro interno das colunas, recheando as colunas com partículas com menor variação de seu diâmetro (LANÇAS, 2010; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares da fase móvel. O termo C, transferência de massa, está relacionado com a facilidade de transferência das moléculas do soluto entre a FE e a FM. Um fator que minimiza o termo C é a espessura do filme líquido que recobre as partículas do suporte. Quanto maior for essa espessura, maior será o termo C e menor a eficiência da coluna. Os termos da Equação de van Deemter podem ser obtidos experimentalmente por meio do gráfico de altura de prato *versus* velocidade linear média (Figura 2-5) (LANÇAS, 2010; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

Figura 2-5: Curva de altura de prato versus velocidade da fase móvel e as contribuições de cada termo da equação de van Deemter.



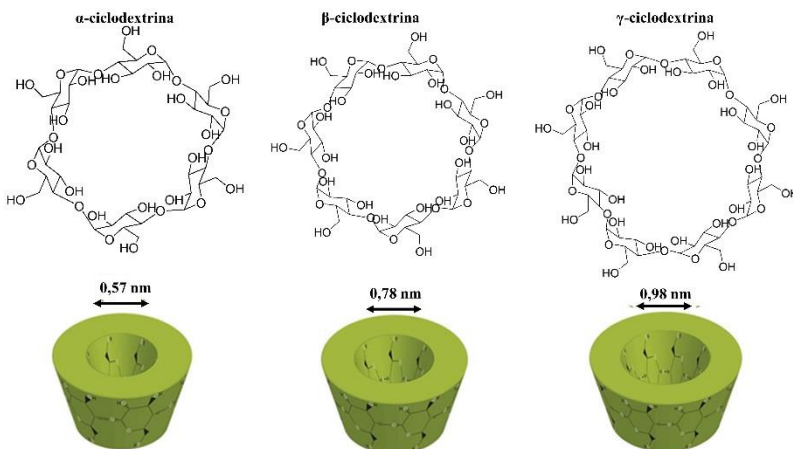
O gráfico de altura de prato *versus* velocidade da fase móvel também pode ser utilizado para a comparação de colunas preenchidas com partículas de diferentes tamanhos. Espera-se que com a redução do tamanho da partícula ocorra uma redução do termo C, relacionado com a transferência de massa na equação de van Deemter. O mesmo é esperado para partículas superficialmente porosas, representando uma menor perda em eficiência com o aumento da velocidade da fase móvel (HAYES et al., 2014; KIRKLAND et al., 2000).

CAPÍTULO 3 - HIDROXI-ISOPROPIL CICLODEXTRINA (HP-RSP-CD)

3.1- INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CD), também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses e dextrinas de Schardinger, são polissacarídeos cíclicos constituídos por unidades de D-(+)-glucose, unidas por ligações glicosídicas α -1,4, produzidos a partir da degradação enzimática do amido (DEL VALLE, 2004). Os três tipos de ciclodextrinas mais empregados em separações analíticas são: α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD) constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glucose, respectivamente (Figura 3-1) (BEESLEY, 2010a; BERTHOD, 2010; DAI et al., 2013).

Figura 3-1: Estrutura e tamanho dos três tipos mais comuns de ciclodextrinas.



As ciclodextrinas foram descobertas em 1891 pelo pesquisador francês Villiers que, durante o processo de redução de dextrinas,

observou-se a formação de um material cristalino proveniente da digestão do amido pela bactéria *Bacillus amylobacter*. De acordo com pesquisadores, a formação das ciclodextrinas só foi possível pois, Villier utilizou-se de culturas de bactérias impuras (DEL VALLE, 2004). Duas das diferentes formas das CD foram isoladas em 1903 por Schardinger, mesmo pesquisador que, em 1904, isolou um novo organismo capaz de formar acetona e álcool etílico a partir do amido presente em plantas. Posteriormente, em 1911, Schardinger relatou que o organismo por ele isolado, era capaz de produzir grandes quantidades de dextrinas (25-30%), que foram denominadas de β -dextrina cristalizada e α -dextrina cristalizada. Em 1942, pela técnica de cristalografia de raio-x, as ciclodextrinas tiveram suas estruturas elucidadas (Figura 3-1). Atualmente sabe-se que é possível a existência natural das δ -CD, ξ -CD, ζ -CD e η -ciclodextrinas, que possuem de 9-12 unidades de glicose (DAI et al., 2013; DEL VALLE, 2004).

Do ponto de vista estrutural, estas moléculas possuem forma assemelhada a um cone, com uma cavidade com 0,79 nm de profundidade. Os diâmetros superior e inferior da cavidade das CD mais comuns são 0,47 e 0,57 nm para a α -CD, 0,60 e 0,78 nm para a β -CD e 0,75 e 0,98 nm para a γ -CD (VENTURINI et al., 2008). A diferença no diâmetro é relacionada ao número de moléculas de glicose que compõem cada uma das ciclodextrinas. O formato peculiar das CD lhes confere características interessantes como a possibilidade de formação de complexos de inclusão com moléculas apolares, que são mantidas dentro da ciclodextrina por uma somatória de forças.

A preferência por moléculas hidrofóbicas é uma consequência da conformação adquirida pela CD, que faz com que os átomos de oxigênio das ligações glicosídicas e os carbonos C-3 e C-5, fiquem orientados para o interior da molécula, tornando-o hidrofóbico. Por outro lado, essa conformação faz com que as hidroxilas secundárias, dos carbonos C-2 e C-3, fiquem posicionadas na face com maior diâmetro, e as hidroxilas primárias ligadas no carbono C-6 na face mais estreita da molécula. O posicionamento das hidroxilas nas regiões externas auxilia na solubilidade das ciclodextrinas. Outra vantagem resultante da posição das hidroxilas, é a possibilidade de derivatização destas com diferentes moléculas, que possam aumentar a solubilidade ou mesmo a seletividade da molécula (Mitchell e Armstrong, 2004; Berthod, 2010).

As características acima citadas tornam as CD capazes de identificar seletivamente diversas espécies químicas, o que as tornam atrativas para aplicações nos mais variados campos, dentre os quais

podemos destacar as separações quirais. Muitas das técnicas que são utilizadas para a resolução quiral como a eletroforese capilar (CE), eletrocromatografia capilar (CEC), cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia de fluido supercrítico (SFC), extração em fase sólida (SPE) e cromatografia gasosa (GC), têm utilizado as CD como seletores capazes de diferenciar enantiômeros em racematos (VENTURINI et al., 2008). Dentre os métodos cromatográficos, a HPLC é a técnica mais utilizada para separação de enantiômeros, podendo ser realizada por métodos diretos ou indiretos.

3.1.1- Ciclodextrinas em Cromatografia líquida

A evolução das CD e seus derivados em cromatografia líquida seguiu basicamente duas frentes: adição das ciclodextrinas ou de um derivado altamente solúvel na fase móvel ou utilização das CD quimicamente ligadas à sílica, como fase estacionária.

3.1.1.1- Ciclodextrinas como aditivos da fase móvel

Algumas propriedades das ciclodextrinas tais como: (i) seletividade e a formação de complexos de inclusão reversíveis, (ii) solubilidade em água, (iii) estável na presença de luz e não absorve energia em quase toda região do ultravioleta (UV) e infravermelho (IV) estável em uma ampla faixa de pH, promoveram o seu uso como aditivo de fase móvel para cromatografia de fase reversa, nas separações enantioméricas (HAN, 1997; WARD; WARD, 2012).

A primeira vez que uma separação enantiomérica foi realizada utilizando a CD como aditivo da fase móvel foi em 1982, quando Debowski e colaboradores realizaram a separação de ácido mandélico adicionando diferentes concentrações de β -CD à fase móvel (DEBOWSKI; SYBILSKA; JURCZAK, 1982). Desde então, diversas separações enantioméricas foram realizadas utilizando a ciclodextrina em sua forma nativa, como aditivo da fase móvel, demonstrando sua capacidade de separar os diferentes tipos de isômeros, como isômeros estruturais, diastereoisômeros e enantiômeros (RODRÍGUEZ-BONILLA et al., 2011; STAMMEL; WOESLE; THOMAS, 1995). Porém, essa metodologia desperta pouco interesse por apresentar limitações que reduzem consideravelmente suas aplicações, como por exemplo a baixa solubilidade das CD em solventes orgânicos, tornando possível apenas

aplicações em fase reversa. Outra desvantagem é a baixa eficiência e resolução obtidos com este método (HAN, 1997).

3.1.1.2- Fases estacionárias a base de ciclodextrinas

As primeiras colunas contendo ciclodextrinas como seletor quiral, surgiram em meados da década de 1960. Essas colunas surgiram como resultado da pesquisa de Solms e Egli, que foram os primeiros a reportar a síntese dos polímeros de ciclodextrina, bem como a seletividade destes polímeros ao se ligar em diferentes substâncias. Esses polímeros, conhecidos como resinas de ciclodextrina-epicloridrina, passaram a ser utilizados como fases estacionárias para cromatografia líquida (LI; PURDY, 1992). Mesmo com diferentes trabalhos demonstrando as aplicações destas colunas em separações de compostos como ácidos aromáticos, produtos naturais e ácidos nucleicos, a utilização destes polímeros como FE (fase estacionária) passou a enfrentar alguns problemas substanciais. Primeiro, o acesso as cavidades das CD que se encontram no interior do polímero são diferentes quando comparados com uma CD localizada na superfície. Portanto, como o aprisionamento da molécula no interior da CD, a liberação ocorre por processos de difusão controlada, elas demoram um maior tempo para atingir o equilíbrio que as CD localizadas no interior do polímero; segundo, a incompatibilidade destas FE com solventes orgânicos, ou seja, as separações só poderiam ser realizadas com soluções aquosas; e terceiro, os polímeros não são resistentes à pressão, o que os tornam instáveis e com tempo de vida útil reduzido quando utilizadas em HPLC (HAN, 1997; LI; PURDY, 1992; VARGA et al., 2012).

Na tentativa de contornar os problemas enfrentados com os polímeros, pesquisadores do Japão, Fujimura *et al.* e Kawaguchi *et al.*, realizaram, de forma independente e quase que simultaneamente, as primeiras tentativas de fazer uma fase estacionária quiral (CSP) ligando quimicamente as CD à sílica gel (FUJIMURA; UEDA; ANDO, 1983; KAWAGUCHI et al., 1983). Moléculas de β -ciclodextrinas foram covalentemente ligadas à sílica utilizando etilenodiamina como ponte de ligação entre o suporte e a CD. Embora eficazes, alguns problemas relacionados ao tipo de ligante foram encontrados incluindo: hidroliticamente instável, baixo recobrimento de ciclodextrina, seletividade afetada pela presença de nitrogênio no ligante e síntese laboriosa (BUI; ARMSTRONG; BOEHM, 1984; LI; PURDY, 1992; MITCHELL; ARMSTRONG, 2004).

Em 1983, Armstrong desenvolveu um novo tipo de fase estacionária à base de CD, que foi quimicamente ligada sem a necessidade de utilizar um ligante contendo nitrogênio ou enxofre. O método desenvolvido por Armstrong na produção das novas fases estacionárias consistia em: (i) ativação da sílica com hidróxido de sódio, (ii) o grupo glicidoxipropilsilano, contendo um anel epóxi, era ligado à sílica e (iii) as CD previamente ativadas com hidreto de sódio, reagem com o anel epóxi formando uma ligação covalente. Os ligantes utilizados nessas novas FE continham de 6-10 átomos, tornando o movimento das CD limitado aumentando o número de sítios de interação com os analitos. Outro fator que contribui para o sucesso desse tipo de ligação sílica-CD, foi o fato de não conter nitrogênio no ligante, tornando essas fases hidroliticamente estáveis. As fases estacionárias desenvolvidas por Armstrong passaram a ser comercializadas pela empresa Advanced Separation Technologies e se tornaram as primeiras CSP para separações quirais em fase reversa. (BUI; ARMSTRONG; BOEHM, 1984; HAN, 1997; MITCHELL; ARMSTRONG, 2004).

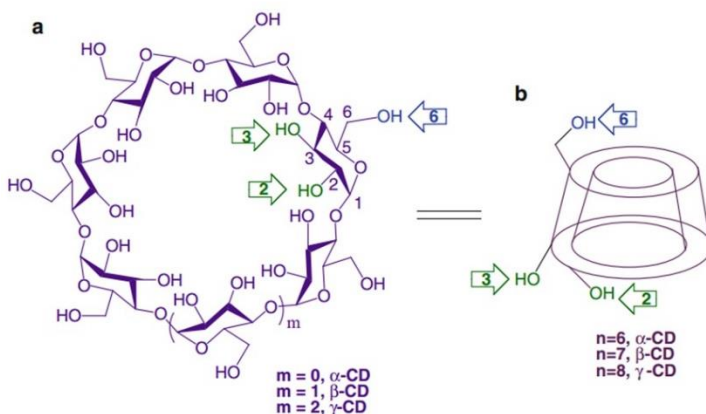
Dentre as colunas que contêm fases estacionárias quirais à base de ciclodextrinas, as que são à base de β -CD, são de longe as mais populares. Tendo sua aplicabilidade e seu poder de resolução enantiomérica demonstrados em diversas aplicações (ARMSTRONG; DEMOND, 1984; ARMSTRONG et al., 1990; HAN et al., 2005a, 2005b; VARGA et al., 2012). Subsequentemente, outras CSP à base de CD, nativas ou derivatizadas, foram desenvolvidas.

As CSP à base de α -CD e γ -CD, mesmo possuindo menos aplicações em fase reversa que CSP com β -CD, também são capazes de resolver enantiômeros, porém, com aplicações mais específicas. As CSP constituídas de α -ciclodextrina foram utilizadas por Armstrong e colaboradores para separar aminoácidos aromáticos e análogos substituídos (ARMSTRONG et al., 1987). Essas colunas também foram utilizadas na separação de monoterpenos como o α -pineno e o β -pineno. Sendo esse o único caso conhecido em que a cromatografia líquida foi aplicada numa separação quiral dessa classe de compostos. Por sua vez, as CSP que contêm γ -ciclodextrinas, demonstraram serem eficientes na separação de isômeros posicionais bem como na separação de compostos quirais policíclicos. Essas fases estacionárias também foram efetivas na separação de estereoisômeros de esteroides (ARMSTRONG, 1994; MITCHELL; ARMSTRONG, 2004).

3.1.1.3- Ciclodextrinas derivatizadas

As ciclodextrinas, em sua forma nativa, são moléculas rígidas e que apresentam limitações em termos de forma e tamanho. Estas limitações estão relacionadas com as interações intermoleculares, principalmente as de hidrogênio, que ocorrem entre as hidroxilas das moléculas de glucose (Figura 3-2), formando uma espécie de cinturão que afeta a forma da molécula bem como suas propriedades (KHAN et al., 1998; TANG; NG; SUN, 2013). Entretanto, a presença dessas hidroxilas em sua estrutura, faz com que as ciclodextrinas possam ser facilmente funcionalizadas, podendo-se aumentar a seletividade frente a um determinado grupo de moléculas ou mesmo aumentar a solubilidade dessas em solventes específicos, conforme o grupo adicionado.

Figura 3-1: Estrutura das CD com as hidroxilas reativas localizadas nas regiões externas. Imagem adaptada de (TANG; NG; SUN, 2013).

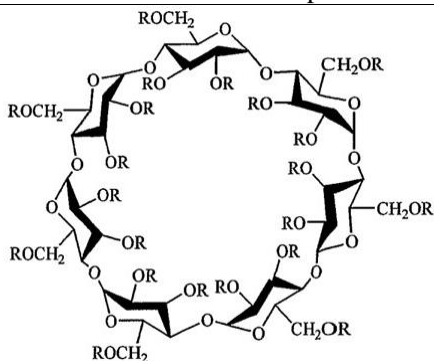


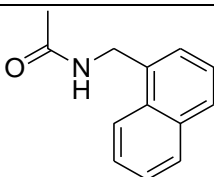
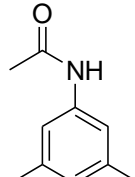
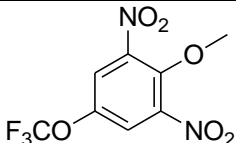
A melhor forma de derivatizar as ciclodextrinas é por meio da substituição nucleofílica nos grupamentos hidroxilas. Entretanto, os grupos OH presentes nas posições 2, 3 e 6 competem pelo reagente utilizado, tornando a derivatização seletiva muito mais complexa. Dos três grupos presentes, a hidroxila na posição 6 é a mais básica, sendo o

grupo da posição 2 o mais ácido e o grupo na posição 3, o mais inacessível. Sendo assim, para que ocorra a substituição em apenas um dos grupos deve-se utilizar um grupo nucleófilo fraco, como o cloreto de terc-butiltrimetilsilil. Caso contrário, a utilização de um nucleófilo forte resultará na substituição indiscriminada de todos os grupos OH (TANG; NG; SUN, 2013). A hidroxila na posição 6 é normalmente utilizada para ligar a CD ao suporte da fase estacionária.

Desde que a primeira coluna contendo CSP à base CD foi introduzida por Armstrong *et al.*, uma variedade enorme de ciclodextrinas modificadas foram utilizadas como fase estacionária quiral (Tabela 3-1). Dentre todos os derivados de CD, as mais utilizadas são a hidroxipropil-ciclodextrina (AHMED *et al.*, 2005), disponível comercialmente como Cyclobond I RSP, as funcionalizadas com compostos aromáticos 3,5-dimetilfenil-ciclodextrina e a R-nafiletil-ciclodextrina, conhecidas comercialmente como Cyclobond I DMP e Cyclobond I RN, respectivamente.

Tabela 3-1: Ciclodextrinas derivatizadas disponíveis comercialmente.



R =	Sufixo	Nome comercial
—CH ₃	DM 2,3-di-O-metil	CB-DM
—COCH ₃	AC Acetilada	CB-AC
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{—CH}_2\text{CHCH}_3 \end{array}$	SP ou RSP/HP-RSP (S ou racêmico RS) hidroxipropil éter.	CB-RSP ou CB-HP-RSP
	RN ou SN R ou S - naftiletil- carbamato	CB-RN ou CB-SN
	DMP 3,5-dimetilfenil carbamato	CB-DMP
	DNP 2,6-dinitro-4- trifluorometilfenileter	CB-DNP

3.1.2 Mecanismo de reconhecimento quiral

O sucesso das CSP à base de CD se deve a dois fatores: primeiro a possibilidade de funcionalização com diferentes grupos que, como discutido anteriormente, possibilitam a ampliação da seletividade das ciclodextrinas frente a determinados grupos de compostos, e sua solubilidade; segundo, estas colunas são denominadas de “*multi modais*” que significa, possuem aplicações em diferentes modos de eluição como fase normal (LIN et al., 2014), fase reversa e polar orgânico (SIMMS et al., 2004). Essas CSP apresentam características consideráveis essenciais para uma fase estacionária “*multi modal*”, que: (i) são estáveis em todos os solventes utilizados; (ii) sofrem alterações conformacionais reversíveis de acordo com a composição da fase móvel; (iii) apresentam mecanismos de reconhecimento quiral distintos em cada modo de eluição e conseqüentemente seletividade significativa frente a determinadas classes de compostos; (iv) possuem um procedimento prático para a escolha de um determinado modo e otimização deste conforme necessidade (MITCHELL; ARMSTRONG, 2004).

As regras básicas de reconhecimento quiral, se aplicam para as CSP contendo CD, assim como para qualquer fase estacionária quiral como discutido previamente. Em resumo, para que ocorra o reconhecimento quiral, devem ocorrer três pontos de interação entre a fase estacionária e o enantiômero. Outro ponto chave é a diferença, mesmo que pequena, na energia livre de transferência entre fase móvel e a fase estacionária para cada um dos enantiômero. E por último, nem todas as interações entre o analito e a FE contribuem para o reconhecimento quiral. Frequentemente, a retenção de uma molécula é apenas em parte relacionada à interação com o seletor quiral. Por exemplo, existem algumas regiões da fase estacionária como o ligante utilizado, bem como regiões do suporte que não foram derivatizadas e que não contribuem para o reconhecimento de enantiômeros, porém, contribuem na retenção dos analitos (MITCHELL; ARMSTRONG, 2004).

As fases estacionárias quirais contendo ciclodextrinas são efetivas em três modos de operação, e em cada um deles possuem um mecanismo de reconhecimento quiral diferente como discutiremos a seguir.

3.1.2.1 Modo Fase reversa

Em separações com as colunas à base de ciclodextrina realizadas no modo fase reversa, com a fase móvel aquosa ou hidro-orgânica, a formação do complexo de inclusão é a primeira interação que levará ao reconhecimento quiral. Nesta etapa, a região hidrofóbica da molécula ocupará a cavidade do seletor quiral. Dois termos são utilizados para descrever esses complexos de inclusão que são “*tight*” e “*loose*”, e estão relacionados com o encaixe do analito na cavidade da ciclodextrina. Para um complexo de inclusão denominado de “*loose*”, o analito possui a habilidade de se mover e girar dentro da cavidade reduzindo as possibilidades do reconhecimento quiral. Por outro lado, um complexo de inclusão denominado de “*tight*” irá conferir uma orientação seletiva ao analito, resultando num menor grau de liberdade para uma possível rotação ou uma reorientação no interior da cavidade do seletor quiral. Durante o processo de inclusão, o analito pode se dissociar da CD e particionar com a fase móvel. Os analitos complexados com a ciclodextrina podem interagir com a CD por meio de interações de hidrogênio ou repulsão estérica com as hidroxilas secundárias presentes na CD, formando assim os três, ou mais, pontos necessários para que haja o reconhecimento quiral. Outra forma de se aumentar seletividade é por meio da derivatização das hidroxilas secundárias com grupos que vão adicionar diferentes interações (interações π - π , interações de hidrogênio, dipolar, etc.) (BERTHOD,2010; MITCHELL; ARMSTRONG, 2004).

Através da inspeção na literatura, é possível perceber que as moléculas separadas nesses sistemas apresentam algumas características que facilitam o reconhecimento quiral como a presença de um grupo hidrofóbico, como um anel aromático, que irá contribuir na formação do complexo de inclusão. Entretanto, o anel aromático deve possuir um tamanho que encaixe adequadamente à cavidade da ciclodextrina ou afetará a formação do complexo. Uma segunda característica necessária é que, uma vez complexado, o centro estereogênico ou um substituinte esteja próximo do grupo funcional adicionado à ciclodextrina funcionalizada.

3.1.2.2 Modo Polar orgânico

No modo polar orgânico a fase móvel é não aquosa e contém, obrigatoriamente, porcentagens elevadas de acetonitrila e completando a fase com metanol. Como consequência, a cavidade da ciclodextrina é

basicamente ocupada pelas moléculas dos solventes orgânicos, resultando numa fase estacionária mais polar uma vez que os analitos interagem majoritariamente com a região externa da CD, ou seja, a região mais polar. Desse modo, o reconhecimento quiral ocorre na superfície da CD. As interações que levam ao reconhecimento quiral são as interações de hidrogênio, que ocorrem entre as hidroxilas secundárias e o analito, interações do tipo dipolo-dipolo e as interações estéricas repulsivas.

Esse modo de eluição foi desenvolvido para a separação de compostos mais polares (ARMSTRONG et al., 1992; RISLEY; STREGE, 2000), podendo ser aplicado em separações quirais ou aquirais. A escolha desse modo para a separação de um dado analito deve seguir algumas regras. Primeiro, o analito deve conter em sua estrutura pelo menos dois grupos capazes de fazer ligações de hidrogênio. Sendo que, um grupo deve estar localizado no centro estereogênico ou próximo a ele. O outro grupo pode estar localizado em qualquer região da molécula. Outro fator que ajuda é se o composto possui em sua estrutura algum grupo volumoso próximo ao centro quiral (CHANG et al., 1993; MITCHELL; ARMSTRONG, 2004).

3.1.2.3 Modo Fase Normal

Assim como no modo polar orgânico, em análises em fase normal não ocorre a formação dos complexos de inclusão. Nesses sistemas, a fase móvel é composta por um solvente orgânico não polar (Heptano, Hexano, e etc.), e solventes polares como álcoois e éteres. O solvente orgânico apolar, ocupa a cavidade da ciclodextrina. Consequentemente, os analitos podem interagir com a sua face externa (polar), ou, no caso das ciclodextrinas funcionalizadas, com algum grupo que possa estar presente. Entretanto, apenas CD funcionalizadas com compostos aromáticos foram efetivas em fase normal (BEESLEY, 2010b).

Assim como nos outros modos de eluição, diferentes tipos de interações intermoleculares contribuem para o reconhecimento quiral (interações de hidrogênio, interações π - π , etc.). De acordo com Mitchell e Armstrong, a separação de compostos não aromáticos não é possível utilizando colunas a base de CD no modo fase normal, indicando que as interações do tipo π - π entre o analito e a FE, desempenham um papel fundamental no reconhecimento quiral (MITCHELL; ARMSTRONG, 2004).

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Obter a funcionalização de partículas superficialmente porosas com hidroxipropil-ciclodextrina para avaliação do efeito dessas novas partículas em separações enantioméricas utilizando fase reversa como modo de eluição.

3.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar as novas fases estacionárias utilizando as novas partículas como suporte;
- Empacotar colunas 150 mm x 4,6 mm d.i. com as novas fases estacionárias;
- Avaliar a performance cromatográfica por meio das curvas de van Deemter;
- Comparar a performance das novas colunas com colunas empacotados com partículas totalmente porosas de 5 e 3 μm de diâmetro.

3.3 EXPERIMENTAL

3.3.1 Materiais

N,N-dimetilformamida anidra (DMF), hidreto de sódio (NaH), (RS)-2-cloro-5-(1-hidroxi-3-oxo-2,3-di-hidro-1H-isoindol-1-il)benzeno-1-sulfonamida (Clortalidona), 1,2-difenil-1,2-etanodiol (Hidrobenzoína), ácido 2-fenilpropionico, Cloreto de N,N'-bis(3,5-di-tert-butilsalicilideno)-1,2-ciclohexanodiaminomanganês(III) (catalisador de Jacobsen), ácido acético, nitrato de amônio (NH_4NO_3) e acetato de amônio (NH_4OAc) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Os solventes acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), de grau HPLC, foram adquiridos da EMD (Gibbstown, NJ, USA). A água deionizada foi purificada por um sistema Milli-Q, sistema purificador de água (Millipore, Billerica, MA, USA). As partículas totalmente porosas de diâmetro de 5 μm e 3 μm foram obtidas da Daiso (Tóqui, Japão). A partícula superficialmente porosa, Porshell II [®], diâmetro de 2,6 μm , com núcleo sólido de 1,6 μm e camada porosa de 0.5 μm foi fornecida pela empresa Agilent Technologies.

3.3.2 Metodologia

As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado com um detector de arranjos de diodo (DAD, do inglês Diode Array Detector) e um injetor automático. Para todas as análises realizadas por HPLC, o volume de injeção foi de 0,5 μL . A fase móvel utilizada foi degaseificada utilizando-se vácuo durante 5 minutos. Os analitos foram dissolvidos em metanol ou na fase móvel apropriada. Os estoques dos analitos foram posteriormente diluídos quando necessário. A fase móvel utilizada para análise no modo fase reversa (RPM, do inglês Reverse Phase Mode) foi composta de ACN : 10 mM NH_4OAc , o pH foi ajustado para 4,1 com a adição de ácido acético. A composição da fase móvel utilizada foi 25:75 para as análises do ácido 2-fenilpropionico e hidrobenzoína, e 15:85 para a análise de clortalidona. Para as análises realizadas no modo orgânico polar (POM, do inglês Polar Organic Mode) a fase móvel foi preparada com ACN:MeOH e a composição foi 95:5 para a análise do catalisador de Jacobsen.

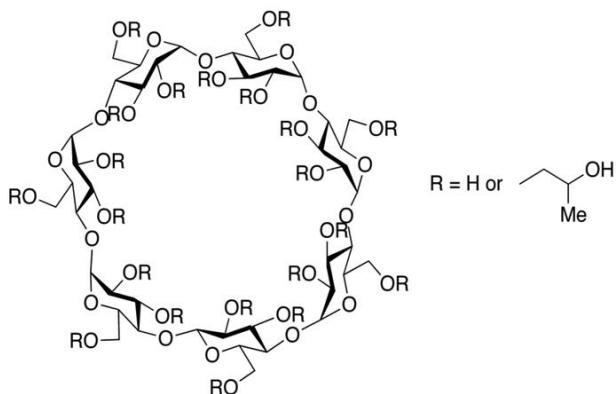
3.3.3 Síntese da fase estacionária

A síntese foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Armstrong (ARMSTRONG, 1985; STALCUP et al., 1990), utilizando ligante epóxi, sem a presença de nitrogênio em sua estrutura. Primeiro, 5 g de sílica foram mantidas a 170° C durante 12 horas. Após esse período a sílica foi adicionada à 100 mL de tolueno anidro em um balão de três bocas. A mistura foi aquecida e mantida sob refluxo até que toda a água fosse removida para um sistema Dean-Stark, e então resfriada a temperatura de 90° C. Por seguinte, 3 mL de 3-glicidiloxipropil-trimetoxi-silano foram adicionados e a reação foi mantida sob agitação durante 3 horas. Após o término da reação, o produto foi filtrado e lavado com tolueno e metanol e então mantido sob vácuo para secar.

Para a segunda etapa da síntese, 3 g de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina foi mantida à 100° C durante 12 horas, para remover qualquer resquício de água. A sílica seca preparada anteriormente, foi adicionada em 100 mL de N,N-dimetilformamida. A ciclodextrina foi dissolvida, separadamente, em 125 mL DMF e 3 g de hidreto de sódio (NaH) foram adicionados. A mistura foi mantida sob agitação por 15 minutos. A mistura foi então filtrada para remoção do excesso de NaH. O sal de sódio da ciclodextrina dissolvido em DMF foi então adicionado à sílica. A mistura foi mantida em refluxo por 3 horas. Após esse período, a reação foi resfriada à temperatura ambiente. O produto foi filtrado e lavado com DMF, metanol, tolueno, metanol, água e metanol e mantida sobre vácuo para secagem. Todo o processo de síntese foi realizado em atmosfera de nitrogênio. O processo foi o mesmo para os três tipos de sílica utilizados neste trabalho.

As propriedades das partículas e os resultados das sínteses estão listados na tabela 3.2. Após a síntese, as fases estacionárias foram empacotadas em colunas de aço inoxidável com dimensões de 15 cm x 0.46 cm (d.i). Neste capítulo, as colunas empacotadas com partículas de 5 μ m e 3 μ m foram nomeadas de coluna 1 e coluna 2 respectivamente. A coluna empacotada com as partículas superficialmente porosas foi denominada de coluna 3. Para avaliar o efeito de se utilizar SPP em separações enantioméricas, todas as fases foram derivatizadas com o mesmo seletor quirál, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP-RSP-CD, Figura 3-3).

Figura 3-1: Estrutura do HP-RSP-CD, seletor quiral utilizado nesse estudo.



3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Análise elementar

A Tabela 3-2 resume os valores relevantes referentes as partículas utilizadas como suporte e os resultados da análise elementar obtidos para cada fase estacionária sintetizada. Cada partícula utilizada como suporte possui tamanho e propriedades físicas diferentes. As diferenças entre as propriedades físicas de cada partícula vão afetar a performance de cada coluna de diferentes maneiras.

Como pode-se observar na Tabela 3-2, a SPP possui uma área superficial menor do que as FPP. Como consequência, quando essas partículas são derivatizadas com o seletor quirais, é esperado que se tenha um menor grau de substituição devido a essa menor área superficial. Intuitivamente, esses resultados podem levar a assumirmos que o fato de haver menos seletores quirais nas colunas empacotadas com SPP, as separações enantioméricas serão comprometidas. Essa discussão será detalhada posteriormente. Entretanto, como demonstrado no capítulo anterior, as colunas a base de SPP não demonstram perda de seletividade quando comparadas com as colunas análogas preenchidas com FPP.

Tabela 3-2: Propriedades das partículas e resultados da análise elemental para cada fase estacionária.

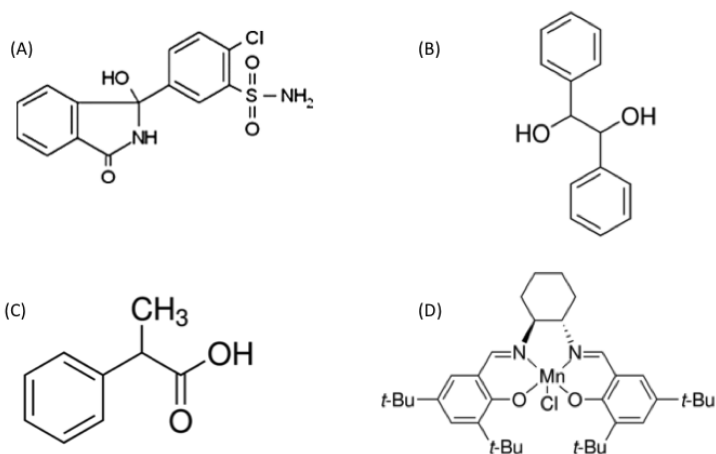
Type	Tamanho de partícula (μm)	Tamanho dos poros (\AA)	Área superficial (m^2/g)	C (%)	H (%)	$\mu\text{mol}/\text{m}^{2a}$	Grau de substituição (%)
Coluna1 FPP	5	93	465	9,8	1,1	0,34	18,1
Coluna 2 FPP	3	100	450	9,3	0,75	0,33	17,2
Coluna 3 SPP	2,6	120	117	2,8	0,88	0,34	5,3

^a Valores calculados através da % C obtidos através da análise elemental.

3.4.2. Comparação cromatográfica

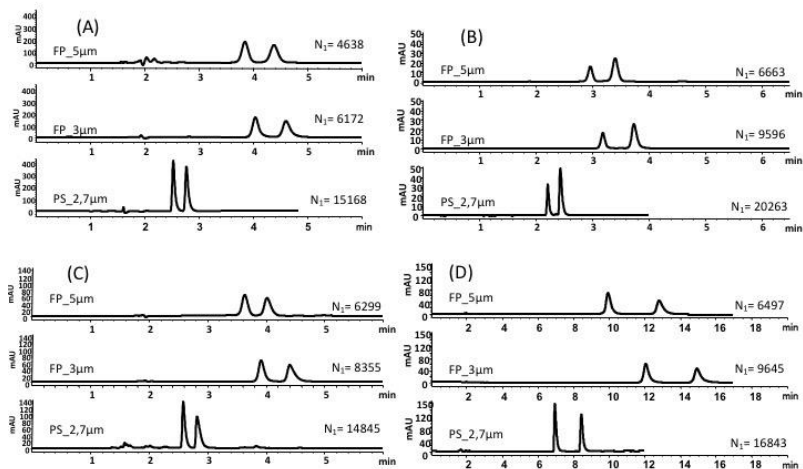
A avaliação do desempenho cromatográfico das três fases estacionárias quirais, funcionalizadas com o mesmo seletor quiral HP-RSP-CD (Figura 3-4), foi avaliada pela separação de quatro compostos quirais: clortalidona (composto A), hidrobenzoína (composto B), ácido 2-fenilpropiónico (composto C) e catalisador de Jacobsen (composto D). Os compostos A, B e C foram analisados utilizando o modo de fase reversa e o composto D foi separado utilizando o modo polar orgânico.

Figura 3-1: Estruturas dos compostos testados A- clortalidona; B- hidrobenzoína; C- ácido 2-fenilpropiónico e D- catalisador de Jacobsen.



Na Figura 3-5, estão os cromatogramas obtidos para cada composto em cada coluna. Como podemos observar, quando comparamos o desempenho das colunas 1 e 2, empacotadas com partículas totalmente porosas, com a coluna 3, empacotada com partículas superficialmente porosas, notamos que a coluna 3 produziu análises com maior eficiência e em menor tempo, como predito na teoria. No geral, as análises com a coluna 3 foram 50% mais rápidas, o que representa uma grande vantagem, uma vez que a utilização dessas colunas pode representar um aumento significativo na frequência analítica e redução dos gastos de solventes.

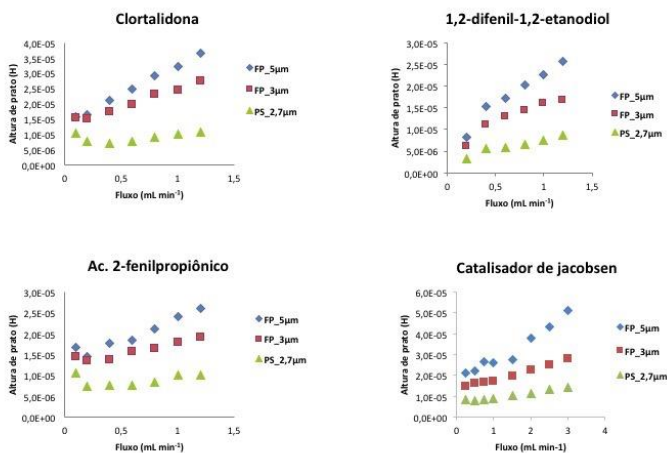
Figura 3-2: Separação dos enantiômeros de (A) clortalidona, (B) hidrobenzoína, (C) ácido 2-fenilpropionico e (D) catalisador de Jacobsen utilizando as colunas indicadas em cada cromatograma. A fase móvel utilizada em RPM (Reverse Phase Mode) foi acetonitrila /10 mM NH_4OAc pH 4.1: a composição da MP foi 25/75 (v/v) para o composto (A) e (C) e 15/85 para o composto (B). Para as separações em POM, a fase móvel foi acetonitrila/metanol e a composição foi 95/5 (v/v) para o composto (D).



3.4.3 Dependência do número de pratos em função do fluxo da fase móvel

A dependência do número de pratos em função do fluxo da fase móvel foi avaliada para a separação dos quatro pares enantioméricos e os resultados estão resumidos na Figura 3-6 A-D. Como pode-se observar na Figura 3-6, a coluna empacotada com SPP, demonstrou uma maior faixa de fluxo ótimo e um aumento mais brando na curva de van Deemter.

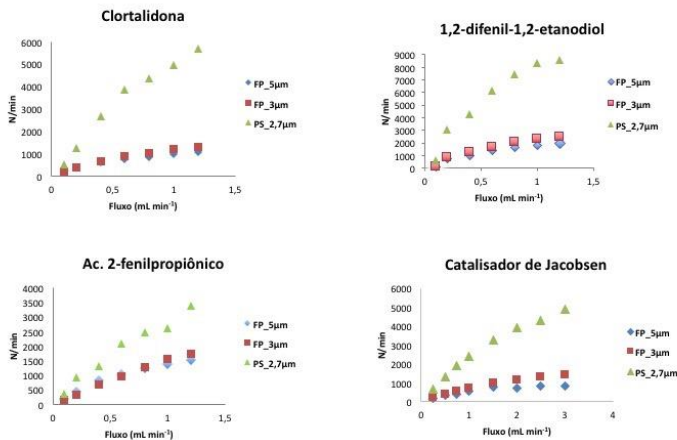
Figura 3-1: Dependência da altura de prato (baseada no primeiro enantiômero eluído) para os compostos testados. As condições de separação estão listadas na seção 3.3.2.



Outro ponto a se destacar na Figura 3-6, é que o fluxo ótimo para todas as colunas é em torno de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, o que é um fato inesperado, uma vez que valores maiores do fluxo ótimo para colunas recheadas com SPP foram teoricamente e experimentalmente comprovados (GRITTI; GUIOCHON, 2014), uma vez que diferentes fatores podem afetar este parâmetro. Entretanto, esse valor indica que nesta velocidade da fase móvel obteremos maior eficiência. No caso da coluna 3, esse valor sofre pouca ou nenhuma alteração em fluxos maiores, resultando assim em análises mais rápidas e eficientes.

Com a Figura 3-6 foi possível observar a vantagem das colunas a base de SPP em relação as colunas a base de FPP. Todavia, essa vantagem se torna mais clara quando comparamos os números de pratos por minuto (N min^{-1}) em função do fluxo da fase móvel (Figura 3-7).

Figura 3-2: Dependência do número de prato por minuto *versus* fluxo da fase móvel (baseado no primeiro enantiômero eluído para todos os compostos testados). As condições de separação estão resumidas na seção 3.3.2.



Basicamente, a Figura 3-7 ilustra a eficiência pelo tempo de análise em diferentes fluxos. Essa figura nos permite visualizar o ganho em tempo de análise e eficiência. Como esperado a vantagem das colunas recheadas com SPP se torna mais clara em valores de fluxo maiores. Como por exemplo, na separação dos enantiômeros de hidrobzoína no fluxo de 1,2 mL min⁻¹ produziu valores de N min⁻¹ para a coluna 3 até 9 vezes maior quando comprado com as colunas 1 e 2.

3.4.4. Seletividade

Como mencionado anteriormente, a diferença entre as estruturas das partículas superficialmente e totalmente porosas afetam a área superficial total a ser modificada com o seletor quiral (Tabela 3-3).

Por esta razão, o grau de substituição da fase estacionária

preparada com SPP é até 3,5 x menor do que o obtido com as partículas FPP. Como consequência de menor grau de substituição podemos entender que haverá uma perda na seletividade mas, como demonstrado anteriormente (SPUDEIT et al., 2014), o valor de $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ do SQ (seletor quiral) demonstrou ser mais importante para a seletividade quiral (α) que o grau de substituição absoluto, pelo menos para separações analíticas. Para confirmar essa descoberta, uma inspeção visual nos cromatogramas da (Figura 3-5) sugere que a perda em seletividade foi mínima ou mesmo negligenciável quando comparamos as colunas a base de FPP com a coluna empacotada com SPP utilizando HP-RSP-CD como seletor quiral. Os valores de seletividade calculados (Tabela 3-3) demonstram que a seletividade não foi afetada para os compostos testados.

Em outras palavras, como a cobertura relativa não foi sacrificada pelo tamanho da partícula superficialmente porosa, a seletividade também não sofreu alterações. Essa descoberta confirma o ganho de seletividade quando o SQ é quimicamente ligado as SPPs ao invés de somente adsorvido.

Tabela 3-3 : Resolução (R_s) (em parênteses) e seletividade enantiomérica (α). Valores obtidos para os compostos testados nas colunas empacotados FPP e SPP, num fluxo de 1mL min⁻¹. As condições de separação estão listadas na seção 3.2. As colunas 1 e 2 foram empacotados com FPP com diâmetro de 5 μ m e 3 μ m respectivamente. A coluna 3 foi empacotada com SPP com diâmetro de 2,7 μ m.

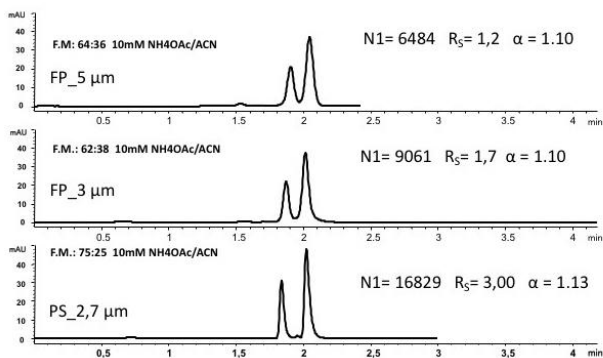
	Hidrobenzoina	Ac. 2- fenilpropionico	Clortalidona	Catalisador de Jacobsen
Coluna 1	1,42 (2,7)	1,24 (1,9)	1,29 (2,2)	1,30 (5,1)
Coluna 2	1,46 (3,7)	1,27 (2,5)	1,28 (2,5)	1,30 (4,5)
Coluna 3	1,50 (3,2)	1,29 (2,2)	1,31 (2,8)	1,30 (6,4)

3.4.5. Resolução (R_s)

Como dito anteriormente, com menor grau de substituição obtido para as partículas superficialmente porosas, era esperado também uma perda na resolução. Entretanto, como podemos ver na Figura 3-8 e na Tabela 3-3, os valores de resolução obtidos para a coluna 3, a base de SPP, foram significativamente maiores que os obtidos com a coluna 1, empacotada com FPP de 5 μm de diâmetro, e foram iguais ou pouco menor quando comparados com os valores obtidos com a coluna 2, empacotada com FPP de 3 μm de diâmetro.

De acordo com Gritti e Guiochon, a razão core/diâmetro da partícula (ρ) pode estar relacionada com o ganho em resolução nas fases estacionárias quirais a base de partículas superficialmente porosas. Ainda segundo Gritti e Guiochon (GRITTI; GUIOCHON, 2014), para colunas empacotadas com partículas com valores de ρ entre 0,5 e 0,95 com valores de retenção constantes, o ganho em resolução pode chegar até 10%. Sendo assim, as fases móveis foram ajustadas para as colunas 1 e 2 de modo que o fator de retenção fosse similar ao obtido pela coluna 3. Essa observação foi testada para o composto 1,2-difenil-1,2-etanodiol (Figura 3-8).

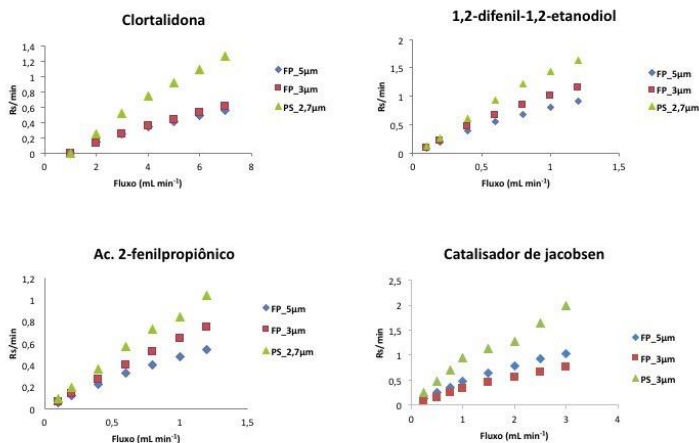
Figura 3-1: Comparação da separação da 1,2-difenil-1,2-etanodiol realizada com fluxo de 1,2 mL min^{-1} . A fase móvel foi composta por ACN/10mM de NH_4OAc , sendo a composição de 36:64 para a coluna 1, 38:62 para a coluna 2 e 25:75 para a coluna 3.



Como predito pela teoria, podemos observar na figura acima que, a coluna 3 empacotada com SPP com valor de ρ igual a 0,65, obteve um ganho de resolução de até 20 % quando comparado com as colunas a base de FPP ($\rho = 0$). Esse resultado fornece um suporte empírico para a teoria de Griitti e Guiochon.

Outra forma de comparar o poder de resolução em termos do tempo de análise é por meio do gráfico da resolução por tempo de análise (Figura 3-9). Esses resultados demonstram a perda de R_s quando utilizamos valores elevados para o fluxo da fase móvel, sendo menor para a coluna 3 que para as colunas 1 e 2 empacotadas com material totalmente poroso. Isso indica que as separações enantioméricas podem ser obtidas utilizando colunas a base de SPP com elevados valores de fluxo da fase móvel e com uma perda mínima em R_s , permitindo análise mais rápidas e mantendo o poder de resolução.

Figura 3-2: Dependência da $R_s \text{ min}^{-1}$ versus o fluxo da fase móvel para os compostos testados. As condições de separação estão detalhadas na seção 3.2.2.



3.5 CONCLUSÕES

As colunas empacotadas com partículas superficialmente porosas funcionalizadas com HP-RSP-CD apresentaram resultados satisfatórios, apresentando ganhos em termos de eficiência, resolução e redução de tempo de análise para separações quirais no modo de fase reversa e polar orgânico. A única desvantagem foi que nas eluições em fase reversa, o fluxo máximo é menor devido as altas pressões que podem ocasionar o rompimento das conexões, e também limitam os ganhos em eficiência dessas novas colunas, uma vez que a performance dessas partículas é evidenciada em fluxos mais elevados. Os resultados aqui demonstrados encorajam novos testes com diferentes seletores quirais de diferentes classes (glicopeptídeos macrocíclicos, éteres de coroa e etc).

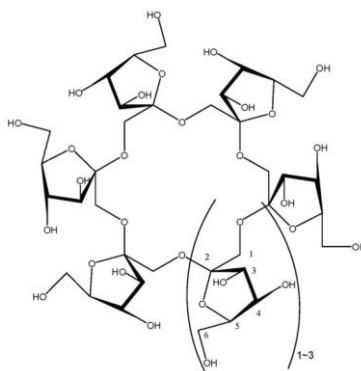
CAPITULO 4: CICLOFRUTANO E SEUS DERIVADOS

4.1- INTRODUÇÃO

Os ciclofrutanos (CF) são uma família de oligossacarídeos constituídos de unidades de D-frutofuranose ligadas por ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1) à um éter de coroa (18-coroa-6), e cada unidade de frutofuranose possui quatro centros estereogênicos e três hidroxilas. Os CF foram reportados pela primeira vez em 1989 por Kawamura e Uchiyama, que o produziram a partir da fermentação da inulina com enzimas extracelulares provenientes de uma variação do *Bacillus circulans* OKUMZ31B (SCRIBA, 2012). Em 1994, Kushibe e colaboradores, relataram a utilização de um novo método de produção dos CF utilizando uma outra variação da bactéria *B. circulans* (MCI-2554), que possibilitou maior eficiência na produção destes compostos (WANG; SUN; ARMSTRONG, 2010).

Assim como as ciclodextrinas, que possuem estruturas com diferentes quantidades de glucose, os CF com 6, 7 e 8 unidades de frutofuranose também já foram reportados na literatura. Esses compostos são denominados de CF6, CF7 e CF8 respectivamente, como mostra a Figura 4-1.

Figura 4-1: Estrutura molecular dos ciclofrutanos CF6, CF7 e CF8.



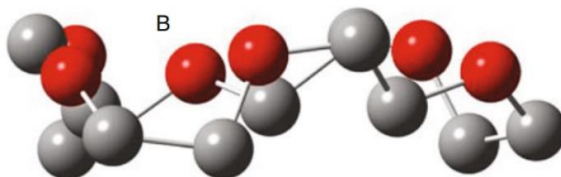
Os ciclofrutanos são oligossacarídeos assim como as ciclodextrinas (CD), entretanto, suas estruturas são diferentes. Ao contrário das CD (Capítulo 3), os derivados do frutano não possuem a

cavidade hidrofóbica. Como consequência, a formação de complexos de inclusão com compostos orgânicos, que apresentam um papel importante no mecanismo de reconhecimento quiral em colunas a base de ciclodextrinas, não ocorrem com os CF. Em vez disso, nos CF, os anéis de pentoses (Frutose), estão dispostos em espiral ou em forma de hélice ao redor do éter de coroa.

Dentre os ciclofrutanos, o CF-6, que contém seis unidades de frutofuranose, é o que desperta maior interesse principalmente por dois motivos: primeiro por estar disponível em sua forma pura e segundo, por possuir uma estrutura geometricamente bem definida (SUN, 2009). As estruturas obtidas por cristalografia de raio x demonstram que as pentoses estão dispostas em forma de espiral ao redor do éter, alternado as posições em relação ao plano principal do éter de coroa. Nesta conformação, as seis hidroxilas presentes na posição três (Figura 4-2) alternam-se entre si, sendo metade direcionada diretamente para o centro da molécula e a outra metade no sentido oposto. Essas hidroxilas resultam em interações de hidrogênio no centro da molécula, que limitam assim o acesso em um dos lados do éter de coroa.

O interior do CF6 é um 18-coroa-6 éter natural. Porém, sua conformação é diferente quando comparado com um éter de coroa sintético. No CF6, os seis átomos de oxigênio do éter estão todos direcionados para o mesmo lado do macrociclo. Tal fato ocorre, pois a conformação adotada gtgtgt, ou seja, alterna entre gauche (g) e trans (t) (Figura 4-2). Consequentemente, todas as hidroxilas das posições 3 e 4 do grupo furanose, estão posicionadas no mesmo lado do macrociclo, tornando essa região hidrofílica. Por sua vez, a outra região do macrociclo é considerada hidrofóbica devido a presença dos grupos etileno do éter de coroa (WANG; SUN; ARMSTRONG, 2010).

Figura 4-2: Conformação adotada pelo éter de coroa no interior do CF6 alternando-se entre gauche e trans. Vermelho: átomos de oxigênio; cinza: átomos de Carbono.

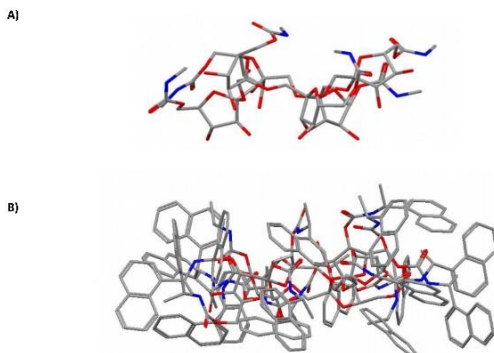


4.1.1 Ciclofrutanos funcionalizados

Com base nas informações estruturais discutidas acima, a forma nativa do CF6 apresenta limitações que interferem na capacidade do reconhecimento quiral, uma vez que sua estrutura se encontra enrijecida pelas ligações intramoleculares, que também limitam o acesso dos analitos ao interior da molécula. Uma alternativa para reduzir a interferência das ligações intramoleculares é a derivatização dos CF com grupos que possam agregar no reconhecimento quiral. Uma forma de alterar essas características dessas moléculas é por meio do bloqueio de algumas hidroxilas presentes na molécula e também pela derivatização, que vai limitar as interações de hidrogênio e fazer com que a estrutura da molécula relaxe, deixando livre o acesso aos oxigênios do éter de coroa presentes no interior da molécula (SUN, 2009).

Os ciclofrutanos podem ser derivatizados com grupos pequenos como o isopropil e o metil, ou com grupos maiores, mais volumosos como o R-naftil, o dimetilfenil e o naftiletil, resultando em características estruturais distintas. Os CF6 funcionalizados com grupos alifáticos, que são menos volumosos (Figura 4-3-A), possuem a estrutura relaxada expondo o éter de coroa presente no interior da molécula bem como algumas hidroxilas. Por sua vez, os CF6 derivatizados com grupos aromáticos, mais volumosos, possuem uma estrutura mais sobrecarregada (Figura 4-3-B), o que dificulta o acesso ao centro da molécula, porém, fornece outros tipos de interações nas regiões periféricas da molécula. Essas características resultam em dois tipos de mecanismos de reconhecimento quiral distintos e de certa forma, complementares, que serão abordados na seção seguinte.

Figura 4-3: Visão lateral do CF-6 derivatizado com: A) seis grupos metilcarbamato e B) dezoito grupos R-naftil carbamato. Vermelho: átomos de oxigênio; Azul: átomos de carbono.



4.1.2 Mecanismos

Os ciclofrutanos compõem uma nova classe de seletores quirais. Apesar de serem oligossacarídeos cíclicos e possuírem um éter de coroa em seu centro, possuem mecanismo de reconhecimento quiral diferente de outros compostos semelhantes e que já estão estabelecidos como seletores quirais. Como discutido anteriormente, os CF possuem uma estrutura que se assemelha as ciclodextrinas, porém, neste caso não há a formação de uma cavidade hidrofóbica como ocorre no caso das ciclodextrinas, por exemplo. Sendo assim, a separação de compostos aromáticos em colunas à base de CF não se dão pela formação dos complexos de inclusão, mas sim pela somatória de outras interações presentes.

O mecanismo de separação quiral do CF pode ser dividido em três partes: a) não derivatizado, b) derivatizado com compostos alifáticos e c) derivatizado com compostos aromáticos.

a) Não derivatizados:

As fases estacionárias contendo CF na sua forma nativa são conhecidas pela sua baixa capacidade de reconhecimento quiral, sendo capazes apenas de separar algumas poucas aminas primárias e alguns derivados de binaftil. De acordo com alguns autores, essas separações

ocorrem apenas quando a fase móvel é composta apenas por solvente orgânico. O fato de não haver reconhecimento quiral utilizando o modo de fase reversa, indica que as interações hidrofóbicas não predominam nessas colunas. Por sua vez, a separação de aminas primárias é atribuída a interação de hidrogênio com os hidrogênios das hidroxilas presentes no CF. A forma como o reconhecimento quiral ocorre é semelhante ao que ocorre em colunas que contêm éter de coroa (18-coroa-6) como FE, entretanto as interações de hidrogênio intermoleculares com o CF são enfraquecidas devido às interações intramoleculares do mesmo tipo.

b) Derivatizados alifáticos

Como discutido anteriormente, o excesso de hidroxilas no CF nativo resulta em uma limitação no reconhecimento quiral da coluna. Uma forma de aumentar a seletividade dessas colunas é através da derivatização que, dependendo do grupo adicionado, poderá além de reduzir as interações intramoleculares, atuar como um ponto de interação para que ocorra o reconhecimento quiral. Os CF-6 derivatizados apenas com grupos alifáticos, demonstram excelente seletividade para compostos que contêm aminas primárias. Assim como ocorre para os CF não derivatizados, as separações nos modos polar orgânico e fase normal apresentaram melhores resultados. Tal fato ocorre, porque as interações de hidrogênio que apresentam um papel fundamental no reconhecimento quiral das aminas primárias, são favorecidas em solventes com baixa constante dielétrica. As separações realizadas no POM (*polar organic mode*) são, no geral, mais eficientes e mais rápidas que as separações realizadas no modo de fase normal.

As aminas primárias são facilmente separadas em colunas contendo CF funcionalizados com grupos alifáticos, porém, para reduzir o tempo de análise para um faixa aceitável, a adição de alguns aditivos se faz necessária. Em separações no NPM (*normal phase mode*), a adição de compostos ácidos com o ácido acético e o ácido trifluoroacético, resulta na redução do tempo de eluição. A magnitude da redução do tempo de retenção está relacionada com a força (pK_a) do ácido adicionado. Os aditivos básicos resultam em uma redução ainda maior no tempo de eluição do composto. Já no modo POM, a mistura de aditivos ácidos e básico é recomendada para a separação de aminas primárias. A composição dos aditivos otimizada é 0,3/0,2 (% V/V) ácido acético/trietilamina em metanol.

A funcionalização do CF com diferentes grupos alifáticos (metil, etil, isopropil e tercbutil) também foi avaliada. Devido a

diferença de geometria e no volume de cada grupo testado, as colunas apresentaram desempenho diferentes. Dentre todas as colunas testadas, as colunas funcionalizadas com isopropil-ciclofrutano apresentaram as melhores separações para as aminas primárias.

c) Derivatizados aromáticos

Assim como em colunas contendo oligo- e polissacarídeos, que são funcionalizados com grupos aromáticos como naftiletil e 3,5-dimetilfenil, a funcionalização do CF com esses grupos é uma estratégia que é adotada com o intuito de aumentar sua capacidade de reconhecimento quiral frente a determinados compostos. A adição de grupos aromáticos torna possível outros tipos de interações intermoleculares como as do tipo π - π .

O volume do grupo adicionado bem como o grau de derivatização afetam drasticamente a seletividade das colunas. Comparando-se duas colunas com os mesmos seletores quirais funcionalizados com o mesmo aromático, mas, em diferente porcentagem, colunas com menor grau de substituição apresentam, ainda que pequena, seletividade para algumas aminas primárias, o que se deve ao fato de que alguns grupos hidroxil estejam disponíveis e assim interagiram através das interações de hidrogênio com as aminas primárias. Por sua vez, a coluna que possui o seletor quiral completamente funcionalizado perde completamente a seletividade de aminas primárias, uma vez que não há mais sítios para a realização das interações de hidrogênio, porém, a separação de outros compostos torna-se possível.

4.1.3 Aplicações

A utilização destes compostos como fases quirais para cromatografia líquida só foi reportada em 2009 por Armstrong e colaboradores, duas décadas após a sua descoberta. Para avaliar a performance dos CF e seus derivados como SQ (seletor quiral), os autores compararam a utilização destes com outras colunas quirais disponíveis comercialmente. Duas formas funcionalizadas foram testadas: grupo alifáticos metilcarbamato e o grupo aromático (R)-(1-naftiletil) carbamato. De acordo com os autores, a forma nativa do ciclofrutano apresenta seletividade quiral limitada devido as interações de hidrogênio que ocorrem em seu interior, que restringem o acesso dos analitos à cavidade do CF-6. Porém, suas formas funcionalizadas

demonstraram um grande potencial de resolução enantiomérica, principalmente para aminas primárias. A grande vantagem do CF6 é que, assim como as ciclodextrinas, há possibilidade de ser derivatizado para que possa separar diferentes classes de compostos (SUN et al., 2009).

Em outro artigo, Armstrong e Sun reportam o desenvolvimento de uma nova fase estacionária quirál (CSP) por meio da ligação do CF-6 funcionalizado com isopropilcarbamato (IP-CF6) com a sílica gel (SUN; ARMSTRONG, 2010). A nova CSP foi avaliada pela injeção de 119 misturas racêmicas de aminas primárias, e demonstrou enantiosseletividade pronunciada com todos os tipos de aminas primárias, separando 93% de todos os compostos testados. Obteve-se maior eficiência com a utilização de solventes orgânicos polares como fase móvel. Outra grande vantagem destacada pelos autores é a possibilidade de se utilizar essa nova fase estacionária quirál em separações em escala preparativa (SUN; ARMSTRONG, 2010).

Armstrong e colaboradores, demonstraram o desenvolvimento de uma nova fase para cromatografia líquida de interação hidrofílica com ciclofrutanos-6 ligado à sílica gel (QIU et al., 2011a). Nesse trabalho, o CF-6 foi ligado à sílica por ligação com carbamato, utilizando dois diferentes métodos (SUN et al., 2009). Com o primeiro, a ligação foi realizada com propilcarbamato e deu origem a duas fases distintas, sendo uma com maior porcentagem de recobrimento (H-CF6) e outra com menor porcentagem de recobrimento (L-CF6). Com o segundo método, a ligação com a sílica foi realizada com o dicarbamoxil-hexil, onde a fase foi denominada de DCH-CF6. As características destas três fases foram avaliadas e comparadas com três diferentes colunas HILIC disponíveis comercialmente. De acordo com os autores, as novas fases estacionárias demonstram vantagens em relação às comerciais na separação de ácidos nucleicos, nucleosídeos, xantinas, β -bloqueadores e ácido salicílico e seus derivados. O desempenho destas fases no modo HILIC pode aumentar a retenção, a seletividade e a resolução para compostos que são difíceis de serem separados por RP-HPLC.

Em outro trabalho, Armstrong e Padivitage usaram um derivado sulfonado do ciclofrutano-6 (SCF6) como fase estacionária para cromatografia de interação hidrofílica (PADIVITAGE; ARMSTRONG, 2011). A nova fase estacionária foi avaliada pela injeção de diversos compostos polares e da comparação dos resultados obtidos com colunas HILIC disponíveis comercialmente: ZIC-HILIC, Diol e Cyclobond I 2000. De acordo com os autores, o SCF6 demonstrou ser uma excelente

fase estacionária para separações de β -bloqueadores, xantinas, ácido salicílico, ácido nucleico, maltooligosacarídeos, vitaminas hidrossolúveis e aminoácidos em modo HILIC. A SCF6 mostrou-se competitiva e frequentemente superior às colunas HILIC disponíveis comercialmente.

A aplicabilidade do ciclofrutano como seletor quiral e fase estacionária para o modo HILIC pode ser verificado em outros trabalhos. Porém, a aplicabilidade dessa classe de compostos não se restringe apenas à cromatografia líquida, podendo ser utilizado em cromatografia gasosa (GC) e em eletroforese capilar (CE). Esta última é uma boa alternativa à cromatografia devido à sua alta eficiência, tempo de análise curto, pequeno consumo de amostras, instrumentação simples e baixo custo operacional (ODA; LANDERS, 1996). Ao contrário da HPLC, que utiliza fases estacionárias quirais, as separações enantioméricas em CE são realizadas pela adição do seletor quiral ao eletrólito de corrida. Apesar de existir uma grande variedade de seletores quirais aplicáveis à CE (GÜBITZ; SCHMID, 1997), a ciclodextrina e seus derivados são os mais utilizados (PERERA et al., 2013).

Jiang e colaboradores demonstraram a utilização do derivado sulfatado do ciclofrutano como seletor quiral para eletroforese capilar (ARMSTRONG et al., 2009). De acordo com os autores, o CF6 não demonstrou enantioseletividade para nenhum dos compostos testados. Por sua vez, o ciclofrutano sulfatado apresentou excelente seletividade para compostos catiônicos, incluindo aminas primárias, secundárias, terciárias e aminoácidos. Outro ponto destacado pelos autores são os elevados valores para os fatores de resolução enantiomérica obtidos em um tempo de análise curto, geralmente menor que 10 minutos.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo geral

Obter a funcionalização de partículas superficialmente porosas com Isopropil-ciclofrutano para avaliação do efeito dessas novas partículas em separações enantioméricas utilizando fase normal e polar orgânico como modos de eluição.

4.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar novas fases estacionárias utilizando as novas partículas como suporte;
- Empacotar colunas 150 mm x 4,6 mm d.i. com as novas fases estacionárias;
- Avaliar a performance cromatográfica por meio das curvas de van Deemter;
- Comparar a performance das novas colunas com colunas empacotados com partículas totalmente porosas de 5 e 3 μm de diâmetro.

4.3 EXPERIMENTAL

4.3.1 Materiais

Tolueno anidro, Piridina anidra, 3-(trietoxisilil)propilisocianeto, (RS) -3-etil-5-metil-2-[(2-aminoetoxi) metil]-4-(2-clorofenil)-6-metil-1,4-di-hidropiridina-3,5-dicarboxilato (amlodipina), (RS)-5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-(trifluorometilsulfonyl)-1H-pirazole-3-carbonitrilo (fipronil), 2'-amino-1,1'-binaftalen-2-ol (NOBIN), 1,2-difeniletilamina, ácido acético (AA) e trietilamina (TEA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). O ciclofrutano contendo seis moléculas de furanose foi fornecido pela AZYP (Arlington, TX, EUA). Acetonitrila (ACN), heptano, etanol (EtOH) e metanol (MeOH) de grau HPLC, foram adquiridos com a empresa EMD (Gibbstown, NJ, EUA). As partículas totalmente porosas, de 5 µm de diâmetro, foram obtidas junto a empresa Daiso (Toquio, Japão). As partículas de 3µm de diâmetro, foram obtidas com a empresa Glantreo (Cork, Irlanda). As partículas superficialmente porosas, com diâmetro de 2,7 µm, foram doadas pela empresa Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).

4.3.2 HPLC Método

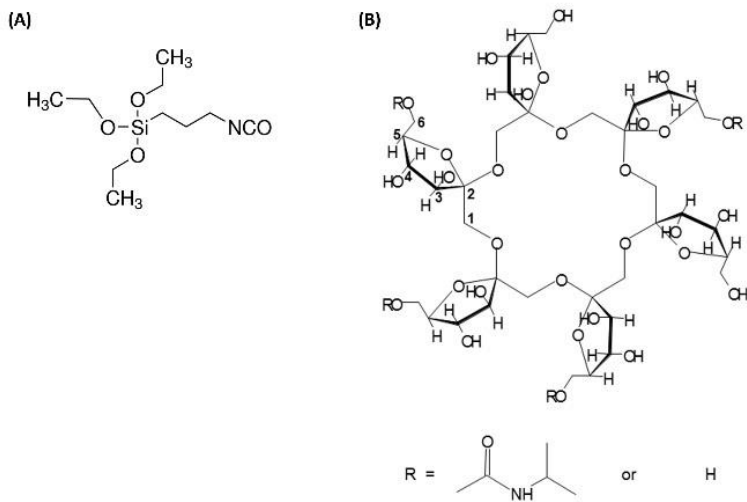
As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado com um detector de arranjos de diodos (DAD, Diode Array Detector) e um injetor automático. Para todas as análises realizadas por HPLC, o volume de injeção foi de 0,5 µL. A fase móvel utilizada foi desgaseificada utilizando-se vácuo durante 5 minutos. Os analitos foram dissolvidos em metanol ou na fase móvel apropriada. Os estoques dos analitos foram posteriormente diluídos conforme necessidade. A fase móvel utilizada para análise no modo polar orgânico (POM, *Polar Organic Mode*) foi composta de ACN: Metanol:0,3%(v/v) ácido acético e 0,2 %(v/v) de trietilamina. A composição da fase móvel utilizada foi 80:20 para as análises do amlodipina e 60:40 para 1-(1-naftil)etilamina. Para separações no modo de eluição fase normal (NPM, *Normal Phase Mode*), a fase móvel utilizada foi heptano: etanol, sendo a composição de 95:5 para NOBIN e para o fipronil.

4.3.3 Síntese da fase estacionária

Para a síntese da fase estacionária 5,0 g de sílica gel foram adicionadas a um balão de duas bocas contendo 80 mL de tolueno anidro. A mistura foi então mantida sob refluxo por 2 horas e 15 mL de tolueno com resíduo de água foram removidos utilizando um Dean-Stark. Simultaneamente, a solução contendo 760 μ L do ligante 3-(trietoxisilil) propil isocianeto dissolvidos em 15 mL de piridina, foi adicionada vagorosamente à solução contendo 1,5 g de IP-CF6 dissolvidos em 60 mL de DMF anidro. A reação foi aquecida a 70°C e mantida durante 5 horas com agitação contínua e com atmosfera inerte de nitrogênio. Após esse período, a reação foi resfriada à temperatura ambiente e então adicionada à solução contendo sílica. A mistura foi aquecida a 110°C e mantida sob refluxo durante 12 horas. O produto, fase estacionária IP-CF6, foi filtrado e lavado com 50 mL de tolueno, metanol, água, acetona e diclorometano, e posta para secagem em uma estufa com vácuo. Análises de CHN foram realizadas com o intuito de se avaliar a síntese. O procedimento foi o mesmo para os três tipos de sílica utilizados neste trabalho.

As propriedades das partículas bem como os resultados das análises de CHN estão listados na Tabela 4-1. Após a síntese, as fases estacionárias foram empacotadas em colunas de aço inoxidável com dimensões de 15 cm x 0,46 cm (d.i). As colunas empacotadas com partículas de 5 μ m e 3 μ m foram nomeadas de coluna 1 e coluna 2, respectivamente. A coluna empacotada com as partículas superficialmente porosas foi denominada de coluna 3. Para avaliar o efeito de se utilizar SPP em separações enantioméricas, todas as fases foram derivatizadas com o mesmo seletor quiral, isopropil-ciclofrutano (IP-CF-6, Figura 4-4).

Figura 4-4: Estrutura química do ligante 3-(trietilsilil) propil isocianato (A) e do seletor quiral IP-CF-6 (B) utilizados neste estudo.



4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Análise elementar

A Tabela 4-1 resume as informações relevantes das partículas utilizadas como suporte e os resultados da análise elementar para cada fase. As partículas possuem estruturas e tamanhos diferentes e como consequência, suas propriedades físico-químicas também são diferentes. As diferentes características dessas partículas, afetam o preparo das colunas desde sua síntese até o seu preenchimento. Entretanto, essas diferenças não afetam apenas o processo de produção, mas também sua performance, como discutido anteriormente.

As partículas superficialmente porosas (SPP, *Superficially Pores Particles*) têm área superficial menor que as partículas totalmente porosas (FPP, *Fully Pores Particles*). Como consequência, quando funcionalizadas com um seletor quirál (SQ), elas irão possuir um menor grau de substituição, como se pode observar na Tabela 4-1, onde a %C e do SQ ligado nas SPP foi de aproximadamente a metade do valor obtido para a partícula de 3 μm e um terço do valor obtido com as partículas de 5 μm . Pode-se supor que com muito menos seletor quirál nas colunas contendo SPP como suporte, as separações enantioméricas serão afetadas. Entretanto, é importante notar que a quantidade de seletor quirál normalizado pela área superficial (Tabela 4-1: $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (C)) é consideravelmente maior para as SPP. Acredita-se que isso ocorra, pois, os silanóis das SPP estão presentes numa região mais acessível, tornando a funcionalização desses grupos mais fácil e eficiente. Por sua vez, nas FPP, parte dos silanóis encontram-se no interior da molécula, região que dificulta a funcionalização desses grupos.

A diferença significativa na quantidade de seletor quirál quimicamente ligado às partículas nem sempre representam os resultados esperados. Por exemplo, acredita-se que grandes quantidades de seletor quirál podem dar maior seletividade, mas também podem gerar tempos de análises maiores e alargamento de banda. Outra possibilidade é que menores quantidades de seletor quirál podem resultar em análises mais rápidas, porém, com perda na seletividade. Estas e outras possibilidades serão vistas nas sessões 4.4.2. e 4.4.3.

Tabela 4-1: Propriedades das partículas e resultados da análise elementar para cada fase estacionária.

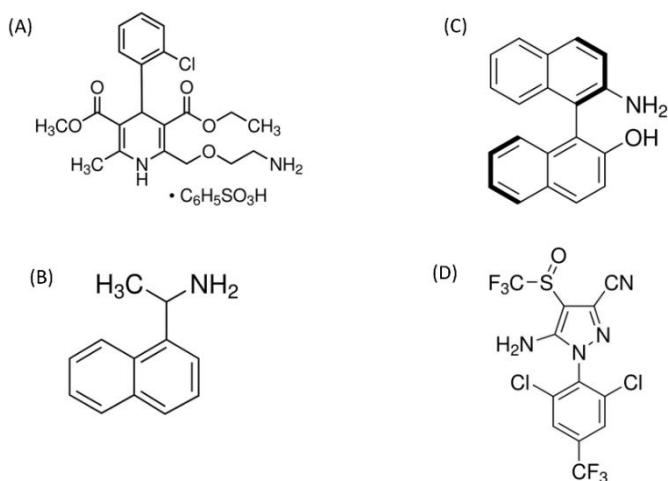
	Tipo	Tamanho de partícula (µm)	Tamanho do poro (Å)	Área superficial (m ² /g)	C (%)	N (%)	µmol/m ² ^a	Porcentagem de recobrimento (%)
Coluna 1	FPP	5	93	465	14,1	1,1	0,77	32,2
Coluna 2	FPP	3	100	300	11,5	0,75	0,76	24,4
Coluna 3	SPP	2,7	120	120	6,2	0,88	0,88	13,1

^a Valores calculados através da % C obtidos através da análise elementar.

4.4.2 Comparação cromatográfica

Os perfis cromatográficos das três colunas, funcionalizadas com o mesmo seletor quiral, IP-CF6 (Figura 4-5), foram avaliadas para a separação de quatro compostos quirais: amlodipina (composto A), 1-(1-naftil) etilamina (composto B), NOBIN (composto C) e fipronil (composto D), sendo que as estruturas estão demonstradas na Figura 4-5. Os compostos A e B foram analisados no modo polar orgânico de eluição enquanto que os compostos C e D separados no modo de fase normal. Esses modos de eluição foram selecionados devido a resultados obtidos em estudo anteriores.

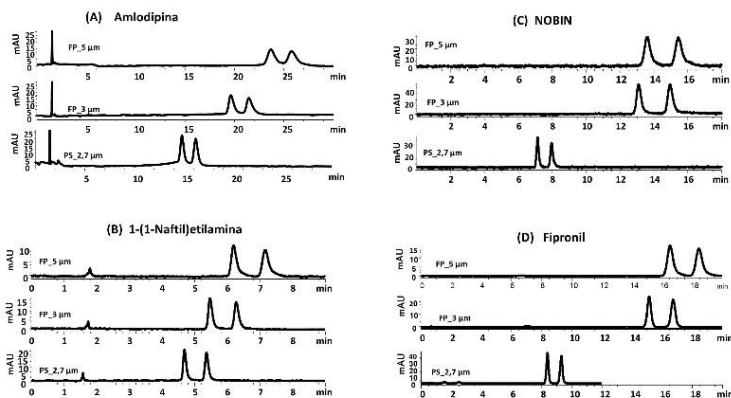
Figura 4-5: Estrutura do compostos testados A- Amlodipina; B-1-(1-naftil)etilamina; C- NOBIN e D- Fipronil.



Quando comparadas, as partículas superficialmente porosas (coluna 3) e as totalmente porosas (colunas 1 e 2), é possível perceber que as separações realizadas com a coluna 3, à base SPP, ocorreram em um menor tempo de análise e com maior eficiência (N). Os cromatogramas (Figura 4-6), claramente mostram que, para os compostos testados, o tempo de eluição foi pelo menos 50% menor e os picos são mais estreitos e mais simétricos para a coluna 3, empacotada com SPP. Curiosamente, a separação realizada no modo NPM

apresentou uma diminuição ainda mais significativa na retenção para as SPP (Fig. 4-6C e D) quando comparadas com a separação por POM (Fig. 4-6A e B). As possíveis razões para este fato não foram consideradas no tratamento teórico para as separações quirais em colunas a base de SPP (GRITTI; GUIOCHON, 2014) e nem tem-se este fenômeno relatado na prática.

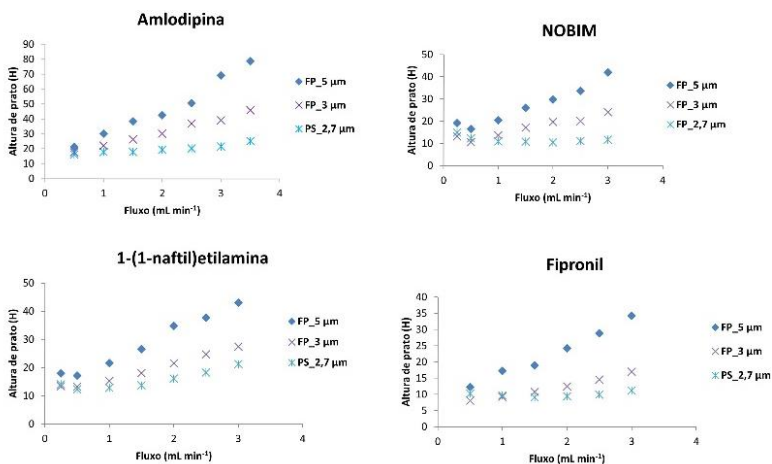
Figura 4-6: Separação dos enantiômeros de (A) amlodipina, (B) 1-(1-naftil) etilamina, (C) NOBIN e (D) fipronil, utilizando as colunas indicadas em cada cromatograma. A fase móvel utilizada em POM foi ACN: metanol: 0,3%(v/v) ácido acético e 0,2 % (v/v) de trietilamina. A composição da MP foi 80:20 para o composto (A) e 60:40 para composto (B). Para separações em NPM, a fase móvel utilizada foi heptano: etanol, sendo a composição de 95:5 para os compostos (C) e (D).



4.4.3 – Dependência do número de pratos em função do fluxo da fase móvel

A dependência do número de pratos com a variação do fluxo de fase móvel foi avaliada para a separação dos quatro pares de enantiômeros e os resultados estão demonstrados na Figura 4-7A-D em função da altura de prato (H) *versus* fluxo. Como pode-se perceber, a coluna preparada com partículas superficialmente porosas apresenta uma menor variação na curva de van Deemter, o que representa uma região maior com fluxo ótimo. O mesmo não ocorre para as colunas 1 e 2, que utilizam FPP como suporte.

Figura 4-7: Dependência da altura de prato (baseada no primeiro enantiômero eluído) para os compostos testados. As condições de separação estão listadas na seção 4.3.2.

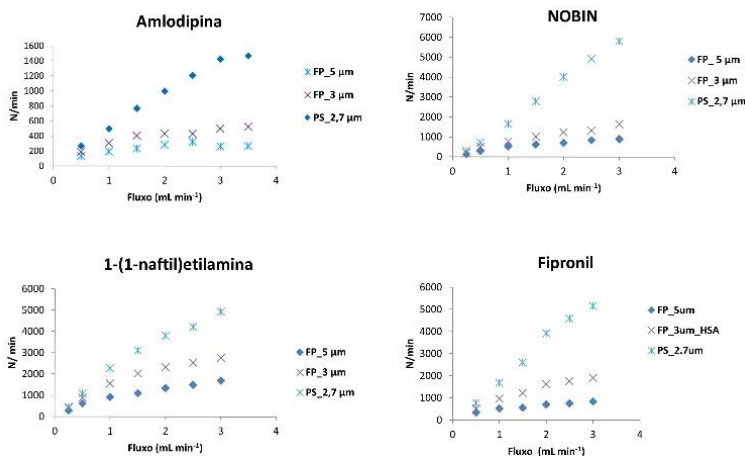


O conjunto destes resultados mostram que as separações enantioméricas podem ser realizadas em um menor tempo com um mínimo de perda de performance. Essa observação é uma consequência da estrutura das partículas superficialmente porosas (Capítulo 2), que mantêm sua performance quase inalterada em fluxos elevados.

Outra observação a partir dos resultados citados na Figura 4-7, é que a velocidade ótima de fluxo para a coluna 3 é normalmente em torno de 1 mL min⁻¹ e para as colunas 1 e 2 ~0,5 mLmin⁻¹. Esses valores do fluxo ótimo mais elevado para as colunas à base SPP corrobora com dados obtidos do cálculo computacional por Gritti e Guiochon (GRITTI; GUIOCHON, 2014). Em geral, isto resulta em maior eficiência e menor tempo de análise.

Como discutido acima, as vantagens das SPP tornam-se mais claras com fluxo elevado, especificamente acima de 1mL min⁻¹. Uma forma de tornar essa observação mais clara e demonstrar a vantagem da performance da SPP em relação as FPP é comparando o número de pratos por unidade de tempo (N min⁻¹) *versus* o fluxo da fase móvel, como demonstrado na Figura 4-8.

Figura 4-8: Dependência do número de prato por minuto *versus* fluxo da fase móvel (baseado no primeiro enantiômero eluído para todos os compostos testados). As condições de separação estão resumidas na seção 4.3.2.



Essencialmente, a Figura 4-8 mostra o ganho real em tempo de análise quando se utiliza colunas quirais à base de SPP. As vantagens das SPP tornam-se mais evidentes em maiores fluxos. Por exemplo, a separação enantiomérica do fipronil realizada com um fluxo de 3 mL min⁻¹ utilizando a coluna 3, produziu um valor de número de pratos por tempo de análise aproximadamente 7x maior do que o valor obtido para a análise realizada, nas mesmas condições, com a coluna 1.

4.4.4 Seletividade (α)

Como mencionado anteriormente, a diferença entre as estruturas das partículas FPP e SPP afetam a área superficial disponível para a modificação com um seletor quiral (Tabela 4-2). Por causa disto, o recobrimento do seletor quiral sobre a fase estacionária para a coluna 3, recheada com partículas SPP, foi 2,5 vezes menor que o obtido pelas colunas 1 e 2, recheadas com FPP. Como consequência deste baixo revestimento, uma perda na seletividade era esperada. Entretanto, uma inspeção nos cromatogramas da Figura 4-6, sugerem que esta perda na seletividade é negligenciável quando comparamos as colunas de FPP e SPP.

Os valores de seletividade calculados (Tabela 4-2) mostram que a seletividade não foi afetada para os compostos testados. Aparentemente, apesar das CSP à base de SPP possuírem uma menor quantidade de SQ (Tabela 4-1) e também um valor de funcionalização por área superficial ($\mu\text{mol m}^{-2}$) igual ou um pouco maior que as demais CSP à base de FPP, a análise permitiu que a enantioseletividade obtida com essas colunas fosse comparável às obtidas com colunas à base de FPP. Isso indica que $\mu\text{mol m}^{-2}$ do seletor quiral apresenta um papel mais importante para a seletividade em separações quirais que o recobrimento absoluto.

Estes resultados estão em contraste com os reportados por Lamsadze et al. (LOMSADZE et al., 2012), onde a performance das colunas de SPP usando celulose tris(4-cloro-3-metilfenilcarbamato) depositada sobre a sílica, foi avaliada e comparada com colunas análogas contendo partículas totalmente porosas. De acordo com os autores, a perda na seletividade com as colunas de SPP, foram acima de 15%, o que é significativo para separações enantioméricas.

Com bases nessas comparações, acredita-se que as CSP quimicamente ligadas são mais favoráveis às separações com alta eficiência utilizando partículas superficialmente porosas, que as CSP onde o polímero é apenas depositado sobre o suporte.

Tabela 4-2: Resolução (R_s) e seletividade enantiomérica (α) (em parênteses). Valores obtidos para os compostos testados nas colunas empacotados FPP e SPP, num fluxo de 1mL min^{-1} . As condições de separação estão listadas na seção 4.2. As colunas 1 e 2 foram empacotados com FPP com diâmetro de $5\ \mu\text{m}$ e $3\ \mu\text{m}$ respectivamente. Coluna 3 foi empacotado com SPP com diâmetro de $2,7\ \mu\text{m}$.

	Amlodipina	1-(1-naftil) Etilamina	NOBIN	Fipronil
FP_5 μm^a	1,2 (1,09)	2,2 (1,25)	2,0 (1,09)	1,6 (1,11)
FP_3 μm^b	1,5 (1,09)	2,8 (1,25)	2,7 (1,09)	2,3 (1,11)
PS_2,7 μm^c	1,5 (1,08)	2,6 (1,25)	2,4 (1,08)	2,1 (1,11)

a – coluna 1; b – coluna 2; c – coluna 3

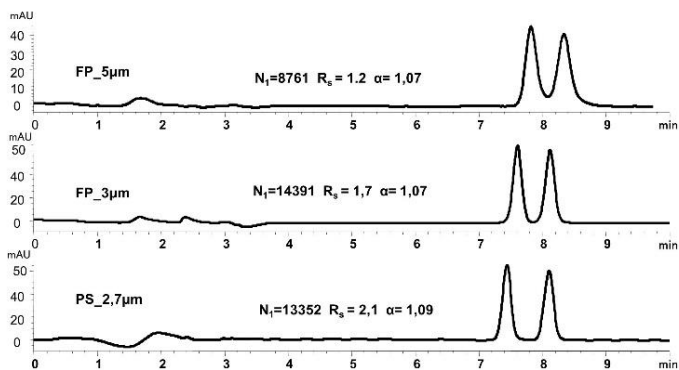
4.4.5 Resolução (R_s)

Devido ao baixo revestimento presente nas CSP na coluna 3, uma perda na resolução também era esperada. Entretanto, como podemos ver na Figura 4-6 e na Tabela 4.2, as resoluções obtidas nas colunas à base de SPP (coluna 3) foram significativamente maiores quando comparadas com aquelas obtidas em colunas empacotas com partículas de $5\ \mu\text{m}$ totalmente porosas e foram iguais ou um pouco menores quando comparadas com as partículas de $3\ \mu\text{m}$ FPP. Esta observação empírica está em contraste com o tratamento teórico onde de Gritti e Guiochon, onde diferenças na R_s foram previstas para serem insignificantes (SPP vs FPP), sob condições constantes de fase móvel (GRITTI; GUIOCHON, 2014).

De acordo com Gritti e Guiochon, a razão core/diâmetro da partícula (ρ), pode estar relacionada com o ganho de resolução das CSP à base de partículas superficialmente porosas. Estima-se que colunas recheadas com SPP com valores de ρ entre 0,5 e 0,95, com fator de retenção constantes podem ter um ganho de resolução de até 10% (GRITTI; GUIOCHON, 2014). Sendo assim, se a força da fase móvel fosse ajustada para as colunas 1 e 2 de modo que o tempo de eluição dos compostos fosse similar nas três colunas, a coluna 3 deveria apresentar a maior resolução. Esta observação foi testada para o fipronil, ajustando-se a composição da fase móvel de modo que todos os fatores de retenção fossem comparáveis em todas as colunas, os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 4-9.

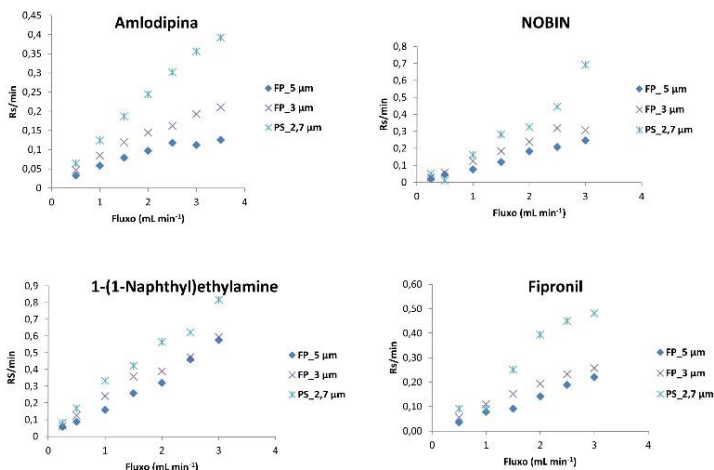
Como previsto em teoria, as colunas à base de SPP, com valores de ρ de 0,63, mostraram um ganho na resolução acima de 20% comparada com as colunas contendo partículas totalmente porosas de 3 μm e 5 μm (o qual tem $\rho = 0$). Este resultado fornece suporte aos cálculos de Gritti e Guiochon, mas também mostra que os ganhos em resolução podem ser ainda maiores para separações enantioméricas utilizando CSP quimicamente ligadas.

Figura 4-9: Comparação da separação da fipronil realizada com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A fase móvel foi composta por heptano:etanol, sendo a composição de 92:8 para as colunas 1 e 2 e 95:5 para a coluna 3.



Talvez o jeito mais fácil de comparar o poder de resolução, em termos de tempo de análise, é plotar a resolução por minuto em função do fluxo da fase móvel (Figura 4-10). Estes resultados mostram que a perda de resolução em altos fluxos com a coluna 3 SPP é menor quando obtida com as colunas 1 e 2 FPP. Isto significa que as separações enantioméricas podem ser obtidas utilizando colunas de SPP utilizando altos fluxos com uma mínima perda na resolução, permitindo análises mais rápidas e mantendo o poder de resolução.

Figura 4-10: Dependência da $R_s \text{ min}^{-1}$ versus o fluxo da fase móvel para os compostos testados. As condições de separação estão detalhadas na seção 4.2.



4.5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstrados evidenciam assim, as vantagens das partículas superficialmente porosas para separações quirais em fase normal e polar orgânico. Dentre as vantagens podemos destacar tempo de análise mais curto, maior eficiência, alto rendimento em fluxos elevados e uma maior faixa de fluxo ótimo. Outro ponto relevante desse estudo foi que a seletividade se manteve inalterada na comparação entre as colunas recheadas com SPP e FPP.

REFERÊNCIAS

AHMED, K. S. et al. Application of Native and Hydroxypropyl-Substituted β -Cyclodextrin Bonded Silica Gel as Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v. 62, n. 11-12, p. 571–579, 5 dez. 2005.

ARIENS, E. J. Racemic Therapeutics—Problems all Along the Line. In: **Chirality in Drug Design and Synthesis**. [s.l.] Elsevier, 1990. p. 29–43.

ARMSTRONG, D. W. **Bonded phase material for chromatographic separations** Google Patents, , 1985. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US4539399>>

ARMSTRONG, D. W. et al. Direct Liquid Chromatographic Separation of Racemates with an α -Cyclodextrin bonded Phase. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 2594–2596, 1987.

ARMSTRONG, D. W. et al. Derivatized Cyclodextrins for Normal-Phase Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 15, p. 1610–1615, 1990.

ARMSTRONG, D. W. et al. A New Approach for the Direct Resolution of Racemic Beta Adrenergic Blocking Agents by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 15, n. 3, p. 545–556, mar. 1992.

ARMSTRONG, D. W. Direct enantiomeric resolution of monoterpane hydrocarbons via reversed-phase high-performance liquid chromatography with an α -cyclodextrin bonded stationary phase. **Science**, v. 666, p. 445–448, 1994.

ARMSTRONG, D. W. et al. Synthesis and examination of sulfated cyclofructans as a novel class of chiral selectors for CE. **Electrophoresis**, v. 30, n. 22, p. 3897–3909, 2009.

ARMSTRONG, D. W.; DEMOND, W. Cyclodextrin Bonded Phases For the Liquid Chromatographic Separation of Optical, Geometrical, and Structural Isomers. **Journal of Chromatographic Science**, v. 22, n. 9, p. 411–415, 1984.

ARSHADY, R. Beaded polymer supports and gels. **Journal of**

Chromatography A, v. 586, n. 2, p. 181–197, nov. 1991.

BEESELEY, T. E. Description and Evaluation of Chiral Interactive Sites on Bonded Cyclodextrin Stationary Phases for Liquid Chromatography. In: BERTHOD, A. (Ed.). . **Chiral Recognition in Separation Methods**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010a. p. 53–76.

BEESELEY, T. E. Chiral Recognition in Separation Methods. In: [s.l: s.n.].

BERTHOD, A. Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings. **Journal of Chromatography A**, v. 549, p. 1–28, jan. 1991.

BERTHOD, A. Chiral Recognition in Separation Methods. In: [s.l: s.n.].

BUI, K. H.; ARMSTRONG, D. W.; BOEHM, R. E. Evaluation of the theory and experimental consequences of gradient liquid chromatographic polymer separations. **Journal of Chromatography A**, v. 288, p. 15–24, jan. 1984.

CHANG, S. C. et al. Evaluation of a new polar—organic high-performance liquid chromatographic mobile phase for cyclodextrin-bonded chiral stationary phases. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 144–153, abr. 1993.

CHEONG, W. J. Porous Silica Particles As Chromatographic Separation Media: A Review. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 35, n. 12, p. 3465–3474, 20 dez. 2014.

DAI, Y. et al. Cyclodextrin-Based Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography. In: TANG, W.; NG, S.; SUN, D. (Eds.). . **Modified Cyclodextrins for Chiral Separation**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 67–101.

DEBOWSKI, J.; SYBILSKA, D.; JURCZAK, J. β -cyclodextrin as a chiral component of the mobile phase for separation of mandelic acid into enantiomers in reversed-phase systems of high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 237, n. 2, p. 303–306, mar. 1982.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

DESTEFANO, J. J.; LANGLOIS, T. J.; KIRKLAND, J. J. Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: some performance comparisons with sub-2- μm particles. **Journal of chromatographic science**, v. 46, n. March, p. 254–260, 2008.

FUJIMURA, K.; UEDA, T.; ANDO, T. Retention behavior of some aromatic compounds on chemically bonded cyclodextrin silica stationary phase in liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 446–450, mar. 1983.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Facts and Legends About Columns Packed with Sub-3- $\frac{1}{4}$ μm Core–Shell Particles. **LC GC North America**, v. 1262, n. 7, p. 107–21, 2012.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Possible resolution gain in enantioseparations afforded by core–shell particle technology. **Journal of Chromatography A**, v. 1348, p. 87–96, 2014.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M. G. Chiral separation principles in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 792, n. 1-2, p. 179–225, 1997.

GUPTA, V. et al. Development and validation of HPLC method-a review. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 17–25, 2012.

HAN, S. M. Direct enantiomeric separations by high performance liquid chromatography using cyclodextrins. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 11, n. 5, p. 259–71, 1997.

HAN, X. et al. Separation of chiral furan derivatives by liquid chromatography using cyclodextrin-based chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, n. 1-2, p. 111–120, 2005a.

HAN, X. et al. Separation of Enantiomers of Isochromene Derivatives by HPLC Using Cyclodextrin-Based Stationary Phases. **Chromatographia**, v. 61, n. 5-6, p. 205–211, 9 mar. 2005b.

HAYES, R. et al. Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 36–52, ago. 2014.

HENRY, R. A. The Early Days of HPLC at DuPont. 2009.

KALÍKOVÁ, K.; RIESOVÁ, M.; TESAŘOVÁ, E. Recent chiral selectors for separation in HPLC and CE. **Open Chemistry**, v. 10, n. 3, 1 jan. 2012.

KAWAGUCHI, Y. et al. Chemically bonded cyclodextrin stationary phases for liquid chromatographic separation of aromatic compounds. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 1852–1857, out. 1983.

KHAN, A. R. et al. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 1977–1996, 1998.

KIRKLAND, J. J. et al. Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. **Journal of Chromatography A**, v. 890, n. 1, p. 3–13, 2000.

KIRKLAND, J. J.; DESTEFANO, J. J. The art and science of forming packed analytical high-performance liquid chromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, n. 1-2, p. 50–57, set. 2006.

LANÇAS, F. M. O Renascimento das partículas superficialmente porosas (“core shell particles”) em HPLC. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 2, p. 47–54, 2010.

LI, S.; PURDY, W. C. Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 6, p. 1457–1470, set. 1992.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657–663, dez. 1997.

LIN, C. et al. Comparative HPLC enantioseparation on substituted phenylcarbamoylated cyclodextrin chiral stationary phases and mobile phase effects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 221–227, set. 2014.

LOMSADZE, K. et al. 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**, v. 1234, p. 50–55, 2012.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase

reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559–1568, 2010.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197–207, 2012.

MITCHELL, C. R.; ARMSTRONG, D. W. Cyclodextrin-Based Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: A Twenty-Year Overview. In: SCHMID, M. G.; GÜBITZ, G. (Eds.). **Chiral Separations**. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 061–112.

MURAKAMI, H. From racemates to single enantiomers - Chiral synthetic drugs over the last 20 years. In: **Topics in Current Chemistry**. [s.l.: s.n.]. v. 269p. 273–299.

NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 111–135, 2013.

NEUE. **HPLC Columns, Theory, Technology, and Practice**. [s.l.: s.n.]. v. 26

ODA, R. P.; LANDERS, J. P. Introduction to Capillary Electrophoresis. In: **Handbook of Capillary Electrophoresis**. [s.l.: s.n.]. p. 1–48.

PADIVITAGE, N. L. T.; ARMSTRONG, D. W. Sulfonated cyclofructan 6 based stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 14, p. 1636–1647, 2011.

PATEL, D. C. et al. Gone in Seconds: Praxis, Performance, and Peculiarities of Ultrafast Chiral Liquid Chromatography with Superficially Porous Particles. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 18, p. 9137–9148, 15 set. 2015.

PERERA, S. et al. **The enantiomeric separation of tetrahydrobenzimidazoles cyclodextrins- and cyclofructans.** **Chirality**, 2013.

QIU, H. et al. Cyclofructan 6 based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 2, p. 270–9, 2011a.

QIU, H. et al. Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 10, p. 3307–3322, 8 abr. 2011b.

RISLEY, D. S.; STREGE, M. A. Chiral separations of polar compounds by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1736–9, 2000.

RODRÍGUEZ-BONILLA, P. et al. Development of a reversed phase high performance liquid chromatography method based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives to determine pterostilbene in blueberries. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 15-16, p. 1091–1097, 2011.

SABIR, A. M.; MOLOY, M.; BHASIN, P. S. HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 4, p. 39–46, 21 out. 2015.

SCRIBA, G. K. E. Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences. **Chromatographia**, v. 75, n. 15-16, p. 815–838, 2012.

SILVA, C. R. et al. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270–276, abr. 2004.

SIMMS, P. J. et al. Gradient elution of organic acids on a β -cyclodextrin column in the polar organic mode and its application to drug discovery. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, n. 1-2, p. 69–75, out. 2004.

SKOOG, D. A et al. Fundamentals of Analytical Chemistry. **Anal. Chem.**, v. 398, p. 27–28, 2004.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. [s.l: s.n.].

SPUDEIT, D. A et al. Superficially porous particles vs. fully porous particles for bonded high performance liquid chromatographic chiral stationary phases: isopropyl cyclofructan 6. **Journal of chromatography. A**, v. 1363, p. 89–95, 2014.

STALCUP, A M. et al. (S)-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, a new chiral stationary phase for reversed-phase liquid chromatography. **Journal**

of chromatography, v. 513, p. 181–94, 1990.

STAMMEL, W.; WOESLE, B.; THOMAS, H. Enantiomeric separation of tetrahydroisoquinoline alkaloids by high-performance liquid chromatography with β -cyclodextrin as chiral selector. **Chirality**, v. 7, n. 1, p. 10–19, 1995.

SUN, P. **DEVELOPMENT OF NEW CHIRAL SELECTORS FOR LIQUID**. [s.l.] University of Texas at Arlington, 2009.

SUN, P. et al. Development of new HPLC chiral stationary phases based on native and derivatized cyclofructans. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10215–10226, 2009.

SUN, P.; ARMSTRONG, D. W. Effective enantiomeric separations of racemic primary amines by the isopropyl carbamate-cyclofructan6 chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 30, p. 4904–4918, 2010.

SWARTZ, M. E. UPLC™: An Introduction and Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 7-8, p. 1253–1263, abr. 2005.

TANG, W.; NG, S.; SUN, D. **Modified Cyclodextrins for Chiral Separation**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

UNGER, K. K.; LAMOTTE, S.; MACHTEJEVAS, E. Column Technology in Liquid Chromatography. In: **Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation**. [s.l.: s.n.]. p. 41–86.

VARGA, G. et al. Comparison of separation performances of novel β -cyclodextrin-based chiral stationary phases in high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 71–76, nov. 2012.

VENTURINI, C. D. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VIKRAM, K., BHARADWAJ, R., GUPTA, G., KUMAR, S. An Overview on HPLC Method Development, Optimization and Validation process for drug analysis. **THE PHARMACEUTICAL AND CHEMICAL JOURNAL**, v. 2, n. 2, p. 10, 2015.

WAGNER, B. M. et al. Superficially porous silica particles with wide pores for biomacromolecular separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1264, p. 22–30, 2012.

WANG, C.; SUN, P.; ARMSTRONG, D. W. Cyclofructans, a New Class of Chiral Stationary Phases. In: **Chiral Recognition in Separation Methods**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 77–96.

WARD, T. J.; WARD, K. D. Chiral Separations: A Review of Current Topics and Trends. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 626–635, 17 jan. 2012.