

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Estudos de Separação Enantiosseletiva para uma Série de Sulfóxidos Quirais em Colunas Poliméricas.”**

**Tiago de Campos Lourenço\***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Quezia B. Cass

\*Bolsista FAPESP

São Carlos – SP

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L892es

Lourenço, Tiago de Campos.

Estudos de separação enantiosseletiva para uma série de sulfóxidos quirais em colunas poliméricas / Tiago de Campos Lourenço. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
117 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

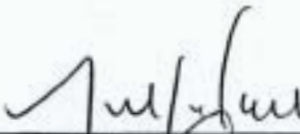
1. Análise cromatográfica. 2. Cromatografia quiral. 3. Coluna - cromatografia. 4. Colunas de polissacarídeos. I. Título.

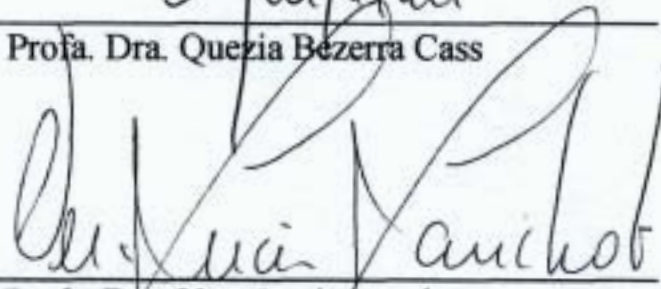
CDD: 543.089 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Mestrado Acadêmico**

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato Tiago de Campos Lourenço, realizada em 12 de março de 2010:*

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Vera Lucia Lanchote

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Nelson Ferreira Claro Junior

*“Discovery consists of seeing what  
everybody has seen and thinking  
what nobody has thought.”*

Albert Von Szent-Györgyi

*Dedico esta dissertação à minha família  
meu pai, José Maria, minha mãe, Ilza e meu irmão, Felipe  
pelo amor incondicional e incentivo em todos os momentos.*

*À Alice,  
pelo amor, amizade e companheirismo.*

## Agradecimentos

Agradeço, principalmente, a Prof<sup>ª</sup>. Dra. Quezia B. Cass pela orientação, confiança e apoio recebido durante a realização deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Regina V. Oliveira e à Dra. Neila M. Cassiano pela amizade e ensinamentos durante o cotidiano.

Ao corpo docente, técnico e administrativo do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de realização da parte experimental desta dissertação.

A todos os meus amigos do grupo de Síntese Orgânica e CLAE, em especial, a Kenia, a Marcela e a Roberta pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao meu grande amigo Fernando Gonçalves de Almeida pela amizade e conselhos.

À minha prima e irmã Ana Gabriele.

À família Lopes pela confiança e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos Fernando (Bombinha), Diego (Feio), Rodrigo Smirmaul (Tigrão), Rodrigo Lourenço (Jóia), Felipe Pacheco (Burga), João Volpato, Alan Escodro e Claudia Rodrigues (Claudinha).

Ao Alexandre Augusto Cruz, por sua amizade e disponibilidade para ajudar com os equipamentos.

Aos meus amigos dos laboratórios vizinhos de química orgânica, por serem prestativos sempre que necessário.

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro.

Ao CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro.

À todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.



# Lista de Figuras

## Introdução

<b>Figura 1.1</b> - Representação do modelo de “interação de três pontos” .....	<b>2</b>
<b>Figura 1.2</b> - Reconhecimento quiral entre os (S)-enantiômeros e do metil N-(2-naftil) alaninato (1) e do N-(3,5-dinitrobenzoil)leucina n-propilamida (2) .....	<b>3</b>
<b>Figura 1.3</b> - Estrutura do seletor quiral (NEC- $\beta$ -CD) .....	<b>9</b>
<b>Figura 1.4</b> - Fases quirais derivadas de benzil e fenilcarbamatos de celulose e amilose. 1(a): tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, 2(a): tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e 2(b): tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose .....	<b>11</b>
<b>Figura 1.5</b> - Estrutura química da Teicoplanina .....	<b>14</b>
<b>Figura 1.6</b> - Estruturas químicas das CSPs do tipo “Pirkle”. a) 3,5-dinitro-benzoil-fenilglicina, b) Naftilalanina e c) (S,S) Whelk-O <sup>®</sup> 1 .....	<b>17</b>
<b>Figura 1.7</b> - Estrutura química da CSP (+)-(18-coroa-6)-2,3,11,12-ácido tetracarboxílico .....	<b>20</b>
<b>Figura 1.8</b> - a) Estrutura Tradicional, b) Estrutura dos enantiômeros .....	<b>23</b>
<b>Figura 1.9</b> - Estrutura do Esomeprazol (Nexium <sup>™</sup> ) .....	<b>24</b>

## Resultados e Discussões

<b>Figura 3.1</b> - Série de sulfóxidos quirais avaliada .....	<b>28</b>
<b>Figura 3.2</b> - Estrutura proposta da (R,R) P-CAP <sup>®</sup> .....	<b>29</b>
<b>Figura 3.3</b> - N,N-[(1R,2R)-1,2-difenil-1,2-etanoedil]bis-2-propenamida .....	<b>30</b>
<b>Figura 3.4</b> - Perfil de retenção do 1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> enantiômero do omeprazol no modo normal de eluição na (R,R) P-CAP <sup>®</sup> .....	<b>34</b>
<b>Figura 3.5</b> - a) Perfil de retenção do 1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> enantiômero, b) Fator de resolução, do Metil naftil sulfóxido no modo normal de eluição na (R,R) P-CAP-DP <sup>®</sup> .....	<b>34</b>
<b>Figura 3.6</b> - Cromatogramas do omeprazol, (R,R) P-CAP <sup>®</sup> , 250mm X 4,6mm, vazão:1mL/min, $\lambda$ =302nm, 20°C .....	<b>36</b>
<b>Figura 3.7</b> - Cromatogramas do metil naftil sulfóxido (7), (R,R) P-CAP-DP <sup>®</sup> , 250mm X 4,6mm, vazão:1mL/min, $\lambda$ =240nm, 20°C .....	<b>37</b>

<b>Figura 3.8</b> - Perfil de retenção do 1º e 2º enantiômero do a) pantoprazol na (R,R) P-CAP® e b) metil naftil sulfóxido na (R,R) P-CAP-DP®, no modo polar orgânico.	<b>38</b>
<b>Figura 3.9</b> - Representação estrutural do monômero da DEAVB	<b>40</b>
<b>Figura 3.10</b> - Perfil de retenção do 1º e 2º enantiômero do pantoprazol no modo normal de eluição na DEAVB	<b>44</b>
<b>Figura 3.11</b> - a) Perfil de retenção do 1º e 2º enantiômero, b) Parâmetros cromatográficos, do omeprazol (10) no modo polar orgânico de eluição na DEAVB	<b>45</b>
<b>Figura 3.12</b> - Gráfico ilustrativo das enantiorresoluções obtidas para a série de sulfóxidos quirais na (R,R)P-CAP® e na (R,R)P-CAP-DP®.	<b>49</b>
<b>Figura 3.13</b> - Gráfico ilustrativo das enantiorresoluções obtidas para a série de sulfóxidos quirais na DEAVB.	<b>50</b>
<b>Figura 3.14</b> - Gráfico ilustrativo da complementariedade de resoluções das colunas (R,R)P-CAP®, (R,R)P-CAP-DP® e DEAVB	<b>50</b>
<b>Figura 3.15</b> - Carbamatos sintetizados.	<b>52</b>
<b>Figura 3.16</b> - Espectro no Infravermelho tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose	<b>53</b>
<b>Figura 3.17</b> - Síntese da 3-aminopropilsílica.	<b>54</b>
<b>Figura 3.18</b> - Análise de distribuição dos tamanhos da partícula sílica – APS.	<b>55</b>
<b>Figura 3.19</b> - Metodologia para a preparação das CSPs de polissacarídeos adsorvidos (CSP 1 - 2).	<b>55</b>
<b>Figura 3.20</b> - Análise de distribuição dos tamanhos da partícula a) tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (CSP 1) b) tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose (CSP 2)	<b>57</b>
<b>Figura 3.21</b> - Estruturas dos padrões utilizados na avaliação das colunas quirais.	<b>57</b>
<b>Figura 3.22</b> - Esquema da CSP de polissacarídeo imobilizado por reticulação.	<b>58</b>
<b>Figura 3.23</b> - Metodologia de preparo das colunas quirais de polissacarídeo imobilizado (CSP 3 e CSP 4)	<b>58</b>
<b>Figura 3.24</b> - Metodologia de preparo das colunas quirais de polissacarídeo imobilizado (CSP 5 e CSP 6)	<b>61</b>
<b>Figura 3.25</b> - Análise de distribuição dos tamanhos da partícula da CSP 5.	<b>62</b>
<b>Figura 3.26</b> - Análise de distribuição dos tamanhos da partícula da tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose (CSP 8).	<b>66</b>

# Lista de Tabelas

## Introdução

<b>Tabela 1.1:</b> Seletores quirais e principais interações com analitos quirais .....	<b>6</b>
---	----------

## Resultados e Discussões

<b>Tabela 3.1:</b> Parâmetros cromatográficos das separações obtidas pela (R,R) P-CAP <sup>®</sup> e pela (R,R) P-CAP-DP <sup>®</sup> .....	<b>31</b>
<b>Tabela 3.2:</b> Comparação da eficiência da enantiorresolução do modafinil (12) no modo normal, polar orgânico e normal com solvente clorado de eluição na (R,R) P-CAP <sup>®</sup> .....	<b>39</b>
<b>Tabela 3.3:</b> Parâmetros cromatográficos das separações obtidas pela DEAVB ...	<b>41</b>
<b>Tabela 3.4:</b> Comparação da eficiência da enantioresolução do modafinil (12) no modo normal, polar orgânico e normal com solvente clorado de eluição na DEAVB .....	<b>46</b>
<b>Tabela 3.5:</b> Parâmetros cromatográficos das separações obtidas no modo reverso de eluição na DEAVB .....	<b>48</b>
<b>Tabela 3.6:</b> Avaliação das colunas cromatográficas CSP 1, CSP 4, CSP 5 e CSP 6 .....	<b>60</b>
<b>Tabela 3.7:</b> Avaliação das colunas cromatográficas CSP 1 e CSP 7 .....	<b>64</b>

## Resumo

### “Estudos de Separação Enantiosseletividade para uma Série de Sulfóxidos Quirais em Colunas Poliméricas.”

Este trabalho descreve a investigação do poder de enantiorresolução de novas fases estacionária quirais (CSP) de polímero sintético preparadas a partir dos monômeros poli(*trans*-1,2-ciclohexanedil-bis acrilamida (P-CAP<sup>®</sup>), *N,N'*-[(1*R*,2*R*)-1,2-difenil-1,2-etanodil]bis-2-propenamida (P-CAP-DP<sup>®</sup>) e *trans*-9,10-dihidro-9,10-etanoantraceno-(11*S*,12*S*)-11,12-acido dicarboxílico bis-4-vinilfenilamida (DEAVB) para uma série de dezessete sulfóxidos quirais. A série de sulfóxidos composta por aril alquil sulfóxidos, sulfóxidos benzoimidazólicos e pelos fármacos quirais modafinil, albendazol sulfóxido, omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol foram eluidos no modo multimodal. O estudo sistemático da eficiência das três colunas de polímero sintético na enantiorresolução da séries de sulfóxidos quirais e a superioridade da DEAVB nas separações destes compostos nos três diferentes modos de eluição são apresentados. A P-CAP<sup>®</sup>, P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB também foram avaliadas pela primeira vez no modo reverso de eluição e a estabilidade destas colunas foi investigada pelo uso de solventes cromatográficos não usuais. O estudo do desenvolvimento de fases estacionárias quirais de derivados de polissacarídeos imobilizados em sílica – APS foi realizado utilizando-se métodos térmicos ou fotoquímicos. O método fotoquímico foi mais eficiente e proporcionou o preparo da coluna de tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (CSP 7). Esta coluna apresentou estabilidade frente a solventes cromatográficos não usuais, porém demonstrou baixo poder de enantiorresolução para os compostos quirais avaliados. Através do procedimento fotoquímico a CSP de tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose (CSP 8) também foi preparada. Todavia, as condições de imobilização necessitam de maiores investigações, estes resultados estão também presentes e discutidos neste trabalho.

## Abstract

### “Enantiomeric Resolution of a Chiral Sulfoxide Series by LC on Synthetic Polymeric Columns with Multimodal Elution.”

The liquid chromatography enantiomeric separation of a series of seventeen chiral sulfoxides was systematically investigated using multimodal elution with the new synthetic polymeric stationary phases based on monomers N-(2-acryloylamino-(1R,2R)-cyclohexyl)-acrylamine (P-CAP<sup>®</sup>), N,N'-O-[(1R,2R)-1,2-diphenyl-1,2-ethanediyl]bis-2-propenamide (P-CAP-DP<sup>®</sup>) and trans-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-(11S,12S)-11,12-dicarboxylic acid bis-4-vinylphenylamide (DEAVB). The sulfoxide series was composed of aryl alkyl sulfoxides, benzoimidazole sulfoxides and the drugs modafinil, albendazole sulfoxide, omeprazole, lansoprazole, pantoprazole and rabeprazole. This work examines the effectiveness of the polymeric chiral stationary phases for the separation of chiral sulfoxides and describes the superiority of DEABV for these separations in three different elution modes. The first ever reversed phase enantiomeric separations on these columns is demonstrated. Besides that, the use of non standard chromatography solvents was evaluated for the sulfoxides series on the polymeric stationary phases. The study of the development of polysaccharides chiral stationary phases (CSPs) immobilized on to aminopropylsilica was carried out using thermal or photochemical methods. The photochemical method was more effective and provided the production of a CSP based on amilose tris-3,5-dimethylphenylcarbamate (CSP 7). This column showed stability for non standards mobile phases; however, has showed low enantiorresolution power for the compounds investigated. Using the photochemical approach an amilose tris-3,5-dimetoxiphenylcarbamate (CSP 8) was also prepared. The immobilization conditions needs, however, futher investigations and these results will be also presented and discussed in this work.

# Sumário

<b>1- Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 - Fases Estacionárias Quirais para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b> ..	<b>1</b>
<b>1.1.1 - Seletores Quirais Naturais</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.1.1 - Proteínas</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.1.2 - Ciclodextrinas</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.1.3 - Polissacarídeos</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1.1.4 - Glicopeptídeos Macrocíclicos</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1.1.5 - Alcalóides de Cinchona</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.2 - Seletores Quirais Sintéticos</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.2.1 - Tipo “Pirkle”</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.2.2 - Troca de Ligantes</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.2.3 - Éteres de Coroa</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.2.4 - Polímero sintético</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1.2.5 - Polímero impresso molecularmente (MIP)</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2 - Sulfóxidos Quirais</b> .....	<b>23</b>
<b>2- Objetivos</b> .....	<b>26</b>
<b>3- Resultados e Discussões</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 - Avaliação das CSPs de polímero sintético</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.1 - Avaliação da (R,R)P-CAP<sup>®</sup> e da (R,R)P-CAP-DP<sup>®</sup></b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.2 - Avaliação da DEAVB</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 - Síntese e preparo de CSPs de polissacarídeo imobilizado</b> .....	<b>51</b>
<b>3.2.1 - Síntese dos tris-arilcarbamatos de amilose</b> .....	<b>52</b>
<b>3.2.2 - Modificação da superfície da sílica</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2.3 - Preparação das CSPs de polissacarídeos quirais adsorvidos (CSP 1 e CSP 2)</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2.4 - Preparo e Avaliação das CSPs de polissacarídeos quirais imobilizados. (CSP 3 – CSP 8)</b> .....	<b>57</b>

<b>4- Conclusões e Perspectivas</b> .....	<b>67</b>
<b>5- Parte Experimental</b> .....	<b>69</b>
<b>5.1 - Generalidades</b> .....	<b>69</b>
<b>5.2 - Procedimento Experimental</b> .....	<b>71</b>
<b>5.2.1 - Condições cromatográficas para as análises das colunas de polímero sintético (R,R)P-CAP<sup>®</sup>, (R,R)P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB</b> .....	<b>71</b>
<b>5.2.2 - Síntese do complexo de molibdênio de n-óxido de piridina</b> .....	<b>72</b>
<b>5.2.3 - Síntese dos sulfetos pró-quirais</b> .....	<b>72</b>
<b>5.2.4 - Síntese dos Sulfóxidos quirais</b> .....	<b>74</b>
<b>5.2.5 - Síntese dos Tris-fenilcarbamatos de Amilose</b> .....	<b>76</b>
<b>5.2.6 - Preparação do suporte 3-Aminopropilsílica</b> .....	<b>77</b>
<b>5.2.7 - Preparação das CSPs de polissacarídeo adsorvido em sílica APS-Nucleosil</b> .....	<b>78</b>
<b>5.2.8 - Preparação das CSPs de polissacarídeo imobilizado em sílica APS-Nucleosil</b> .....	<b>78</b>
<b>5.2.9 - Empacotamento das Fases Estacionárias Quirais</b> .....	<b>82</b>
<b>6- Referências Bibliográficas</b> .....	<b>83</b>
<b>ANEXO I - Cromatogramas Seleccionados DEAVB</b> .....	<b>97</b>
<b>ANEXO II - Cromatogramas das CSPs de Polissacarídeos Derivados</b> .....	<b>111</b>

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1. 1- Fases Estacionárias Quirais para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

O conceito básico de resolução quiral teve início em 1809, com o cristalógrafo Hauy<sup>1apud</sup>, mas foi Pasteur, em 1848, que efetivamente descobriu a diferença de atividade entre dois enantiômeros, ao publicar que a enzima *Penicillium glaucum* consome mais rapidamente o enantiômero (+)-tartarato de amônio do que o (-)-tartarato de amônio<sup>2apud</sup>.

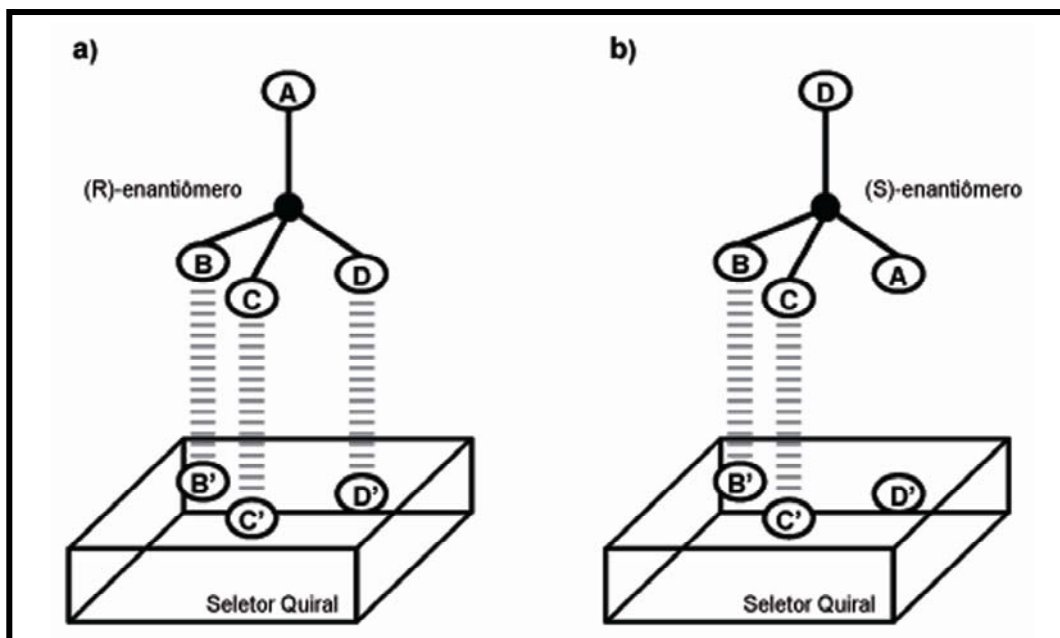
Pasteur também foi responsável pela primeira resolução de enantiômeros. Após observar que os cristais do racemato de amônio tartarato de sódio possuíam duas formas enantiomórficas distintas, ele separou-os manualmente, com o auxílio de uma pinça e uma lente de aumento, e demonstrou que os dois tipos diferentes de cristais rotacionavam a luz polarizada em sentidos opostos<sup>3apud</sup>. Este experimento de Pasteur é conhecido como o marco da resolução quiral.

A diferença do coeficiente de adsorção de dois enantiômeros em compostos com morfologia assimétrica mostrou ser uma importante técnica de separação desde o início do século XX. Em 1936, Nakamura *et al*<sup>4</sup> utilizaram cristais enantiomórficos de quartzo para separar pequenas quantidades de  $[\text{Co}d\text{g}_2(\text{NH}_3)\text{Cl}]$ , propondo que a morfologia assimétrica do quartzo é responsável por adsorver mais fortemente um dos enantiômeros. Henderson e Rule<sup>5</sup>, em 1939, separaram o ( $\pm$ )-*p*-fenilenebisimino cânfora utilizando lactose sólida. A mistura racêmica foi adsorvida na parte superior de um tubo contendo o adsorvente e após sucessivas lavagens com solvente, um dos enantiômeros permaneceu adsorvido no topo do tubo enquanto o outro foi encontrado na parte inferior do tubo.

A primeira técnica de relativo sucesso na resolução de enantiômeros foi a cromatografia em papel, tendo sido eficiente na separação de alguns aminoácidos aromáticos<sup>6,7</sup>. Baseado nestes trabalhos de separação em papel, Dagliesh, em 1952, propôs o modelo de “interação de três pontos” entre enantiômeros e o seletor quiral<sup>6</sup>. Segundo este modelo, são necessárias três interações simultâneas entre um dos enantiômeros e o seletor quiral, sendo que pelo menos uma delas deve ser dependente da estereoquímica do analito. Além disso,



estas interações devem ser de sítios distintos tanto no enantiômero quanto no seletor quiral<sup>2</sup> (Figura 1.1a). O outro enantiômero interage somente com dois sítios do seletor quiral, conforme mostrado na Figura 1.1b.



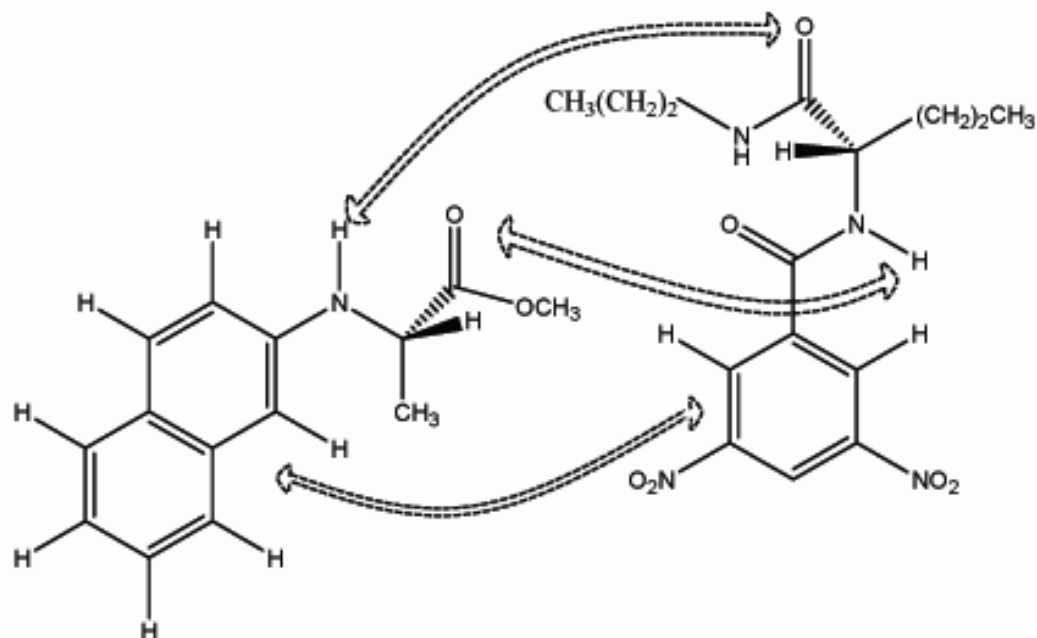
**Figura 1. 1-** Representação do modelo de “interação de três pontos”

O modelo original<sup>6</sup> considera que apenas as interações atrativas são responsáveis pela discriminação quiral. Atualmente, porém, é aceito que as interações repulsivas também participam do mecanismo de resolução enantiomérica. Assim, por exemplo, duas interações podem ser repulsivas se uma terceira for atrativa e forte o suficiente para promover a formação de, no mínimo, um dos complexos diastereoisoméricos transitórios enantiômero/seletor quiral<sup>8</sup>. Se as três interações são atrativas, então o enantiômero na Figura 1a estará mais fortemente ligado ao seletor do que o enantiômero na Figura 1b.

Os principais tipos de interações, responsáveis pela discriminação, entre os enantiômeros de um analito e o seletor quiral, no sentido decrescente de intensidade, são<sup>2</sup>: interação coulômbica, ligação de hidrogênio e interação estérica (muito forte), interação  $\pi$ - $\pi$  e íon-dipolo (fortes), interação dipolo-dipolo (intermediária), interação dipolo-dipolo induzido (fraca) e dispersão de London (muito fraca). As interações coulômbicas e do tipo  $\pi$ - $\pi$  podem ser atrativas ou repulsivas, a estérica é repulsiva e as demais são todas atrativas.

O modelo de “interação de três pontos” é bem aceito no meio científico, principalmente para explicar a discriminação de aminoácidos em fases estacionárias quirais do tipo troca de ligantes. Entretanto, este mesmo modelo é freqüentemente questionado para explicar as separações em seletores quirais de proteínas. Devido à complexa estrutura tridimensional das proteínas, o mecanismo de discriminação quiral não é completamente conhecido, sendo considerado estéreo-específico para cada mistura enantioméricas<sup>9,10</sup>.

Pirkle e Pochapsky<sup>11</sup> demonstraram que para sistemas com interação  $\pi$ - $\pi$ , a rigidez conformacional dos anéis aromáticos participa da formação do complexo diastereoisomérico e, como consequência, apenas dois grupos funcionais ligados ao centro estereogênico do analito precisam interagir com os grupos funcionais do seletor quiral. Segundo os autores, ocorrem três interações entre o seletor quiral da fase estacionária, (*S*)-metil *N*-(2-naftil)alaninato (1), e o enantiômero (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoil)leucina *n*-propilamida (2); uma interação  $\pi$ - $\pi$  entre os grupos aromáticos da fase estacionária e do (*S*)-enantiômero do analito e duas ligações de hidrogênio com os grupos C=O (Figura 1.2). Topiol e Sabio<sup>12</sup> denominaram este modelo como uma “interação pseudo-dois-pontos”.



**Figura 1. 2-** Reconhecimento quiral entre os (*S*)-enantiômeros e do metil *N*-(2-naftil)alaninato (1) e do *N*-(3,5-dinitrobenzoil)leucina *n*-propilamida (2)

É importante salientar que o reconhecimento quiral não necessariamente resulta em uma discriminação quiral dos enantiômeros. A separação é baseada na diferença de energia livre ( $\delta\Delta G$ ) da formação dos dois complexos diastereoisoméricos, a qual depende da entalpia ( $\delta\Delta H$ ) e da entropia ( $T \times \delta\Delta S$ ). Normalmente a contribuição da entalpia é mais efetiva, uma vez que os dois complexos diastereoisoméricos diferem no número de interações (duas ou três). Algumas vezes, porém, o que predomina é a grande diferença na entropia de formação dos dois complexos, situação que ocorre, por exemplo, quando há uma considerável diferença no número de moléculas do solvente que participam da formação dos dois complexos. Em ambos os casos, quando há predominância da entalpia ou da entropia, ocorre discriminação quiral<sup>8</sup>.

Entretanto, há uma temperatura específica onde a entalpia e a entropia se anulam. Nesta temperatura há formação dos complexos diastereoisoméricos e, portanto, reconhecimento quiral, mas não ocorre discriminação dos enantiômeros. Para que haja discriminação quiral é necessário temperaturas maiores ou menores do que esta temperatura específica<sup>8</sup>.

Os processos envolvidos na formação dos complexos diastereoisoméricos transitórios analito/fase estacionária quiral (CSP) não são simples e singulares, visto que várias interações simultâneas são requeridas para discriminar um enantiômero do outro. Nos mecanismos enantiosseletivos, muitas vezes as interações fracas podem desempenhar um papel tão decisivo quanto as interações fortes<sup>11</sup>. Além disso, geralmente os seletores quirais possuem vários grupos que podem apresentar mais de um tipo de interação com o analito. O grupo naftil, por exemplo, muito usado nos seletores do tipo Pirkle, pode interagir estericamente ou eletronicamente ( $\pi$ - $\pi$ ) com os enantiômeros do analito. Adicionalmente, a fase móvel desempenha um papel importante na resolução enantiomérica. Mesmo assim, usualmente a escolha do seletor quiral é feita considerando as interações mais fortes entre os enantiômeros e a CSP<sup>2</sup>.

O crescente número de fases estacionárias quirais desenvolvidas e comercialmente disponíveis se, por um lado, possibilita a separação de enantiômeros de uma ampla variedade de compostos, ao mesmo tempo dificulta a escolha da fase estacionária mais apropriada para cada tipo de separação. Em vista

disto, Wainer<sup>13</sup> classificou as CSPs em cinco tipos diferentes (I-V), de acordo com as interações analito/CSP que levam ao reconhecimento quiral:

*Tipo I:* A grande maioria das fases do *tipo I* é baseada em derivados de aminoácidos, cujos grupos funcionais atuam como sítios de interação entre o analito e a fase estacionária quiral. Os complexos diastereoisoméricos analito/CSP são formados, principalmente, por meio de interações  $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo e estéricas. As CSPs do tipo Pirkle estão classificadas no *Tipo I*.

*Tipo II:* Neste grupo estão classificadas as fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos. A formação dos complexos diastereoisoméricos analito/CSP ocorre, principalmente, devido a interações  $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Entretanto, a formação de complexos de inclusão contribui de forma efetiva para o mecanismo de discriminação quiral.

*Tipo III:* O reconhecimento quiral é devido a formação de complexos de inclusão decorrente da entrada do analito na cavidade quiral da fase estacionária. Interações secundárias, tais como ligação de hidrogênio e interações estéricas, estabilizam os complexos diastereoisoméricos formados. Ciclodextrinas, polímeros impressos molecularmente (MIPs), éteres de coroa e alguns polímeros sintéticos, são fases quirais pertencentes a este grupo.

*Tipo IV:* O mecanismo de separação dos enantiômeros é baseado na formação de complexos diastereoisoméricos ternários envolvendo um enantiômero de uma molécula quiral (L), usualmente um aminoácido; um íon de um metal de transição (M), normalmente  $\text{Cu}^{2+}$ ; e os enantiômeros do analito racêmico (R e S). Os complexos formados, representados por L-M-R e L-M-S, podem ser separados se possuírem estabilidades diferentes. As CSPs baseadas em troca de ligantes são classificadas neste *tipo IV*.

*Tipo V:* Quando a CSP é uma proteína, o mecanismo de reconhecimento quiral é baseado, principalmente, em interações polares e hidrofóbicas.

Em outra classificação, sugerida por Berthod<sup>2</sup>, as CSPs foram agrupadas de acordo com o tipo de seletor quiral, natural ou sintético, da fase estacionária (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1:** Seletores quirais e principais interações com analitos quirais

Seletor Quiral	CSPs	Principais Interações
Natural	Proteínas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas
	Ciclodextrinas	Complexo de Inclusão e ligação de hidrogênio
	Polissacarídeos	Complexo de Inclusão e interação atrativas
	Glicopeptídeos	Complexo de inclusão e interações iônicas
	Macrocíclicos	
Cinchona	Interações eletrostáticas	
Sintético	Tipo Pirkle	Interação $\pi$ - $\pi$ e ligação de hidrogênio
	Troca de Ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo
	Éteres de Coroa	Complexo de inclusão e íon dipolo
	Polímeros Sintéticos	Interação $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo
	MIPs	Específico para cada analito

### 1.1. 1 – Seletores Quirais Naturais

#### 1.1.1. 1 - Proteínas

As proteínas apresentam uma estrutura altamente complexa e possuem diferentes sítios que podem interagir com analitos quirais. Apesar do mecanismo de reconhecimento quiral não estar totalmente elucidado, é conhecido que as principais interações envolvidas na discriminação quiral são eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio<sup>14</sup>.

As fases quirais protéicas podem ser preparadas por dois métodos distintos. Em um deles, o seletor quiral é adsorvido no suporte da fase estacionária, usualmente sílica, enquanto no outro a proteína é quimicamente ligada ao suporte cromatográfico por meio de ligações covalentes<sup>15</sup>.

As CSP de proteínas preparadas quimicamente são as mais estáveis e, portanto, as mais utilizadas<sup>15</sup>. As proteínas podem ser covalentemente ligadas à sílica derivada (aminopropilsílica) através dos grupos amino ou carboxílico da proteína. No primeiro procedimento são utilizados reagentes eletrófilos como espaçadores, tais quais o suberato de N,N-disuccinimidila (DSS)<sup>16</sup> e o

glutaraldeído<sup>17</sup>. Reações com reagentes nucleofílicos como, por exemplo, o 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodimida (EDC) promovem a imobilização da proteína por meio dos seus grupos carboxílicos<sup>18</sup>.

Diferentes proteínas têm sido utilizadas no preparo de colunas comerciais e dentre elas destacam-se a albumina sérica bovina (BSA), a albumina sérica humana (HSA), a ovomucóide e a  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida<sup>19</sup>. Estas CSPs são altamente sensíveis a variações nas condições cromatográficas, uma vez que alterações no pH da fase móvel, solventes orgânicos, aditivos e temperatura podem modificar a conformação espacial e os sítios de discriminação quiral destes seletores. Desta forma, a alteração nestes parâmetros pode afetar a retenção e a enantioseletividade dos analitos<sup>15</sup>.

Devido a sua baixa capacidade de carga, decorrente da pequena quantidade de seletor quiral que pode ser imobilizado por grama de sílica, as fases estacionárias protéicas não são utilizadas para a separação de enantiômeros em escala preparativa<sup>20</sup>. Entretanto, as mesmas encontram grande aplicabilidade na área biomédica, principalmente em estudos de interação fármaco-proteína. Wainer e colaboradores<sup>21</sup> investigaram as interações de alguns benzodiazepínicos e da warfarina com os sítios ativos da HSA utilizada como fase estacionária quiral. Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a existência de interação alostérica entre os sítios ativos dos benzodiazepínicos e da warfarina. A literatura também descreve estudos da interação carbamazepina-proteína<sup>22</sup> e interações de ibuprofeno/acetato de S-lorazepam, S-oxazepam hemisuccinato/R-oxazepam hemisuccinato e L-triptofano/fenitoína<sup>23</sup> em colunas de HSA e das interações de diversos compostos ácidos, básicos e neutros em coluna de  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida<sup>24</sup>.

### 1.1.1. 2 - Ciclodextrinas

Ciclodextrinas (CDs) são polissacarídeos cíclicos constituídos por unidades de D-(+)-glicopiranosose conectadas por ligações  $\alpha$ -(1,4). As colunas de ciclodextrinas comercialmente disponíveis são as que possuem seis, sete ou oito unidades de  $\alpha$ -D-glicose, as quais são denominadas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina<sup>25</sup>.

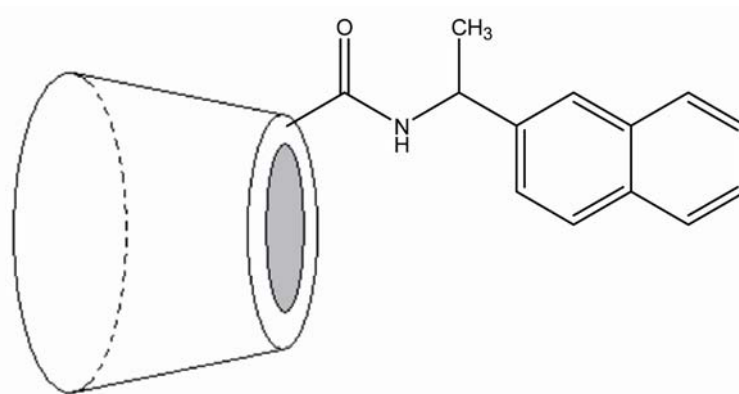
A molécula de ciclodextrina possui uma estrutura estereoespecífica, na forma de cone truncado. A ausência de grupos hidroxila livres orientados para o

interior da cavidade faz com que esta apresente um caráter relativamente hidrofóbico. Por outro lado, a superfície externa é hidrofílica, devido à presença de grupos hidroxila primários e secundários<sup>25</sup>.

No processo de reconhecimento quiral, os enantiômeros entram, pelo menos parcialmente, na cavidade das moléculas de ciclodextrina formando complexos diastereoisoméricos. Estes complexos de inclusão são estabilizados por interações dipolo-dipolo induzido, dispersões de London e estéricas entre os enantiômeros do analito e a fase estacionária. Interações secundárias do tipo ligações de hidrogênio, entre os grupos hidroxila da superfície externa da ciclodextrina e parte da molécula do analito que ficou para fora da cavidade, também contribuem para a estabilização dos complexos diastereoisoméricos<sup>13,26</sup>.

As colunas de CD são muito utilizadas no modo reverso de eluição, sendo que o uso de tampões tais como fosfato e acetato de trimetilamônio podem melhorar a eficiência das fases e diminuir a retenção de analitos aniônicos e catiônicos<sup>13</sup>.

A derivação das hidroxilas primárias e secundárias, presentes na parte externa, possibilitou o desenvolvimento de novas fases com diferentes funcionalidades e polaridades e, conseqüentemente, com diferentes tipos de interações<sup>27</sup>. Dentre os derivados de CD, a fase naftiletilcarbamato de  $\beta$ -ciclodextrina (NEC- $\beta$ -CD), ilustrada na Figura 1.3, merece destaque pois, além de apresentarem as tradicionais possibilidades de interações ( $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e formação de complexo de inclusão), um novo centro estereogênico é adicionado à estrutura do seletor quiral. Armstrong e colaboradores<sup>28</sup> relataram a separação de 121 compostos racêmicos na fase estacionária quiral (S)-(1-naftiletil)carbamato de  $\beta$ -ciclodextrina (S-NEC- $\beta$ -CD) e 74 racematos na CSP R-NEC- $\beta$ -CD, usando modo normal de eluição. A NEC- $\beta$ -CD também é conhecida por ser uma das primeiras CSPs utilizada em eluição multimodal<sup>29</sup>.



**Figura 1. 3-** Estrutura do seletor quiral (NEC-β-CD)

Chang *et al* descreveram a atuação complementar destes seletores no modo polar orgânico em relação aos outros dois modos de eluição. O uso de fases móveis constituídas predominantemente de acetonitrila, com pequenas porcentagens de metanol, ácido acético e trietilamina possibilitou a separação enantiomérica de vários compostos quirais que não foram resolvidos no modo normal ou reverso<sup>30</sup>.

Apesar das colunas de ciclodextrinas serem utilizadas com sucesso em separações analíticas<sup>31</sup>, devido a sua baixa capacidade de carga estas fases quirais não são usadas em cromatografia preparativa.

### 1.1.1. 3 - Polissacarídeos

Os polissacarídeos na sua forma nativa são capazes de discriminar enantiômeros e resolver compostos quirais. Entretanto, as suas habilidades de reconhecimento quiral não são suficientes para serem utilizadas como CSP em cromatografia líquida<sup>32</sup>.

A primeira CSP derivada de polissacarídeo, o triacetato de celulose microcristalina, foi desenvolvida por Hesse e Hagel em 1973<sup>33</sup>. Esta fase quiral apresentou boa habilidade de separação enantiosseletiva e foi usada para separação de muitos compostos alifáticos e aromáticos<sup>34,35</sup>.

Okamoto e colaboradores<sup>36</sup> solubilizaram o triacetato de celulose e o adsorveram em sílica macroporosa. Esta fase mostrou uma capacidade de reconhecimento quiral completamente distinta da fase preparada por Hesse e Hagel, sendo observada inversão na ordem de eluição de enantiômeros<sup>37</sup>. Desde então,



diversas CSPs baseadas em tris-benzoatos, tris-fenilcarbamatos e tris-benzilcarbamatos de polissacarídeos adsorvidos em 3-aminopropilsilica macroporosa foram desenvolvidas pelo grupo do Okamoto<sup>32,36,38-44</sup>. Uma variedade de polissacarídeos, tais como celulose, amilose, quitosana, quitina e xilan, foram eficientemente derivados e usados como seletores quirais para separação de uma diversidade de classes de compostos quirais.<sup>39,40,42,43,45</sup>

A CSP tris(benzoato) de celulose (Chiralcel<sup>®</sup> OB) e especialmente a tris(4-metilbenzoato) de celulose (Chiralcel<sup>®</sup> OJ), comercializadas pela Diacel Chemical Industry, exibem excelente habilidade de reconhecimento quiral para diversos compostos racêmicos<sup>38,40</sup>. Nestes derivados tris-benzoatos, os grupos carbonila dos ésteres podem interagir com os enantiômeros por meio de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo<sup>26,38,42,44</sup>. Com base nas separações de uma série de alcoóis aromáticos<sup>46</sup> e amidas<sup>47</sup> quirais na fase tris-benzoato de celulose, Wainer e colaboradores propuseram um mecanismo similar de reconhecimento quiral. Ademais, Wainer *et al*<sup>46</sup> explicaram o mecanismo de formação dos complexos de inclusão, decorrentes do encaixe da porção aromática do analito na cavidade quiral da fase estacionária. Os complexos diastereoisoméricos formados são estabilizados por interações estéricas e ligação de hidrogênio.

Dentre as CSPs baseadas em tris-fenilcarbamatos, as fases tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e amilose<sup>33,36,40,44,48,49</sup> (Figura 4) são as mais estudadas e utilizadas, devido à elevada estabilidade e grande capacidade de discriminação e resolução de uma ampla variedade de compostos. Nestes derivados, os enantiômeros podem interagir com os grupos –NH e C=O da fase estacionária, além de interações dipolo-dipolo com os grupos C=O. Interações  $\pi$ - $\pi$  também são importantes na resolução quiral de racematos aromáticos<sup>26,50</sup>. A capacidade de enantioseparação nos derivados tris-fenilcarbamatos, assim como nos tris-benzoatos, é grandemente influenciada pela posição e natureza dos substituintes nos grupos fenila<sup>38,40</sup>.

As CSPs tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose são comercializadas pela Diacel Chemical Industry, com os nomes Chiralcel<sup>®</sup> OD e Chiralpak<sup>®</sup> AD, respectivamente. Atualmente, a Phenomenex disponibiliza três tipos de colunas quirais baseada em tris-fenilcarbamatos, a tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (Lux<sup>®</sup> Cellulose-1),



de amilose<sup>40,42,52</sup> em eluição multimodal. Os estudos mostraram que as mesmas podem ser usadas nos três modos de eluição sem perda da performance das colunas e com alterações na capacidade de discriminação quiral por mudanças do modificador orgânico ou do modo de eluição, o que aumenta ainda mais a aplicabilidade destas colunas para separações quirais.

A fase tris(3,5-dimetoxifenilcarbamato) de amilose, não disponível comercialmente<sup>49</sup>, apresentou excelente poder de discriminação quiral, no modo reverso de eluição, para os enantiômeros do metirapol e metirapona em plasma humano<sup>58</sup>, para os enantiômeros do lansoprazol<sup>59</sup> e do pantoprazol<sup>60</sup>, sendo utilizada com êxito em estudos farmacocinéticos.

Embora as CSPs de polissacarídeos apresentem grande aplicabilidade na resolução de misturas enantioméricas com várias estruturas químicas, alguns solventes cromatográficos não usuais, como tetrahydrofurano (THF), acetato de etila, acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano e tolueno, não podem ser usados como fases móveis, uma vez que podem solubilizar o seletor quiral adsorvido na sílica<sup>61</sup>. Esta limitação pode causar problemas em relação a eficiência da resolução de enantiômeros em escala analítica e preparativa<sup>20,40</sup>.

A restrição em relação ao uso destes solventes pode ser solucionada pela imobilização dos derivados de polissacarídeos nos suportes cromatográficos. Okamoto e colaboradores desenvolveram as primeiras CSPs imobilizadas de polissacarídeo, ao ligar covalentemente o tris(3,5-dimetilcarbamato) e o tris(3,5-diclorofenilcarbamato) de celulose à 3-aminopropilsílica<sup>62</sup> (APS) e o tris(3,5-dimetilcarbamato) de celulose e amilose regioseletivamente imobilizados à APS<sup>63</sup>. Desde então, várias CSPs de polissacarídeos quimicamente ligadas têm sido desenvolvidas<sup>40,64-67</sup>.

Diversos métodos de preparação das CSPs de polissacarídeos imobilizadas, por meio da ligação covalente direta do seletor quiral ao suporte<sup>62,63,68</sup> ou pela reticulação do polissacarídeo, previamente imobilizado no suporte, por ligações intercruzadas<sup>69-72</sup>, estão descritos na literatura. Algumas técnicas de imobilização combinam as duas estratégias<sup>73-76</sup>.

Recentemente, Ikai *et al*<sup>77</sup> desenvolveram um método de imobilização via policondensação intermolecular dos grupos trietoxisilil introduzidos nos derivados de polissacarídeos.

Atualmente, três CSPs quimicamente ligadas são comercializadas pela Daiacel, a Chiralpak<sup>®</sup> IA, tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, a Chiralpak<sup>®</sup> IB, tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e a Chiralpak<sup>®</sup> IC, tris(3,5-diclorofenilcarbamato) de celulose. Estas fases estacionárias apresentam excelente habilidade de reconhecimento quiral para uma série de compostos com diferentes propriedades físico-químicas<sup>78-80</sup>.

Devido ao alto poder de enantiorresolução e grande estabilidade, as CSPs baseadas em derivados de polissacarídeos, adsorvidos ou quimicamente ligados ao suporte, têm sido utilizadas na quantificação de enantiômeros em matrizes biológicas<sup>81-84</sup>. Devido a sua alta capacidade de carga e versatilidade nos diferentes modos de eluição, estas fases também são muito utilizadas para separações em escala semi-preparativa e preparativa<sup>85-88</sup>.

#### 1.1.1. 4 - Glicopeptídeos Macro-cíclicos

As fases quirais baseadas em glicopeptídeos macro-cíclicos foram introduzidas por Armstrong<sup>89</sup>, em 1994. Vancomicina, rifamicina B e tiostrepton, covalentemente ligadas à sílica gel, demonstraram excelente enantiosseletividade para uma grande variedade de compostos quirais.

Seis tipos de CSPs de antibióticos macro-cíclicos são comercializadas pela Astec: com fase de ristocetina A (Chirobiotic<sup>®</sup> R), fases de Vancomicina (Chirobiotic<sup>®</sup> V e Chirobiotic<sup>®</sup> V2), fases de teicoplanina (Chirobiotic<sup>®</sup> T e Chirobiotic<sup>®</sup> T2) e teicoplanina aglicona (Chirobiotic<sup>®</sup> TAG).

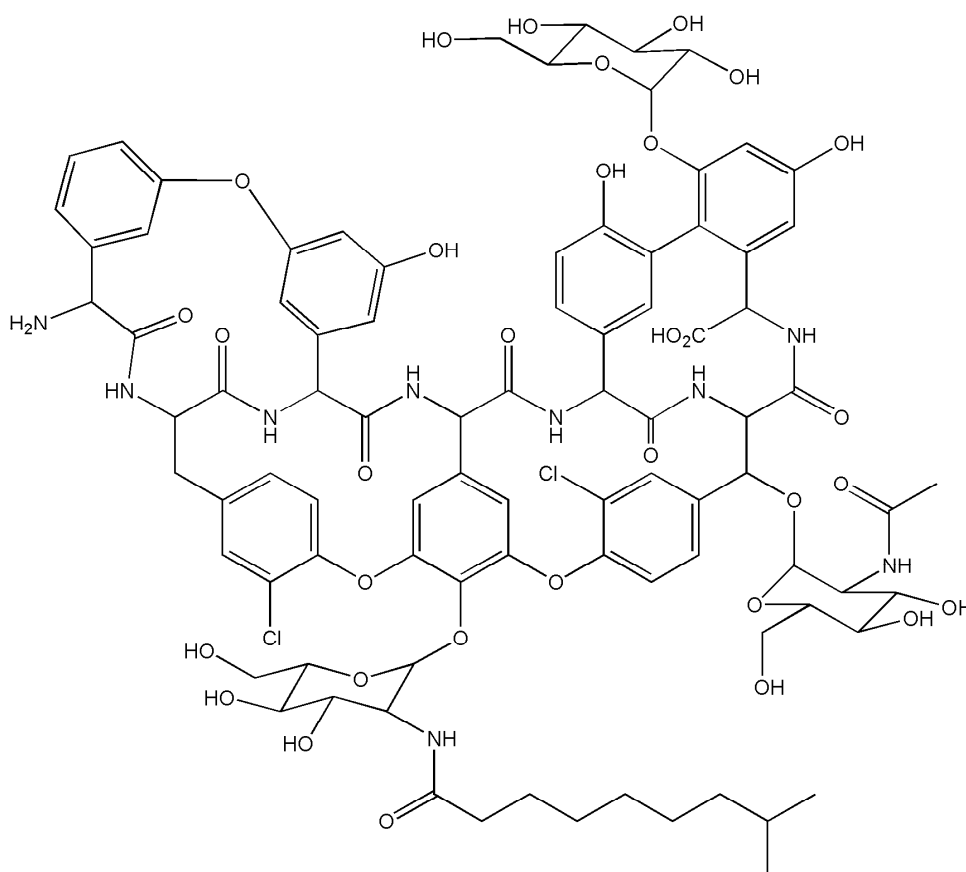
As colunas Chirobiotic<sup>®</sup> V2 e Chirobiotic<sup>®</sup> T2 possuem os mesmos seletores quirais que as colunas Chirobiotic<sup>®</sup> V e Chirobiotic<sup>®</sup> T, respectivamente. Entretanto, estes seletores são ligados de formas diferentes na superfície de sílica, o que propicia diferentes sítios de interação com os analitos.

A molécula de vancomicina possui 18 centros quirais; 3 cavidades macro-cíclicas, as quais contêm 5 anéis aromáticos; além de duas cadeias laterais, uma é um carboidrato dímero e a outra um *N*-metil aminoácido. Há também diversos grupos funcionais: 9 grupos hidroxila, 2 amino, 7 amida e 2 átomos de cloro substituintes em dois anéis aromáticos diferentes<sup>89-91</sup>.

A estrutura da ristocetina A possui 38 centros estereogênicos e 4 cavidades macrocíclicas com 7 anéis aromáticos. Há 22 grupos hidroxila, 2 amino, 6 amida e um grupo metil éster. Vários açúcares estão covalentemente ligados aos anéis aromáticos das cavidades<sup>90,91</sup>.

A teicoplanina (Figura 1.5) apresenta 23 centros quirais, 4 cavidades macrocíclicas, diferentes grupos funcionais e três carboidratos, D-manose,  $\beta$ -D-N-acetil glucosamina e uma unidade hidrofóbica  $\beta$ -D-N-acil glucosamina (com uma cadeia nonil). Desta forma, esta fase quiral possui um caráter mais hidrofóbico que a vancomicina ou a ristocetina A<sup>90,91</sup>.

A teicoplanina aglicona não possui as três unidades de carboidratos presentes na teicoplanina, que são substituídos por grupos -OH<sup>90,91</sup>.



**Figura 1. 5–** Estrutura química da Teicoplanina

Devido à presença das cavidades quirais e de diversos tipos de grupos funcionais, a enantioseparação pode ocorrer por diferentes mecanismos: formação de complexos de inclusão, ligação de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$ , eletrostáticas,

estéricas, dipolo-dipolo e dispersão de London. A fase móvel determina quais destas interações irão predominar no mecanismo de reconhecimento quiral<sup>90,91</sup>.

Um dos grandes atrativos deste tipo de CSP é que elas podem ser usadas no modo normal, reverso, polar orgânico e polar iônico. Entretanto, os modos reverso e polar iônico são os mais eficientes para este tipo de CSP<sup>92</sup>.

A natureza complementar destas fases quirais é bem conhecida. Se, por exemplo, uma separação parcial é obtida em uma dada CSP, separação com linha de base, nas mesmas condições de análise, pode ser conseguida trocando-se o seletor. Esta complementaridade é decorrente das estruturas similares dos antibióticos macrocíclicos. É importante comentar que esta complementaridade ocorre no modo reverso e no modo polar iônico de eluição, mas raramente no modo normal<sup>92,93</sup>.

As CSPs de teicoplanina e de teicoplamina aglicona são as mais utilizadas, principalmente para a resolução de aminoácidos quirais<sup>94-98</sup>. Porém, as CSPs de vancomicina e ristocetina também são úteis para a separação destes compostos<sup>89,99</sup>. Ademais, estas fases quirais apresentam enantiosseletividade para uma grande variedade de classes de compostos como, por exemplo, lactonas<sup>89</sup>, sulfóxidos<sup>100</sup> e alcalóides<sup>101</sup>, e fazem parte do protocolo de separação de produtos racêmicos de corporações farmacêuticas<sup>102</sup>.

### 1.1.1. 5 - Alcalóides de Cinchona

Dentre os alcalóides de cinchona, a quinina e a quinidina destacam-se por serem fontes naturais de seletores quirais. A capacidade de resolver enantiômeros é decorrente das características estruturais destes dois alcalóides diastereoisoméricos que possuem um anel planar quinolínico e um anel rígido de quinuclidina, além de cinco centros estereogênicos em cada molécula<sup>103</sup>.

Apesar de serem diastereoisômeros, a quinina e a quinidina, como seletores quirais, são considerados “pseudo-enantiômeros”, uma vez que a capacidade de discriminação quiral é atribuída a apenas um centro quiral, que possui configuração espacial oposta nos dois alcalóides. Este comportamento “pseudo-enantiomérico” propicia a inversão da ordem de eluição dos enantiômeros<sup>104</sup>.

As CSPs de carbamatos de quinina e quinidina covalentemente imobilizados em sílica são muito eficientes na resolução de enantiômeros de aminoácidos e outros compostos ácidos<sup>104-106</sup>, especialmente no modo reverso, utilizando-se misturas de solventes orgânicos e tampões aquosos<sup>104,107</sup>. Com fases móveis aquosas tamponadas (pH entre 4 e 7), o grupo ácido do analito encontra-se ionizado (negativamente carregado) e interage com amina terciária do grupo quinuclidina protonada (positivamente carregada) via interação iônica intermolecular.

Além da interação eletrostática, ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$ , dipolo-dipolo e estérica também participam do processo de discriminação quiral<sup>105,107,108</sup>.

Atualmente, a Chemical Technologies Europe comercializa as CSPs Chiralpak® QN-AX e Chiralpak® QD-AX preparadas com 9-O-tert-butilcarbamato de quinina e quinidina, respectivamente.

## 1.1 2 - Seletores Quirais Sintéticos

### 1.1.2. 1 - Tipo “Pirkle”

Estas CSPs são preparadas através do uso de moléculas quirais sintéticas, geralmente aminoácidos modificados, covalentemente ligadas à superfície do suporte. Em 1979, Pirke e House<sup>109</sup> prepararam a primeira fase comercial usando o 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina (Figura 6a).

Os seletores quirais do tipo “Pirkle” se caracterizam por possuírem unidades aromáticas que desempenham um papel fundamental na formação dos complexos diastereoisoméricos entre a fase estacionária e os enantiômeros do composto quiral. Além da interação  $\pi$ - $\pi$ , estas CSPs também podem interagir por meio de ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo e estérica<sup>26</sup>.

Existem três tipos distintos de CSP do tipo “Pirkle”, que são diferenciadas pelas unidades aromáticas presentes em suas estruturas químicas:  $\pi$ -ácidas (com grupos aceptores de elétrons  $\pi$ ),  $\pi$ -básicas (com grupos doadores de elétrons  $\pi$ ) e  $\pi$  ácido-básico (com grupos aceptores e doadores de elétrons  $\pi$ )<sup>26</sup>.

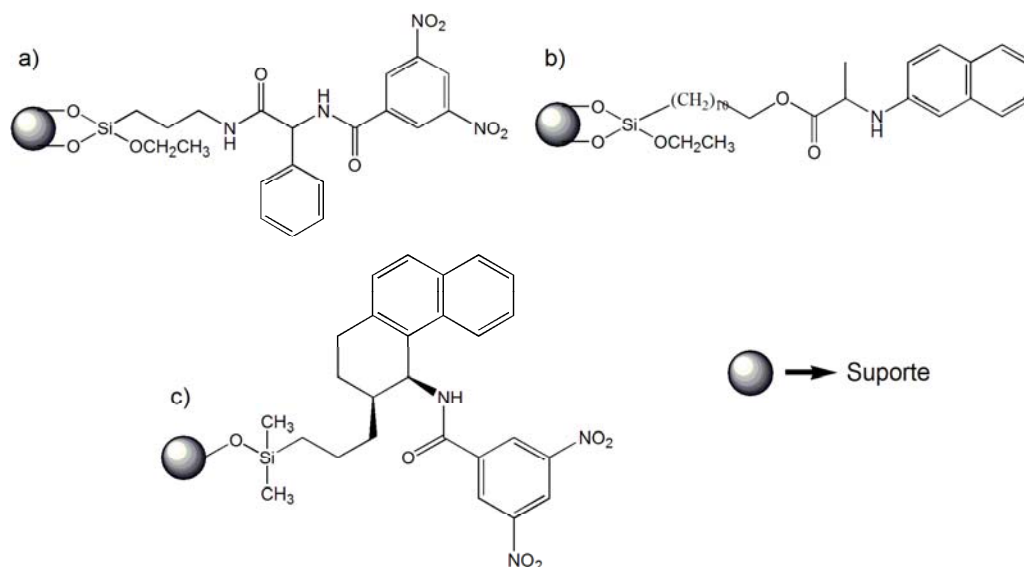
Enquanto as CSPs  $\pi$ -ácidas são adequadas para separar enantiômeros contendo grupos doadores de elétrons  $\pi$ , as  $\pi$ -básicas discriminam compostos que possuem grupos receptores de elétrons  $\pi$ . As CSPs  $\pi$  ácido-básico

são úteis na resolução quiral de compostos com grupos aceptores e/ou doadores de elétrons  $\pi$ <sup>110</sup>. Normalmente as CSPs do tipo “Pirkle” são utilizadas no modo normal de eluição, apesar de apresentarem poder de discriminação quiral no modo reverso<sup>111</sup>.

A 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina immobilizada na sílica (Figura 1.6a), uma  $\pi$ -ácida, apresentou eficiência na separação de diversas classes de compostos quirais, como sulfóxidos, aminas, aminoácidos, lactonas, hidroxíácidos e mercaptanas<sup>109</sup>. Um exemplo de CSP doadora de elétrons  $\pi$  ( $\pi$ -básica) é a derivada da naftilalanina (Figura 1.6b), que contém um anel naftaleno em sua estrutura química<sup>110</sup>.

Diversas CSPs do tipo “Pirkle” foram sintetizadas e estão disponíveis comercialmente. As CSPs  $\pi$ -ácidas já foram utilizadas para separar compostos aromáticos, ácidos arilpropionícos e arilsuccinamidas, enquanto alcoóis, aminoácidos, aminas e tios foram enantioresolvidos com as CSPs  $\pi$ -básicas<sup>112</sup>.

Uma das fases mais eficientes é a Whelk-O<sup>®</sup> 1<sup>113</sup> (Regis Technologies), caracterizada como  $\pi$  ácido-básico (Figura 1.6c). Esta fase estacionária, inicialmente desenvolvida para resolver o naxopreno<sup>114</sup>, também mostrou excelente enantiosseletividade na separação de misturas enantioméricas de derivados cetônicos, alcoóis, flavononas, cumarinas, epóxidos e sulfóxidos<sup>115,116</sup>.



**Figura 1. 6**– Estruturas químicas das CSPs do tipo “Pirkle”. **a)** 3,5-dinitro-benzoil-fenilglicina, **b)** Naftilalanina e **c)** (S,S) Whelk-O<sup>®</sup> 1



Os centro(s) estereogênico(s) dos seletores quirais sintéticos, tais como as CSPs do tipo “Pirkle”, podem ser, se desejados, invertidos; isto é uma vantagem em relação aos seletores quirais naturais<sup>117</sup>. A inversão da configuração espacial do centro quiral da fase estacionária leva à inversão da ordem de eluição dos enantiômeros, o que é uma importante característica para aplicações em escala analítica e, principalmente, em escala preparativa<sup>20</sup>.

### 1.1.2. 2 - Troca de Ligantes

A primeira separação de misturas enantioméricas (aminoácidos) com linha de base, em cromatografia líquida, foi realizada por Davankov e Rogozhin<sup>118</sup>, em 1971, usando como seletor quiral o aminoácido L-prolina imobilizado em suporte de poliestireno e íons  $\text{Cu}^{2+}$  na fase móvel. Este tipo de CSP sintética recebeu o nome de troca de ligantes.

O princípio básico da cromatografia de troca de ligantes é a coordenação reversível de analitos quelantes com um íon metálico que está complexado com um seletor quiral, formando complexos ternários seletor quiral/íon metálico/analitos. Estes complexos diastereoisoméricos são estabilizados por interações dipolo-dipolo, estéricas e ligações de hidrogênio<sup>26</sup>.

As CSPs do tipo troca de ligantes são úteis para a resolução quiral de analitos com dois ou três grupos funcionais doadores de elétrons (hidroxila, amino e carboxílicos), tais como aminoácidos e seus derivados, peptídeos, aminoalcoóis e hidroxíácidos. O íon metálico preferencialmente escolhido é  $\text{Cu(II)}$  e os seletores quirais incluem aminoácidos cíclicos como prolina e hidroxiprolina, aminoácidos contendo enxofre derivados da cistina e penicilina<sup>119,120</sup>.

Hyun *et al*<sup>121</sup> sintetizaram uma fase estacionária baseada no sal sódico (R)-*N,N*-carboximetilundecilfenilglicinol covalentemente ligado em sílica gel, usada na resolução de  $\alpha$ - e  $\beta$ -aminoácidos. Um novo tipo de micro coluna monolítica quiral quimicamente modificada foi desenvolvida por Chen *et al*<sup>122</sup>. A sílica monolítica foi preparada por um processo sol-gel e quimicamente modificada com seletores quirais como L-prolinamida, L-alaninamida e L-fenilalaninamida. Estas fases foram utilizadas com sucesso na enantioseparação de dansil aminoácidos e hidroxíácidos.

Seletores quirais que possuem grupos hidrofóbicos podem ser fisicamente adsorvidos em suportes sólidos, geralmente sílica alquil derivada<sup>119,120,123</sup>. Diversas CSPs preparadas com este método são utilizadas na enantioseparação de aminoácidos<sup>124-128</sup>.

As CSPs do tipo troca de ligantes apresentam aplicabilidade restrita quando comparadas a outras colunas quirais, uma vez que conseguem resolver um número limitado de classes de compostos quirais, tais como aminoácidos, hidroxiácidos e amino alcoóis<sup>125</sup>.

CSPs do tipo troca de ligantes são comercializadas pela Daiacel, Serva, Phenomenex, Macherey-Nagel, Astec, Regis Technologies, Sumica Chemical Analysis Service, etc.

### 1.1.2. 3 - Éteres de Coroa

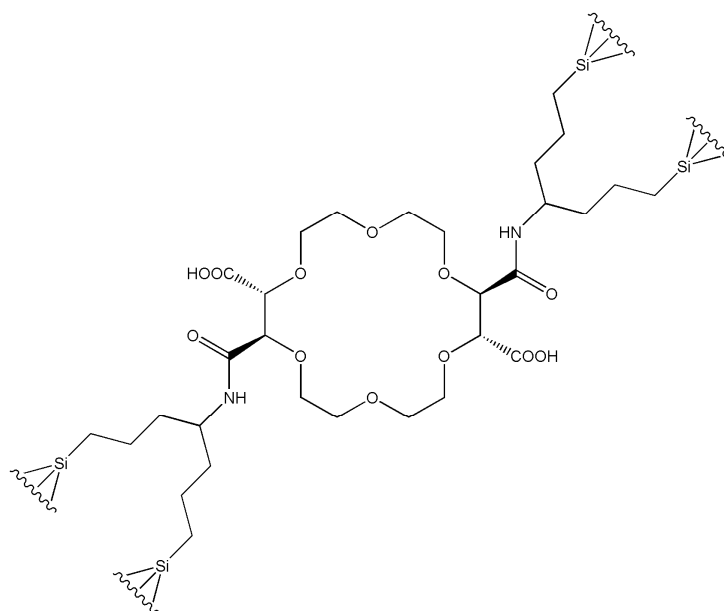
Os éteres de coroa, poliéteres macrocíclicos sintéticos, possuem cavidades de tamanhos específicos que atuam como uma barreira quiral e, assim, propiciam a discriminação entre os enantiômeros. Nos modos normal e reverso, com aditivos ácidos, os átomos de oxigênio da cavidade interagem com grupos amino protonados dos analitos, acarretando na formação de complexos de inclusão. Além da interação íon-dipolo, ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$  e estéricas também atuam na estabilização dos complexos formados<sup>26</sup>.

Cram e colaboradores, na década de 70, prepararam as primeiras CSPs por imobilização do bis(1,1'-binaftil)-22-coroa-6 em sílica gel e poliestireno, as quais apresentaram razoável resolução de enantiômeros de  $\alpha$ -amino ácidos e seus derivados<sup>129,130</sup>. Posteriormente, em 1987, Shinbo *et al*<sup>131</sup> desenvolveram uma CSP usando (3,3'-difeníl-1,1'-binaft-2,2'-diil)-20-coroa-6 adsorvida em octadesil sílica. Esta CSP comercializada pela Daicel Chemical Industries (Crownpak<sup>®</sup> CR) é útil para resoluções cromatográficas de compostos quirais contendo grupos amino primários<sup>132,133</sup>. Entretanto, devido ao tipo de imobilização do seletor quiral no suporte cromatográfico, a sua utilização não é compatível com fases móveis contendo mais do que 15% de metanol, pois solubiliza o seletor quiral adsorvido. O uso de outros solventes orgânicos também não é recomendado.

Desde então, diversas CSPs de éteres de coroa foram sintetizadas e avaliadas em relação às suas capacidades de reconhecimento quiral. Hyun *et al*

sintetizaram uma CSP ligando covalentemente o (3,3'-difenil-1,1'-binaft-2,2'-diil)-20-coroa-6 na superfície da sílica. Esta CSP foi efetiva na separação de enantiômeros de vários  $\alpha$ -amino ácidos naturais e sintéticos. Com este tipo de imobilização química, fases móveis contendo metanol, etanol e acetonitrila (20-80%) puderam ser utilizadas sem perda de performance da coluna<sup>134</sup>.

As fases estacionárias quirais derivadas de (+)-(18-coroa-6)-2,3,11,12-ácido tetracarboxílico covalentemente ligado à sílica mostraram excelente reconhecimento quiral para aminoácidos, aminoalcoóis e aminas com grupos amino primários<sup>135</sup> e  $\beta$ -substituídos  $\beta$ -aminoácidos<sup>136</sup>. Hyun *et al*<sup>137</sup> ligaram os seletores quirais no suporte por meio de duas ligações covalentes (Figura 1.7), tornando-as mais robustas e úteis para cromatografia de leito móvel simulado (SMB)<sup>138</sup>.



**Figura 1. 7–** Estrutura química da CSP (+)-(18-coroa-6)-2,3,11,12-ácido tetracarboxílico

Hirose *et al*<sup>139,140</sup> desenvolveram CSPs com pseudos éteres de coroa imobilizados na sílica. Estas fases mostraram altas resoluções para  $\alpha$ -aminoácidos, aminas lipofílicas e aminoalcoóis, no modo normal de eluição com aditivos ácidos.

De maneira geral, as CSPs de éteres de coroa quiral possuem aplicação restrita a misturas enantioméricas com caráter eletrofílico. Compostos como aminas<sup>139</sup>, aminoácidos<sup>141</sup>, amino ésteres<sup>142</sup>, aminoamidas<sup>135</sup>, aminoalcoóis<sup>143</sup>

e aminocetonas<sup>144</sup> são bem resolvidos neste tipo de CSP, particularmente com fases móveis ácidas.

As CSPs foram utilizadas para determinação da pureza enantiomérica de substâncias biologicamente ativas como a norefedrina<sup>145</sup> e a tocinida<sup>146</sup>. A sua utilização em escala preparativa é restrita, uma vez a grande quantidade de ácido comumente utilizado na fase móvel, dificulta o isolamento do enantiômero puro<sup>147</sup>.

#### 1.1.2. 4 - Polímeros Sintéticos

Em 1981, Okamoto *et al* sintetizaram o (+)-poli(trifenilmetilmetacrilato), via catálise assimétrica aniônica, e adsorveram este polímero helicoidal quiral em sílica gel macroporosa<sup>148</sup>. Esta CSP, comercializada pela Daiacel com o nome de Chiralpak<sup>®</sup> OT(+), apresentou eficiente enantiosseparação para compostos cíclicos trans-disubstituídos<sup>148</sup>, bicíclicos<sup>149</sup> e policíclicos<sup>150</sup>.

A CSP preparada com poli(*N*-acrilóil-(*S*)-fenilalanina etil éster) ligada à sílica por copolimerização é outra importante CSP polimérica<sup>151</sup>. Esta fase estacionária quiral, ChiraSpher<sup>®</sup> da Merck, tem sido empregada na separação enantiomérica de compostos farmacêuticos, tais quais derivados de benzotiadiazepínicos, gantofiban e intermediários sintéticos e derivados de benzotiazepinas<sup>152-154</sup>.

Allenmark e colaboradores<sup>155</sup>, desenvolveram novas CSPs poliméricas preparadas a partir de derivados de *O,O'*-diarilol-*N,N'*-dialil-*l*-tartardiamida covalentemente ligados a sílica gel funcionalizada. As CSPs preparadas a partir dos monômeros tartarato de *O,O'*-bis(3,5-dimetilbenzoil)-*N,N'*-dialil-*l*-diamida e tartarato de *O,O'*-bis(4-(*tert*-butil)benzoil)-*N,N'*-dialil-*l*-diamida demonstraram eficiência na resolução de diversos compostos quirais<sup>155</sup>, principalmente no modo normal de eluição. Estas fases quirais são comercializadas pela EKA Chemical com os nomes Kromasil<sup>®</sup> CHI-DMB e Kromasil<sup>®</sup> CHI-TBB, respectivamente.

Armstrong e colaboradores imobilizaram diferentes homopolímeros quirais à superfície da sílica. As CSPs são preparadas pela reação de polimerização dos monômeros *trans*-1,2-ciclohexanodil-bis-acrilamida (P-CAP<sup>®</sup>; Astec)<sup>156</sup>, *N,N'*-[(1*R*,2*R*)-1,2-difenil-1,2-etanodil]bis-2-propenamida (P-CAP-DP<sup>®</sup>; Astec)<sup>157</sup> e *trans*-9,10-dihidro-9,10-etanoantraceno-(11*S*,12*S*)-11,12-acido dicarboxílico bis-4-vinilfenilamida (DEAVB)<sup>158</sup>. Estas CSPs demonstraram eficiência na separação de

diversos compostos quirais nos modos de eluição normal, normal clorado e polar orgânico<sup>156-158</sup>.

Recentemente, as colunas P-CAP<sup>®</sup>, P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB foram empregadas na resolução de uma série de 17 sulfóxidos quirais<sup>159</sup>. A DEAVB apresentou alto poder de discriminação quiral para os fármacos inibidores da bomba protônica (PPIs), omeprazol, pantoprazol, lansoprazol e rabeprazol, e também para o modafinil, no modo multimodal. Pela primeira vez foi demonstrada a capacidade de discriminação quiral desta fase no modo reverso de eluição<sup>159</sup>.

Para todas estas CSPs poliméricas, interações  $\pi$ - $\pi$ , estéricas e ligação de hidrogênio participam do mecanismo de discriminação<sup>2</sup>.

### 1.1.2. 5 - Polímero impresso molecularmente (MIP)

O preparo deste tipo de CSP emprega moléculas modelo (geralmente um dos enantiômeros da mistura que se deseja resolver) para criar os sítios de interações estereoquímicas entre o seletor e o analito<sup>160</sup>. A cavidade quiral do MIP tem tamanho, forma e arranjo dos grupos funcionais complementares ao da molécula modelo e, desta forma, podem atuar como sítios de ligação altamente específicos<sup>161,162</sup>. Diferentemente dos demais tipos de CSPs, as fases quirais de polímeros impressos molecularmente permitem prognosticar a ordem de eluição dos enantiômeros<sup>163</sup>.

De maneira geral, as CSPs de MIPs são eficientes na separação de compostos quirais que tiveram um de seus enantiômeros utilizados como *template*. Porém, ao se resolver misturas enantioméricas de compostos análogos há uma diminuição no fator de retenção e na resolução cromatográfica<sup>164</sup>.

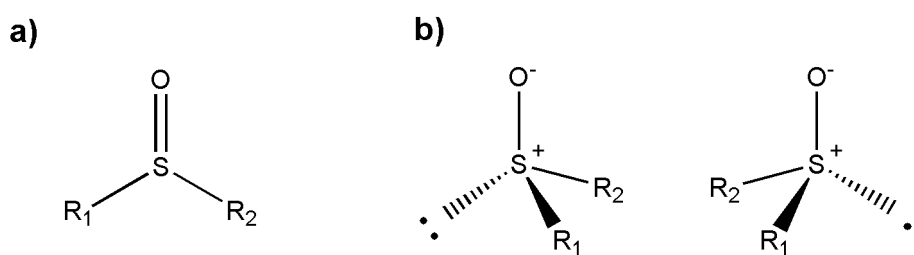
Embora os MIPs sejam usados em escala analítica e preparativa, estas CSPs possuem baixa eficiência quando comparadas a outras fases quirais devido a problemas de transferência de massa e heterogeneidade dos sítios de interação, o que causa bandas largas e assimétricas<sup>165</sup>. Outras limitações inerentes a estas CSP são a pequena capacidade de carga da coluna e o baixo número de pratos teóricos<sup>166</sup>.

Entretanto, devido ao baixo custo de síntese e fácil preparo, uma grande variedade de CSPs tem sido desenvolvidas e utilizadas para resolução quiral

de diferentes fármacos, tais como efedrina<sup>167</sup>, naproxeno, propranolol e timolol<sup>168</sup>; de aminoácidos<sup>169,170</sup> e peptídeos<sup>171</sup>.

## 1. 2 - Sulfóxidos Quirais

Compostos de enxofre trivalentes, como sulfóxidos, possuem distribuição espacial não planar e quando substituídos por dois grupos diferentes são encontrados na forma de dois enantiômeros. Devido à hibridização  $sp^3$  e a presença do par de elétrons isolados, que ocupa a quarta posição do pseudo-centro tetraédrico, a configuração espacial dos sulfóxidos é piramidal (Figura 1.8). Este tipo de configuração possui grande estabilidade estéreoquímica, fazendo com que os enantiômeros sejam separados sem interconversão<sup>172</sup>.



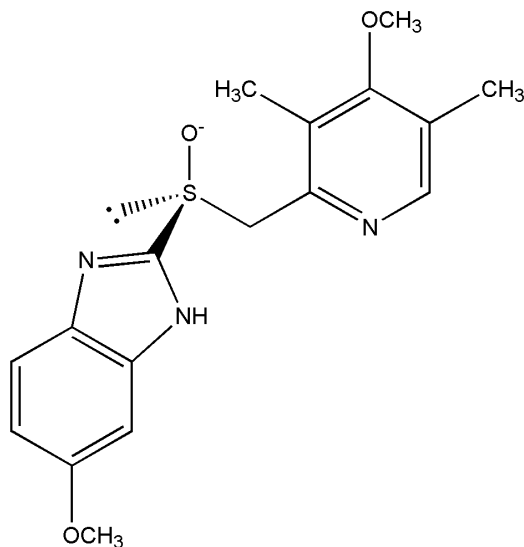
**Figura 1. 8-** a) Estrutura Tradicional, b) Estrutura dos enantiômeros

A estabilidade estéreoquímica dos sulfóxidos é atribuída a sua alta barreira de inversão, que é de  $40\text{Kcal/mol}^{74}$ , aproximadamente. Isto faz com que estes compostos tenham conformação estável abaixo de  $200^\circ\text{C}^{173,174}$ .

A primeira separação de sulfóxidos quirais foi feita em 1926<sup>175</sup> e desde então esta classe de compostos vem chamando muita a atenção, devido à grande importância para a síntese orgânica, para as indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos.

Existem diversas substâncias biologicamente ativas que possuem como centro estereogênico o átomo de enxofre. Desta forma, esses enantiômeros podem agir de forma diferente no organismo, podendo um deles não ser efetivo, ser menos efetivo, ou ocasionar efeitos colaterais. Com isso, é relevante o interesse em se obter os dois enantiômeros separados, para analisar o efeito biológico que cada um tem sobre o organismo<sup>176</sup>.

Um exemplo da importância da análise da influência dos fármacos sobre o organismo é o caso do esomeprazol (Nexium<sup>TM</sup>) e omeprazol (Losec<sup>TM</sup>). O esomeprazol, o enantiômero S do omeprazol, possui melhor resposta clínica que a mistura racêmica no tratamento de úlcera e gastrite (Figura 1.9)<sup>177</sup>.



**Figura 1. 9-** Estrutura do Esomeprazol (Nexium<sup>TM</sup>).

Diversos tipos de fases estacionárias já foram utilizadas para enantiorresolver sulfóxidos quirais, dentre elas destacam-se as de polissacarídeos derivados, especialmente, as derivadas de tris-arilcarbamatos e tris-fenilcarbamatos de amilose e celulose. Estas CSPs demonstraram complementariedade na resolução desta classe de compostos<sup>52,178</sup>.

Os fármacos inibidores da bomba protônica (PPI's) - omeprazol, pantoprazol, lansoprazol e rabeprazol - são, eficientemente, discriminados pelas CSPs de polissacarídeos adsorvidos<sup>85,179</sup> ou imobilizados<sup>153</sup> na superfície do suporte. Sendo assim, as CSPs tris-3,5-dimetilfenilcarbamato e tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose adsorvidos em sílica gel foram utilizadas para separar em escala multimiligrama os fármacos PPI's<sup>85</sup>.

Outro sulfóxido quiral, biologicamente ativo, enantiorresolvido pelas CSPs de polissacarídeo é o modafinil<sup>180</sup>. O uso da coluna cromatográfica tris[(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose acoplada a uma coluna de meio de acesso restrito (RAM) proporcionou a quantificação dos enantiômeros do modafinil em plasma humano, através de injeção direta<sup>181</sup>. Além disso, a coluna tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (CHIRALPAK AD) foi utilizada, em sistema cromatográfico de leito móvel

simulado (SMB), para a obtenção do (*R*) – enantiômero do modafinil em escala de até 0,5 kg/dia<sup>182</sup>.

O uso de fluído supercrítico (SFC) como fase móvel, também proporcionou a discriminação de sulfóxidos quirais em colunas de polissacarídeo, tanto em escala analítica<sup>183</sup> quanto em escala preparativa<sup>184</sup>. Em ambos os casos utilizou-se tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose como seletor quiral.

Um dos maiores fatores de separação enantiomérica, já reportado na literatura, ocorreu pela utilização da CSP tris-3,5-diclorofenilcarbamato de celulose, que enantiorresolveu o sulfóxido quiral 2-(Benzilsulfinil)benzamida com enantiosseletividade ( $\alpha$ ) de 110,9<sup>185</sup>.

Apesar das colunas de derivados de polissacarídeo serem as mais eficientes para a discriminação quiral de sulfóxidos, as CSPs de glicopeptídeos macrocíclicos também possuem alto poder de enantiorresolução para esta classe de compostos.

As CSPs de ristocetina A, teicoplanina (T), teicoplanina aglicona (TAG), vancomicina e vancomicina aglicona (VAG) já foram testadas para a resolução de uma série de 31 sulfóxidos quirais; sendo que, as CSPs de teicoplanina e TAG demonstraram maior eficiência<sup>100</sup>. Desta forma, a TAG foi utilizada para estudos que correlacionam a temperatura com a eficiência da separação de uma série de arilsulfóxidos substituídos<sup>186</sup>.

Outros tipos de CSPs já empregadas para a discriminação quiral de sulfóxidos incluem as de ciclodextrinas<sup>187,188</sup>, utilizadas no modo reverso de eluição, as de proteínas, utilizadas no modo polar iônico<sup>189,190</sup> e as CSPs do tipo Pirkle, utilizadas, principalmente, no modo normal de eluição<sup>191,192</sup>.



## 2 – Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

1 – Avaliação da capacidade de enantiorresolução das fases estacionárias quirais de polímero sintético poli(*trans*-1,2-ciclohexanedil-bis acrilamida (P-CAP<sup>®</sup>) e as fases preparadas através dos monômeros: N, N-[(1R,2R)-1,2-difenil-1,2-etanoediil]bis-2-propenamida (P-CAP-DP<sup>®</sup>) e *trans*-9,10-dihidro-9,10-etanoantraceno-(11S,12S)-11,12-acido dicarboxílico bis-4-vinilfenilamida (DEAVB) para uma série de sulfóxidos quirais no modo multimodal

2 – Avaliação da estabilidade das fases P-CAP<sup>®</sup>, P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB frente a solventes não usuais em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3 – Estudo de métodos de imobilização, fotoquímica e térmica, de polissacarídeos derivados na superfície de sílica Nucleosil-APS (7µm e 500Å), para o desenvolvimento de fases estacionárias quirais de polissacarídeo imobilizado.

4 – Preparo e avaliação da capacidade de enantiorresolução e da estabilidade das fases estacionárias de polissacarídeo imobilizado tris-3,5-dimetilfenilcarbamato e tris-3,5-dimetoxifenil carbamato de amilose.

## 3 – Resultados e Discussões

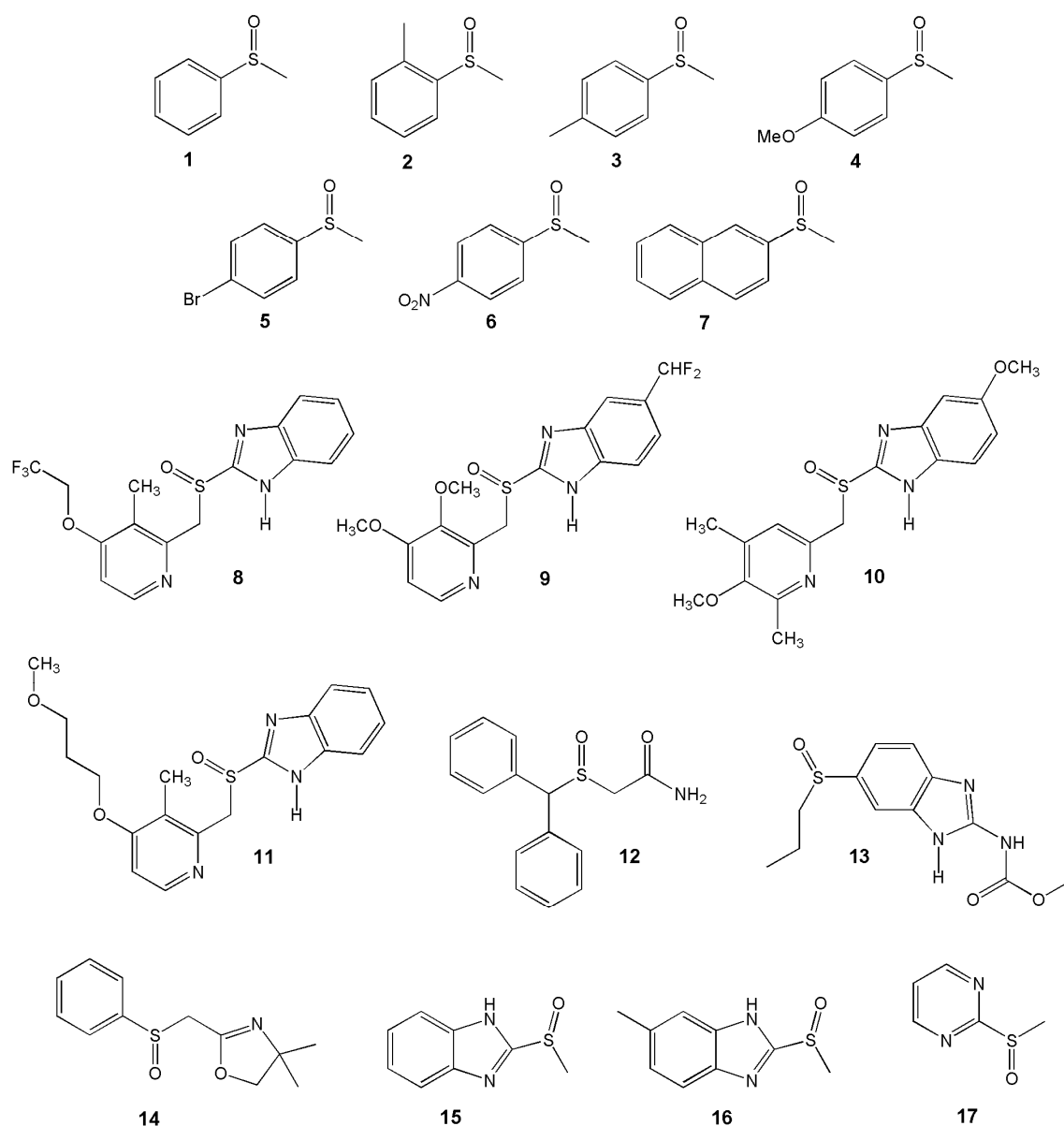
### 3.1 - Avaliação das CSPs de polímero sintético

Poucos relatos, referentes a separações enantioméricas, são encontrados na literatura, no início da década de 80<sup>193</sup>. Com o advento das tecnologias analíticas relacionadas a separações quirais e das CSPs, resoluções de misturas enantioméricas tornou-se prática e rotineira durante os anos 90. Atualmente, há mais de 100 colunas cromatográficas quirais disponíveis comercialmente, que atuam através de diferentes mecanismos de discriminação quiral, e conseqüentemente, resolvem as mais diversas classes de enantiômeros<sup>112</sup>.

O desenvolvimento de novas CSPs proporciona novos perfis de separação, que visam melhorar ou complementar as resoluções já existentes. Estudos buscam colunas cromatográficas com maior capacidade de injeção, maior estabilidade e CSPs poliméricas com configuração absoluta. Neste contexto, as CSPs de polímero sintético se destacam<sup>194</sup>, apesar de possuírem menor poder de discriminação quiral do que as CSPs de polissacarídeos derivados<sup>195</sup>, conhecidas devido à ampla enantiosseletividade tanto em escala analítica quanto em preparativa<sup>64</sup>.

Estudos, sistemáticos, com o objetivo de se avaliar a enantiorresolução de diversas classes de compostos quirais, nas novas CSPs são necessários para se entender o real poder de discriminação quiral que elas possuem.

A análise do poder de enantioseparação das CSPs de polímero sintético, (R,R)P-CAP<sup>®</sup>, (R,R)P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB, foi efetuada através da eluição da série de sulfóxidos quirais (figura 3.1) nos três modos de eluição, o modo normal, o modo polar orgânico e o modo reverso.



**Figura 3. 1** – Série de sulfóxidos quirais avaliada

A série de sulfóxidos quirais foi escolhida devido a sua diversidade estrutural, contendo aril alquil sulfóxidos, fármacos e sulfóxidos benzimidazólicos.

Os compostos (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (14), (15), (16) e (17) foram sintetizados, a partir da oxidação dos respectivos sulfetos com complexo de molibdênio aquiral, segundo método desenvolvido por Cass e colaboradores<sup>196</sup> e descrito na parte experimental. Os demais sulfóxidos foram obtidos através de doações por corporações farmacêuticas ou por pesquisadores.

O modo normal de eluição foi avaliado através do estudo sistemático da fase móvel *n*-hexano/etanol, variada na faixa de 10 em 10% e no intervalo de 10

a 100% de etanol. No intuito de se analisar o efeito do modificador orgânico e de aditivos ácidos, substituiu-se etanol por 2-propanol e adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA) na fase móvel, respectivamente.

Acetonitrila e metanol foram avaliados no modo polar orgânico de eluição, analisando-se misturas destes dois solventes como fase móvel, variando a composição na faixa de 10 em 10%, no intervalo de 0 a 100% de acetonitrila.

O modo reverso de eluição foi estudado com metanol e etanol como modificadores orgânicos, foram avaliadas composições de fase móvel pontuais, conforme melhor enantiorresolução e fator de retenção. Por fim, fases móveis contendo diclorometano e metil *tert*-butil éter também foram avaliadas, no intuito de se verificar a estabilidade das colunas de polímero sintético e suas capacidades de enantiorresolução através de uso de eluentes cromatográficos não usuais.

### 3.1. 1 - Avaliação da (*R,R*)P-CAP<sup>®</sup> e da (*R,R*)P-CAP-DP<sup>®</sup>

As CSPs preparadas a partir do monômero poli(*trans*-1,2-ciclohexanedil-bis acrilamida são comercializadas pela *Advanced Separations Technologies* com o nome comercial de (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> ou (*S,S*) P-CAP<sup>®</sup> e são produzidas através da reação de polimerização do (*1R,2R*) DACH ou do (*1S,2S*) DACH, respectivamente. Estas CSPs possuem o mesmo poder de enantiorresolução com enantiosseletividade oposta<sup>156</sup>.

No processo de síntese da P-CAP<sup>®</sup>, o iniciador de radical é, inicialmente, imobilizado na superfície da sílica gel, antes da reação de polimerização. Com isso, a CSP possui uma estrutura linear rígida do tipo "brush", sendo que os ramos são as unidades de DACH – ACR<sup>156</sup>. A estrutura química do monômero da (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> encontra-se na figura 3.2.

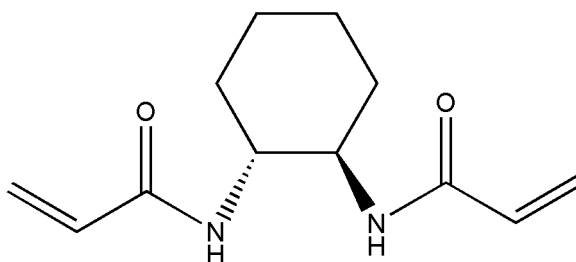
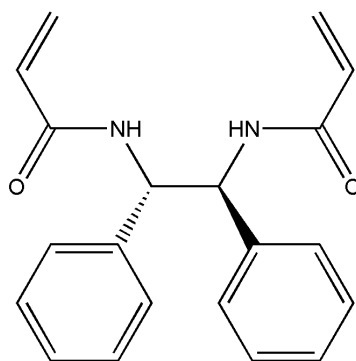


Figura 3. 2 - Estrutura proposta da (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>

A P-CAP<sup>®</sup> pode interagir com o analito, principalmente, através de ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação estérica e hidrofóbica. Sendo assim compostos quirais com grupos hidroxilas, carboxilas, aminas, amidas e uréia já foram separados com sucesso no modo normal, polar orgânico, normal com solvente clorado<sup>156</sup> e através do uso de fluido supercrítico (SFC) como fase móvel<sup>194</sup>.

Outra CSP de polímero sintético, recentemente, preparada foi a (R,R)P-CAP-DP<sup>®</sup>, que também é comercializada pela *Advanced Separations Technologies* e é preparada através do monômero N,N-[(1R,2R)-1,2-difenil-1,2-etanoedil]bis-2-propenamida. Diferentemente da P-CAP<sup>®</sup>, o iniciador de radical da P-CAP-DP<sup>®</sup> não é ligado ao suporte antes da reação de polimerização, mas dissolvido no meio reacional contendo o monômero e a sílica gel<sup>157</sup>. Desta forma, esta CSP possui uma estrutura flexível, permitindo um maior número de interações com menor intensidade. A Figura 3.3 demonstra a estrutura química do monômero da (R,R)P-CAP-DP<sup>®</sup>.



**Figura 3. 3** - N,N-[(1R,2R)-1,2-difenil-1,2-etanoedil]bis-2-propenamida

A P-CAP-DP<sup>®</sup> é capaz de interagir através de ligação de hidrogênio, interação  $\pi$ - $\pi$ , interação dipolo-dipolo e estérica. Segundo estudos de Armstrong e colaboradores, esta CSP mostrou ser complementar a P-CAP<sup>®</sup>, pois ambas demonstraram diferente enantiosseletividade para a mesma série de compostos<sup>156,157</sup>.

### Modo Normal de Eluição

Um total de onze sulfóxidos quirais (65%) foram separados no modo multimodal pela (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>, enquanto que a (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> resolveu oito (43%) compostos. Nove (53%) sulfóxidos quirais foram separados pela (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> no modo normal de eluição, utilizando-se *n*-hexano/etanol como fase móvel, enquanto que oito (47%) foram separados pela (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup>.

Os sulfóxidos 5, 6, 15, 16 e os sulfóxidos 6, 8, 10, 12 foram separados, respectivamente, na (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> e na (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> exclusivamente pelo uso de *n*-hexano/etanol como fase móvel (Tabela 3.1). As separações obtidas foram avaliadas de acordo com fator de retenção ( $k_1$ ), enantiosseletividade ( $\alpha$ ) e enantiorresolução ( $R_s$ ) definidos na parte experimental ( pp. 70).

**Tabela 3. 1:** Parâmetros cromatográficos das separações obtidas pela (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> e pela (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup>.

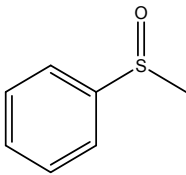
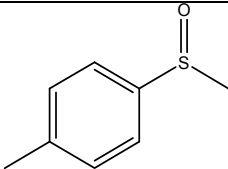
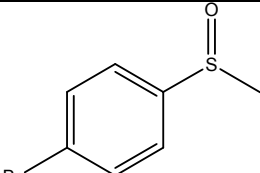
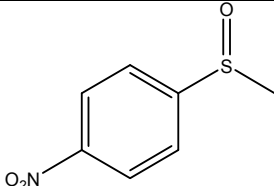
Estrutura	Fase Móvel	Coluna	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
 <b>(1)</b> Fenil metil sulfóxido	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP-DP	3,56	1,33	0,86
	ACN (100%)	P-CAP-DP	1,06	1,07	0,73
 <b>(3)</b> p-tolueno metil sulfóxido	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP-DP	2,87	1,03	0,68
	ACN (100%)	P-CAP-DP	1,77	1,05	0,68
 <b>(5)</b> 4-(bromofenil)metil sulfóxido	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	1,68	1,04	0,68
		P-CAP-DP	3,29	1,04	0,83
	ACN (100%)	P-CAP-DP	1,39	1,06	0,68
 <b>(6)</b> 4-(nitrofenil)metil sulfóxido	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	3,80	1,03	0,68
		P-CAP-DP	9,05	1,03	0,73

Tabela 3.1 (continuação)

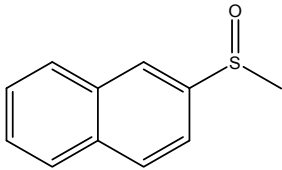
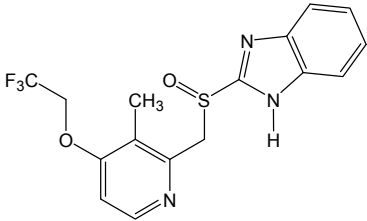
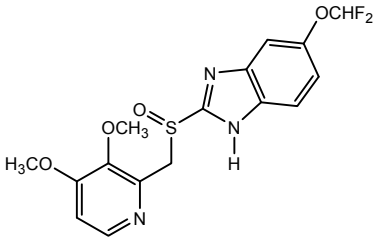
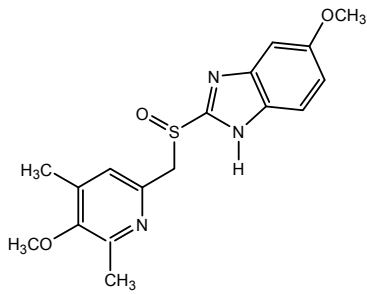
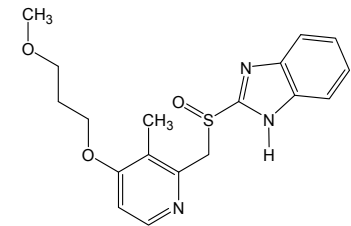
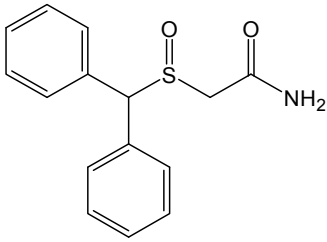
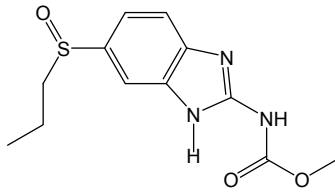
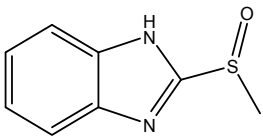
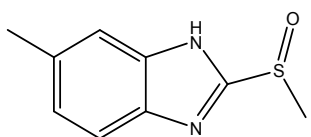
Estrutura	Fase Móvel	Coluna	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
 <b>(7) Metil naftil sulfóxido</b>	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	1,85	1,05	0,68
		P-CAP-DP	3,92	1,17	1,22
	ACN (100%)	P-CAP	0,99	1,09	0,80
		P-CAP-DP	1,70	1,29	1,27
 <b>(8) lansoprazol</b>	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP-DP	13,6	1,06	0,68
	ACN (100%)	P-CAP	4,64	1,07	0,80
 <b>(09) pantoprazol</b>	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	9,21	1,09	0,90
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:01)	P-CAP	2,60	1,10	0,68
	ACN (100%)	P-CAP	5,32	1,16	0,90
 <b>(10) omeprazol</b>	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	8,89	1,13	1,15
		P-CAP-DP	9,42	1,08	0,78
	ACN (100%)	P-CAP	6,23	1,05	0,80
 <b>(11) rabeprazole</b>	ACN (100%)	P-CAP	5,87	1,10	0,73

Tabela 3.1 (continuação)

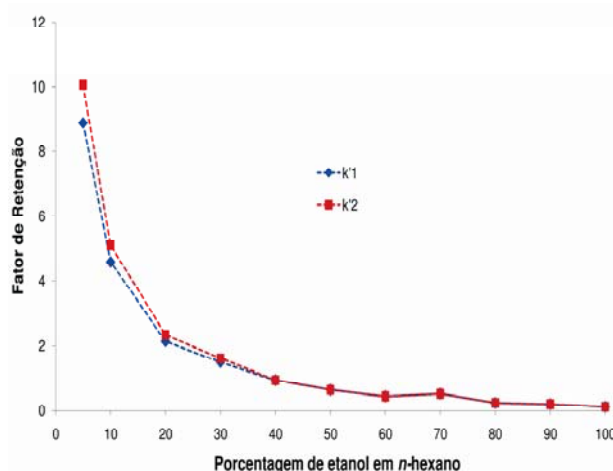
Estrutura	Fase Móvel	Coluna	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
 <b>(12)</b> modafinil	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	13,3	1,05	0,73
		P-CAP-DP	11,0	1,08	1,07
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:01)	P-CAP	2,47	1,11	1,00
	ACN (100%)	P-CAP	3,68	1,10	0,90
 <b>(13)</b> albendazol sulfóxido	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	5,75	1,07	0,73
	ACN (100%)	P-CAP	11,3	1,19	0,9
 <b>(15)</b> metil sulfinil benzoimidazol	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	2,98	1,05	0,68
 <b>(16)</b> metil sulfinil 5-metil benzoimidazol	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	P-CAP	2,38	1,05	0,68

O perfil típico de retenção do modo normal de eluição foi observado para todos os enantiômeros analisados na (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>, ou seja, quanto maior a concentração de hidrocarboneto na composição da fase móvel, maior é a transferência de massa entre o analito e a fase estacionária e, conseqüentemente, maior o fator de retenção.

A separação quiral ocorreu apenas quando a fase móvel era composta, majoritariamente, por *n*-hexano; o omeprazol, por exemplo, obteve maior

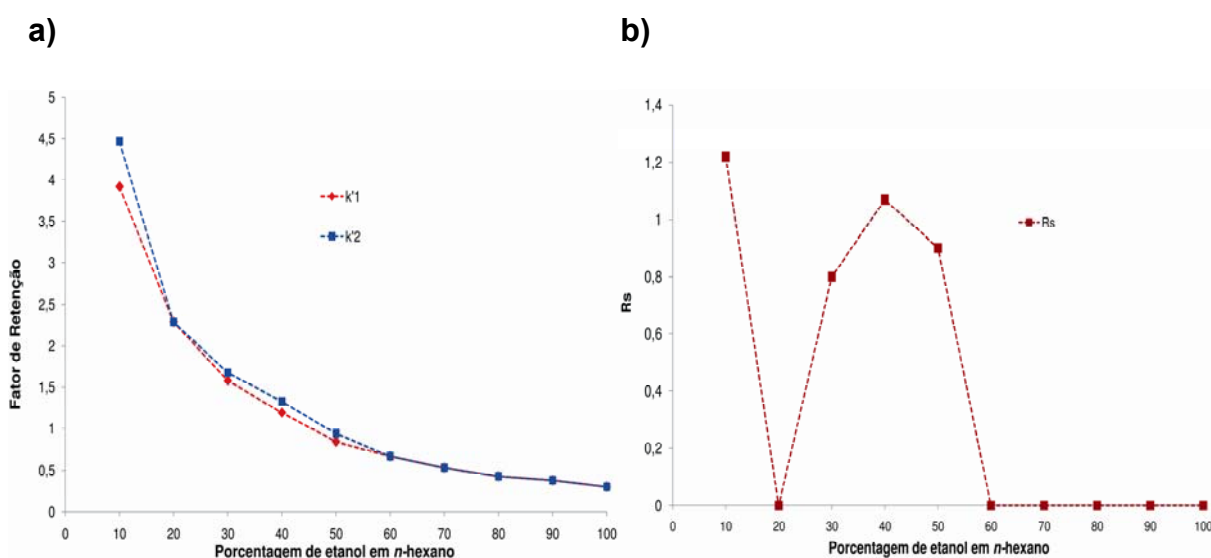


enantiosseletividade quando se utilizou *n*-hexano/etanol (95:05) como fase móvel (Figura 3.4).



**Figura 3. 4** - Perfil de retenção do 1º e 2º enantiômero do omeprazol no modo normal de eluição na (*R,R*) P-CAP®

De maneira geral, este perfil de eluição também foi observado para as separações dos sulfóxidos quirais na (*R,R*) P-CAP-DP®, porém alguns compostos apresentaram perfil inesperado. O composto (7), por exemplo, obteve as melhores separações com a composição de fase móvel *n*-hexano/etanol (90:10) e *n*-hexano/etanol (60:40). Por outro lado, ao avaliar *n*-hexano/etanol (80:20) ocorreu uma perda total da enantiosseletividade da separação, veja a Figura 3.5a e 3.5b.



**Figura 3. 5** - a) Perfil de retenção do 1º e 2º enantiômero, b) Fator de resolução, do Metil naftil sulfóxido no modo normal de eluição na (*R,R*) P-CAP-DP®

O comportamento obtido por este seletor quiral não é usual e destaca a importância do estudo, sistemático, da análise do poder de discriminação quiral de novas CSPs. Desta forma, o mecanismo de enantiorresolução do metil naftil sulfóxido pela (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> necessita de uma investigação mais específica para ser elucidado.

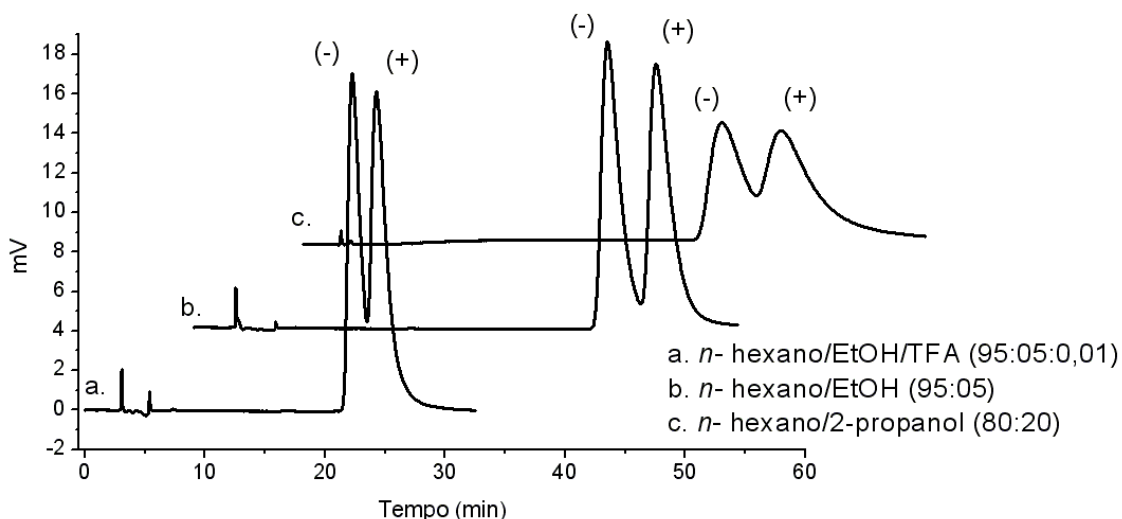
A interação que deve, predominantemente, atuar para que ocorra a discriminação quiral da série de sulfóxidos pela (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>, no modo normal é a ligação de hidrogênio. A maioria dos enantiômeros separados possui grupos nucleofílicos em suas estruturas químicas, os quais podem interagir com os hidrogênios dos nitrogênios  $\alpha$  carbonila da (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>.

A Interação dipolo-dipolo da ligação S=O e interações estéricas entre o analito e o seletor quiral também são importantes. O metil naftil sulfóxido (7), mesmo não tendo a possibilidade de efetuar ligação de hidrogênio é separado. Por outro lado, o benzilmetil sulfóxido (1) não é separado, pois possui um menor momento dipolar na ligação S=O e um menor volume estérico.

As duas melhores separações obtidas na (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup>, no modo normal de eluição, foram para os compostos (7) e (12). Nota-se que ambos sulfóxidos quirais possuem centro estereogênico substituído por anéis aromáticos, possibilitando assim uma eficiente interação  $\pi$ - $\pi$  com o seletor quiral. Este fato destaca que a interação  $\pi$ - $\pi$  é a estereo-específica para esta CSPs, neste modo de eluição. Além disso, o composto (1), o qual tem pequeno volume estérico e não possui a possibilidade de fazer ligações de hidrogênio, foi enantiodiscriminado.

2-propanol foi avaliado como modificador do modo normal de eluição nas duas CSPs de polímero sintético. O uso, de *n*-hexano/2-propanol como fase móvel, proporcionou piores enantiorresoluções para todos os compostos avaliados. Isto ocorreu, provavelmente, devido à maior viscosidade da nova composição de fase móvel, o que diminui a transferência de massa entre o analito e o adsorvente, e conseqüentemente, a enantiorresolução.

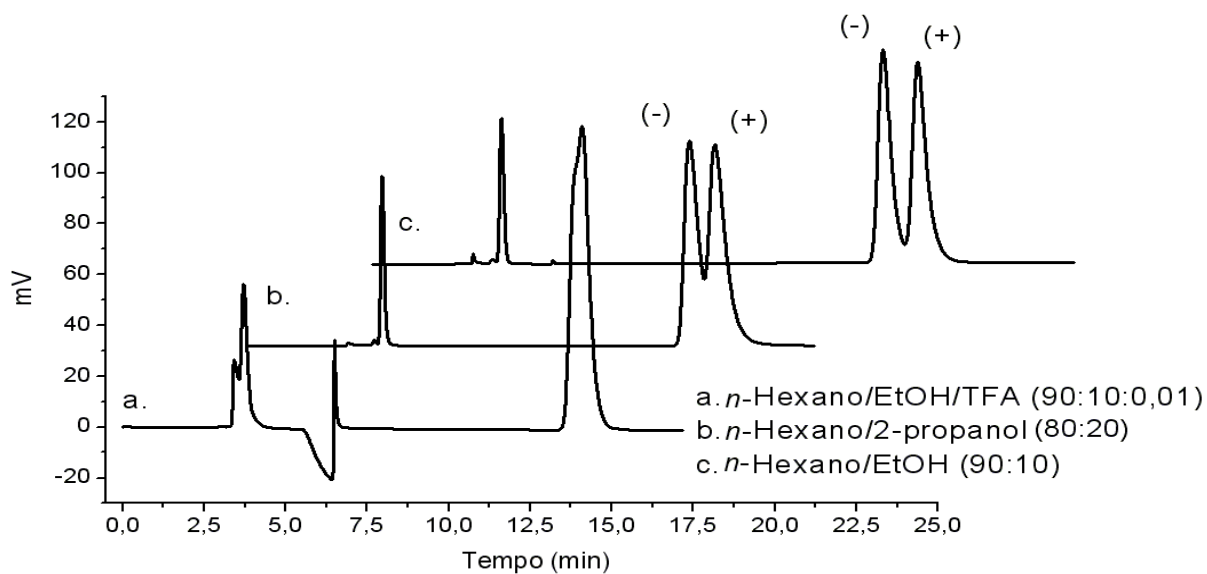
As figuras 3.6 e 3.7 mostram exemplos típicos das separações obtidas para a série de sulfóxidos quirais, com comparações das separações obtidas no modo normal utilizando-se *n*-hexano/etanol, *n*-hexano/2-propanol e *n*-hexano/etanol/TFA como eluentes.



**Figura 3. 6** - Cromatogramas do omeprazol, (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>, 250mm X 4,6mm, vazão:1mL/min,  $\lambda$ =302nm, 20°C

O uso de aditivos ácidos na fase móvel, como ácido trifluoroacético (TFA), foi eficiente na enantiorresolução de diversos compostos quirais, pela (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> e (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup>, por diminuir o fator de retenção e produzir bandas cromatográficas mais simétricas<sup>156,157</sup>. O uso de TFA (0,01%) como aditivo da fase móvel, também diminuiu o fator de retenção das separações obtidas para a série de sulfóxidos quirais, porém proporcionou menor interação quiral entre os enantiômeros e o adsorvente diminuindo a enantiorresolução.

Este comportamento pode ser observado para a separação do omeprazol pela (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>, com fator de separação ( $\alpha$ =1,13) e enantiorresolução ( $R_s$ =1,38) para este fármaco ao utilizar *n*-hexano/etanol (95:05), os quais mudam para  $\alpha$ =1,10 e  $R_s$ =0,96 ao utilizar *n*-hexano/etanol/TFA (95:05:0,01) (Figura 3.6). No caso do metil naftil sulfóxido na (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> fator de separação ( $\alpha$ =1,16) e resolução ( $R_s$ =1,22), obtidos através do uso de *n*-hexano/etanol (90:10), foi perdido ao se utilizar *n*-hexano/etanol/TFA (95:05:0,01) como fase móvel (Figura 3.7).



**Figura 3. 7** - Cromatogramas do metil naftil sulfóxido (7), (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup>, 250mm X 4,6mm, vazão:1mL/min,  $\lambda$ =240nm, 20°C

### Modo Polar Orgânico de Eluição

Sete (41%) dos dezessete sulfóxidos quirais foram separados no modo polar orgânico pela (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> e quatro (24%) pela (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup>. Na primeira coluna cromatográfica, o modo polar orgânico mostrou ser complementar ao modo normal, já que proporcionou a resolução de dois compostos (8 e 11) não separados pelo uso de hidrocarboneto/álcool como fase móvel (Tabela 3.1, p. 31).

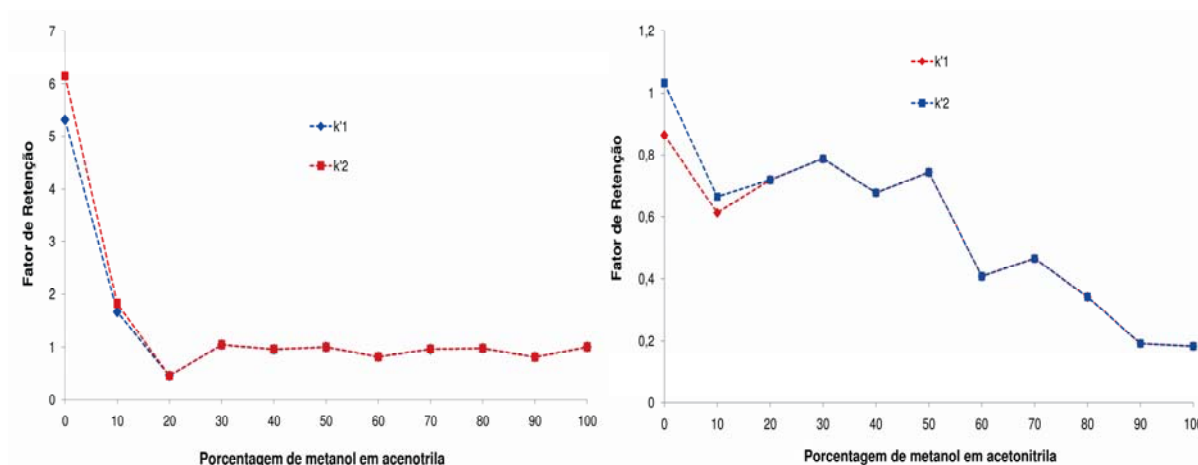
Baixo poder de discriminação quiral foi obtido pela (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> no modo polar orgânico de eluição, além disso os quatro sulfóxidos quirais separados foram também discriminados pelo modo normal. (Tabela 3.1, p.31).

Para as duas CSPs, acetonitrila foi melhor do que metanol como modificador do modo polar orgânico, já que proporcionou melhores separações. De fato, todos os compostos foram separados através da utilização de ACN (100%) como fase móvel. Isto ocorre, pois o metanol desfavorece a magnitude das ligações de hidrogênio entre o seletor quiral e os analitos, o que proporciona uma menor transferência de massa.

A figura 3.8a e 3.8b demonstram o perfil de eluição observado, para os sulfóxidos quirais na (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> e (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> no modo polar orgânico, respectivamente.

a)

b)



**Figura 3. 8** - Perfil de retenção do 1º e 2º enantiômero do **a)** pantoprazol na (*R,R*) P-CAP® e **b)** metil naftil sulfóxido na (*R,R*) P-CAP-DP®, no modo polar orgânico

Apesar das duas CSPs apresentarem menor poder de discriminação quiral no modo polar orgânico, os compostos que foram separados nos dois modos (polar orgânico e normal) apresentaram menor fator de retenção com comparável resolução pelo uso de ACN (100%) como fase móvel (tabela 3.1, p.31).

A (*R,R*) P-CAP® e (*R,R*) P-CAP-DP® obtiveram maior abrangência na separação de sulfóxidos quirais, através do uso de hidrocarboneto/álcool (modo normal) como fase móvel. Por sua vez, o modo polar orgânico pode aumentar a eficiência das separações, por diminuir o tempo das análises.

### Modo Normal com solventes cromatográficos não usuais

Armstrong e colaboradores separaram compostos quirais na (*R,R*)P-CAP® e na (*R,R*)P-CAP-DP® utilizando o modo normal com solvente clorado (diclorometano/metanol). Apesar deste modo de eluição ser menos abrangente do que o modo normal (*n*-hexano/etanol) e do que o polar orgânico, seu uso proporciona o aumento da enantiosseletividade de algumas misturas enantioméricas<sup>156,157</sup>.

A utilização de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99:01) como fase móvel mostrou pouca eficiência na discriminação da série de sulfóxidos quirais, pelas duas CSPs de polímero sintético. Apenas dois (11%) sulfóxidos (9, 12) foram separados pela

(*R,R*)P-CAP<sup>®</sup>, enquanto nenhuma separação foi obtida pela (*R,R*)P-CAP-DP<sup>®</sup> (tabela 3.1, p.31).

Apesar do baixo número de compostos separados, o modo normal com solvente clorado proporcionou um pequeno aumento na resolução da separação do modafinil (tabela 3.2). Isto indica que para alguns compostos, este modo de eluição pode ser uma alternativa para se obter melhores separações.

**Tabela 3. 2:** Comparação da eficiência da enantiorresolução do modafinil (12) no modo normal, polar orgânico e normal com solvente clorado de eluição na (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>.

Fase Móvel	$k'_1$	$\alpha$	$R_s$
<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	13,3	1,05	0,73
ACN (100%)	3,68	1,10	0,9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:01)	2,47	1,11	1,0

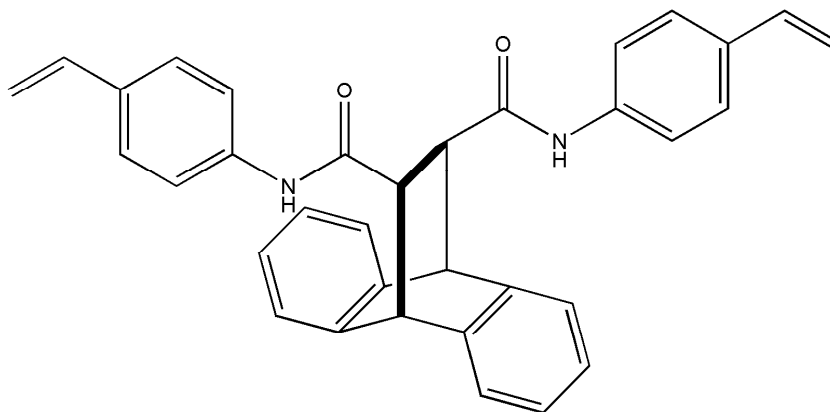
Nas duas colunas de polímero sintético, (*R,R*)P-CAP e (*R,R*)P-CAP-DP<sup>®</sup>, a utilização de *n*-hexano/metil *tert*-butil éter/etanol como fase móvel não proporcionou nenhuma separação dos sulfóxidos quirais avaliados.

### 3.1. 2 - Avaliação da DEAVB

A DEAVB é um protótipo de coluna comercial de polímero sintético, sintetizada a partir do monômero quiral *trans*-9,10-dihidro-9,10-etanoantraceno-(11*S*,12*S*)-11,12-ácido dicarboxílico bis-4-vinilfenilamida. Assim como a P-CAP<sup>®</sup> esta CSP é sintetizada através da imobilização, prévia, do iniciador de radical na sílica gel, antes da reação de polimerização. Sendo assim, a estrutura do polímero é rígida, estável e as interações quirais são mais eficientes<sup>158</sup>.

Esta CSP vincula a estrutura rígida da P-CAP<sup>®</sup> e as interações  $\pi$ - $\pi$  da P-CAP-DP<sup>®</sup>, fazendo com que uma maior eficiência na discriminação quiral de misturas enantioméricas seja obtida<sup>158</sup>.

Além da interação  $\pi$ - $\pi$ , a DEAVB também possui interações do tipo ligações de hidrogênio, interação dipolo-dipolo e interação estérica. A estrutura química do monômero da DEAVB está representada na figura 3.9.



**Figura 3. 9** - Representação estrutural do monômero da DEAVB

### Modo Normal de eluição normal

O uso do modo normal de eluição proporcionou uma grande abrangência na resolução dos sulfóxidos quirais pela DEAVB, separando treze (76%) dos dezessete estudados, sendo que seis (35%) deles foram separados apenas neste modo de eluição, nesta coluna cromatográfica.

Além do grande número de compostos discriminados, está CSP demonstrou alta eficiência na enantiorresolução dos compostos 8, 9, 10, 11, 12 ( $2,47 < R_s < 5,15$ ). A tabela 3.3 apresenta os parâmetros cromatográficos das melhores separações obtidas.

**Tabela 3. 3:** Parâmetros cromatográficos das separações obtidas pela DEAVB.

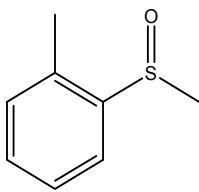
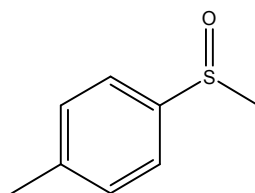
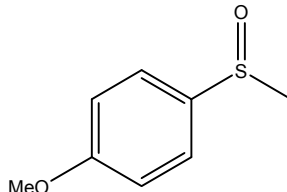
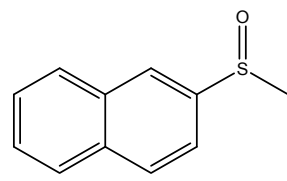
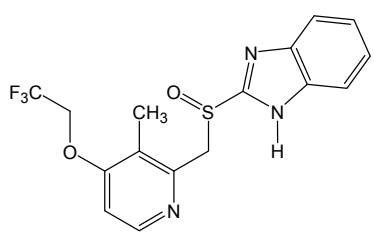
Estrutura	Fase Móvel	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
 <p><b>(2)</b> <i>o</i>-tolueno metil sulfóxido</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	1,36	1,50	0,78
 <p><b>(3)</b> <i>p</i>-tolueno metil sulfóxido</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	1,36	1,03	0,68
 <p><b>(4)</b> 4-(metoxifenil)metil sulfóxido</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (90:10)	2,84	1,05	1,04
 <p><b>(7)</b> Metil naftil sulfóxido</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20)	1,77	1,03	0,68
 <p><b>(8)</b> lansoprazol</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20)	2,96	1,35	3,49
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:01)	2,96	1,20	1,60
	<i>n</i> -hexano/MtBE/EtOH (30:45:25)	1,59	1,34	2,34
	ACN (100%)	0,84	1,23	1,26
	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30)	2,23	1,20	1,60
	EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30)	1,60	1,22	1,68



Tabela 3.3 (continuação)

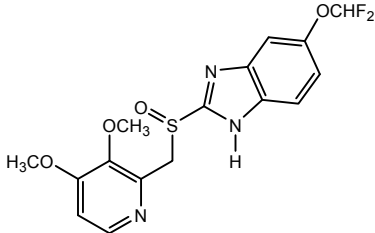
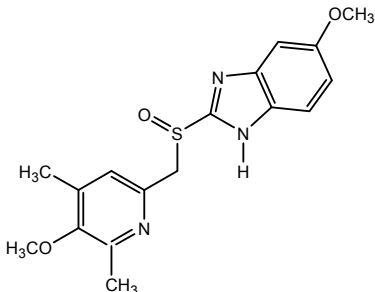
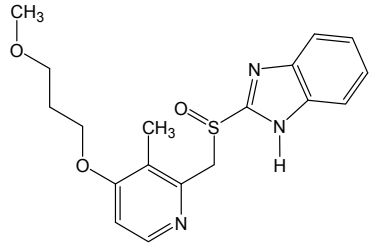
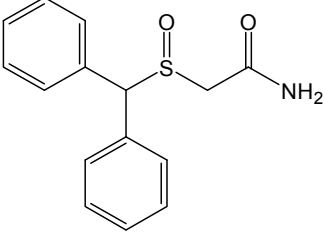
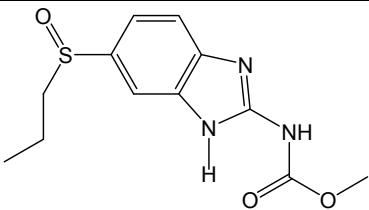
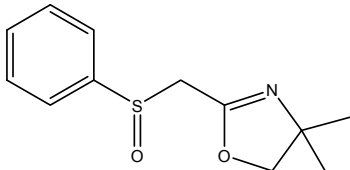
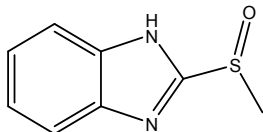
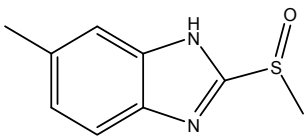
Estrutura	Fase Móvel	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
 <p><b>(9) pantoprazol</b></p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20)	6,55	1,56	5,15
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:01)	3,56	1,50	3,67
	<i>n</i> -hexano /MtBE/EtOH (30:45:25)	3,23	1,59	3,58
	ACN (100%)	1,01	1,40	2,37
	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30)	2,82	1,30	2,20
	EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30)	1,33	1,42	2,55
 <p><b>(10) omeprazol</b></p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20)	4,76	1,55	4,68
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:01)	3,31	1,37	2,75
	<i>n</i> -hexano/MtBE/EtOH (30:45:25)	3,65	1,57	3,41
	ACN (100%)	1,91	1,37	2,16
	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30)	3,42	1,30	2,18
	EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30)	2,08	1,32	2,45
 <p><b>(11) rabeprazol</b></p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20)	4,62	1,47	4,29
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:01)	3,29	1,33	2,18
	<i>n</i> -hexano/MtBE/EtOH (30:45:25)	3,13	1,49	3,24
	ACN (100%)	1,68	1,27	1,59
	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30)	1,70	1,30	1,70
	EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30)	2,00	1,29	2,27
 <p><b>(12) modafinil</b></p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20)	5,12	1,21	2,47
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:01)	3,33	1,41	4,13
	<i>n</i> -hexano/MtBE/EtOH (30:45:25)	4,16	1,21	2,07
	ACN (100%)	0,92	1,23	1,61

Tabela 3.3 (continuação)

Estrutura	Fase Móvel	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
 <p>(13) albendazole sulfóxido</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20)	2,82	1,03	0,68
 <p>(14) 2-Benzenosulfenilmetil -4,4-dimetil-4,5-dihidrooxazol</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20)	1,40	1,04	0,68
 <p>(15) metil sulfinil benzoimidazol</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20) ACN (100%)	2,98 0,43	1,05 1,15	0,91 0,78
 <p>(16) metil sulfinil 5-metil benzoimidazol</p>	<i>n</i> -hexano/EtOH (80:20) ACN (100%)	1,38 0,45	1,07 1,15	0,78 0,73

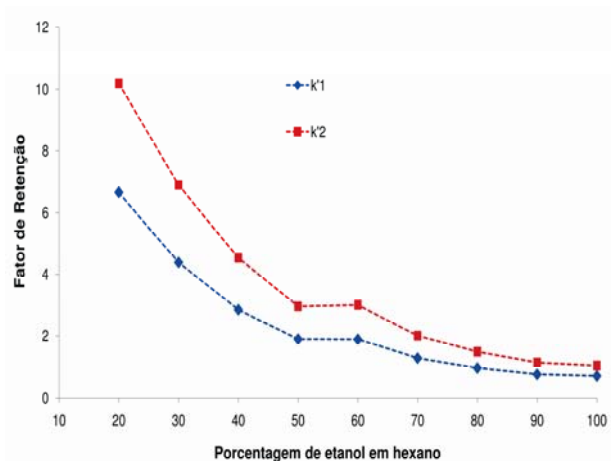
As estruturas químicas dos compostos separados com linha de base pela DEAVB (8-12) são bastante similares entre si, possuem mais do que uma unidade de interação  $\pi$ - $\pi$  e grupamentos amina, que efetuam a ligação de hidrogênio. Logo, estas duas interações são importantes para que a separação quiral ocorra de forma efetiva.

A interação  $\pi$ - $\pi$  mostra ser fundamental no mecanismo de discriminação quiral. O composto (4), por exemplo, possui anel benzênico *para* substituído por um grupo metoxi (grupo doador de elétrons), enquanto o composto (6) possui grupo retirador de elétrons. A enantiorresolução do composto (4) infere

que a alta densidade eletrônica do anel benzênico, causado pelo grupo substituinte do anel aromático, exerce papel decisivo na separação quiral deste caso.

A DEAVB demonstrou um grande poder de discriminação quiral para os sulfóxidos (8), (9), (10), (11) e (12) no modo normal de eluição, já que estes foram separados por todas as composições de fases móveis avaliadas.

As melhores separações foram obtidas pelo uso de *n*-hexano/etanol (80:20) como fase móvel, já *n*-hexano/etanol (90:10) e *n*-hexano (100%) não proporcionou a eluição dos compostos. A figura 3.10 demonstra o perfil de separação para o pantoprazol, que é típico do modo normal de eluição e semelhante aos demais sulfóxidos quirais resolvidos.



**Figura 3. 10** - Perfil de retenção do 1º e 2º enantiômero do pantoprazol no modo normal de eluição na DEAVB

Ressalta-se que a utilização de 100% de etanol como fase móvel (modo polar orgânico) resultou na separação dos sulfóxidos (8), (9), (10), (11) e (12) pela DEAVB com enantiorresolução ( $R_s$ ) de 1,02, 1,90, 2,50, 1,40 e 1,35, respectivamente. Além disso, com a composição de fase móvel, *n*-hexano/etanol (30:70) (modo normal) estes sulfóxidos foram todos separados com linha de base ( $R_s > 1,5$ ). No Anexo I (p. 97), estão presentes os cromatogramas selecionados (1-5), das separações obtidas com maior enantiorresolução, para os compostos (8-12) no modo normal de eluição pela coluna DEAVB.

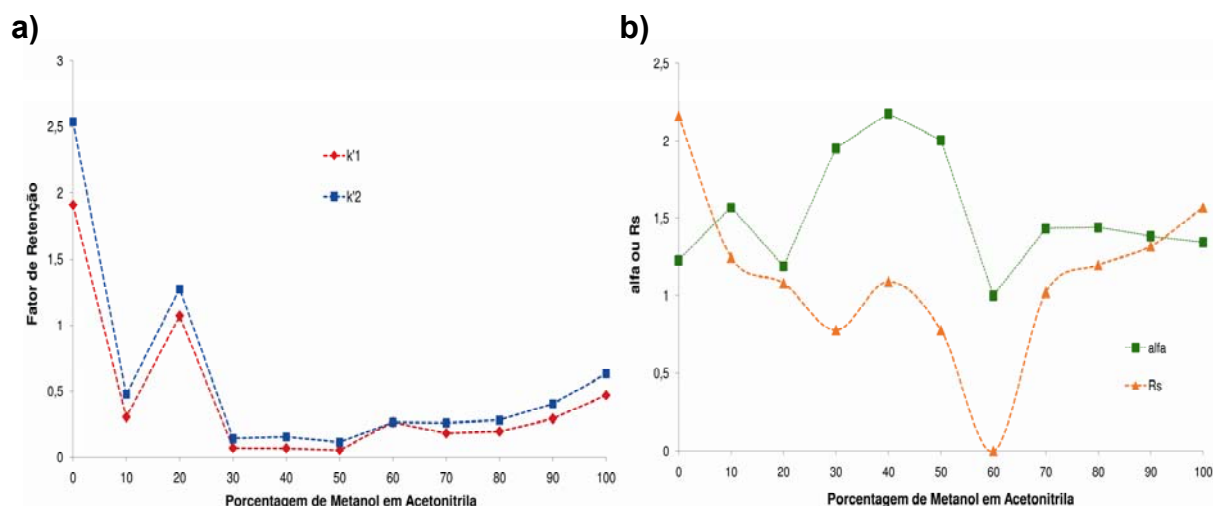
A utilização de 2-propanol como modificador orgânico do modo normal de eluição e o uso de TFA na fase móvel ocasionou perda da eficiência da separação, assim como observado para a (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> e (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup>.

### Modo polar orgânico de eluição

Sete (41%) dos dezessete sulfóxidos quirais estudados foram separados pela DEAVB no modo polar orgânico, sendo quatro deles separados com linha de base. A tabela 3.3 (p. 41) apresenta os parâmetros cromatográficos para as melhores separações obtidas.

Os perfis de eluição obtidos para as separações das misturas enantioméricas pela DEAVB, no modo polar orgânico, foram todos similares (figura 3.11a), sendo a melhor separação quiral obtida, com o uso de 100% de acetonitrila como fase móvel.

Apesar do uso de metanol (100%) como fase móvel, também ser eficiente para as separações dos compostos (8-12) pela DEAVB, com faixa de enantiorresoluções de 0,68 à 1,57, o uso de ACN (100%) sempre resultou em melhores separações (Figura 3.11b).



**Figura 3. 11 - a) Perfil de retenção do 1º e 2º enantiômero, b) Parâmetros cromatográficos, do omeprazol (10) no modo polar orgânico de eluição na DEAVB**

O uso de ACN/MeOH (90:10) proporcionou um pequeno acréscimo na resolução, quando comparado com o uso de 100% de metanol, com exceção do omeprazol (10), que o  $R_s$  diminuiu de 1,57 para 1,27 (Figura 3.11b). Todas as outras composições de fase móvel avaliadas, ACN/MeOH, diminuíram as enantiorresoluções obtidas pelo uso de acetonitrila (100%) ou metanol (100%).

A DEAVB apresentou menor eficiência no modo polar orgânico, do que no modo normal de eluição, pois separou um menor número de sulfóxidos quirais. Todavia, o uso de acetonitrila (100%) proporcionou separações com linha de base em um curto tempo de análise, mostrando-se útil para aplicações quantitativas pela DEAVB, especialmente, para os compostos (8), (9), (10), (11) e (12).

No Anexo I (p. 99), são presentes os cromatogramas (6-9) referentes as separações linha de base obtidas pela DEAVB no modo polar orgânico de eluição.

### Modo normal com solventes cromatográficos não usuais

A DEAVB demonstrou pouca abrangência nas separações dos sulfóxidos quirais através do uso do modo normal com solvente clorado de eluição, porém a utilização de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99:01) como fase móvel proporcionou cinco (29%) separações com linha de base. A tabela 3.3 (p. 41) apresenta os parâmetros cromatográficos das melhores separações obtidas.

Assim como nos demais modos de eluição, a DEAVB apresentou alta eficiência para as discriminações dos compostos (8), (9), (10), (11) e (12) através do uso de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99:01) como fase móvel. Todas as separações foram obtidas com alta enantiorresolução e, razoável, fator de retenção. A maior enantiorresolução do modafinil (12) pela DEAVB foi obtida pelo uso de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99:01) (Tabela 3.4).

**Tabela 3. 4:** Comparação da eficiência da enantioresolução do modafinil (12) no modo normal, polar orgânico e normal com solvente clorado de eluição na DEAVB.

Modos de Eluição	k' <sub>1</sub>	α	Rs
Normal, <i>n</i> -hexano/Etanol (90:10)	5,12	1,21	2,47
Polar Orgânico, ACN (100%)	0,92	1,23	1,61
Normal com solvente clorado, diclorometano/metanol (99:01)	3,33	1,41	4,13

No Anexo I (p. 101) é possível visualizar os cromatogramas (10-14) das separações obtidas pela DEAVB no modo normal com solvente clorado de eluição.

Destaca-se o cromatograma 14, referente à separação obtida para o modafinil, o qual apresenta alta enantiosseletividade ( $\alpha$ ) e enantiorresolução ( $R_s$ ).

Na DEAVB, a utilização da fase móvel *n*-hexano/metil *tert*-butil éter/EtOH, com composição de (30:45:25), também foi altamente eficiente na separação dos compostos 8, 9, 10, 11 e 12, obtendo-se enantiorresoluções na faixa de  $R_s=2,07$  a  $R_s=3,58$  (tabela 3.3, p. 41). A substituição de etanol por 2-propanol na composição desta fase móvel causou o aumento do fator de retenção e da assimetria das bandas cromatográficas, provavelmente, devido a sua maior viscosidade e menor momento dipolar.

No Anexo I (p. 104) são presentes os cromatogramas (15-19), das separações obtidas para os sulfóxidos quirais (8-12) pela DEAVB, utilizando-se fase móvel *n*-hexano/metil *tert*-butil éter/EtOH (30:45:25).

### Modo reverso de eluição

O modo reverso de eluição é um modo muito importante para análises de compostos quirais, principalmente, para o desenvolvimento de métodos bioanalíticos em fluídos biológicos, estudos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos. Apesar desta evidente importância, as colunas de polímero sintético P-CAP<sup>®</sup>, P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB ainda não tinham sido testadas neste modo de eluição, já que as separações quirais nestas três colunas ocorrem, principalmente, devido a ligação de hidrogênio, interação com maior magnitude em solventes orgânicos<sup>156-158</sup>.

A (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> e (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> foram avaliadas no modo reverso de eluição, com metanol e etanol como modificadores, e não apresentaram nenhum poder de discriminação quiral para a série de sulfóxidos avaliada. Por outro lado, devido a maior rigidez, a maior interação estérica e ao sistema  $\pi$  estendido, a DEAVB proporcionou boas separações para os fármacos PPI's (8, 9, 10 e 11) tanto através do uso de MeOH/H<sub>2</sub>O quanto pelo uso de EtOH/H<sub>2</sub>O como fase móvel (tabela 3.5).

**Tabela 3. 5:** Parâmetros cromatográficos das separações obtidas no modo reverso de eluição na DEAVB.

Estrutura	$k'_1$	$\alpha$	$R_s$	Fase Móvel
(8) lansoprasol	2,23	1,20	1,60	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30)
	1,60	1,22	1,68	EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30)
(9) pantoprazol	2,82	1,30	2,20	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30)
	1,33	1,42	2,55	EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30)
(10) omeprazol	3,42	1,30	2,18	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30)
	2,08	1,32	2,45	EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30)
(11) rabeprazol	1,70	1,30	1,70	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30)
	2,00	1,29	2,27	EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30)

A utilização de etanol ao invés de metanol, como modificador do modo reverso de eluição, proporcionou uma maior eficiência na separação dos compostos quirais, por apresentar separações com maior enantiorresolução.

O uso de EtOH/H<sub>2</sub>O como fase móvel na DEAVB pode ser uma alternativa para as análises quantitativas dos fármacos PPI's, já que além dos ótimos fatores cromatográficos que foram obtidos, trata-se de uma fase móvel pouco agressiva ao meio ambiente.

No Anexo I (p. 106), é possível verificar os cromatogramas (20-27) das separações dos sulfóxidos quirais obtidas pela DEAVB, no modo reverso de eluição utilizando-se MeOH e EtOH como modificadores orgânicos.

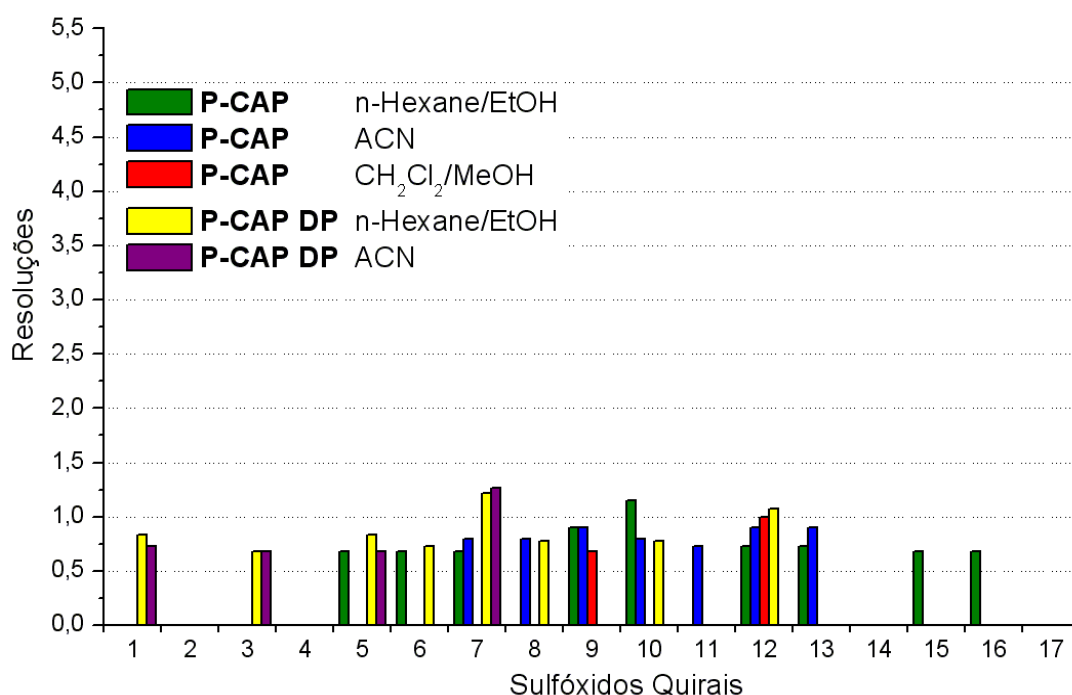
### 3.1. 3 - Comparação da (R,R)P-CAP<sup>®</sup>, (R,R)P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB.

As três colunas de polímeros sintéticos mostraram poder de discriminação quiral à série de sulfóxidos estudada. De maneira geral, separaram dezesseis (94%) dos dezessete compostos, apenas o sulfóxido (17) não foi discriminado.

O metil naftil sulfóxido (7) foi melhor separado pela (R,R)P-CAP-DP<sup>®</sup>, apesar desta coluna apresentar baixo poder de discriminação quiral para os outros compostos da série. Os sulfóxidos (5, 6, 15, e 16), com pequeno volume estérico,

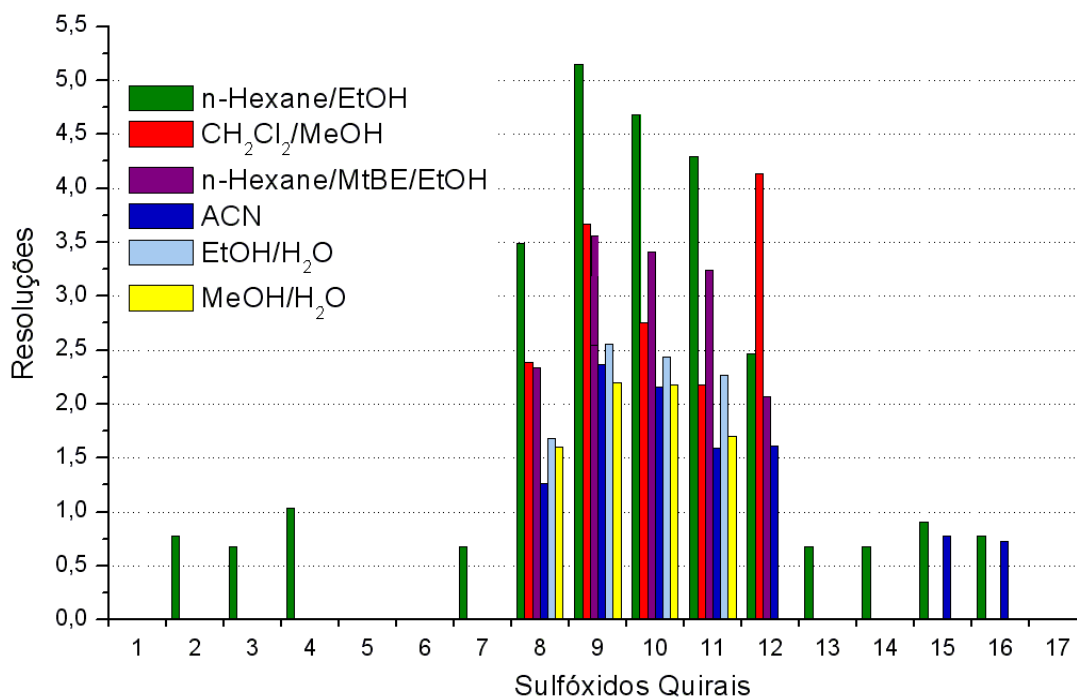
foram separados com baixo  $R_s$  pela  $(R,R)$ P-CAP<sup>®</sup> no modo normal e no modo polar orgânico.

A DEAVB foi a CSP que mostrou o maior poder de enantiorresolução das três colunas de polímero sintético e separou 13 dos 17 sulfóxidos quirais avaliados. Além disso, foi capaz de separar o modafinil (12) com diferentes composições de fases móveis orgânicas e os fármacos PPI's (8-11) com todas as composições de fases móveis orgânicas e aquosas<sup>159</sup> (tabela 3.3, p.41). Estes resultados indicam que as separações não ocorrem apenas devido as interações CSP-sulfóxido, mas também é função das interações estéricas entre o adsorvente e o compostos quiral. Desta forma, os compostos com grupos substituintes grandes, próximos ao centro estereogênico, são melhores discriminados pela DEAVB. Os gráficos das figuras 3.12 e 3.13 sumarizam as separações obtidas.



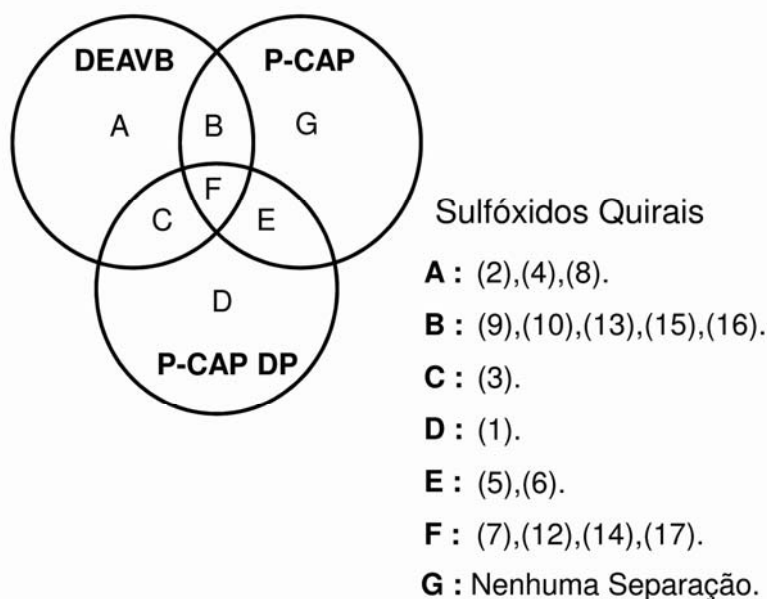
**Figura 3. 12** – Gráfico ilustrativo das enantiorresoluções obtidas para a série de sulfóxidos quirais na  $(R,R)$ P-CAP<sup>®</sup> e na  $(R,R)$ P-CAP-DP<sup>®</sup>





**Figura 3. 13** - Gráfico ilustrativo das enantiorresoluções obtidas para a série de sulfóxidos quirais na DEAVB

As três colunas de polímeros sintéticos apresentaram enantiosseletividades complementares, para a série de sulfóxidos quirais avaliada. Quatro misturas enantioméricas (1, 2, 4 e 14) foram separadas apenas, por uma das colunas cromatográficas. A figura 3.14 apresenta uma ilustração que exprime os compostos separados por mais de uma CSP.



**Figura 3. 14** - Gráfico ilustrativo da complementariedade de resoluções das colunas (R,R)P-CAP<sup>®</sup>, (R,R)P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB

A ordem de eluição dos enantiômeros foi a mesma para as três colunas de polímero sintético, em todas as composições de fases móveis avaliadas. O (-)-enantiômero foi sempre o composto com menor fator de retenção, enquanto que o (+)-enantiômero o composto mais retentivo.

### 3. 2 - Síntese e preparo de CSPs de polissacarídeo imobilizado.

Os métodos de síntese de CSPs de polissacarídeos, adsorvidos em sílica gel, são desenvolvidos através da solubilização prévia do seletor quiral em solventes, tais como: tetraidrofurano (THF) e/ou diclorometano<sup>49,178</sup>, o que impossibilita, portanto o uso destes solventes como fase móvel. Este fato faz com que as CSPs de polissacarídeos adsorvidos possuam limitações, quanto à escolha de eluentes, já que a utilização de solventes, como: THF, dimetil sulfóxido, acetona, acetato de etila (EA), metil *t*-butil éter (M*t*BE) e diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), causam a solubilização do seletor quiral, e em consequência o aumento da pressão da coluna cromatográfica<sup>61,80</sup>.

As CSPs, de polissacarídeos imobilizados, surgiram no intuito de permitir a utilização de uma maior variedade de solventes como fase móvel.<sup>32,36</sup> A livre escolha de fase móvel pode ser um atributo importante para as resoluções enantioméricas em LC, pois permite que novos perfis de enantioseparação sejam obtidos. Além disso, proporciona a escolha do solvente em que a mistura enantiomérica é injetado, de forma, a evitar a racemização e/ou aumentar a solubilidade<sup>61</sup>.

Apesar dos processos de imobilização de polissacarídeos no suporte, alterarem a conformação natural do seletor quiral, diminuindo geralmente seu poder de enantiodiscriminação, o desenvolvimento de novas CSPs imobilizadas de polissacarídeos tem sido alvo intenso de pesquisa, por proporcionar maior robustez e aplicabilidade às colunas cromatográficas<sup>61</sup>.

A CSP tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose adsorvido em sílica gel é conhecida por ser a mais eficiente das CSPs desenvolvidas. A análoga imobilizada no suporte mostra-se estável frente a solventes não usuais em LC e eficaz na discriminação quiral de diversas classes de compostos<sup>197</sup>.

Por sua vez, o seletor quiral de polissacarídeo tris-3,5-dimetoxifenil carbamato de amilose adsorvido em sílica gel, desenvolvido por Cass e

colaboradores, mostra-se muito eficiente na resolução de compostos como sulfóxidos<sup>52</sup>, álcoois<sup>58</sup> e xantolignóides<sup>198</sup>. Com isso, esta CSP já foi utilizada com sucesso para a quantificação de fármacos em plasma humano<sup>58,60</sup> e para estudos teóricos de mecanismos de retenção<sup>199</sup>.

Desta forma, têm-se o interesse de se obter a CSP de tris-3,5-dimetoxifenil carbamato immobilizado na superfície da sílica gel, para expandir sua capacidade de enantiorresolução e, conseqüentemente, a aplicabilidade deste seletor quiral. Para isso, utilizou-se inicialmente o tris-3,5-dimetilfenil carbamato de amilose como modelo, para desenvolver um eficiente método de imobilização, já que os reagentes utilizados em sua síntese são mais acessíveis.

### 3.2. 1 - Síntese dos tris-arilcarbamatos de amilose

Os tris-aril carbamatos de amilose adsorvidos<sup>48,64</sup> ou imobilizados<sup>80</sup> na superfície da sílica gel foram, exaustivamente, investigados quanto ao poder de discriminação quiral, para as mais distintas classes de misturas enantioméricas, demonstrando grande sucesso.

Os carbamatos de amilose são preparados a partir da reação do polissacarídeo com o isocianato, utilizando piridina como solvente e condições anidras, já que os isocianatos reagem muito facilmente com a água gerando derivados de uréia como produto. Os carbamatos são formados através do ataque nucleofílico das hidroxilas da amilose aos grupos carbonila do isocianato, havendo assim a substituição dos grupos hidroxilas (Figura 3.15).

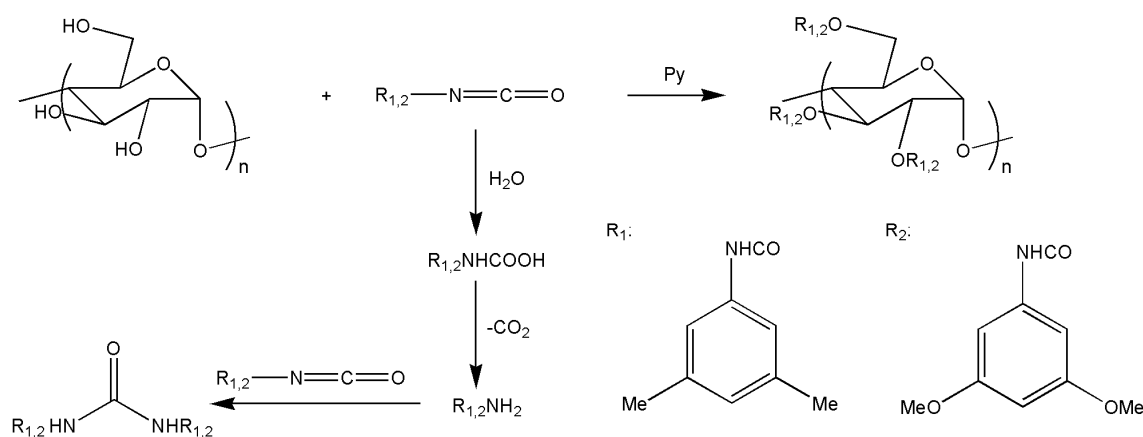
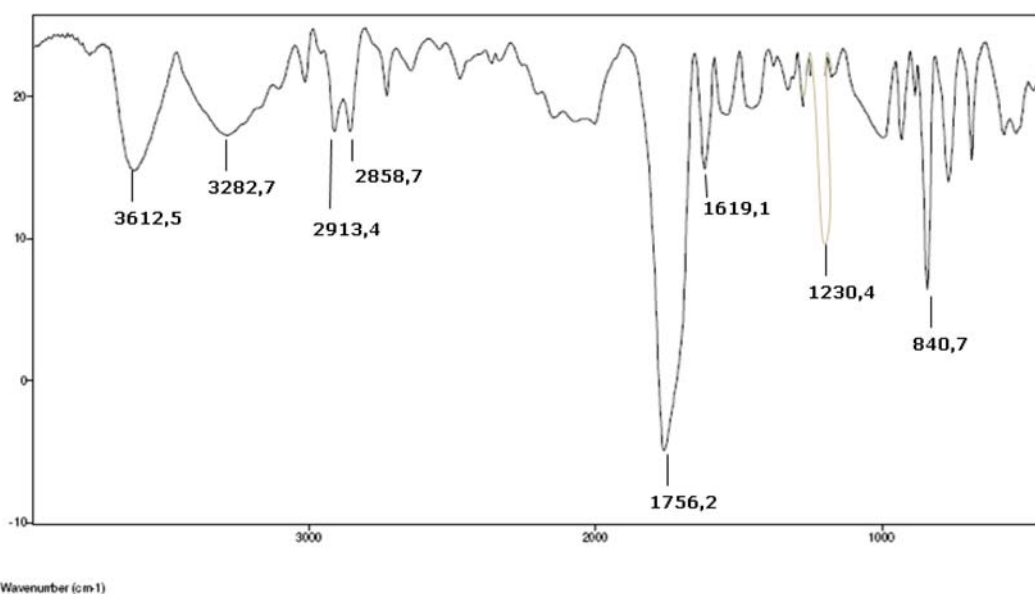


Figura 3. 15 - Carbamatos sintetizados

Inicialmente, dois tris-arilcarbamatos foram sintetizados para se preparar as fases estacionárias de polissacarídeo imobilizado, o tris-3,5-dimetilfenilcarbamato e o tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose. Ambos foram caracterizados através de espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar. A figura 3.16 demonstra o espectro de infravermelho obtido para o tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose.



**Figura 3. 16** - Espectro no Infravermelho tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose

Os espectros no infravermelho dos carbamatos de amilose mostram absorção próximas à  $1720\text{ cm}^{-1}$ , de intensidade forte, característica de carbonila, à  $1220\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação carbono/nitrogênio (C-N) e, por fim, absorção em  $3300\text{ cm}^{-1}$ , característica da função N-H.

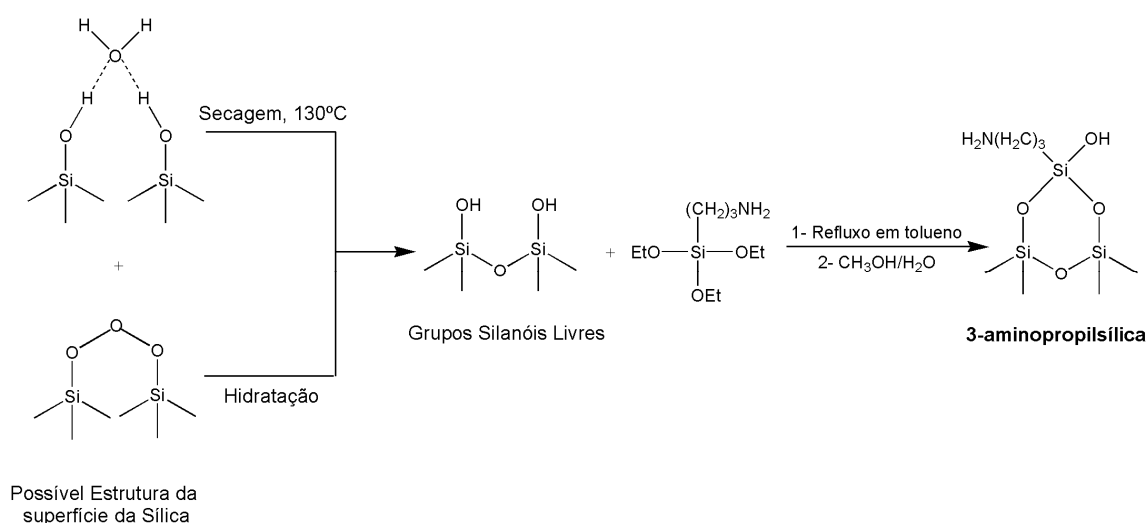
Os percentuais de derivação dos grupos hidroxilas foram investigados através dos resultados de análise elementar e mostraram uma derivação quase completa, com percentuais similares aos encontrados na literatura<sup>200</sup> (Parte Experimental, p. 77).

### 3.2. 2 - Modificação da Superfície da Sílica

Um fator importante no uso de sílica como suporte em cromatografia líquida é a natureza química de sua superfície, principalmente, para fases adsorvidas, que mantem os seletos quirais estáveis em suas superfícies, através de interações intermoleculares entre os seletos quirais e a sílica<sup>80</sup>.

Com a finalidade de diminuir a polaridade da sílica e aumentar as ligações de hidrogênio com os carbamatos usados para o preparo das CSPs, a superfície do suporte foi modificada por reação com 3-aminopropiltrietoxissilano<sup>201</sup>.

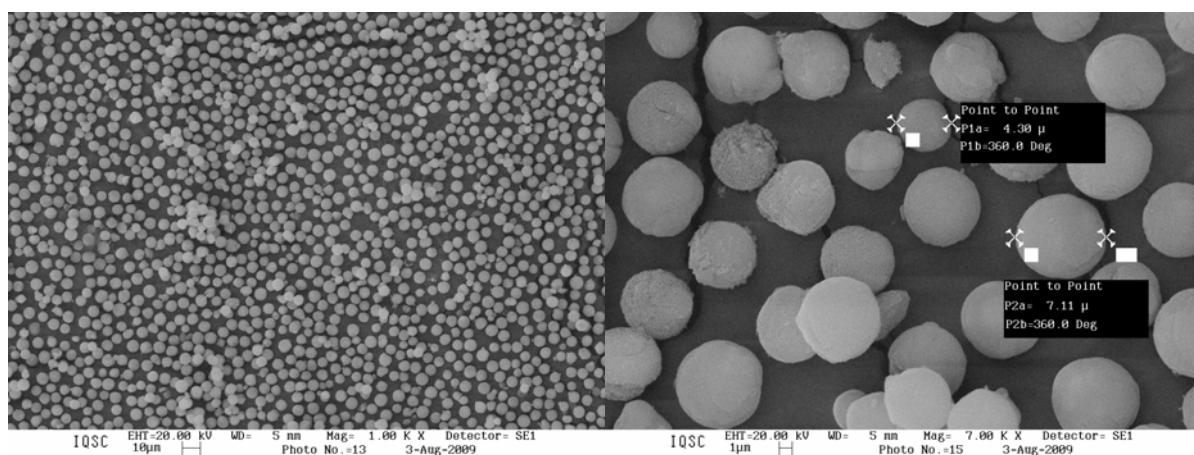
Para isso, efetuou-se o pré-tratamento da sílica secando-a em uma temperatura próxima a 120°C e, em seguida, hidratando-a em um ambiente de umidade controlada – solução saturada de LiCl em dessecador, com umidade relativa de, aproximadamente, 12%. Desta forma, obteve-se a formação dos grupos silanóis livres e a sílica foi modificada através da reação de silanização com 3-aminopropiltrietoxissilano (Figura 3.17)<sup>201</sup>.



**Figura 3. 17 - Síntese da 3-aminopropilsilica**

Inicialmente, sílica Nucleosil (500Å, 7µm) foi derivada a 3-aminopropilsilica para ser utilizada como suporte das CSPs (CSP 1-CSP 8), o produto resultante (sílica – APS) foi submetido a análise elementar, obtendo-se resultados similares aos encontrados na literatura<sup>202</sup>.

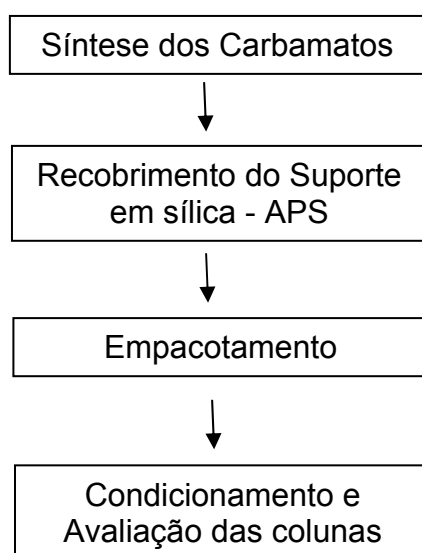
Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível identificar o tamanho da partícula do suporte e sua distribuição espacial (Figura 3.18). Tamanho de partículas semelhante e distribuição espacial regular, sem formação de aglomerados, resultam em colunas cromatográficas com alta permeabilidade e em consequência alta eficiência e durabilidade<sup>201</sup>.



**Figura 3. 18** – Análise de distribuição dos tamanhos da partícula sílica – APS

### 3.2. 3 - Preparação das CSPs de polissacarídeos quirais adsorvidos (CSP 1 e CSP 2)

O preparo das colunas quirais de derivados de polissacarídeos, adsorvidos em 3-aminopropilsílica, foi efetuado conforme procedimento (Figura 3.19) já estabelecido por Cass e colaboradores<sup>49,178</sup>. Este procedimento foi efetuado, no intuito, de se ter colunas cromatográficas análogas as CSPs de polissacarídeos imobilizados, proporcionando assim a comparação do poder de discriminação quiral das CSPs de polissacarídeos adsorvidos e imobilizados.



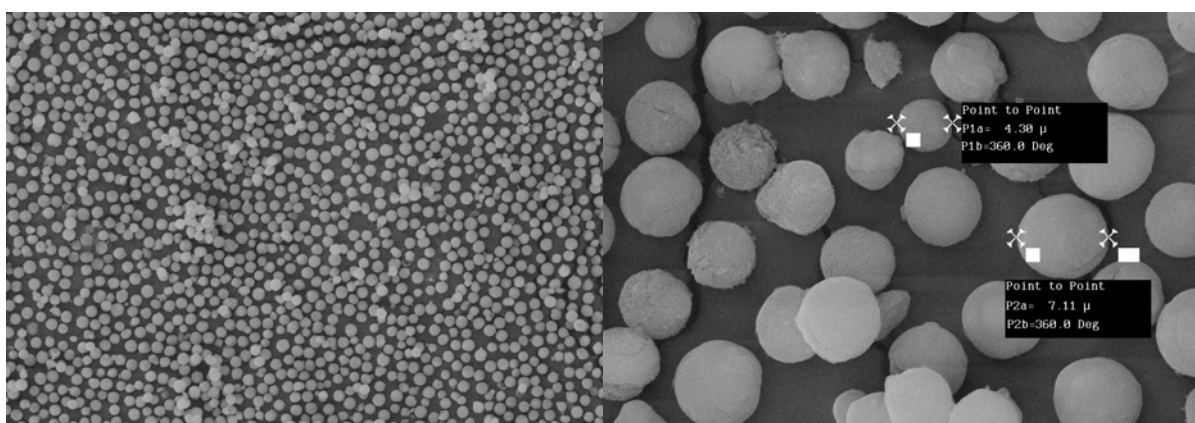
**Figura 3. 19** - Metodologia para a preparação das CSPs de polissacarídeos adsorvidos (CSP 1 - 2)

O recobrimento do suporte foi efetuado a 20% g/g com tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (CSP 1) e com tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose (CSP 2).

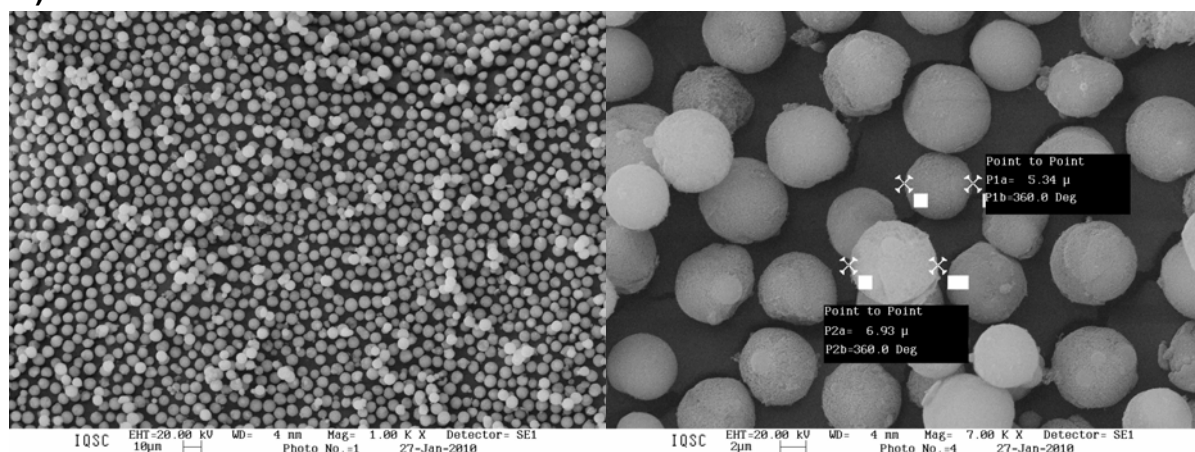
Inicialmente, a sílica derivada foi refluxada em THF durante 30min em um balão com formações côncavas, para se obter uma suspensão homogênea do suporte. O carbamato, previamente solubilizado em THF, foi adicionado à sílica em suspensão e o solvente foi evaporado, lentamente, em rotaevaporador. Nesta etapa do processo ocorre a adsorção do seletor quiral no suporte, principalmente, pela interação do tipo ligação de hidrogênio.

O produto, recoberto e seco, foi peneirado lentamente para a uniformização do tamanho das partículas e submetido à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que demonstrou distribuição e tamanho regular das partículas das CSPs (Figura 3.20).

a)



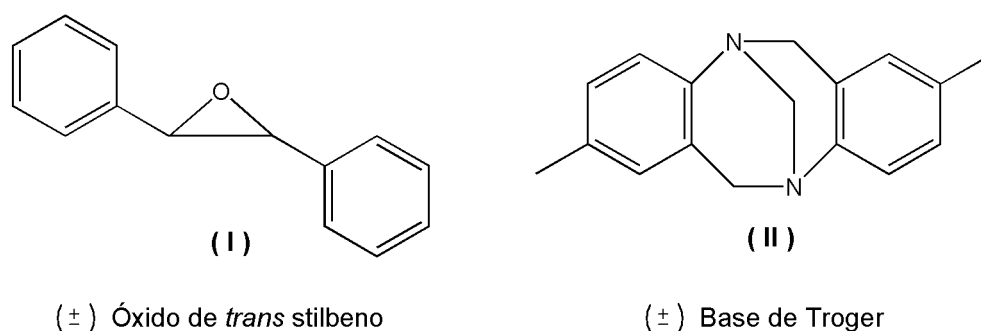
b)



**Figura 3. 20** - Análise de distribuição dos tamanhos da partícula a) tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (CSP 1) b) tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose (CSP 2)

As CSPs preparadas foram suspensas em *n*-hexano/2-propanol (50:50) e as colunas foram empacotadas em *n*-hexano/2-propanol (90:10), sob pressão aproximada de 7500 psi.

O poder de discriminação quiral, das colunas de CSPs de polissacarídeos adsorvidos, foi avaliado através da análise das separações obtidas para os compostos padrões ( $\pm$ ) óxido *trans*-stilbeno e ( $\pm$ ) base de Troger (Figura 3.21). A performance foi avaliada considerando-se os parâmetros cromatográficos: fator de retenção ( $k$ ), fator de separação ( $\alpha$ ) e resolução ( $R_s$ ).



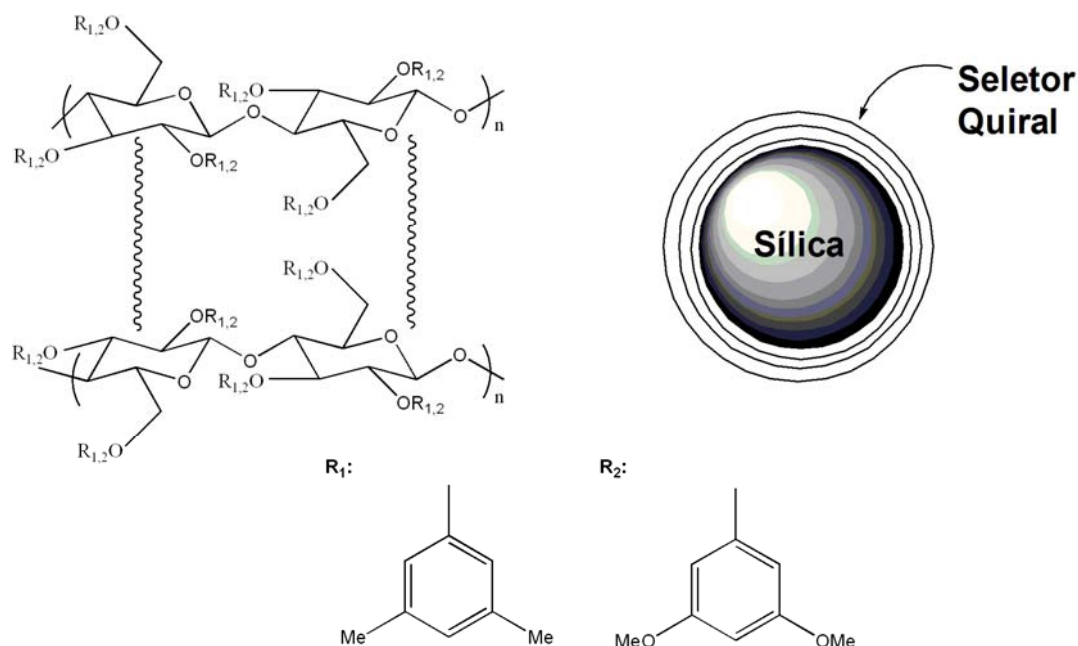
**Figura 3. 21** - Estruturas dos padrões utilizados na avaliação das colunas quirais

As duas colunas cromatográficas apresentaram excelentes valores para os parâmetros avaliados e boa simetria de bandas cromatográficas. Desta forma, o seletor quiral foi eficientemente preparado e adsorvido na sílica – APS.

#### **3.2. 4 - Preparo e Avaliação das CSPs de polissacarídeos quirais imobilizados. (CSP 3 – CSP 8)**

A imobilização de derivados de polissacarídeos no suporte pode ser efetuada através de métodos fotoquímicos ou térmicos, em ambos os casos, os seletores quirais reticulados no suporte não possuem grupos polimerizáveis em suas estruturas químicas, desta forma a imobilização é decorrente de ligações intercruzadas entre as unidades de açúcares<sup>69-72</sup> (Figura 3.22).

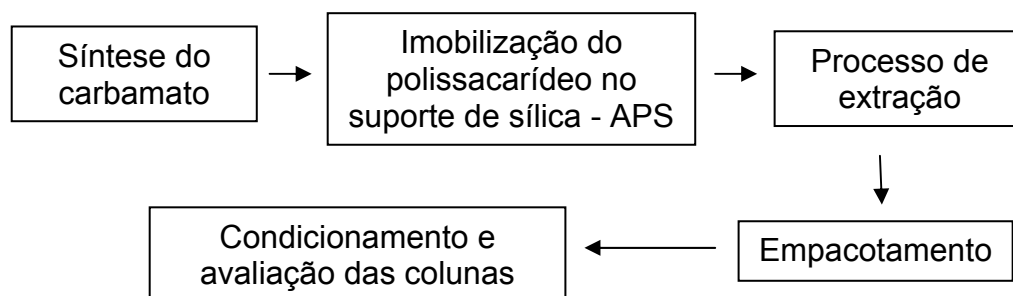




**Figura 3. 22** - Esquema da CSP de polissacarídeo imobilizado por reticulação

Inicialmente, investigou-se o método de síntese da CSP de polissacarídeo imobilizado para o tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (CSP 3), baseado nos métodos publicados na literatura por Francotte e colaboradores<sup>69,70,72</sup>. Como dito anteriormente, os reagentes envolvidos em sua síntese são economicamente mais viáveis do que os envolvidos para o preparo da tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose.

No total, foram preparadas quatro (CSP 3, CSP 4, CSP 5 e CSP 6) colunas cromatográficas através de métodos por imobilização térmica, que consiste no uso de excesso do iniciador de radical, azoisobutironitrila (AIBN), para a formação das ligações intercruzadas (Figura 3.23).



**Figura 3. 23** – Esquema do preparo das colunas quirais de polissacarídeo imobilizado (CSP 3 e CSP 4).

A imobilização do seletor quiral no suporte foi efetuada pela solubilização do carbamato e iniciador radicalar (AIBN) em THF. Esta solução foi adicionada em suspensão de sílica – APS, no balão especial com formações concâvas. O solvente foi evaporado em rotaevaporador e, em seguida, a mistura reacional foi submetida ao tratamento térmico, totalmente isento de solvente. Nesta etapa do processo, o aquecimento a 120°C sob atmosfera de N<sub>2</sub>, foi realizado para reticular o seletor quiral no suporte.

O produto, recoberto e seco, foi submetido à extração Soxlet com THF para ocorrer a solubilização do carbamato não imobilizado, durante o tratamento térmico. Em seguida, suspendeu-se a CSP em *n*-hexano, para se fazer a solubilização de produtos de degradação do polissacarídeo, já que a temperatura utilizada no método de imobilização térmico é muito elevada.

Após o processo de peneiramento a CSP 3 foi submetida ao empacotamento com *n*-hexano/2-propanol (90:10), a 7500psi. Nesta fase, observou-se tempo de empacotamento muito elevado, superior a 10 horas, resultando em uma pressão de coluna cromatográfica muito alta, o que impossibilitou a avaliação do poder de discriminação quiral da coluna CSP 3.

Aglomerados de partículas levam a menor permeabilidade e em consequência a altas pressões<sup>201</sup>. Devido às condições de reação, ao qual foi submetido o seletor quiral durante o processo de imobilização térmico, não foi possível a obtenção da coluna cromatográfica (CSP 3).

Diante disso, o preparo da CSP 4 foi realizado de maneira semelhante ao da CSP 3 (figura 3.23), porém durante o processo de imobilização do seletor quiral, a evaporação do solvente foi realizada de maneira lenta idêntica ao realizado para o preparo das CSPs de polissacarídeo adsorvido (CSP 1-2). Assumiu-se que, desta forma, a adsorção do polissacarídeo no suporte iria ocorrer previamente, aumentando o rendimento da formação das ligações inter cruzadas e diminuindo o desenvolvimento de aglomerados de partículas.

A coluna CSP 4 apresentou menor tempo de empacotamento do que a coluna CSP 3, e em consequência menor pressão. Sendo assim, foi possível avaliar o poder de discriminação quiral desta coluna, através da análise das separações obtidas para os compostos padrões (±) óxido *trans*-stilbeno e (±) base de Troger (Figura 3.21).

Analisando os resultados apresentados na tabela 3.6, observa-se que a coluna CSP 4 apresentou menor eficiência do que a análoga CSP 1. A coluna CSP 4 apresentou menor enantiorresolução e enantiosseletividade para a separação dos padrões avaliados. A literatura, de modo geral, mostra que as colunas de polissacarídeos imobilizados apresentam menor capacidade de discriminação quiral, quando comparadas com as colunas análogas de polissacarídeos adsorvidos<sup>61</sup>. Os cromatogramas das separações obtidas estão presentes no Anexo II (p. 112).

**Tabela 3. 6:** Avaliação das colunas cromatográficas CSP 1, CSP 4, CSP 5 e CSP 6.

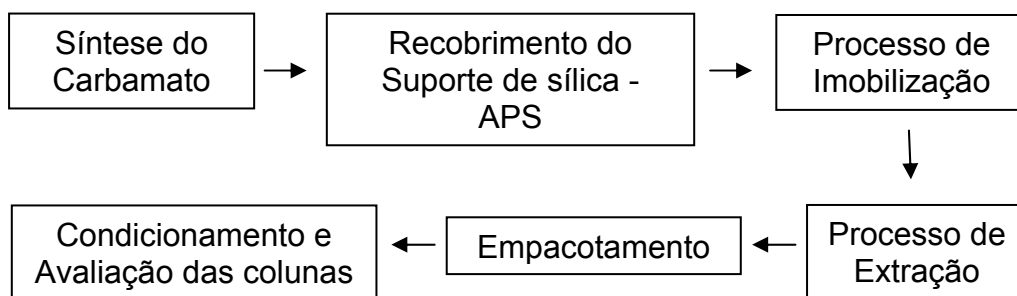
		CSP 1	CSP 4	CSP 5	CSP 6
(I) <sup>a</sup>	k' <sub>1</sub>	0,60	0,52	0,43	0,31
	α	2,81	1,85	2,41	1,84
	R <sub>s</sub>	6,16	1,32	5,24	1,41
(II) <sup>a</sup>	k' <sub>1</sub>	1,03	0,90	0,80	0,59
	α	1,64	1,52	1,58	1,47
	R <sub>s</sub>	3,17	1,19	3,04	1,25
<b>Omeprazol<sup>b</sup></b>	k' <sub>1</sub>	14,98			5,30
	α	1,48	-	-	1,34
	R <sub>s</sub>	2,78			1,40
<b>Albendazol sulfóxido<sup>b</sup></b>	k' <sub>1</sub>	13,45			6,13
	α	1,78	-	-	1,63
	R <sub>s</sub>	3,92			2,10

<sup>a</sup> Fase Móvel: *n*-hexano/2- propanol (95:05), vazão:0,5mL.min<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> Fase móvel: *n*-hexano/etanol (85:15), vazão: 0,5mL.min<sup>-1</sup>.

Entretanto, durante a avaliação da coluna CSP 4 com os padrões (I-II) foi observado o aumento da pressão da coluna cromatográfica, o que levou a interrupção das análises nesta coluna. O aumento da pressão foi atribuído à baixa eficácia do método térmico de imobilização proposto, o que resultou na formação de aglomerados de partículas e na ineficiente reticulação das partículas da sílica pelo polissacarídeo derivado.

Comparando os métodos de preparo das colunas CSP 3 e CSP 4, verifica-se que a adsorção prévia do carbamato na superfície do suporte, antes de se realizar o procedimento de imobilização, possibilita a menor formação de

aglomerados de partículas. Desta forma, a CSP 5 foi desenvolvida através do recobrimento prévio do suporte (Figura 3.24).

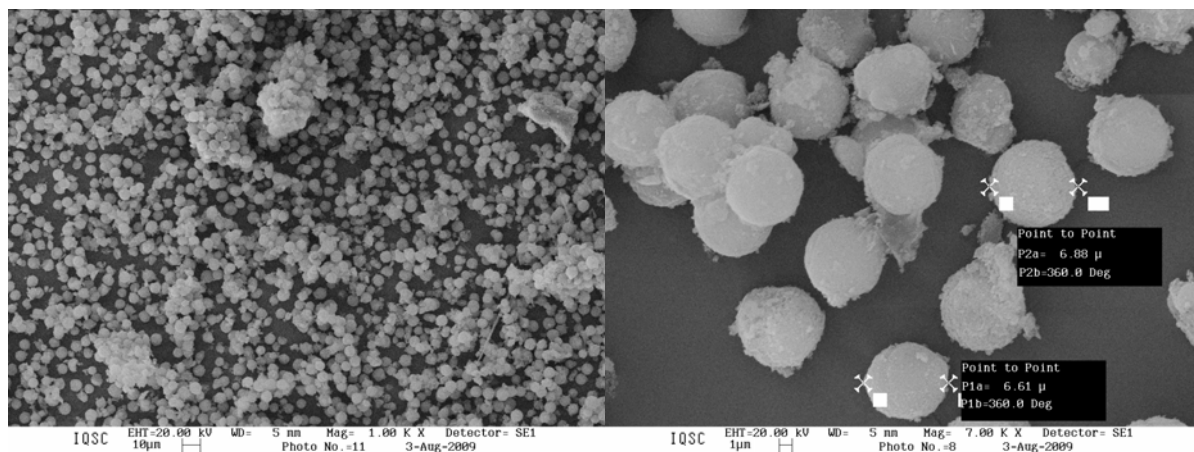


**Figura 3. 24** – Esquema do preparo de preparo das colunas quirais de polissacarídeo imobilizado (CSP 5 e CSP 6).

O recobrimento do suporte foi realizado de forma análoga ao desenvolvido para o preparo da coluna CSP 1. O produto resultante foi suspenso em solução metanólica de AIBN e submetido ao processo de imobilização térmica, conforme o procedimento feito para a CSP 4. A nova coluna cromatográfica (CSP 5) apresentou um menor tempo de empacotamento e pressão de coluna inferior ao obtido pela CSP 4, indicando menor formação de aglomerados de partículas.

A coluna CSP 5 foi avaliada com os padrões I e II (Figura 3.21), demonstrando superior poder de enantiodiscriminação quando comparada com a CSP 4. Ao comparar os parâmetros cromatográficos obtidos com a coluna CSP 5 aos da coluna CSP 1, tem-se valores semelhantes de enantiosseletividade e de enantiorresolução, mesmo com inferior fator de retenção (Tabela 3.6, p. 60).

Apesar de apresentar um alto poder de discriminação quiral para os compostos avaliados, a CSP 5 apresentou alta assimetria das bandas cromatográficas, para o padrão I ( $As_1=0,40$ ;  $As_2=0,30$ ) e para o padrão II ( $As_1=0,60$ ;  $As_2=0,88$ ) (Anexo II, p. 113). A presença de resíduos aquirais, proveniente da degradação do carbamato durante o procedimento de imobilização térmica e a formação de aglomerados de partículas causam ineficiência na transferência de massa pelo seletor quiral, resultando em bandas assimétricas. A Figura 3.25 apresenta a análise de MEV efetuada para a CSP 5.



**Figura 3. 25** - Análise de distribuição dos tamanhos da partícula da CSP 5.

No intuito de aumentar a eficiência do intercruzamento e diminuir a degradação do carbamato de polissacarídeo, a CSP 6 foi preparada de modo similar a CSP 5 (Figura 3.24), porém com redução da temperatura e aumento do tempo reacional.

A coluna CSP 6 apresentou poder de discriminação quiral para os compostos padrões I e II (Figura 3.21) e razoável simetria das bandas cromatográficas, padrão I ( $As_1= 0,85$ ;  $As_2= 0,90$ ) e padrão II ( $As_1= 1,10$ ;  $As_2= 0,91$ ) (Anexo II, p. 114). É importante observar, entretanto, que o fator de retenção ( $k$ ) para as separações obtidas pela coluna CSP 6 é inferior ao das separações obtidas pela CSP 1, com isso o fator de separação ( $\alpha$ ) e de resolução ( $R_s$ ) são valores satisfatórios, apesar de inferiores aos obtidos pela CSP 1 (Tabela 3.6, p.60).

Para avaliar se a coluna CSP 6 levaria ao aumento da pressão do sistema cromatográfico, quando submetida a rotina de análises, os fármacos omeprazol e alendazol sulfóxido foram avaliados no modo normal de eluição, já que as colunas análogas de polissacarídeos adsorvidos apresentam grande poder de discriminação quiral para estes compostos<sup>85,184</sup> (Tabela 3.6, p.60).

Foram obtidos valores de parâmetros cromatográficos satisfatórios, para as separações dos fármacos pela CSP 6 no modo normal de eluição, especialmente, para o alendazol sulfóxido (tabela 3.6, p. 60). Os cromatogramas, presentes no Anexo II (p. 115), mostram elevada assimetria de banda - omeprazol ( $As_1=1,50$  ;  $As_2=0,86$ ) e alendazol sulfóxido ( $As_1=3,0$  ;  $As_2=1,83$ ) - devido ao elevado tempo de análise, decorrente da utilização de grande quantidade de hidrocarboneto na composição de fase móvel.

Ao comparar as separações dos fármacos quirais obtidas pela coluna CSP 1 e CSP 6 (Tabela 3.6, p. 60), observa-se que a coluna imobilizada teve fatores de retenção, de separação e enantiorresolução inferiores aos obtidos pela análoga adsorvida.

A CSP 6 apresentou poder de discriminação quiral para os compostos avaliados e robustez para as análises no modo normal de eluição (hidrocarboneto/álcool), sem elevar a pressão do sistema cromatográfico. Sendo assim, avaliou-se esta coluna com solventes cromatográficos não usuais em LC, no intuito de se analisar a eficiência do processo de imobilização térmica de polissacarídeos derivados em sílica - APS.

Ao utilizar *n*-hexano/MtBe/EtOH (30:45:25) como fase movel, foi observado o grande aumento de pressão da coluna cromatográfica, interrompendo as análises. Este comportamento foi atribuído a ineficiente reticulação do seletor quiral no suporte, o que causou a solubilização do carbamato de polissacarídeo e o aumento da pressão.

O procedimento de imobilização térmico não produziu eficiência da reticulação do seletor quiral no suporte, produzindo aglomerados de partículas, produtos de degradação do polissacarídeo e/ou a não formação das ligações inter cruzadas. Diante do desafio de produzir uma eficiente CSP de polissacarídeo imobilizado, alterou-se o procedimento de imobilização, de térmico para fotoquímico (CSP 7). No total foram preparadas duas colunas (CSP 7 e CSP 8) de derivados de polissacarídeos imobilizados fotoquimicamente na sílica – APS Nucleosil.

O método de preparo da CSP 7 foi similar ao efetuado para a CSP 6 (Figura 3.24), porém ao invés de se utilizar o procedimento de imobilização térmico, utilizou-se o processo de imobilização fotoquímico. Este método consiste na irradiação de uma suspensão de carbamato de polissacarídeo adsorvido em sílica, para formar as ligações inter cruzadas.

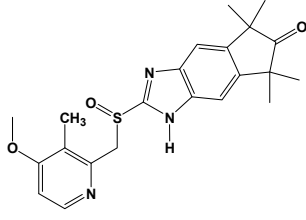
Inicialmente, o poder de discriminação quiral da coluna CSP 7 foi analisado através da avaliação dos padrões I e II (Figura 3.21) no modo normal de eluição. Surpreendentemente, os compostos não foram enantiorresolvidos, divergindo do comportamento observado para as outras colunas preparadas.

A diferente enantiosseletividade, entre colunas de polissacarídeo imobilizado e de polissacarídeo adsorvido, é algo inerente do processo de imobilização do seletor quiral. Com isso, pode ocorrer o aumento, diminuição ou

perda total no poder de enantiorresolução, dependendo da forma como o carbamato é imobilizado ao suporte, principalmente, devido à alteração na conformação espacial do polissacarídeo<sup>61</sup>.

Apesar de não separar os padrões I e II, a coluna CSP 7 mostrou poder de discriminação quiral para fármacos omeprazol e albendazol sulfóxido no modo normal de eluição (Tabela 3.7; cromatogramas presentes no Anexo II p. 116). Isto exprime a presença de seletor quiral no suporte.

**Tabela 3. 7:** Avaliação das colunas cromatográficas CSP 1 e CSP 7.

		CSP 1	CSP 7
<b>Omeprazol<sup>a</sup></b>	$k'_1$	14,98	2,68
	$\alpha$	1,48	1,43
	$R_s$	2,78	1,39
<b>Albendazol sulfóxido<sup>a</sup></b>	$k'_1$	13,45	2,25
	$\alpha$	1,78	1,90
	$R_s$	3,92	3,48
 <b>Ro 18-5364<sup>b</sup></b>	$k'_1$		2,21
	$\alpha$	-	1,22
	$R_s$		1,05
<b>Albendazol sulfóxido<sup>c</sup></b>	$k'_1$		2,88
	$\alpha$	-	1,28
	$R_s$		0,68

<sup>a</sup> Fase móvel: *n*-hexano/etanol (85:15), vazão: 0,5mL.min<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> Fase Móvel: MfBE/EA/EtOH (68:28:04), vazão: 0,5mL.min<sup>-1</sup>. <sup>c</sup> MfBE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (49:49:2), vazão: 0,5mL.min<sup>-1</sup>.

O omeprazol foi melhor separado pela coluna CSP 1, coluna CSP 6 (Tabela 3.6, p.60) e coluna CSP 7 (Tabela 3.7), respectivamente, sendo a coluna CSP 7 a que apresentou o menor fator de retenção. Menor tempo de análise também foi observado para a separação do albendazol sulfóxido pela coluna CSP 7, porém superior resolução ( $R_s$ ) foi alcançada por esta coluna, quando comparada com as obtidas pela CSP 1 e CSP 6.

Como a coluna CSP 7 demonstrou diferenciação enantiomérica para os fármacos quirais e estabilidade para as separações efetuadas no modo normal de eluição, avaliou-se a eficiência do intercruzamento do carbamato na sílica – APS. Desta forma, analisou-se o poder de enantiorresolução desta coluna pelo uso de solventes que solubilizam o carbamato de polissacarídeo adsorvido.

Além de demonstrar poder de discriminação quiral para os fármacos quirais Ro 18-5364 e albendazol sulfóxido em condições de eluentes não usuais em LC (tabela 3.7; cromatogramas presente no Anexo II p. 117), a coluna CSP 7 também apresentou estabilidade frente aos solventes metil *tert*-butil éter, diclorometano e acetato de etila.

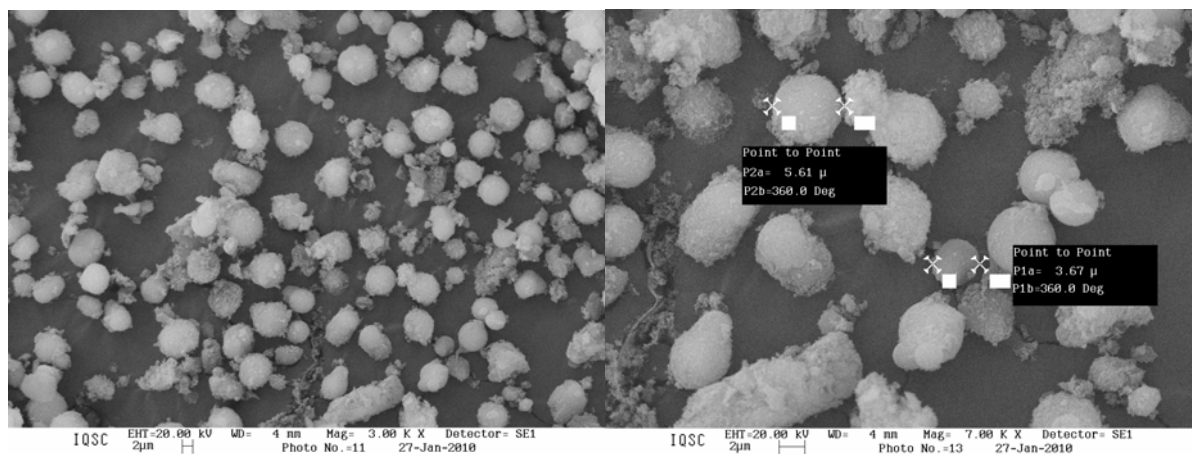
Apesar da comprovada estabilidade da coluna CSP 7 frente aos solvente não usuais em LC, as separações quirais obtidas exprime a presença de uma baixa concentração de seletor quiral imobilizado na superfície do suporte, provavelmente, devido ao baixo tempo de exposição a radiação ultravioleta.

O procedimento de imobilização fotoquímico mostrou-se um método mais brando e eficiente do que o processo térmico, pois proporcionou a imobilização do seletor quiral tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose na superfie da sílica – APS, sem gerar produtos de degradação. Com isso, propôs-se a imobilização fotoquímica do derivado de polissacarídeo tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose na sílica – APS, por se tratar de um seletor quiral não comercial e ainda não imobilizado na superfície do suporte.

O método realizado para o preparo da coluna cromatográfica, de tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica – APS (CSP 8), foi similar ao desenvolvido para a CSP 7 (figura 3.24), porém o procedimento fotoquímico foi feito com um maior tempo de exposição a radiação ultravioleta, sendo de 48 horas ao invés de 24 horas.

Este novo método de preparo resultou em uma coluna quiral com pressão muito elevada, devido a formação de aglomerados de partículas (Figura 3.26). Desta forma, a avaliação do poder de discriminação quiral do tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose imobilizado no suporte não foi realizada.





**Figura 3. 26** - Análise de distribuição dos tamanhos da partícula da tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose (CSP 8)

O procedimento de imobilização fotoquímico pode ser utilizado para o preparo de colunas de derivados de polissacarídeos imobilizados em sílica – APS. Para isso, é necessário realizar estudos que determinem o tempo eficaz de exposição do seletor quiral à radiação ultravioleta, de maneira a proporcionar colunas cromatográficas robustas e com elevado poder de discriminação quiral.

## 4 – Conclusões e Perspectivas

As colunas de polímero sintético (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>, (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB foram avaliadas no modo multimodal para a série de dezessete sulfóxidos quirais e mostraram complementaridade, por apresentarem diferente enantiosseletividade.

De maneira geral, a DEAVB foi a coluna que demonstrou o maior poder de discriminação quiral para os compostos avaliados, especialmente, para os fármacos quirais omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol e modafinil, os quais foram discriminados com excelente enantiorresolução nas mais diversas composição de fases móveis.

O modo reverso de eluição foi investigado, pela primeira vez, nas colunas de polímero sintético. Utilizou-se metanol ou etanol como modificadores orgânicos e ambos proporcionaram separações com linha de base dos compostos omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol na coluna DEAVB. O uso de etanol/H<sub>2</sub>O, uma fase móvel pouco agressiva ao meio ambiente, é uma alternativa para o desenvolvimento de métodos bioanalíticos destes fármacos quirais.

As fases móveis não usuais em LC foram também avaliadas com sucesso nas colunas de polímero sintético que demonstraram estabilidade. A melhor separação para o fármaco modafinil foi obtida com o uso de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99:01) na coluna DEAVB, esta composição de fase móvel também proporcionou boa separação do modafinil na (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup>.

Métodos de imobilização térmica de tris-carbamatos de polissacarídeo em sílica – APS Nucleosil macroporosa foram estudadas. Foi observada baixa eficiência no intercruzamento do tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose. A necessidade de se utilizar alta temperatura para reticular o seletor quiral na sílica, causou a degradação do carbamato de polissacarídeo e a formação de aglomerados de partículas, o que provocou altas pressões nas colunas obtidas e baixa eficiência.

A CSP tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizada na sílica – APS Nucleosil (CSP 7) foi desenvolvida através do método de imobilização fotoquímico, com 24 horas de irradiação. Este seletor quiral demonstrou estabilidade frente a solvente não usuais em LC e baixo poder de enantiorresolução.

O método de imobilização fotoquímico mostrou-se muito sensível ao tempo de irradiação do seletor quiral. A CSP do tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de

---

amilose imobilizado em sílica – APS Nucleosil (CSP 8) foi preparada com 48 horas de irradiação, esta coluna cromatográfica demonstrou elevado tempo de empacotamento e alta pressão.

Tem-se como perspectiva, efetuar a otimização do tempo de exposição dos derivados de polissacarídeos à radiação. Pressupõe-se que, desta forma, seja possível a obtenção de colunas de polissacarídeos imobilizados, com poder de discriminação quiral comparável as análogas adsorvidas e estáveis frente aos solventes cromatográficos não usuais.

## 5– Parte Experimental

### 5. 1- Generalidades

Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados no espectrômetro BOMEM MB-Series, em pastilha de KBr.

Os espectros na região do ultravioleta foram registrados em um espectrômetro Hitachi U-2001, utilizando-se de cubeta de quartzo e água destilada como solvente.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ , 200 e 400 MHz) e de Carbono 13 (RMN de  $^{13}\text{C}$  200 MHz), foram adquiridos em espectrômetros Bruker ARX-200 e DRX-400 (DQ-UFSCAR). Os solventes foram escolhidos dependendo da solubilidade da amostra. Os mais utilizados foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno de referência ( $\delta=0$ ). Os valores de deslocamento químico foram referidos em unidade de  $\delta$  e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram descritas da seguinte forma: s = singlete; d = dublete; dd= duplo dublete; t = tripleto; q = quadruplete; m = multiplete.

A pesagem dos reagentes foi feita em balança analítica AND, modelo HR200, com precisão de 0,0001g.

O progresso das reações de oxidação de sulfetos à sulfóxidos foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se sílica gel G (200- 430 mesh), segundo Stahl, da Merck A.G., e placas de ultra violeta do tipo DC Alufolien Kiesegel 60F- 254. A purificação dos sulfóxidos foi efetuada através de coluna de bancada com sílica gel G (200 – 430 mesh).

Os solventes utilizados nas reações de oxidação foram de grau HPLC (MALLINCKRODT e J. T. BAKER). Para concentrar as soluções orgânicas utilizou-se evaporadores rotatórios Büchi e Fisaton, operando à pressão reduzida (20-40 mmHg).

Os sulfetos tioanizol, 4-bromotioanizol 98%, 4-nitrotioanizol foram obtidos comercialmente pela ACROS e LANCASTER. Para a síntese dos alquil aril sulfetos e sulfetos benzimidazólicos foram utilizados os tióis (4)-metoxibenzenotiol 98%, p-toluenotiol 98%, o-toluenotiol 97%, 2-mercapto-5-metilbenzimidazol 99%, 2-

mercaptobenzilimidazol 98% e 2-mercaptopirimidina 98% todos obtidos pela ACROS; iodometano 99% ALDRICH; hidreto de sódio 60%wt dispersão em óleo mineral ALDRICH. O metilnaftil sulfeto foi gentilmente cedido pela Ms. Bianca R. Lopes, o 2-Benzenosulfenilmetil-4,4-dimetil-4,5-dihidrooxazol foi cedido pelo Prof. Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira (Universidade Federal do Paraná) e o modafinil foi cedido pelo Ms. Túlio Ferreira Galatti. O albendazol sulfóxido e o Ro 18-5364 foram cedidos pela Ouro Fino (Ribeirão Preto, SP, Brasil), o omeprazol pela Libbs (São Paulo, SP, Brasil), o lansoprazol pela Boehinger Ingelheim (São Paulo, SP, Brasil), o pantoprazol pela Eurofarma (São Paulo, SP, Brasil) e o rabeprazol pela Eisai Co., Ltd, Clinical Research Center (Tóquio, Japão).

Para a síntese dos complexos utilizou-se peróxido de hidrogênio (PA ACS) 30% v/v da Synth; ácido molibídico (ACS, pó cristalino) ACROS e n-óxido de piridina ACROS.

As análises cromatográficas foram feitas utilizando-se um cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kioto, Japão), composto por uma bomba modelo LC-10AD acoplado a um detector de ultravioleta SPD-10A, a um auto-injetor modelo SIL-10A e a um detector de dicroísmo circular da marca JASCO modelo CD-2095*plus*. Este equipamento está ligado a interfaces CBM-10A e os cromatogramas são registrados através do software Labsolutions.

Os parâmetros cromatográficos usados foram calculados da seguinte forma:  $k_1 = (t_1 - t_0)/t_0$ ;  $k_2 = (t_2 - t_0)/t_0$ ;  $\alpha = k_2/k_1$  e a Resolução,  $R_s = 1,8 (t_2 - t_1)/(w_2 + w_1)$ , onde  $t_0$  foi determinado pela injeção da fase móvel correspondente,  $t_1$  e  $t_2$  representam os tempos de retenção e  $k_1$  e  $k_2$  são os fatores de retenção do primeiro e do segundo enantiômero, respectivamente;  $w_1$  e  $w_2$  são as larguras do primeiro e do segundo enantiômero, medidas à meia altura;  $\alpha$  é o fator de separação e  $R_s$  é o fator de resolução dos enantiômeros. Por fim a assimetria das bandas cromatográficas ( $A_s$ ) foi calculada por:  $A_s = b_f/a_f$ , onde  $b_f$  e  $a_f$  são as meias larguras das bandas, medidas a 10% da altura do pico.

A sílica utilizada para o preparo das CSPs de polissacarídeo imobilizado foi a sílica Nucleosil MACHEREY-NAGEL 7 $\mu$ m, com tamanho de poro de 500Å. Os isocianatos de arila e o 3 – aminotrietoisilano foram comprados da ACROS. O iniciador de radical azoisobutironitrila (AIBN) foi gentilmente cedido pelo Prof.Dr. Alcindo Aparecido dos Santos (Universidade de São Paulo). Para a

avaliação das colunas quirais empregadas neste trabalho foram utilizados os padrões racêmicos base de Tröger e óxido de trans-estilbeno ambos ALDRICH.

A lâmpada utilizada para a imobilização fotoquímica dos derivados de polissacarídeo foi de 100watts de Bausch & Lomb (Mercury Power Supply HP 100). A peneira usada para a uniformização e homogeneização das fases estacionárias quirais sintetizadas foi ENDECOTT SBS 410/1986 (995308) com orifícios de 38  $\mu\text{m}$ .

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas, todos grau HPLC (MALLINCKRODT, J. T. BAKER, TEDIA), foram filtrados a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando-se membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45  $\mu\text{m}$  e, posteriormente, degaseificados em ultra-som COLE-PALMER 8852. Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume e a ordem de eluição dos enantiômeros foi determinada através do sinal de rotação do dicroísmo circular.

## 5. 2- Procedimento Experimental

### 5.2. 1 - Condições cromatográficas para as análises das colunas de polímero sintético (*R,R*)P-CAP<sup>®</sup>, (*R,R*)P-CAP-DP<sup>®</sup> e DEAVB.

O modo normal de eluição foi avaliado, sistematicamente, para as composições de *n*-hexano/etanol, de 10 em 10%, no intervalo de 10 a 100% de etanol. A composição de *n*-hexano/2-propanol foi avaliada, nas proporções em que se tinham as melhores separações, com etanol como modificador, no intuito de se comparar os modificadores orgânicos.

O modo polar orgânico de eluição foi avaliado com acetonitrila e metanol, as misturas dos dois solventes foram avaliadas nas composições de 10 em 10%, no intervalo de 0 a 100% de acetonitrila.

Composições com solventes não usuais em LC foram avaliadas nas colunas de polímero sintético, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH nas proporções (99:01) e (95:05), *n*-hexano/MtBE/EtOH (30:45:25) e *n*-hexano/MtBE/2-propanol (30:45:25).

O modo reverso também foi avaliado nas colunas de polímero sintético, as análises foram efetuadas com MeOH e EtOH como modificadores, de 100% à 70%.

A (*R,R*) P-CAP<sup>®</sup> e a (*R,R*) P-CAP-DP<sup>®</sup> utilizadas neste estudo são colunas comercializadas pela *Advanced Separations Technologies* (Whippany, NJ,

EUA) e a DEAVB é um protótipo da coluna comercial. As três colunas de polímero sintético (250 X 4,6mm D.I.), com tamanho de partícula de 5 $\mu$ m e de poro 200Å, foram gentilmente cedidas pelo prof<sup>o</sup> Dr. Daniel W. Armstrong (Universidade do Texas em Arlington, Texas, EUA).

A ordem de eluição dos enantiômeros foi determinada através do detector de dicroísmo circular acoplado ao detector de ultravioleta.

## 5.2. 2- Síntese do complexo de molibdênio de n-óxido de piridina

O complexo de molibdênio foi preparado a partir do ácido molibídico, peróxido de hidrogênio (30%) e n-óxido de piridina.

Em um balão de fundo redondo de 50mL, imerso em banho de gelo picado e água, o ácido molibídico foi adicionado, seguido do peróxido de hidrogênio (30%). Manteve-se a mistura reacional sob agitação magnética por duas horas. Em seguida, adicionou-se n-óxido de piridina. Observando-se a formação de cristais amarelados, os quais foram filtrados a vácuo e lavados com éter de petróleo/isopropanol 1:1 v/v.

**MoO<sub>5</sub>(N-óxido de Piridina)(H<sub>2</sub>O)**: 2,06g (19,0mmol) de ácido molibídico seguido de 18mL (28,5mmol) de peróxido de hidrogênio – (30%v/v) e 2,03g (20,9mmol) N-óxido de piridina foi adicionado. Após 1 hora adicionou-se 5mL de ácido sulfúrico 6N. Foi obtido um precipitado amarelo com 87,0% de rendimento. **I.V.**( $\nu_{\text{máx}}$ , **KBr**, **cm<sup>-1</sup>**): 3348, 3111, 1470, 1207, 969, 836, 576, 529. **U.V.**( $\lambda_{\text{máx}}$ , **nm**): 238, 268. **Análise elementar: Calculado** - %C= 20,76; %H= 2,42; %N= 4,84, **Experimental obtido** - %C= 20,81; %H= 2,30; %N= 4,92.

## 5.2. 3 - Síntese dos sulfetos pró-quirais

À suspensão de hidreto de sódio em tetraidrofurano (THF) a 0°C e atmosfera inerte adicionou-se lentamente a solução do tiol em THF. A reação foi mantida sob agitação por uma hora em banho de gelo e, em seguida, ainda em banho de gelo, adicionou-se a solução de iodeto de metila em THF. A reação foi mantida sob constante agitação e à temperatura ambiente até que todo tiol fosse consumido.

A reação foi extraída com acetato de etila e solução aquosa de carbonato de sódio 5%. A fase orgânica foi separada, lavada com água (3x10) e concentrada em rotaevaporador.

Os sulfetos obtidos foram caracterizados por  $^1\text{H}$ -RMN e infravermelho.

**4-metoxitioanizol:** 4-metoxibenzenotiol (1g; 7,13 mmol) em 15 mL de THF foi adicionado à suspensão de NaH (7,13 mmol), em banho de gelo e atmosfera inerte. Após 1 hora de agitação iodeto de metila (7,84 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida sob constante agitação até que todo tiol fosse consumido. O sulfeto foi obtido como um óleo com 90% de rendimento.

**I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 2921, 2835, 1594, 1493, 1461, 1283, 1243, 1177, 1033, 822, 624, 517.  **$^1\text{H}$ -RMN (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm):** 2,42(s, 3H); 3,75(s, 3H); 6,83 (m, 2H); 7,25 (m, 2H).

**o-tolueno sulfeto:** o-tolueno tiol (1g; 8,06 mmol) em 15 mL de THF foi adicionado à suspensão de NaH (8,06 mmol), em banho de gelo e atmosfera inerte. Após 1 hora de agitação iodeto de metila (8,87 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida sob constante agitação até que todo tiol fosse consumido. O sulfeto foi obtido como um óleo com 90% de rendimento. **I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3060, 2927, 2855, 1591, 1470, 1438, 1063, 1047, 741.  **$^1\text{H}$ -RMN (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm):** 2,69(s, 3H); 3,05(s, 3H); 7,08(m, 2H); 7,39 (m, 2H).

**p-tolueno sulfeto:** o-tolueno tiol (1g; 8,06 mmol) em 15 mL de THF foi adicionado à suspensão de NaH (8,06 mmol), em banho de gelo e atmosfera inerte. Após 1 hora de agitação iodeto de metila (8,87 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida sob constante agitação até que todo tiol fosse consumido. O sulfeto foi obtido como um óleo com 90% de rendimento. **I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 2952, 2922, 2853, 1513, 1489, 1462, 1376, 1015, 803, 721, 485.  **$^1\text{H}$ -RMN(200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm):** 2,46 (s, 3H); 2,59 (s, 3H); 7,12 (m, 2H); 7,40 (m, 2H).

**metil sulfenil 5-metil benzoimidazol:** 2-mercapto-5-metilbenzoimidazol (1g; 6,10 mmol) em 15 mL de THF foi adicionado à suspensão de NaH (6,10 mmol), em banho de gelo e atmosfera inerte. Após 1 hora de agitação iodeto de metila (6,80



mmol) foi adicionado e a reação foi mantida sob constante agitação até que todo tiol fosse consumido. O sulfeto foi obtido como um óleo com 93% de rendimento. **I.V.** ( $\nu_{\text{max.}}$ , **KBr**,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3437, 3058, 2933, 1598, 1623, 1456, 1372, 1281, 1243, 1119, 1015, 978, 822, 747, 489.  **$^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 2.43 (s, 3H); 2.57 (s, 3H); 7.03-7.54 (m, 3H).

**metil sulfenil benzoimidazol:** 2-mercapto-benzoimidazol (1g; 6,70 mmol) em 15 mL de THF foi adicionado à suspensão de NaH (6,70 mmol), em banho de gelo e atmosfera inerte. Após 1 hora de agitação iodeto de metila (7,50 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida sob constante agitação até que todo tiol fosse consumido. O sulfeto foi obtido como um óleo com 95% de rendimento. **I.V.** ( $\nu_{\text{max.}}$ , **KBr**,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3431, 3055, 2931, 1698, 1613, 1450, 1362, 1279, 1233, 1114, 1007, 976, 821, 741, 481.  **$^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 2.76 (s, 3H); 7.23-7.61 (m, 4H).

**2-metil sulfenil pirimidina:** 2-mercaptopirimidina (1g; 8,93 mmol) em 15 mL de THF foi adicionado à suspensão de NaH (8,30 mmol), em banho de gelo e atmosfera inerte. Após 1 hora de agitação iodeto de metila (9,03 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida sob constante agitação até que todo tiol fosse consumido. O sulfeto foi obtido como um óleo com 85% de rendimento. **I.V.** ( $\nu_{\text{max.}}$ , **KBr**,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3324, 3021, 2958, 1686, 1489, 1321, 1270, 1130, 1017, 831, 741.  **$^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 2.47 (s, 1H); 7.17 (s, 1H), 8,70 (s, 2H).

#### 5.2. 4 - Síntese dos Sulfóxidos quirais

As reações foram feitas em balões de fundo redondo, imersos em banho de gelo, sob constante agitação e adição lenta do oxidante ao sulfeto, na proporção de 1:1 mmol sulfeto/oxidante, com o auxílio de um adicionador de sólidos. Foi utilizado como solvente uma mistura de metanol/acetonitrila (1:5 v/v). As reações foram acompanhadas por C.C.D.

As misturas reacionais foram extraídas com diclorometano e água, em triplicata, as fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro e concentradas no rotaevaporador. Posteriormente, foi efetuado a purificação dos produtos de reação, isto foi feito, utilizando-se uma coluna de bancada, empacotada

com sílica flash (nucleosil) e Acetato de Etila/*n*-hexano como eluentes. Os produtos foram caracterizados por IV e  $^1\text{H-RMN}$ .

**4-(bromofenil)metil sulfóxido:** o complexo (21,3 mg; 0,075 mmol) foi lentamente adicionado ao 4-bromotioanizol (6) (15 mg; 0,075 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , **KBr**,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2920, 2909, 1571, 1468, 1420, 1385, 1310, 1148, 1084, 1042, 1005, 964, 817, 770, 720, 554, 528.  $^1\text{H-RMN}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2,72(s, 3H); 7,52(m, 3H); 7,68 (m, 2H).

**Fenil metil sulfóxido:** o complexo (35 mg; 0,12 mmol) foi lentamente adicionado ao tioanizol (1) (15 mg; 0,12 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , **KBr**,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3057, 2997, 2920, 1581, 1479, 1441, 1414, 1089, 1048, 956, 742, 691.  $^1\text{H-RMN}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2,72(s, 3H); 7,51(m, 3H); 7,64(m, 2H).

**4-(nitrofenil)metil sulfóxido:** o complexo (25,6mg; 0,089 mmol) foi lentamente adicionado ao 4-nitrotioanizol (5) (15 mg; 0,089 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5).I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , **KBr**,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3096, 2927, 1958, 1581, 1511, 1478, 1335, 1091, 1053, 853, 836, 741, 526.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2,80(s, 3H); 7,84(m, 2H); 8,14(m, 2H).

**4-(metoxifenil)metil sulfóxido:** o complexo (28 mg; 0,097 mmol) foi lentamente adicionado ao 4-metoxitioanizol (4) (15 mg; 0,097 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5).I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , **KBr**,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3459, 2936, 2843, 1599, 1494, 1458, 1301, 1253, 1180, 1092, 1035, 951, 830, 681, 580, 524.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2,70(s, 3H); 3,86(s, 3H); 7,03(m, 2H); 7,60(m, 2H).

**o-tolueno metil sulfóxido:** o complexo (31,4 mg; 0,12 mmol) foi lentamente adicionado ao *o*-tolueno sulfeto (2) (15 mg; 0,12 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , **KBr**,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3055, 2990, 2920, 1626, 1505, 1478, 1442, 1409, 1302, 1254, 1111, 1089, 1072, 957, 933, 749, 785.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2,38(s, 3H); 2,69(s, 3H); 7,22(m, 2H); 7,42(m, 2H).

**p-tolueno metil sulfóxido:** o complexo (31,4 mg; 0,12 mmol) foi lentamente adicionado ao *p*-tolueno sulfeto (3) (15 mg; 0,12 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3059, 2995, 2920, 1583, 1477, 1443, 1416, 1299, 1154, 1085, 1051, 955, 740, 693.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2,42(s, 3H); 2,71(s, 3H); 7,34(m, 2H); 7,55(m, 2H).

**metil naftil sulfóxido:** o complexo (25 mg; 0,085 mmol) foi lentamente adicionado ao metil naftil sulfeto (7) (15 mg; 0,085 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3049, 2917, 1621, 1588, 1499, 1423, 1131, 1068, 955, 849, 817, 739, 478.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2,84(s, 3H); 7,57(m, 2H); 7,95(m, 1H); 8,17(m, 4H).

**metil sulfinil benzoimidazol:** o complexo 35,5 mg ( 0,115 mmol) foi lentamente adicionado ao metil sulfenil benzoimidazol 20 mg (0,115 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{max.}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3417, 2976, 2935, 1646, 1508, 1446, 1414, 1253, 1113, 1054, 910, 781, 714, 640, 578, 517.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3.63 (s, 3H); 7.01-7.55 (m, 4H).

**metil sulfinil 5-metil benzoimidazol:** o complexo 35,5 mg ( 0,115 mmol) foi lentamente adicionado ao metil sulfenil 5-metil benzoimidazol 19 mg (0,115 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{max.}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3421, 2979, 2936, 1654, 1518, 1445, 1418, 1251, 1116, 1032, 919, 785, 723, 645, 579, 522.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 2.43 (s, 3H); 3.06 (s, 3H); 6.61-7.69 (m, 3H).

**2- metil sulfinil pirimidina:** o complexo 35,5 mg ( 0,115 mmol) foi lentamente adicionado ao 2- metil sulfenil pirimidina 15 mg (0,115 mmol) em 10 ml de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{max.}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3403, 2961, 2942, 1657, 1467, 1255, 1141, 1055, 902, 763, 595.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3,00 (s, 1H); 9,07 (s, 2H); 7,72 (s, 1H).

**2- Benzenosulfinilmetil- 4,4- dimetil- 4,5- dihidrooxazol:** o complexo 35,5 (0,115mmol) foi lentamente adicionado ao 2- Benzenosulfenilmetil- 4,4- dimetil- 4,5- dihidrooxazol 27mg (0,115mmol) em

10mL de metanol/acetonitrila (1:5). I.V. ( $\nu_{\text{max.}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3417, 2945, 2934, 1644, 1452, 1257, 1143, 1041, 902, 767, 589.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,3 (s, 1H); 7,48 (s, 2H); 7,65 (s, 2H); 2,8 (s, 2H); 3,5 (s, 2H); 1,0 (s, 6H)

### 5.2. 5 - Síntese dos Tris-fenilcarbamatos de Amilose

Partiu-se de 1,00g (6,17mmol) de amilose, previamente seco em estufa à vácuo a 60°C por 24 horas. Adicionou-se piridina (50mL) previamente tratada com hidróxido de potássio (KOH) e destilada sob peneira molecular. A mistura reacional foi agitada a uma temperatura de 98°C durante 24 horas e então se adicionou 3,5 equivalentes do isocianato correspondente (21,6mmol) e deixou-se a reação em revazão por mais 72 horas à mesma temperatura.

Após o resfriamento da mistura reacional à temperatura ambiente, o produto foi precipitado em 300mL de metanol sob agitação magnética por, aproximadamente, uma hora. O produto branco foi, então, filtrado à vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com metanol, até não se percebe-se o odor de resíduos de piridina. O carbamato foi seco em dessecador com vácuo, por 72 horas, e caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar.

#### **Tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose ( $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{N}_3$ ):**

I.V. ( $\nu_{\text{max.}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3282,5; 1756,2; 1230,4.

#### **Analise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=65,66; %H=6,18, %N=6,96.

Valores Experimentais: %C=65,20; %H=5,98, %N=6,44.

#### **Tris-3,5-dimetóxilfenilcarbamato de amilose ( $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{N}_3$ ):**

I.V. ( $\nu_{\text{max.}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3330,2; 1748,3; 1210,9.

#### **Analise Elementar:**

Valores Teóricos: %C=56,65; %H=5,29, %N=6,00

Valores Experimentais: %C=55,90; %H=5,51, %N=5,92

### 5.2. 6- Preparação do suporte 3-Aminopropilsílica

Sílica Nucleosil (7 $\mu\text{m}$  e 500Å) (30g) foi, previamente, seca em estufa à vácuo a 120°C por 24 horas e, em seguida, mantida sob atmosfera de lítio em

dessecador por mais 24 horas. Transferiu-se a sílica para um balão de três bocas contendo 360mL de tolueno (previamente seco), sob agitação mecânica. Em seguida, adicionou-se 36mL (153mmol) de 3-aminopropiltriétoxissilano sob atmosfera de N<sub>2</sub> e revazou-se por 3 horas a 120°C.

O produto branco resultante foi filtrado à vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com tolueno (300mL) e depois com 250mL de mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50 v/v). O produto foi seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72horas e submetido a análise elementar e medidas de tamanho de partícula.

#### **Análise Elementar:**

Sílica Nucleosil: %C=0,52; %H=0,30; %N=0,61.

Sílica - APS-Nucleosil: %C=0,42; %H=0,56, %N=0,68.

### **5.2. 7- Preparação das CSPs de polissacarídeo adsorvido em sílica - APS-Nucleosil**

Sílica - APS-Nucleosil (2,7 g) foi adicionada em um balão especial para revestimento de sílica e, em seguida, 50mL de THF foi acrescentado. Revazou-se a suspensão por meia hora, resfriou-se o sistema à temperatura ambiente e então adicionou-se em pequenas porções 0,675g (20% g/g) do carbamato tris-3,5-dimetilcarbamato de amilose (CSP 1) ou tris-3,5-dimetoxicarbamato de amilose (CSP 2), previamente dissolvidos em THF.

Evaporou-se o solvente muito lentamente em rotaevaporador e as CSPs foram totalmente seca em bomba a vácuo. Após a secagem o produto foi cautelosamente peneirado em peneira especial de 38µm.

### **5.2. 8- Preparação das CSPs de polissacarídeo imobilizado em sílica - APS-Nucleosil**

#### **CSP 3**

Tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (0,5g) e azoisobutironitrila (AIBN) (0,5g) foram solubilizados em 40mL de THF. A solução foi adicionada, em três ciclos, a 3g de sílica - APS-Nucleosil. Em cada ciclo a mistura reacional foi seca em rotaevaporador a 30°C.

O produto resultante (3,98g) foi aquecido livre de solvente, a 120°C por 15 horas, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Em seguida, manteve-se a mistura reacional sob constante agitação magnética em 100 mL de metanol por uma hora. A suspensão é então filtrada a vácuo, em funil de placa sinterizada, e o produto branco é lavado com metanol.

Após secagem em bomba a vácuo, o produto é submetido a extração Soxlet com THF por 17 horas. Em seguida, realizou-se a suspensão do sólido branco em 30 mL de THF e adicionou-se 300 mL de *n*-hexano no vazão de 1,6 mL/min. O produto é, novamente, filtrado a vácuo em funil de placa sinterizado, lavado com *n*-hexano e seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72 horas.

Por fim, peneirou-se cuidadosamente a CSP em peneira especial de orifício de 38 μm.

#### **CSP 4**

Tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose (0,5g) e azoisobutironitrila (AIBN) (0,5g) foram solubilizados em 40 mL de THF. A solução foi adicionada, em três ciclos, a 3g de sílica - APS-Nucleosil. Em cada ciclo a mistura reacional foi, muito lentamente, seca em rotaevaporador.

O produto resultante (3,97g) foi aquecido livre de solvente, a 120°C por 15 horas sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Em seguida, manteve-se a mistura reacional sob constante agitação magnética em 100 mL de metanol por uma hora. A suspensão é então filtrada a vácuo em funil de placa sinterizada e o produto branco é lavado com metanol.

Após secagem em bomba a vácuo, o produto é submetido a extração Soxlet com THF por 17 horas. Em seguida, realizou-se a suspensão do sólido branco em 30 mL de THF e adicionou-se 300 mL de *n*-hexano no vazão de 1,6 mL/min. O produto é, novamente, filtrado a vácuo em funil de placa sinterizado, lavado com *n*-hexano e seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72 horas.

Por fim, peneirou-se cuidadosamente a CSP em peneira especial de orifício de 38 μm.

#### **CSP 5**

CSP de tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose adsorvido em sílica - APS-Nucleosil (3,5g), conforme procedimento descrito na secção 5.2.7, foi suspensa

em solução de azoisobutironitrila (AIBN) (0,5g) e 15mL de MeOH. A suspensão foi então evaporada em rotaevaporador e seco em bomba a vácuo.

O produto resultante (3,95g) foi aquecido livre de solvente, a 120°C por 15 horas sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Em seguida, manteve-se a mistura reacional sob constante agitação magnética em 100mL de metanol por uma hora. A suspensão é então filtrada a vácuo em funil de placa sinterizada e o produto branco é lavado com metanol.

Após secagem em bomba a vácuo, o produto é submetido a extração Soxlet com THF por 17 horas. Em seguida, realizou-se a suspensão do sólido branco em 30mL de THF e adicionou-se 300mL de *n*-hexano no vazão de 1,6mL/min. O produto é, novamente, filtrado a vácuo em funil de placa sinterizado, lavado com *n*-hexano e seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72 horas.

Por fim, peneirou-se cuidadosamente a CSP em peneira especial de orifício de 38µm.

## **CSP 6**

CSP de tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose adsorvido em sílica - APS-Nucleosil (3,5g), conforme procedimento descrito na secção 5.2.7, foi suspensa em solução de azoisobutironitrila (AIBN) (0,5g) e 15mL de MeOH. A suspensão foi então evaporada em rotaevaporador e seco em bomba a vácuo.

O produto resultante (3,96g) foi aquecido livre de solvente, a 95°C por 20 horas sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Em seguida, manteve-se a mistura reacional sob constante agitação magnética em 100mL de metanol por uma hora. A suspensão é então filtrada a vácuo em funil de placa sinterizada e o produto branco é lavado com metanol.

Após secagem em bomba a vácuo, o produto é submetido a extração Soxlet com THF por 17 horas. Em seguida, realizou-se a suspensão do sólido branco em 30mL de THF e adicionou-se 300mL de *n*-hexano no vazão de 1,6mL/min. O produto é, novamente, filtrado a vácuo em funil de placa sinterizado, lavado com *n*-hexano e seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72 horas.

Por fim, peneirou-se cuidadosamente a CSP em peneira especial de orifício de 38µm.

**CSP 7**

CSP de tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose adsorvido em sílica - APS-Nucleosil (3,5g), conforme procedimento descrito na secção 5.2.7, foi suspensa em solução hexânica.

A suspensão foi submetido a irradiação ultravioleta com lâmpada de mercúrio (100watts) por 24horas. A suspensão é então filtrada a vácuo em funil de placa sinterizada, lavada com hexano e seca em bomba a vácuo.

O produto é submetido a extração Soxlet com THF por 17 horas. Em seguida, realizou-se a suspensão do sólido branco em 30mL de THF e adicionou-se 300mL de *n*-hexano no vazão de 1,2mL/min. O produto é, novamente, filtrado a vácuo em funil de placa sinterizado, lavado com *n*-hexano e seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72horas.

Por fim, peneirou-se cuidadosamente a CSP em peneira especial de orifício de 38µm.

**CSP 8**

CSP de tris-3,5-dimetoxifenilcarbamato de amilose adsorvido em sílica - APS-Nucleosil (3,5g), conforme procedimento descrito na secção 5.2.7, foi suspensa em solução hexânica.

A suspensão foi submetido a irradiação ultravioleta com lâmpada de mercúrio (100watts) por 48horas. A suspensão é então filtrada a vácuo em funil de placa sinterizada, lavada com hexano e seca em bomba a vácuo.

O produto é submetido a extração Soxlet com THF por 17 horas. Em seguida, realizou-se a suspensão do sólido branco em 30mL de THF e adicionou-se 300mL de *n*-exano no vazão de 1,2mL/min. O produto é, novamente, filtrado a vácuo em funil de placa sinterizado, lavado com *n*-hexano e seco em dessecador com pentóxido de fósforo por 72horas.

Por fim, peneirou-se cuidadosamente a CSP em peneira especial de orifício de 38µm.



### 5.2. 9 - Empacotamento das Fases Estacionárias Quirais

As CSPs foram empacotadas em colunas inox (150 X 4,6mm D.I.) sob pressão de 7.500psi em *n*-hexano/2-propanol (90:10). As fases estacionárias foram suspensas em 50mL de *n*-hexano/2-propanol (50:50) e uniformizadas em ultra-som por período de três minutos.

As colunas cromatográficas foram condicionadas em *n*-hexano/2-propanol (90:10 v/v) durante 12horas com vazão de 0,5mL/min e, posteriormente, avaliadas com os padrões cromatográficos.

## 6 – Referências Bibliográficas

1. WHITE, C.A. & SUBRAMANIAN, G., *An Introduction to Enantioseparation by Liquid Chromatography*, in *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 1994, Wiley-VCH: Weinheim. p. 1.
2. BERTHOD, A., "Chiral recognition mechanisms". *Analytical Chemistry*. **78**(7): 2093, 2006.
3. KOSTYANOVSKY, R.G., "Louis Pasteur did it for us especially". *Mendeleev Communications*, (3): 85, 2003.
4. TSUCHIDA, R.; KOBAYASHI, M. & NAKAMURA, A., "Configuration of chlorobisdimethylglyoximoamine-cobalt". *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **11**: 38, 1936.
5. HENDERSON, G.M. & RULE, H.G., "A new method of resolving a racemic compound". *Journal of the Chemical Society*. 1568, 1939.
6. DALGLIESH, C.E., "Optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms". *Journal of the Chemical Society*: 3940, 1952.
7. KOTAKE, M.; SAKAN, T.; NAKAMURA, N. & SENOH, S., "Resolution into optical isomers of some amino acids by paper chromatography". *Journal of the American Chemical Society*. **73**: 2973, 1951.
8. DAVANKOV, V.A., "The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction?". *Chirality*. **9**(2): 99, 1997.
9. YANG, J. & HAGE, D.S., "Role of binding capacity versus binding strength in the separation of chiral compounds on protein-based high-performance liquid chromatography columns. Interactions of D- and L-tryptophan with human serum albumin". *Journal of Chromatography, A*. **725**(2): 273, 1996.
10. YANG, J. & HAGE, D.S., "Effect of mobile phase composition on the binding kinetics of chiral solutes on a protein-based high-performance liquid chromatography column: Interactions of D- and L-tryptophan with immobilized human serum albumin". *Journal of Chromatography, A*. **766**(1 + 2): 15, 1997.
11. PIRKLE, W.H. & POCHAPSKY, T.C., "Intermolecular proton[proton] nuclear Overhauser effects in diastereomeric complexes: support for a chromatographically derived chiral recognition model". *Journal of the American Chemical Society*. **108**(18): 5627, 1986.
12. TOPIOL, S. & SABIO, M., "Computational chemical studies of chiral stationary phase models. Complexes of methyl N-(2-naphthyl)alaninate with N-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine n-propylamide". *Journal of Chromatography*. **461**: 129, 1989.
13. WAINER, I.W., *HPLC chiral stationary phases for the stereochemical resolution of enantiomeric compounds. The current state of the art*. 2nd ed. Clinical Pharmacology. Vol. 18. 1993. 139.
14. ALLENMARK, S.G., in *Chiral Separations by HPLC*, KRSTULOVIC, A.M., Editor. 1989, Ellis Horwood: West Sussex.
15. HAGINAKA, J., "Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations". *Journal of Chromatography, A*. **906**(1-2): 253, 2001.
16. ODA, Y.; ASAKAWA, N.; ABE, S.; YOSHIDA, Y. & SATO, T., "Avidin protein-conjugated column for direct injection analysis of drug enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography B*. **572**(1-2): 133, 1991.

17. ALLENMARK, S.G., *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*. 2<sup>nd</sup> ed. 1991, New York: Ellis Horwood.
18. MARLE, I.; JOENSSON, S.; ISAKSSON, R.; PETTERSSON, C. & PETTERSSON, G., "Chiral stationary phases based on intact and fragmented cellobiohydrolase I immobilized on silica". *Journal of Chromatography*. **648**(2): 333, 1993.
19. HAGINAKA, J., "Recent progresses in protein-based chiral stationary phases for enantioseparations in liquid chromatography". *Journal of Chromatography, B*. **875**(1): 12, 2008.
20. FRANCOTTE, E.R., "Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers". *Journal of Chromatography, A*. **906**(1-2): 379, 2001.
21. DOMENICI, E.; BERTUCCI, C.; SALVADORI, P. & WAINER, I.W., "Use of a human serum albumin-based high-performance liquid chromatography chiral stationary phase for the investigation of protein binding: detection of the allosteric interaction between warfarin and benzodiazepine binding sites". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **80**(2): 164, 1991.
22. KIM, H.S. & HAGE, D.S., "Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin". *Journal of Chromatography, B*. **816**(1-2): 57, 2005.
23. CHEN, J. & HAGE, D.S., "Quantitative analysis of allosteric drug-protein binding by bio-interaction chromatography". *Nature Biotechnology*. **22**(11): 1445, 2004.
24. MATSUNAGA, H. & HAGINAKA, J., "Investigation of chiral recognition mechanism on chicken alpha 1-acid glycoprotein using separation system". *Journal of Chromatography, A*. **1106**(1-2): 124, 2006.
25. STALCUP, A.M., *Cyclodextrin Bonded Stationary Phases in Enantiomer Separations*, in *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 1994, Wiley-VCH: Weinheim. p. 405.
26. ALI, I.; KUMERER, K. & ABOUL-ENEIN, H.Y., "Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis". *Chromatographia*. **63**(7-8): 295, 2006.
27. HAN, S.M.; HAN, Y.I. & ARMSTRONG, D.W., "Structural factors affecting chiral recognition and separation on beta -cyclodextrin bonded phases". *Journal of Chromatography*. **441**(2): 376, 1988.
28. BERTHOD, A.; CHANG, S.C. & ARMSTRONG, D.W., "Empirical procedure that uses molecular structure to predict enantioselectivity of chiral stationary phases". *Analytical Chemistry*. **64**(4): 395, 1992.
29. ARMSTRONG, D.W.; HILTON, M. & COFFIN, L., "Multimodal chiral stationary phases for liquid chromatography: (R)- and (S)-naphthylethyl-carbamate-derivatized beta -cyclodextrin". *LC-GC*. **9**(9): 646, 1991.
30. CHANG, S.C.; REID, G.L., III; CHEN, S.; CHANG, C.D. & ARMSTRONG, D.W., "Evaluation of a new polar-organic high-performance liquid chromatographic mobile phase for cyclodextrin-bonded chiral stationary phases". *Trends in Analytical Chemistry*. **12**(4): 144, 1993.
31. WANG, C.; JIANG, C. & ARMSTRONG, D.W., "Considerations on HILIC and polar organic solvent-based separations: use of cyclodextrin and macrocyclic glycopeptide stationary phases". *Journal of Separation Science*. **31**(11): 1980, 2008.

32. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M. & HATADA, K., "Chromatographic resolution. 7. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel". *Journal of the American Chemical Society*. **106**(18): 5357, 1984.
33. HESSE, G. & HAGEL, R., "Complete separation of a racemic mixture by elution chromatography on cellulose triacetate". *Chromatographia*. **6**(6): 277, 1973.
34. BLASCHKE, G., "Chromatographic resolution of chiral drugs on polyamides and cellulose triacetate". *Journal of Chromatography, A*. **9**(2-3): 341, 1986.
35. FRANCOTTE, E., "Contribution of preparative chromatographic resolution to the investigation of chiral phenomena". *Journal of Chromatography, A*. **666**(1-2): 565, 1994.
36. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; YAMAMOTO, K. & HATADA, K., "Chromatographic resolution. 6. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution. Cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica gel". *Chemistry Letters*, (5): 739, 1984.
37. ICHIDA, A.; SHIBATA, T.; OKAMOTO, I.; YUKI, Y.; NAMIKOSHI, H. & TOGA, Y., "Resolution of enantiomers by HPLC on cellulose derivatives". *Chromatographia*. **19**: 280, 1984.
38. YASHIMA, E., "Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation". *Journal of Chromatography, A*. **906**(1-2): 105, 2001.
39. KAIDA, Y. & OKAMOTO, Y., "Optical resolution by high-performance liquid chromatography on benzylcarbamates of cellulose and amylose". *Journal of Chromatography*. **641**(2): 267, 1993.
40. OKAMOTO, Y. & IKAI, T., "Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers". *Chemical Society Reviews*. **37**(12): 2593, 2008.
41. OKAMOTO, Y. & KAIDA, Y., "Polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in HPLC". *Journal of High Resolution Chromatography*. **13**(10): 708, 1990.
42. OKAMOTO, Y. & KAIDA, Y., "Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **666**(1-2): 403, 1994.
43. OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y.; HAYASHIDA, H. & HATADA, K., "Tris(1-phenylethylcarbamate)s of cellulose and amylose as useful chiral stationary phases for chromatographic optical resolution". *Chemistry Letters*, (6): 909, 1990.
44. YASHIMA, E. & OKAMOTO, Y., "Chiral discrimination on polysaccharides derivatives". *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **68**(12): 3289, 1995.
45. CASS, Q.B.; TIRITAN, M.E.; BASSI, A.L.; CALAFATTI, S.A. & DEGANI, A.L.G., "Polysaccharide carbamate as chiral stationary phases for HPLC: development, applications and perspectives". *Química Nova*. **20**(1): 49, 1997.
46. WAINER, I.W.; STIFFIN, R.M. & SHIBATA, T., "Resolution of enantiomeric aromatic alcohols on a cellulose tribenzoate high-performance liquid chromatography chiral stationary phase. A proposed chiral recognition mechanism". *Journal of Chromatography*. **411**: 139, 1987.
47. WAINER, I.W. & ALEMBIK, M.C., "Resolution of enantiomeric amides on a cellulose-based chiral stationary phase. Steric and electronic effects". *Journal of Chromatography*. **358**(1): 85, 1986.

48. CASS, Q.B.; BASSI, A.L.; CALAFATTI, S.A.; MATLIN, S.A.; TIRITAN, M.E. & MOREIRA DE CAMPOS, L.M., "Carbohydrate carbamate coated onto microporous silica: application to chiral analysis of commercial pharmaceutical drugs". *Chirality*. **8**(1): 143, 1996.
49. MATLIN, S.A.; TIRITAN, E.M.; CRAWFORD, A.J.; CASS, Q.B. & BOYD, D., "HPLC with carbohydrate carbamate chiral phases: influence of chiral phase structure on enantioselectivity". *Chirality*. **6**(2): 135, 1994.
50. ABOUL-ENEIN, H.Y. & ALI, I., "Normal phase chiral HPLC of methylphenidate: comparison of different polysaccharide-based chiral stationary phases". *Chirality*. **14**(1): 47, 2002.
51. TIRITAN, M.E.; CASS, Q.B.; DEL ALAMO, A.; MATLIN, S.A. & GRIEB, S.J., "Preparative enantio-separation on polysaccharide phase using microporous silica as a support". *Chirality*. **10**(7): 573, 1998.
52. CASS, Q.B. & BATIGALHIA, F., "Enantiomeric resolution of a series of chiral sulfoxides by high-performance liquid chromatography on polysaccharide-based columns with multimodal elution". *Journal of Chromatography, A*. **987**(1-2): 445, 2003.
53. KAIDA, Y. & OKAMOTO, Y., "Optical resolution of beta -lactams on 1-phenylethylcarbamates of cellulose and amylose". *Chirality*. **4**(2): 122, 1992.
54. CHANKVETADZE, B.; KARTOZIA, I.; YAMAMOTO, C. & OKAMOTO, Y., "Comparative enantioseparation of selected chiral drugs on four different polysaccharide-type chiral stationary phases using polar organic mobile phases". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **27**(3-4): 467, 2002.
55. TACHIBANA, K. & OHNISHI, A., "Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **906**(1-2): 127, 2001.
56. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. & CASSIANO, N.M., "Effects on enantioselectivity by the use of polysaccharide-based columns by multimodal elution". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **26**(13): 2083, 2003.
57. CASS, Q.B.; LUIZA, A.; DEGANI, G. & CASSIANO, N., "The use of a polysaccharide-based column on multimodal elution". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **23**(7): 1029, 2000.
58. CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. & WAINER, I.W., "Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography". *Chirality*. **14**(9): 731, 2002.
59. GOMES, R.F.; CASSIANO, N.M.; PEDRAZZOLI, J., JR. & CASS, Q.B., "Two-dimensional chromatography method applied to the enantiomeric determination of lansoprazole in human plasma by direct sample injection". *Chirality*. **22**(1): 35, 2010.
60. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; CASSIANO, N.M. & PEDRAZZOLI, J., "Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography B*. **766**(1): 153, 2002.
61. ZHANG, T. & FRANCO, P., *Analytical and preparative potential of immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases*, in *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 2007, Wiley-VCH: Weinheim. p. 99.

62. OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; MIURA, S. & HATADA, K., "Chiral stationary phases for HPLC: cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) chemically bonded to silica gel". *Journal of Liquid Chromatography*. **10**(8-9): 1613, 1987.
63. YASHIMA, E.; FUKAYA, H. & OKAMOTO, Y., "(3,5-Dimethylphenyl)carbamates of cellulose and amylose regioselectively bonded to silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography, A*. **677**(1): 11, 1994.
64. IKAI, T. & OKAMOTO, Y., "Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography". *Chemical Reviews*. **109**(11): 6077, 2009.
65. FRANCO, P.; SENSO, A.; OLIVEROS, L. & MINGUILLON, C., "Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography, A*. **906**(1-2): 155, 2001.
66. IKAI, T.; YAMAMOTO, C.; KAMIGAITO, M. & OKAMOTO, Y., "Immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for HPLC". *Polymer Journal*. **38**(2): 91, 2006.
67. IKAI, T.; YAMAMOTO, C.; KAMIGAITO, M. & OKAMOTO, Y., "Immobilized-type chiral packing materials for HPLC based on polysaccharide derivatives". *Journal of Chromatography, B*. **875**(1): 2, 2008.
68. CHEN, X.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; NI, J. & ZHANG, Z., "Synthesis of chemically bonded cellulose trisphenylcarbamate chiral stationary phases for enantiomeric separation". *Journal of Chromatographic Science*. **40**(6): 315, 2002.
69. FRANCOTTE, E., *Photochemically cross-linked polysaccharide derivatives as supports for the chromatographic separation of enantiomers*. 1996: PCT Int. Appl. WO 9627615. p. 36.
70. FRANCOTTE, E., *Thermally immobilized polysaccharide derivatives*. 1997: PCT Int. Appl. WO 19970620. p. 24
71. FRANCOTTE, E. & HUYNH, D., "Immobilized halogenophenylcarbamate derivatives of cellulose as novel stationary phases for enantioselective drug analysis". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **27**(3-4): 421, 2002.
72. FRANCOTTE, E. & ZHANG, T., *Photochemically crosslinked polysaccharide derivatives having no photopolymerizable functional groups*. 1997: PCT Int. Appl. WO 9704011. p. 34.
73. CHEN, X.; QIN, F.; LIU, Y.; HUANG, X. & ZOU, H., "Synthesis of chiral stationary phases with radical polymerization reaction of cellulose phenylcarbamate derivatives and vinylized silica gel". *Journal of Chromatography, A*. **1034**(1-2): 109, 2004.
74. KUBOTA, T.; KUSANO, T.; YAMAMOTO, C.; YASHIMA, E. & OKAMOTO, Y., "Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized onto silica gel via copolymerization with a vinyl monomer and its chiral recognition ability as a chiral stationary phase for HPLC". *Chemistry Letters*, (7): 724, 2001.
75. KUBOTA, T.; YAMAMOTO, C. & OKAMOTO, Y., "Preparation of chiral stationary phase for HPLC based on immobilization of cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate derivatives on silica gel". *Chirality*. **15**(1): 77, 2003.

76. FRANCO, P.; MINGUILLON, C. & OLIVEROS, L., "Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases. III. Effect of the reticulation of the cellulose derivative on performance". *Journal of Chromatography, A*. **791**(1 + 2): 37, 1997.
77. IKAI, T.; YAMAMOTO, C.; KAMIGAITO, M. & OKAMOTO, Y., "Immobilization of polysaccharide derivatives onto silica gel". *Journal of Chromatography, A*. **1157**(1-2): 151, 2007.
78. FRANCO, P. & ZHANG, T., "Common approaches for efficient method development with immobilised polysaccharide-derived chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, B*. **875**(1): 48, 2008.
79. THUNBERG, L.; HASHEMI, J. & ANDERSSON, S., "Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers". *Journal of Chromatography, B*. **875**(1): 72, 2008.
80. ZHANG, T.; NGUYEN, D. & FRANCO, P., "Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilised polysaccharide-based chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **1191**(1-2): 214, 2008.
81. BELAZ, K.R.A.; CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V., "Determination of albendazole metabolites by direct injection of bovine plasma and multidimensional achiral-chiral high performance liquid chromatography". *Talanta*. **76**(1): 146, 2008.
82. HEFNAWY, M.; AL-MAJED, A. & AL-SUWAILEM, A., "Enantioanalysis of Tertatolol in Plasma and Pharmaceutical Formulations with Immobilized Polysaccharide-Derived HPLC Chiral Column at Nano-detection Level". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **32**(13): 1934, 2009.
83. LIU, K.; ZHONG, D. & CHEN, X., "Enantioselective quantification of chiral drugs in human plasma with LC-MS/MS". *Bioanalysis*. **1**(3): 561, 2009.
84. ZHANG, Y.; CAPORUSCIO, C.; DAI, J.; WITKUS, M.; ROSE, A.; SANTELLA, J.; D'ARIENZO, C.; WANG-IVERSON, D.B. & TYMIAK, A.A., "Development and implementation of a stereoselective normal-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intrinsic metabolic clearance in human liver microsomes". *Journal of Chromatography, B*. **875**(1): 154, 2008.
85. BELAZ, K.R.A.; COIMBRA, M.; BARREIRO, J.C.; MONTANARI, C.A. & CASS, Q.B., "Multimilligram enantioresolution of sulfoxide proton pump inhibitors by liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phase". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **47**(1): 81, 2008.
86. FERRETTI, R.; GALLINELLA, B.; LA TORRE, F.; ZANITTI, L.; TURCHETTO, L.; MOSCA, A. & CIRILLI, R., "Direct high-performance liquid chromatography enantioresolution of terazosin on an immobilised polysaccharide-based chiral stationary phase under polar organic and reversed-phase conditions". *Journal of Chromatography, A*. **1216**(28): 5385, 2009.
87. SOUSA, M.E.; TIRITAN, M.E.; BELAZ, K.R.A.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M.S.J.; CASS, Q.B. & PINTO, M.M.M., "Multimilligram enantioresolution of low-solubility xanthonolignoids on polysaccharide chiral stationary phases using a solid-phase injection system". *Journal of Chromatography, A*. **1120**(1-2): 75, 2006.
88. ZHANG, T.; SCHAEFFER, M. & FRANCO, P., "Optimization of the chiral separation of a Ca-sensitizing drug on an immobilized polysaccharide-based

- chiral stationary phase. Case study with a preparative perspective". *Journal of Chromatography, A*. **1083**(1-2): 96, 2005.
89. ARMSTRONG, D.W.; TANG, Y.; CHEN, S.; ZHOU, Y.; BAGWILL, C. & CHEN, J.-R., "Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography". *Analytical Chemistry*. **66**(9): 1473, 1994.
90. ILISZ, I.; BERKECZ, R. & PETER, A., "HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review". *Journal of Separation Science*. **29**(10): 1305, 2006.
91. ILISZ, I.; BERKECZ, R. & PETER, A., "Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **1216**(10): 1845, 2009.
92. BERTHOD, A., "Chiral recognition mechanisms with macrocyclic glycopeptide selectors". *Chirality*. **21**(1): 167, 2009.
93. WARD, T.J. & FARRIS, A.B., III, "Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review". *Journal of Chromatography, A*. **906**(1-2): 73, 2001.
94. ARMSTRONG, D.W.; LIU, Y. & EKBORGOTT, K.H., "A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations". *Chirality*. **7**(6): 474, 1995.
95. BERTHOD, A.; CHEN, X.; KULLMAN, J.P.; ARMSTRONG, D.W.; GASPARRINI, F.; D'ACQUARICA, I.; VILLANI, C. & CAROTTI, A., "Role of the Carbohydrate Moieties in Chiral Recognition on Teicoplanin-Based LC Stationary Phases". *Analytical Chemistry*. **72**(8): 1767, 2000.
96. BERTHOD, A.; LIU, Y.; BAGWILL, C. & ARMSTRONG, D.W., "Facile LC enantioresolution of native amino acids and peptides using a teicoplanin chiral stationary phase". *Journal of Chromatography, A*. **731**(1 + 2): 123, 1996.
97. PETER, A.; ARKI, A.; TOURWE, D.; FORRO, E.; FUELOEP, F. & ARMSTRONG, D.W., "Comparison of the separation efficiencies of Chirobiotic T and TAG columns in the separation of unusual amino acids". *Journal of Chromatography, A*. **1031**(1-2): 159, 2004.
98. SCHLAUCH, M. & FRAHM, A.W., "Enantiomeric and diastereomeric high-performance liquid chromatographic separation of cyclic beta -substituted alpha -amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase". *Journal of Chromatography, A*. **868**(2): 197, 2000.
99. PETER, A.; VEKES, E.; GERA, L.; STEWART, J.M. & ARMSTRONG, D.W., "A comparison of the direct and indirect LC methods for separating enantiomers of unusual glycine and alanine amino acid analogues". *Chromatographia*. **56**: 79, 2002.
100. BERTHOD, A.; XIAO, T.L.; LIU, Y.; JENKS, W.S. & ARMSTRONG, D.W., "Separation of chiral sulfoxides by liquid chromatography using macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **955**(1): 53, 2002.
101. TESAROVA, E.; ZARUBA, K. & FLIEGER, M., "Enantioseparation of semisynthetic ergot alkaloids on vancomycin and teicoplanin stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **844**(1-2): 137, 1999.
102. ANDERSSON, M.E.; ASLAN, D.; CLARKE, A.; ROERADE, J. & HAGMAN, G., "Evaluation of generic chiral liquid chromatography screens for pharmaceutical analysis". *Journal of Chromatography, A*. **1005**(1-2): 83, 2003.



103. DIJKSTRA, G.D.H.; KELLOGG, R.M.; WYNBERG, H.; SVENDSEN, J.S.; MARKO, I. & SHARPLESS, K.B., "Conformational study of cinchona alkaloids. A combined NMR, molecular mechanics and x-ray approach". *Journal of the American Chemical Society*. **111**(21): 8069, 1989.
104. LAEMMERHOFER, M. & LINDNER, W., "Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors. I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers". *Journal of Chromatography, A*. **741**(1): 33, 1996.
105. MANDL, A.; NICOLETTI, L.; LAMMERHOFER, M. & LINDNER, W., "Quinine versus carbamoylated quinine-based chiral anion exchangers. A comparison regarding enantioselectivity for N-protected amino acids and other chiral acids". *Journal of Chromatography, A*. **858**(1): 1, 1999.
106. SARDELLA, R.; LAMMERHOFER, M.; NATALINI, B. & LINDNER, W., "Enantioselective HPLC of potentially CNS-active acidic amino acids with a cinchona carbamate based chiral stationary phase". *Chirality*. **20**(3/4): 571, 2008.
107. MAIER, N.M.; NICOLETTI, L.; LAMMERHOFER, M. & LINDNER, W., "Enantioselective anion exchangers based on cinchona alkaloid-derived carbamates: influence of C8/C9 stereochemistry on chiral recognition". *Chirality*. **11**(7): 522, 1999.
108. MAIER, N.M.; SCHEFZICK, S.; LOMBARDO, G.M.; FELIZ, M.; RISSANEN, K.; LINDNER, W. & LIPKOWITZ, K.B., "Elucidation of the Chiral Recognition Mechanism of Cinchona Alkaloid Carbamate-type Receptors for 3,5-Dinitrobenzoyl Amino Acids". *Journal of the American Chemical Society*. **124**(29): 8611, 2002.
109. PIRKLE, W.H. & HOUSE, D.W., "Chiral high-performance liquid chromatographic stationary phases: Separation of the enantiomers of sulfoxides, amines, amino acids, alcohols, hydroxy acids, lactones, and mercaptans". *Journal of Organic Chemistry*. **44**(12): 1957, 1979.
110. WELCH, C.J., "Crawling out of the chiral pool: the evolution of Pirkle-type chiral stationary phases". *Advances in Chromatography*. **35**: 171, 1995.
111. BARGMANN-LEYDER, N.; TRUFFERT, J.C.; TAMBUTE, A. & CAUDE, M., "Evaluation of Pirkle-type chiral stationary phases by liquid and supercritical fluid chromatography. Influence of the spacer length and the steric hindrance in the vicinity of the stereogenic center". *Journal of Chromatography, A*. **666**(1-2): 27, 1994.
112. FELIX, G. & BERTHOD, A., "Commercial Chiral Stationary Phases for the Separations of Clinical Racemic Drugs". *Separation and Purification Reviews*. **36**(4): 285, 2007.
113. PIRKLE, W.H. & WELCH, C.J., "Chromatographic separation of the enantiomers of acylated amines on chiral stationary phases". *Journal of Organic Chemistry*. **49**(1): 138, 1984.
114. PIRKLE, W.H. & WELCH, C.J., "An improved chiral stationary phase for the chromatographic separation of underivatized naproxen enantiomers". *Journal of Liquid Chromatography*. **15**(11): 1947, 1992.
115. CLEVELAND, T., "Pirkle-concept chiral stationary phases for the HPLC separation of pharmaceutical racemates". *Journal of Liquid Chromatography*. **18**(4): 649, 1995.
116. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. & GLAJCH, J.L., *Practical HPLC Method Development* 2<sup>nd</sup> ed. 1997: John Wiley and Sons, Inc. p. 585.

117. GARGARO, G.; GASPARRINI, F.; MISITI, D.; PALMIERI, G.; PIERINI, M. & VILLANI, D., "New HPLC chiral stationary phases for enantiomeric resolution of sulfoxides and selenoxides". *Chromatographia*. **24**: 505, 1987.
118. DAVANKOV, V.A. & ROGOZHIN, S.V., "Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes. Stereoselective effects in alpha -amino acid-copper(II) complexes". *Journal of Chromatography*. **60**(2): 280, 1971.
119. DAVANKOV, V.A., "30 years of chiral ligand exchange". *Enantiomer*. **5**(3-4): 209, 2000.
120. DAVANKOV, V.A., "Enantioselective ligand exchange in modern separation techniques". *Journal of Chromatography, A*. **1000**(1-2): 891, 2003.
121. HYUN, M.H.; HAN, S.C. & WHANGBO, S.H., "New ligand exchange chiral stationary phase for the liquid chromatographic resolution of alpha - and beta - amino acids". *Journal of Chromatography, A*. **992**(1-2): 47, 2003.
122. CHEN, Z.; UCHIYAMA, K. & HOBO, T., "Chemically modified chiral monolithic silica column prepared by a sol-gel process for enantiomeric separation by micro high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography, A*. **942**(1-2): 83, 2002.
123. GUBITZ, G.S., M., G., *Chiral Separation by Ligand Exchange*, in *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 2007, Wiley-VCH: Weinheim. p. 161.
124. ILISZ, I.; TOURWE, D.; ARMSTRONG, D.W. & PETER, A., "High-performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual secondary amino acids on a D-penicillamine-based chiral ligand exchange column". *Chirality*. **18**(7): 539, 2006.
125. KURGANOV, A.; DAVANKOV, V.; UNGER, K.; EISENBEISS, F. & KINKEL, J., "Unusual peak distortion in ligand-exchange chromatography of enantiomers under overloaded conditions". *Journal of Chromatography, A*. **666**(1-2): 99, 1994.
126. MIYAZAWA, T.; MINOWA, H.; IMAGAWA, K. & YAMADA, T., "Separation of enantiomers of non-protein amino acids by high-performance liquid chromatography on a chiral ligand-exchange column". *Chromatographia*. **60**(1/2): 45, 2004.
127. NATALINI, B.; SARDELLA, R.; MACCHIARULO, A. & PELLICCIARI, R., "Cysteine-based chiral selectors for the ligand-exchange separation of amino acids". *Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **875**(1): 108, 2008.
128. ZAHER, M.; BAUSSANNE, I.; RAVELET, C.; HALDER, S.; HAROUN, M.; FIZE, J.; DECOUT, J.-L. & PEYRIN, E., "Copper(II) complexes of lipophilic aminoglycoside derivatives for the amino acid enantiomeric separation by ligand-exchange liquid chromatography". *Journal of Chromatography, A*. **1185**(2): 291, 2008.
129. SOGAH, G.D.Y. & CRAM, D.J., "Host-guest complexation. 14. Host covalently bound to polystyrene resin for chromatographic resolution of enantiomers of amino acid and ester salts". *Journal of the American Chemical Society*. **101**(11): 3035, 1979.
130. SOUSA, L.R.; SOGAH, G.D.Y.; HOFFMAN, D.H. & CRAM, D.J., "Host-guest complexation. 12. Total optical resolution of amine and amino ester salts by chromatography". *Journal of the American Chemical Society*. **100**(14): 4569, 1978.

131. SHINBO, T.; YAMAGUCHI, T.; NISHIMURA, K. & SUGIURA, M., "Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings". *Journal of Chromatography*. **405**: 145, 1987.
132. SHINBO, T.; YAMAGUCHI, T.; YANAGISHITA, H.; KITAMOTO, D.; SAKAKI, K. & SUGIURA, M., "Improved crown ether-based chiral stationary phase". *Journal of Chromatography*. **625**(2): 101, 1992.
133. LEE, W. & YONG HONG, C., "Direct liquid chromatographic enantiomer separation of new fluoroquinolones including gemifloxacin". *Journal of Chromatography, A*. **879**(2): 113, 2000.
134. HYUN, M.H.; HAN, S.C.; LIPSHUTZ, B.H.; SHIN, Y.J. & WELCH, C.J., "New chiral crown ether stationary phase for the liquid chromatographic resolution of alpha -amino acid enantiomers". *Journal of Chromatography, A*. **910**(2): 359, 2001.
135. MACHIDA, Y.; NISHI, H.; NAKAMURA, K.; NAKAI, H. & SATO, T., "Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether". *Journal of Chromatography, A*. **805**(1-2): 85, 1998.
136. BERKECZ, R.; ILISZ, I.; FUELOEP, F.; PATAJ, Z.; HYUN, M.H. & PETER, A., "High-performance liquid chromatographic enantioseparation of beta -3-homo-amino acid stereoisomers on a (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phase". *Journal of Chromatography, A*. **1189**(1-2): 285, 2008.
137. HYUN, M.H.; KOO, H.J.; JIN, J.S. & LEE, W., "Liquid chromatographic resolution of racemic compounds containing a primary amino group on a dynamic chiral stationary phase derived from chiral crown ether". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **23**(17): 2669, 2000.
138. HYUN, M.H.; SONG, Y.; CHO, Y.J. & KIM, D.H., "Preparation of a new doubly tethered chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid and its application". *Journal of Chromatography, A*. **1108**(2): 208, 2006.
139. HIROSE, K.; NAKAMURA, T.; NISHIOKA, R.; UESHIGE, T. & TOBE, Y., "Preparation and evaluation of novel chiral stationary phases covalently bound with chiral pseudo-18-crown-6 ethers". *Tetrahedron Letters*. **44**(8): 1549, 2003.
140. HIROSE, K.; YONGZHU, J.; NAKAMURA, T.; NISHIOKA, R.; UESHIGE, T. & TOBE, Y., "Chiral stationary phase covalently bound with a chiral pseudo-18-crown-6 ether for enantiomer separation of amino compounds using a normal mobile phase". *Chirality*. **17**(3): 142, 2005.
141. HIROSE, K.; YONGZHU, J.; NAKAMURA, T.; NISHIOKA, R.; UESHIGE, T. & TOBE, Y., "Preparation and evaluation of a chiral stationary phase covalently bound with chiral pseudo-18-crown-6 ether having 1-phenyl-1,2-cyclohexanediol as a chiral unit". *Journal of Chromatography, A*. **1078**(1-2): 35, 2005.
142. HO HYUN, M.; SUNG JIN, J. & LEE, W., "Liquid chromatographic resolution of racemic amino acids and their derivatives on a new chiral stationary phase based on crown ether". *Journal of Chromatography, A*. **822**(1): 155, 1998.
143. HILTON, M. & ARMSTRONG, D.W., "Evaluation of a chiral crown ether LC column for the separation of racemic amines". *Journal of Liquid Chromatography*. **14**(1): 9, 1991.

144. HYUN, M.H.; TAN, G. & CHO, Y.J., "Liquid chromatographic resolution of aryl alpha -amino ketones on chiral stationary phases based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **27**(11): 1671, 2004.
145. HYUN, M.H.; HAN, S.C.; LIPSHUTZ, B.H.; SHIN, Y.-J. & WELCH, C.J., "Liquid chromatographic resolution of racemic amines, amino alcohols and related compounds on a chiral crown ether stationary phase". *Journal of Chromatography, A*. **959**(1-2): 75, 2002.
146. HYUN, M.H.; MIN, H.J. & CHO, Y.J., "Enantiomeric separation of tocainide and its analogues on an optically active crown ether-based stationary phase by liquid chromatography". *Journal of Chromatography, A*. **996**(1-2): 233, 2003.
147. HYUN, M.H., *Enantiomer Separation by Chiral Crown Ether Stationary Phases*, in *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 2007, Wiley-VCH: Weinheim, Alemanha.
148. OKAMOTO, Y.; HONDA, S.; OKAMOTO, I.; YUKI, H.; MURATA, S.; NOYORI, R. & TAKAYA, H., "Novel packing material for optical resolution: (+)-poly(triphenylmethyl methacrylate) coated on macroporous silica gel". *Journal of the American Chemical Society*. **103**(23): 6971, 1981.
149. NAKANO, T., "Optically active synthetic polymers as chiral stationary phases in HPLC". *Journal of Chromatography, A*. **906**(1-2): 205, 2001.
150. PELUSO, P.; COSSU, S.; MORETTO, F. & MARCHETTI, M., "High performance liquid chromatographic enantioseparation of chiral bridged polycyclic compounds on Chiralcel OD-H and Chiralpak OT(+)" *Chirality*. **21**(5): 507, 2009.
151. BLASCHKE, G.; FRAENKEL, W.; BROEKER, W. & KINKEL, J., *Optically active stationary phase for chromatographic resolution of racemic mixtures*. 1987: DE 3619303. p. 6.
152. CANNAZZA, G.; BRAGHIROLI, D.; IULIANI, P. & PARENTI, C., "Energy barrier determination of enantiomerization of chiral 3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide type compounds by enantioselective stopped-flow HPLC". *Tetrahedron Asymmetry*. **17**(22): 3158, 2006.
153. CIRILLI, R.; COSTI, R.; DI SANTO, R.; ARTICO, M.; ROUX, A.; GALLINELLA, B.; ZANITTI, L. & LA TORRE, F., "Enantioselective liquid chromatography of C3-chiral 2,3-dihydro-1,2,5-benzothiadiazepin-4(5H)-one and thione 1,1-dioxides on polyacrylamide- and polysaccharide-based chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **993**(1-2): 17, 2003.
154. SCHULTE, M.; DEVANT, R. & GROSSER, R., "Enantioseparation of gantofiban precursors on chiral stationary phases of the poly-(N-acryloyl amino acid derivative)-type". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **27**(3-4): 627, 2002.
155. ALLENMARK, S.G.; ANDERSSON, S.; MOELLER, P. & SANCHER, D., "A new class of network-polymeric chiral stationary phases". *Chirality*. **7**(4): 248, 1995.
156. ZHONG, Q.; HAN, X.; HE, L.; BEESLEY, T.E.; TRAHANOVSKY, W.S. & ARMSTRONG, D.W., "Chromatographic evaluation of poly(trans-1,2-cyclohexanediyl-bisacrylamide) as a chiral stationary phase for HPLC". *Journal of Chromatography, A*. **1066**(1-2): 55, 2005.
157. HAN, X.; HE, L.; ZHONG, Q.; BEESLEY, T.E. & ARMSTRONG, D.W., "Synthesis and evaluation of a synthetic polymeric chiral stationary phase for LC based on the N,N'-[(1R,2R)-1,2-diphenyl-1,2-ethanediyl]bis-2-propenamide monomer". *Chromatographia*. **63**(1-2): 13, 2006.

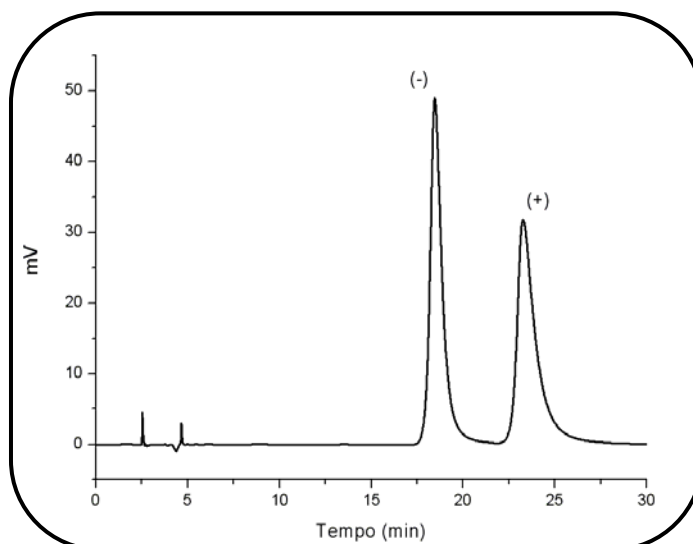
158. HAN, X.; WANG, C.; HE, L.; BEESLEY, T.E. & ARMSTRONG, D.W., "Preparation and evaluation of a new synthetic polymeric chiral stationary phase for HPLC based on the trans-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-(11S,12S)-11,12-dicarboxylic acid bis-4-vinylphenylamide monomer". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **387**(8): 2681, 2007.
159. LOURENCO, T.C.; ARMSTRONG, D.W. & CASS QUEZIA, B., "Enantiomeric Resolution of a Chiral Sulfoxide Series by LC on Synthetic Polymeric Columns with Multimodal Elution ". *Chromatographia*.10.1365/s10337-009-1460-x, 2010.
160. SELLERGREN, B., *Separation of enantiomers using molecularly imprinted polymers*, in *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, SUBRAMANIAN, G., Editor. 2007, Wiley-VCH: Weinheim. p. 399.
161. SELLERGREN, B.; LEPISTOE, M. & MOSBACH, K., "Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition". *Journal of the American Chemical Society*. **110**(17): 5853, 1988.
162. SELLERGREN, B. & SHEA, K.J., "Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers". *Journal of Chromatography*. **635**(1): 31, 1993.
163. MAIER, N.M. & LINDNER, W., "Chiral recognition applications of molecularly imprinted polymers: a critical review". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **389**(2): 377, 2007.
164. SPIVAK, D.A. & CAMPBELL, J., "Systematic study of steric and spatial contributions to molecular recognition by non-covalent imprinted polymers". *Analyst*. **126**(6): 793, 2001.
165. TURIEL, E. & MARTIN-ESTEBAN, A., "Molecularly imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **378**(8): 1876, 2004.
166. HAGINAKA, J., "Application of molecularly imprinted polymers in high-performance liquid chromatography". *Trends in Chromatography*. **1**: 111, 2005.
167. ANSELL, R.J. & KUAH, K.L., "Imprinted polymers for chiral resolution of (+)-ephedrine: understanding the pre-polymerization equilibrium and the action of different mobile phase modifiers". *Analyst*. **130**(2): 179, 2005.
168. ANSELL, R.J., "Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs". *Advanced Drug Delivery Reviews*. **57**(12): 1809, 2005.
169. KEMPE, M., "Antibody-Mimicking Polymers as Chiral Stationary Phases in HPLC". *Analytical Chemistry*. **68**(11): 1948, 1996.
170. KEMPE, M.; FISCHER, L. & MOSBACH, K., "Chiral separation using molecularly imprinted heteroaromatic polymers". *Journal of Molecular Recognition*. **6**(1): 25, 1993.
171. RAMSTROEM, O.; NICHOLLS, I.A. & MOSBACH, K., "Synthetic peptide receptor mimics: highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers". *Tetrahedron: Asymmetry*. **5**(4): 649, 1994.
172. GUO-QIANG, L.; YUE-MING, L. & CHAN, A.S.C., *Principles and Applications of Asymmetric Synthesis*. 2001, Nova York: John Wiley & Sons, Inc. pp 7.
173. RAYNER, D.R.; GORDON, A.J. & MISLOW, K., "Thermal racemization of diaryl, alkyl aryl, and dialkyl sulfoxides by pyramidal inversion". *Journal of the American Chemical Society*. **90**(18): 4854, 1968.

174. FERNANDEZ, I. & KHIAR, N., "Recent Developments in the Synthesis and Utilization of Chiral Sulfoxides". *Chemical Reviews*. **103**(9): 3651, 2003.
175. MONTANARI, F. & NEGRINI, A., "Ethylenation. XVII. Stereochemistry of 1,2-bis(arylsulfinyl)ethylenes". *Gazzetta Chimica Italiana*. **89**: 1548, 1959.
176. THAYER, A.M., "Centering on Chirality". *Chemical and Engineering News*. **85**(32): 11, 2007.
177. ROEHSS, K.; WILDER-SMITH, C.; KILHAMN, J.; FJELLMAN, M. & LIND, T., "Suppression of gastric acid with intravenous esomeprazole and omeprazole: results of 3 studies in healthy subjects". *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. **45**(6): 345, 2007.
178. MATLIN, S.A.; TIRITAN, M.E.; CASS, Q.B. & BOYD, D.R., "Enantiomeric resolution of chiral sulfoxides on polysaccharide phases by HPLC". *Chirality*. **8**(1): 147, 1996.
179. TANAKA, M.; YAMAZAKI, H. & HAKUSUI, H., "Direct HPLC separation of enantiomers of pantoprazole and other benzoimidazole sulfoxides using cellulose-based chiral stationary phases in reversed-phase mode". *Chirality*. **7**(8): 612, 1995.
180. CASS, Q.B.; KOHN, C.K.; CALAFATTI, S.A. & ABOUL-ENEIN, H.Y., "An enantioselective assay for (+-)-modafinil". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **26**(1): 123, 2001.
181. CASS, Q.B. & FERREIRA GALATTI, T., "A method for determination of the plasma levels of modafinil enantiomers, (+-)-modafinil acid and modafinil sulphone by direct human plasma injection and bidimensional achiral-chiral chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **46**(5): 937, 2008.
182. HAUCK, W.; ADAM, P.; BOBIER, C. & LANDMESSER, N., "Use of large-scale chromatography in the preparation of armodafinil". *Chirality*. **20**(8): 896, 2008.
183. TORIBIO, L.; ALONSO, C.; JESUS DEL NOZAL, M.; BERNAL, J.L. & JIMENEZ, J.J., "Enantiomeric separation of chiral sulfoxides by supercritical fluid chromatography". *Journal of Separation Science*. **29**(10): 1363, 2006.
184. TORIBIO, L.; NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L. & NIETO, E.M., "Use of semipreparative supercritical fluid chromatography to obtain small quantities of the albendazole sulfoxide enantiomers". *Journal of Chromatography, A*. **1011**(1-2): 155, 2003.
185. CHANKVETADZE, B.; YAMAMOTO, C. & OKAMOTO, Y., "Enantioseparation of selected chiral sulfoxides using polysaccharide-type chiral stationary phases and polar organic, polar aqueous-organic and normal-phase eluents". *Journal of Chromatography, A*. **922**(1-2): 127, 2001.
186. MERICKO, D.; LEHOTAY, J.; SKACANI, I. & ARMSTRONG, D., "Effect of temperature on retention and enantiomeric separation of chiral sulfoxides using teicoplanin aglycone chiral stationary phase". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **29**(5): 623, 2006.
187. MITCHELL, C.; DESAI, M.; MCCULLA, R.; JENKS, W. & ARMSTRONG, D., "Use of native and derivatized cyclodextrin chiral stationary phases for the enantioseparation of aromatic and aliphatic sulfoxides by high performance liquid chromatography". *Chromatographia*. **56**(3/4): 127, 2002.
188. KUESTERS, E. & GERBER, G., "Enantiomeric separation of racemic sulfoxides on chiral stationary phases by gas and liquid chromatography". *Chromatographia*. **44**(1/2): 91, 1997.

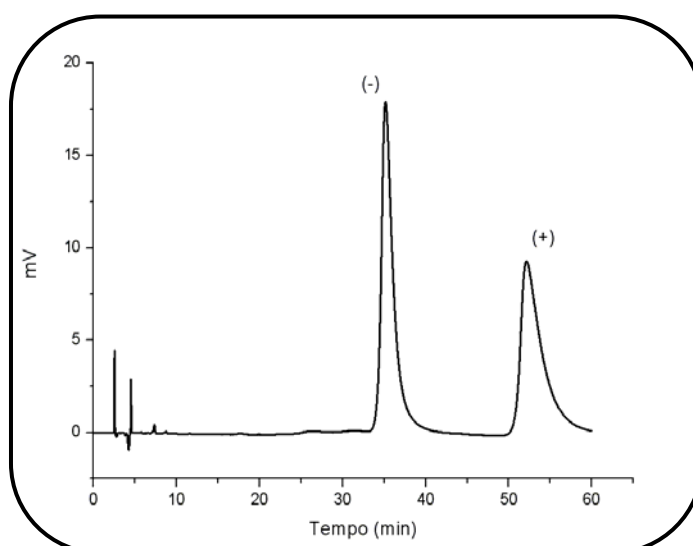
189. BONATO, P.S.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C.M.; PAIAS, F.O.; IHA, M.H. & LIMA, R.P., "Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide- and protein-based chiral stationary phases". *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **13**(2): 190, 2002.
190. BALMER, K.; PERSSON, B.-A. & LAGERSTROEM, P.-O., "Stereoselective effects in the separation of enantiomers of omeprazole and other substituted benzoimidazoles on different chiral stationary phases". *Journal of Chromatography, A*. **660**(1-2): 269, 1994.
191. GASPARRINI, F.; MISITI, D. & VILLANI, C., "Behavior of allyl aryl sulfoxides in high-performance liquid chromatography on a chiral stationary phase". *Journal of Chromatography, A*. **694**(1): 163, 1995.
192. WELCH, C.J.; SZCZERBA, T. & PERRIN, S.R., "Some recent high-performance liquid chromatography separations of the enantiomers of pharmaceuticals and other compounds using the Whelk-O 1 chiral stationary phase". *Journal of Chromatography, A*. **758**(1): 93, 1997.
193. ARMSTRONG, D.W., "Optical isomer separation by liquid chromatography". *Analytical Chemistry*. **59**(2): 84A, 1987.
194. BARNHART, W.W.; GAHM, K.H.; HUA, Z. & GOETZINGER, W., "Supercritical fluid chromatography comparison of the poly(trans-1,2-cyclohexanediyl-bis acrylamide) (P-CAP) column with several derivatized polysaccharide-based stationary phases". *Journal of Chromatography, B*. **875**(1): 217, 2008.
195. YAMAMOTO, C. & OKAMOTO, Y., "Optically active polymers for chiral separation". *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **77**(2): 227, 2004.
196. LOPES, B.R. *Estudo da Oxidação de Sulfetos pró-quirais com Oxo Diperoxo Complexos de Molibdênio*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. p 134.
197. ZHANG, T.; KIENTZY, C.; FRANCO, P.; OHNISHI, A.; KAGAMIHARA, Y. & KUROSAWA, H., "Solvent versatility of immobilized 3,5-dimethylphenylcarbamate of amylose in enantiomeric separations by HPLC". *Journal of Chromatography, A*. **1075**(1-2): 65, 2005.
198. SOUSA, E.P.; TIRITAN, M.E.; OLIVEIRA, R.V.; AFONSO, C.M.M.; CASS, Q.B. & PINTO, M.M.M., "Enantiomeric resolution of kielcorin derivatives by HPLC on polysaccharide stationary phases using multimodal elution". *Chirality*. **16**(5): 279, 2004.
199. MONTANARI, M.L.C.; CASS, Q.B.; LEITAO, A.; ANDRICOPULO, A.D. & MONTANARI, C.A., "The role of molecular interaction fields on enantioselective and nonselective separation of chiral sulfoxides". *Journal of Chromatography, A*. **1121**(1): 64, 2006.
200. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M. & HATADA, K., "Chromatographic resolution. XI. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel". *Journal of Chromatography*. **363**(2): 173, 1986.
201. TIRITAN, M.E. *Resolução Enantiomérica de Sulfóxidos Quirais por CLAE, em Carbamatos de Polissacarídeos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 1996. p 126.
202. JONES, A.D.; BURNS, I.W.; SELLINGS, S.G. & COX, J.A., "Preparation, optimization and slurry packing of an amino bonded phase for the analysis of sugars in food by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography*. **144**(2): 169, 1977.

**ANEXO I – Cromatogramas Seleccionados DEAVB**

Cromatograma 1 – Coluna: DEAVB

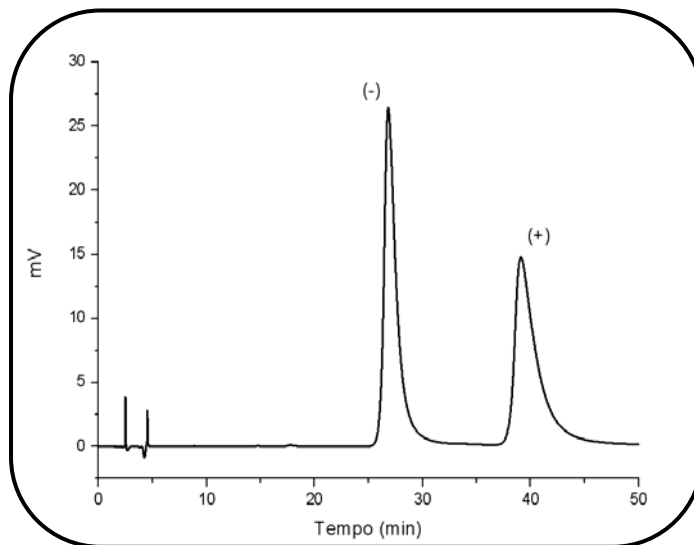
Amostra Padrão: Lansoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )Fase Móvel: *n*-hexano/etanol (80:20)Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$ 

Cromatograma 2 – Coluna: DEAVB

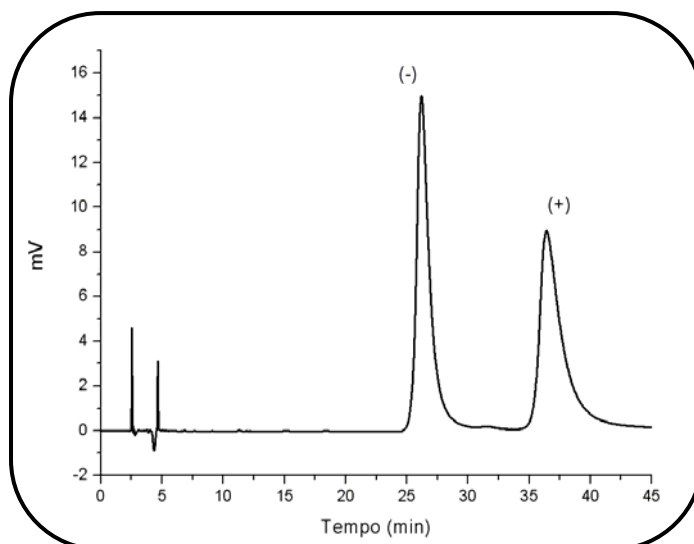
Amostra Padrão: Pantoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )Fase Móvel: *n*-hexano/etanol (80:20)Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$ 



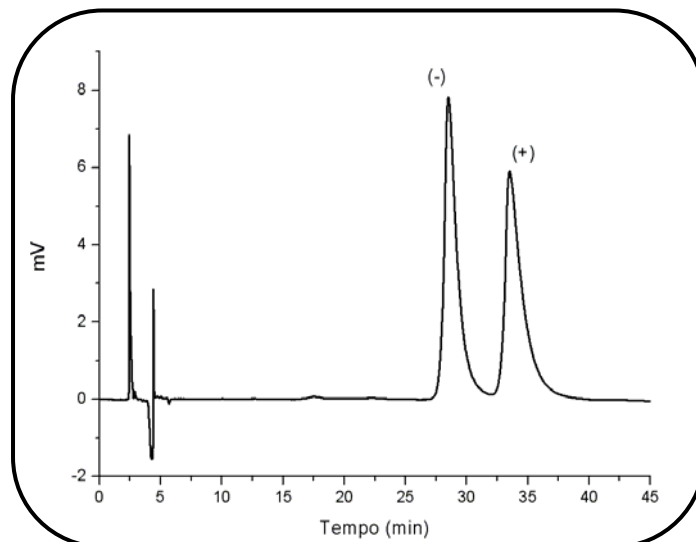
## Cromatograma 3 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Omeprazol (0,1mg.mL<sup>-1</sup>)Fase Móvel: *n*-hexano/etanol (80:20)Vazão: 1,0mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 302$  nm

## Cromatograma 4 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Rabeprazol (0,1mg.mL<sup>-1</sup>)Fase Móvel: *n*-hexano/etanol (80:20)Vazão: 1,0mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 285$  nm

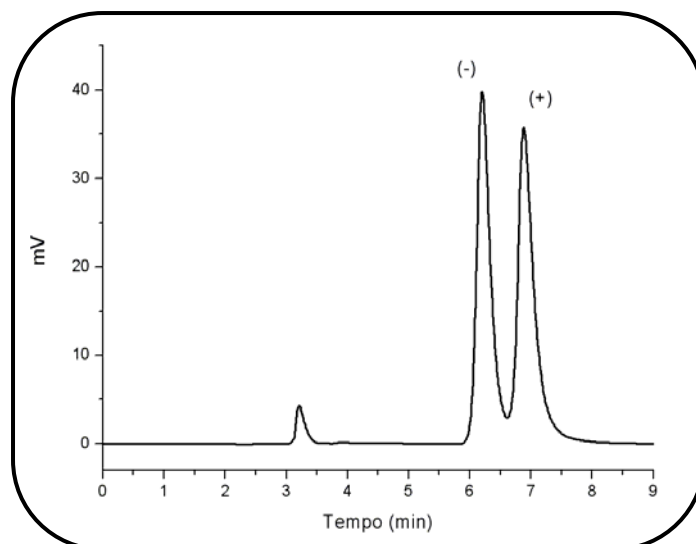
## Cromatograma 5 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Modafinil ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )Fase Móvel: *n*-hexano/etanol (80:20)Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 240\text{ nm}$ 

## Cromatograma 6 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Lansoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: ACN (100%)

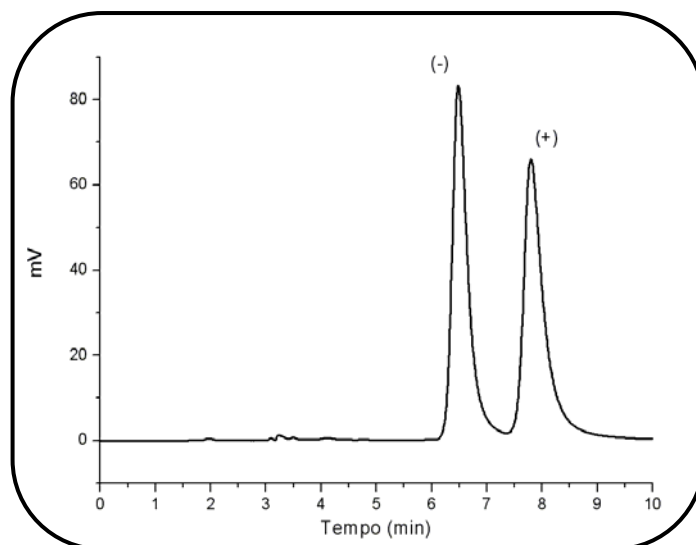
Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$ 

Cromatograma 7 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Pantoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: ACN (100%)

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

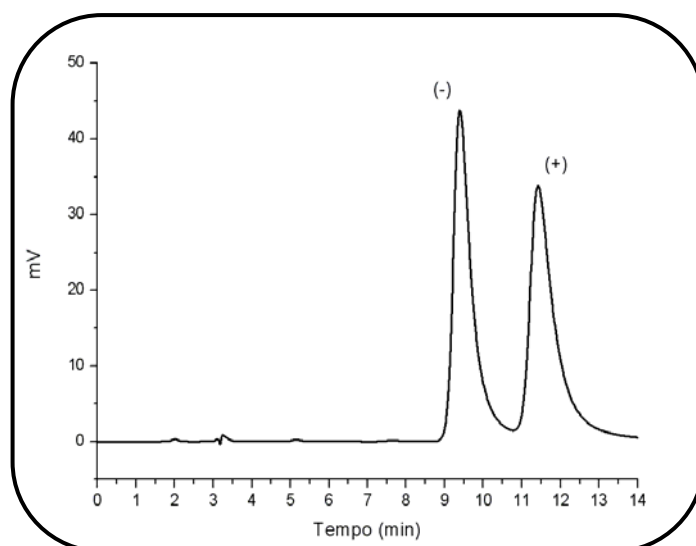


Cromatograma 8 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Omeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: ACN (100%)

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 302\text{ nm}$

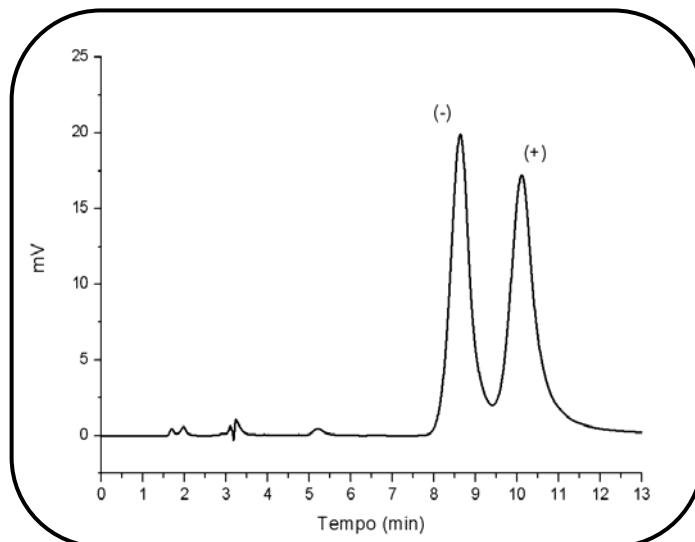


Cromatograma 9 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Rabeprazol(0,1mg.mL<sup>-1</sup>)

Fase Móvel: ACN (100%)

Vazão: 1,0mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 285$  nm

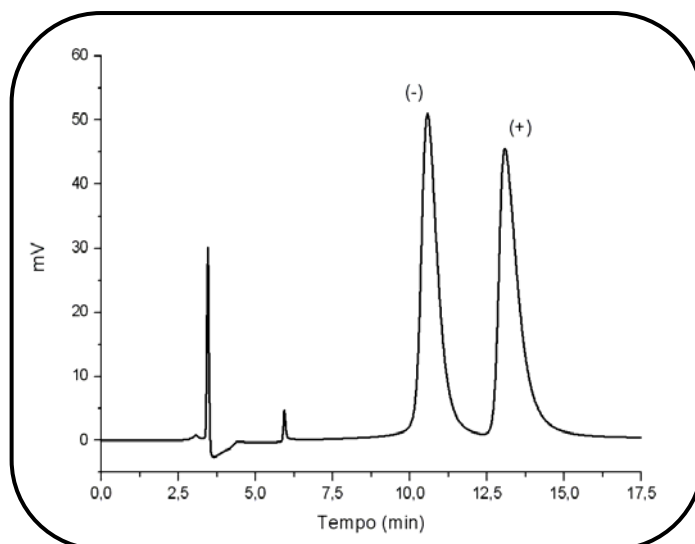


Cromatograma 10 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Lansoprazol (0,1mg.mL<sup>-1</sup>)

Fase Móvel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99:01)

Vazão: 1,0mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 285$  nm

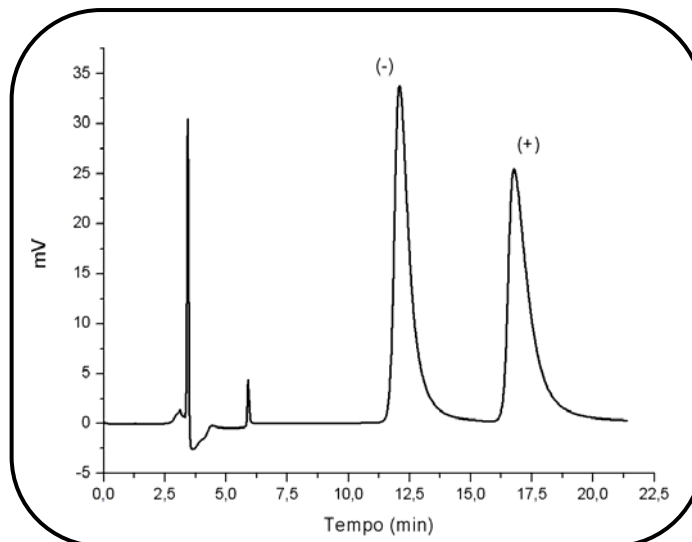


Cromatograma 11 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Pantoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (99:01)

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

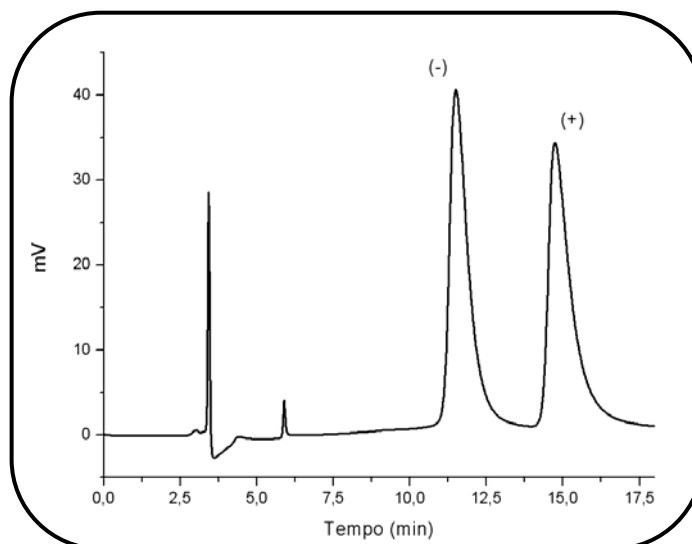


Cromatograma 12 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Omeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (99:01)

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 302\text{ nm}$

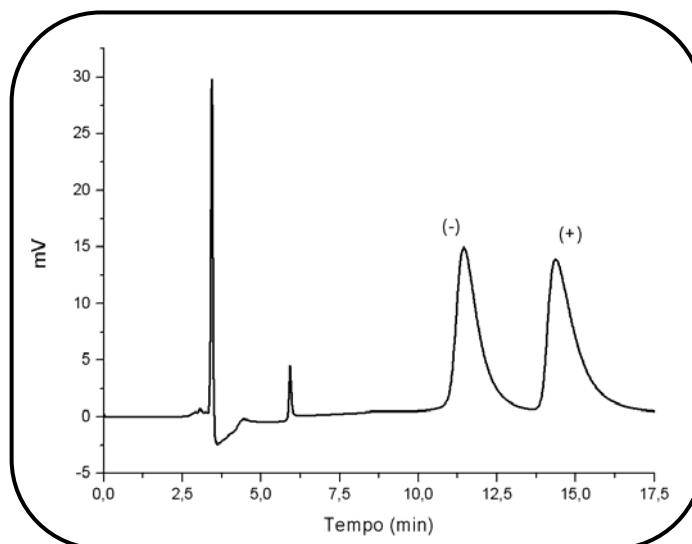


Cromatograma 13– Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Rabeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (99:01)

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

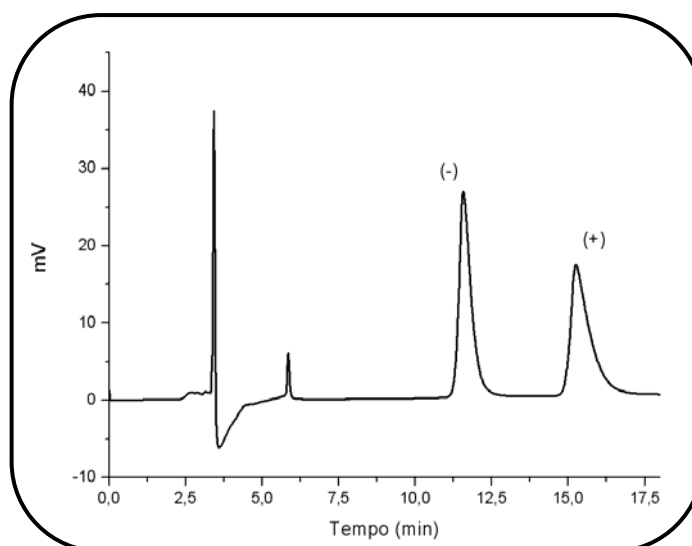


Cromatograma 14 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Modafinil ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (99:01)

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 240\text{ nm}$

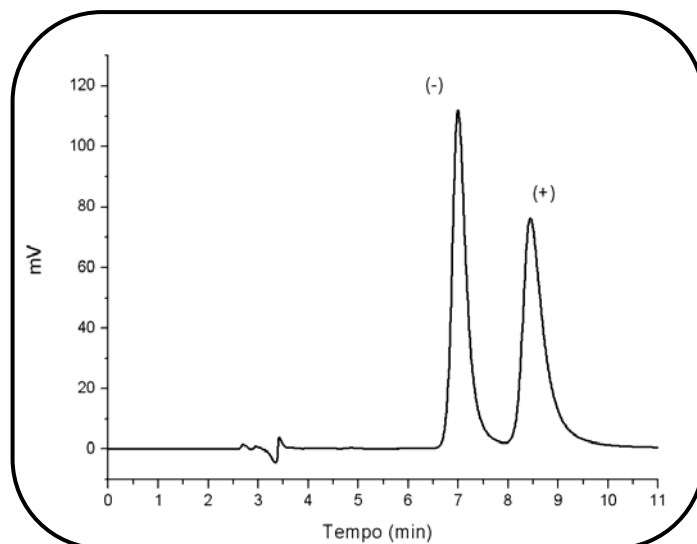


Cromatograma 15 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Lansoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/metil *tert*-butil éter/EtOH (30:45:25).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

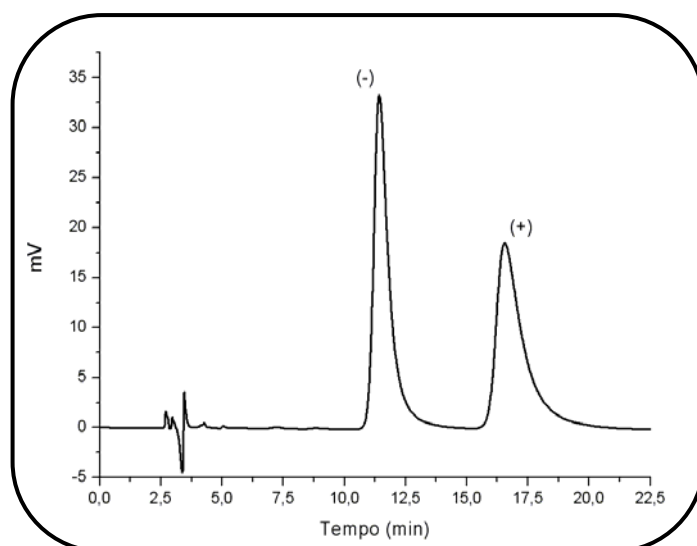


Cromatograma 16 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Pantoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano /metil *tert*-butil éter/EtOH (30:45:25).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

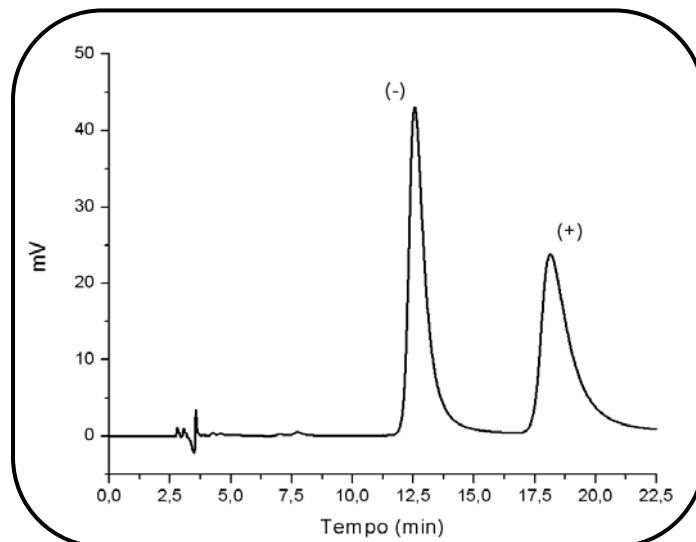


Cromatograma 17 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Omeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano /metil *tert*-butil éter/EtOH (30:45:25).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 302\text{ nm}$

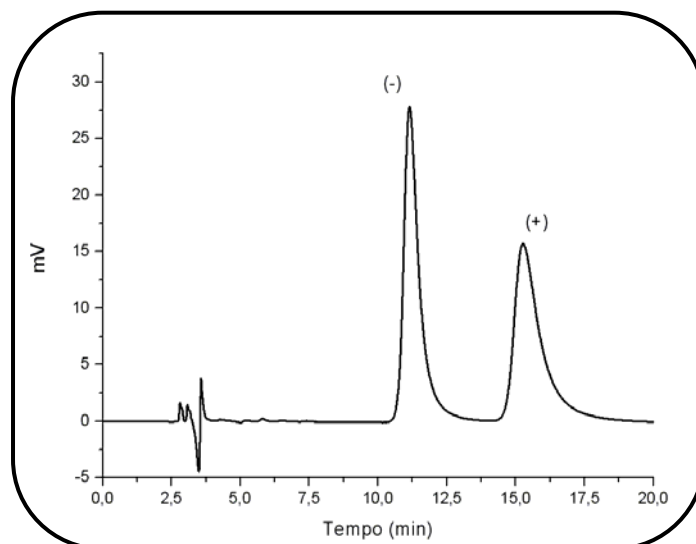


Cromatograma 18 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Rabeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano /metil *tert*-butil éter/EtOH (30:45:25).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$



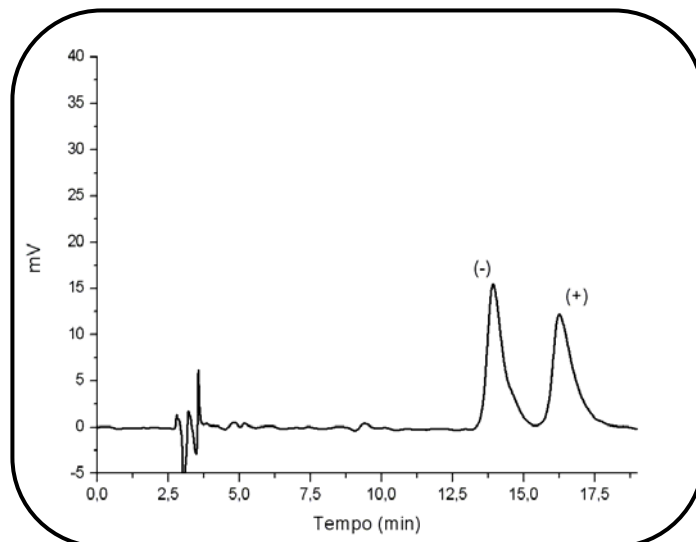


Cromatograma 19 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Modafinil ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano /metil *tert*-butil éter/EtOH (30:45:25).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 240\text{ nm}$

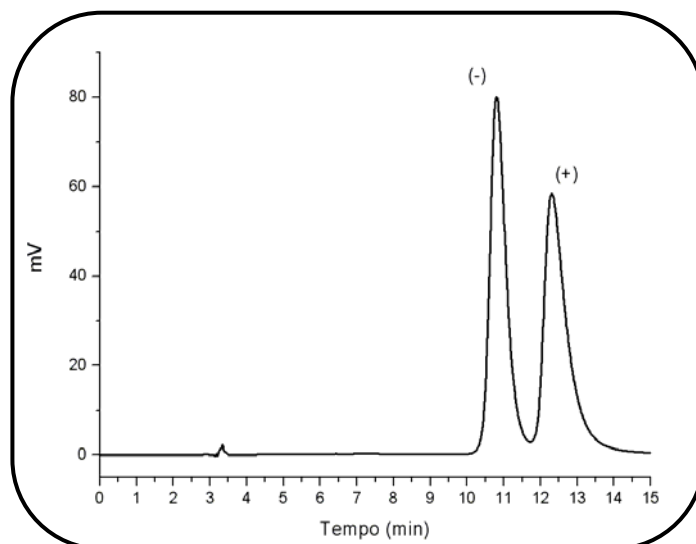


Cromatograma 20 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Lansoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: MeOH/  $\text{H}_2\text{O}$  (70:30).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

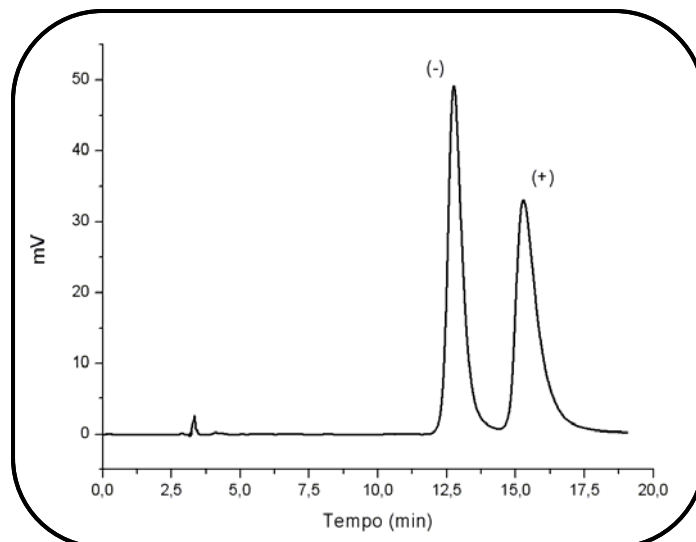


Cromatograma 21 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Pantoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: MeOH/ H<sub>2</sub>O (70:30).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

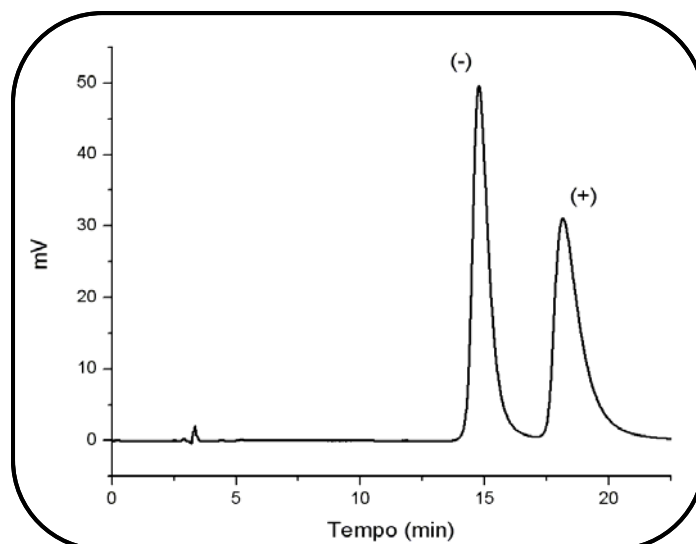


Cromatograma 22 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Omeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: MeOH/ H<sub>2</sub>O (70:30).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 302\text{ nm}$

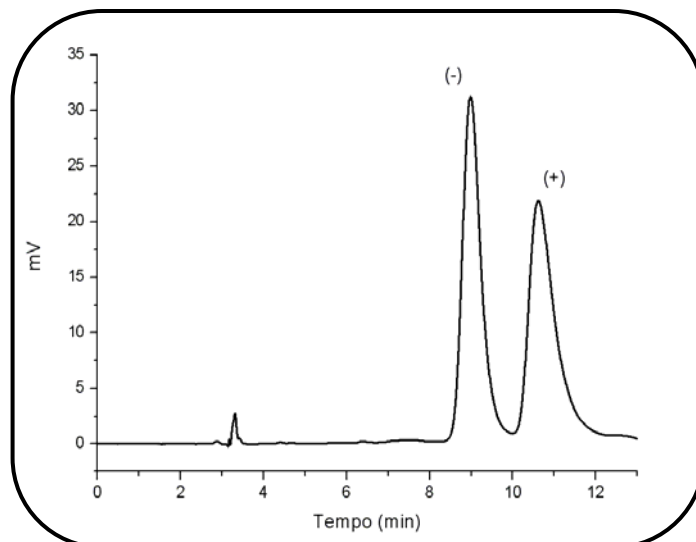


Cromatograma 23 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Rabeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: MeOH/ H<sub>2</sub>O (70:30).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

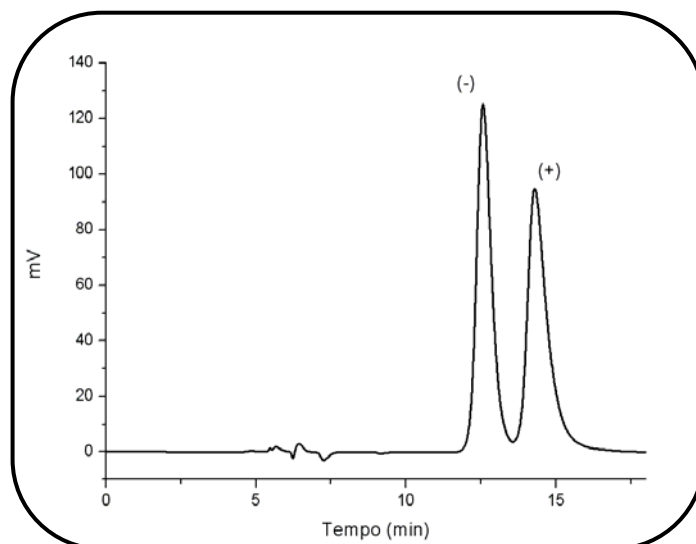


Cromatograma 24 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Lansoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

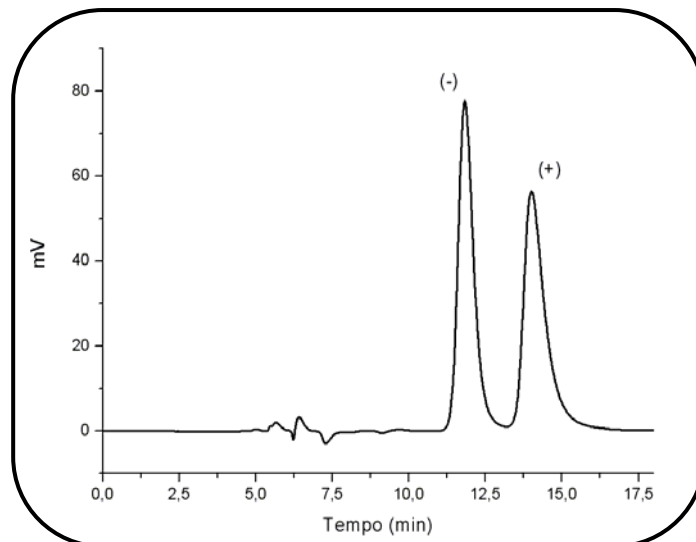


Cromatograma 25 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Pantoprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$

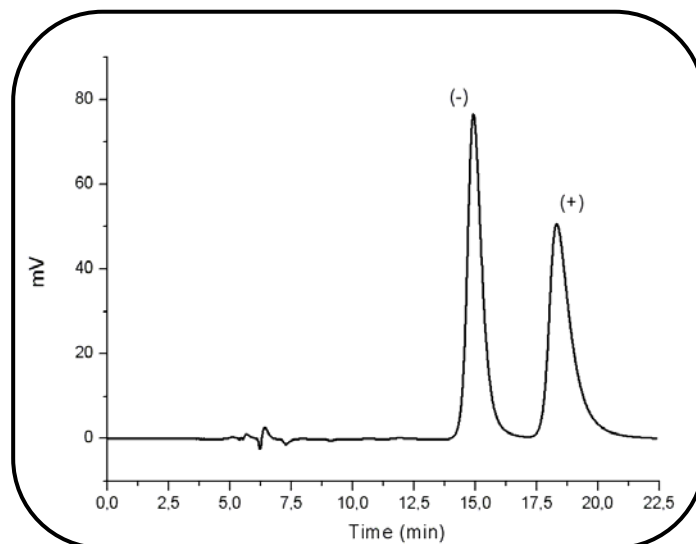


Cromatograma 26 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Omeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 302\text{ nm}$

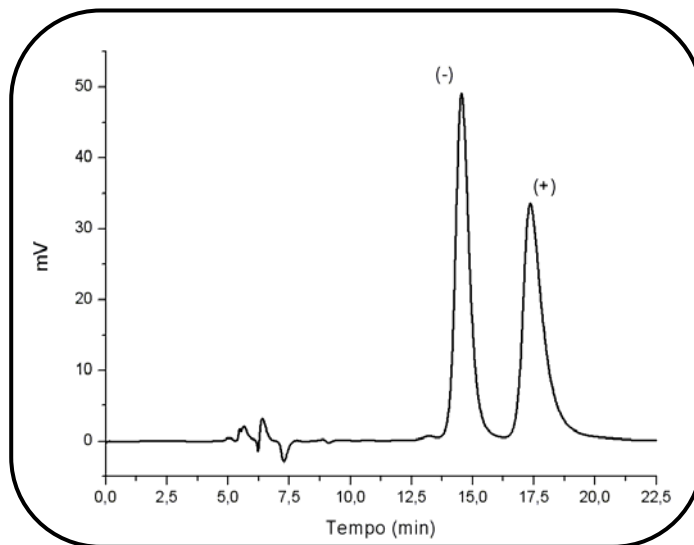


Cromatograma 27 – Coluna: DEAVB

Amostra Padrão: Rabeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30).

Vazão:  $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 285\text{ nm}$



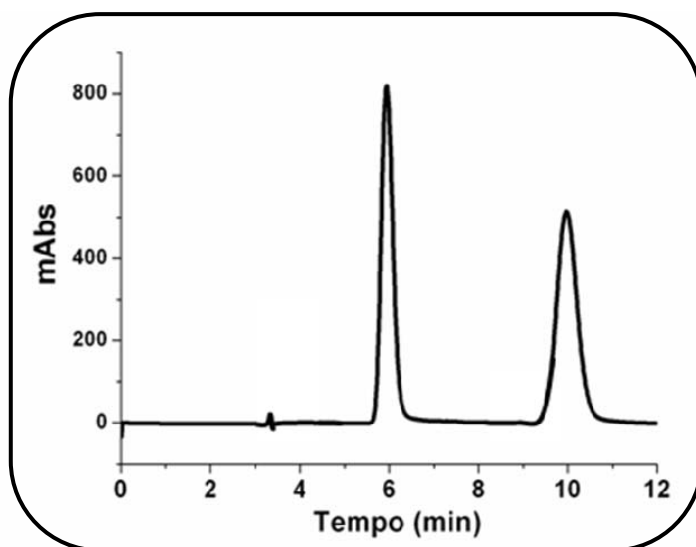
**ANEXO II – Cromatogramas das CSPs de polissacarídeos Derivados**

Cromatograma 1 – Coluna: CSP 1 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose adsorvido em sílica - APS.

Amostra Padrão: ( $\pm$ ) óxido *trans*-stilbeno ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/2-propanol (95:05)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$

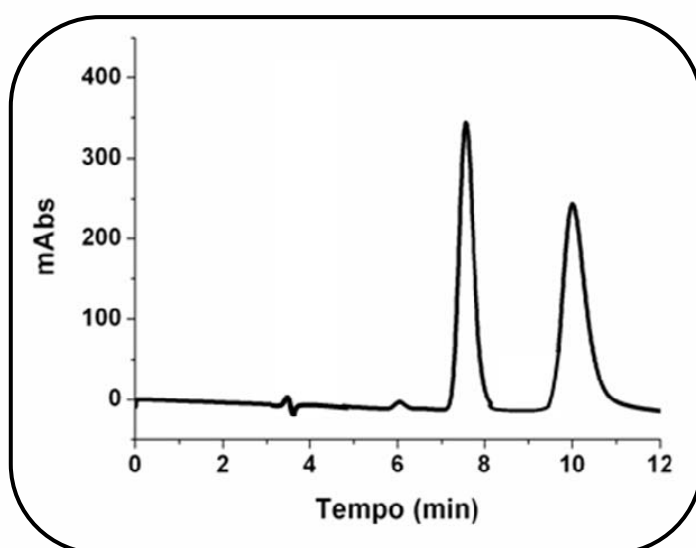


Cromatograma 2 – Coluna: CSP 1 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose adsorvido em sílica - APS.

Amostra Padrão: ( $\pm$ ) Base de Troger ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/2-propanol (95:05)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$

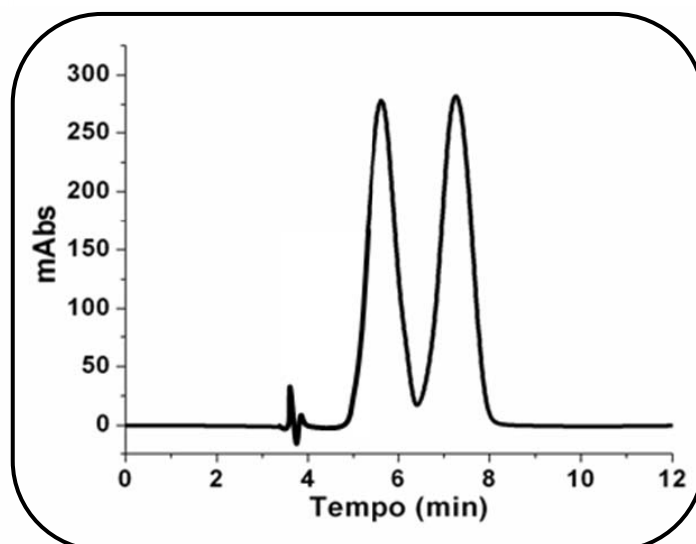


Cromatograma 3 – Coluna: CSP 4 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: ( $\pm$ ) óxido *trans*-stilbeno ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/ 2-propanol (95:05)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$

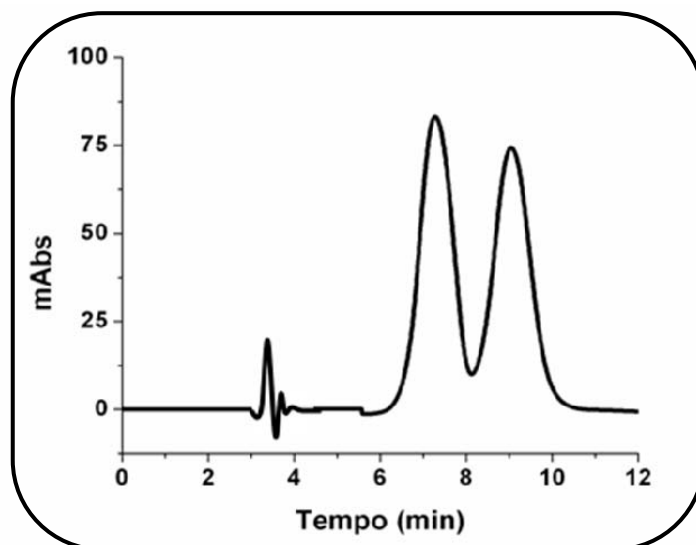


Cromatograma 4 – Coluna: CSP 4 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: ( $\pm$ ) Base de Troger ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/2-propanol (95:05)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$

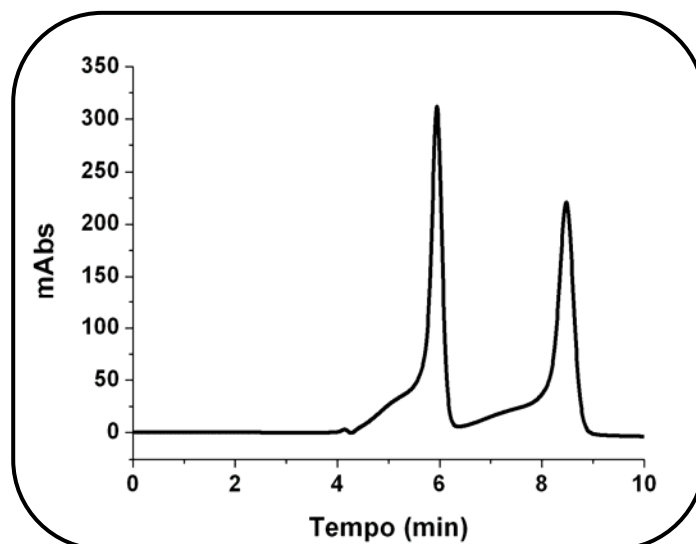


Cromatograma 5 – Coluna: CSP 5 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: ( $\pm$ ) óxido *trans*-stilbeno ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/2-propanol (95:05)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$

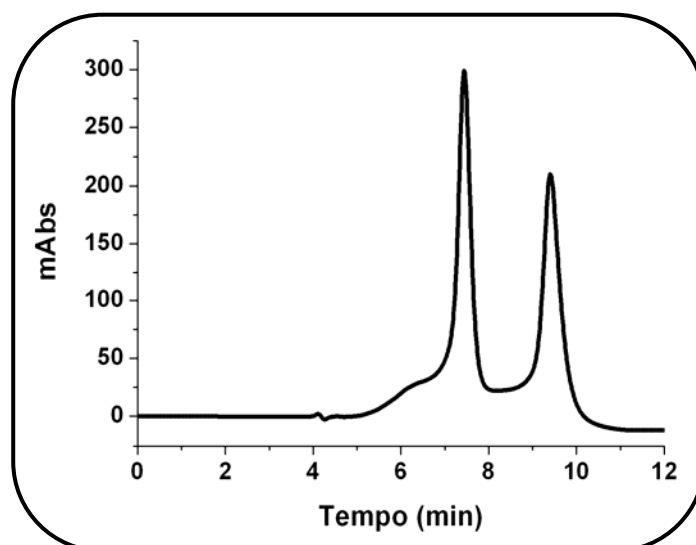


Cromatograma 6 – Coluna: CSP 5 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: ( $\pm$ ) Base de Troger ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/2-propanol (95:05)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$



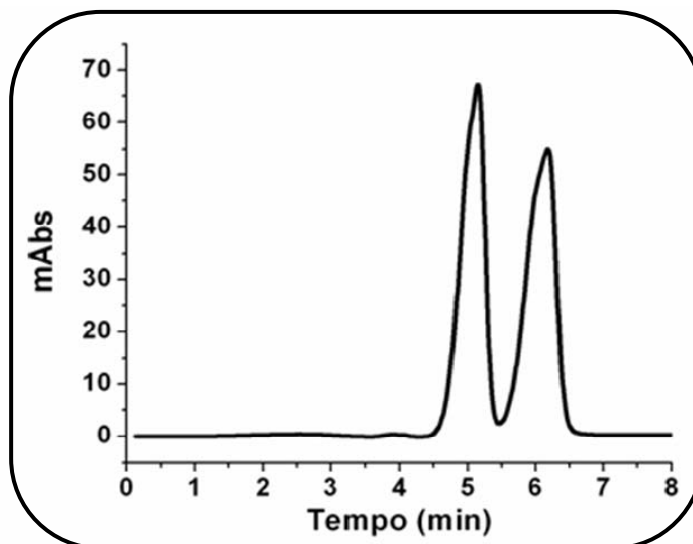


Cromatograma 7 – Coluna: CSP 6 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: ( $\pm$ ) óxido *trans*-stilbeno ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/2-propanol (95:05)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$

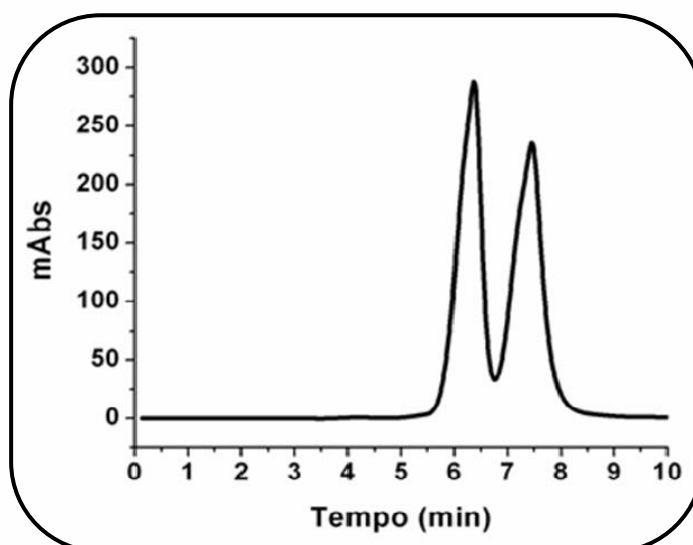


Cromatograma 8 – Coluna: CSP 6 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: ( $\pm$ ) Base de Troger ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/2-propanol (95:05)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$

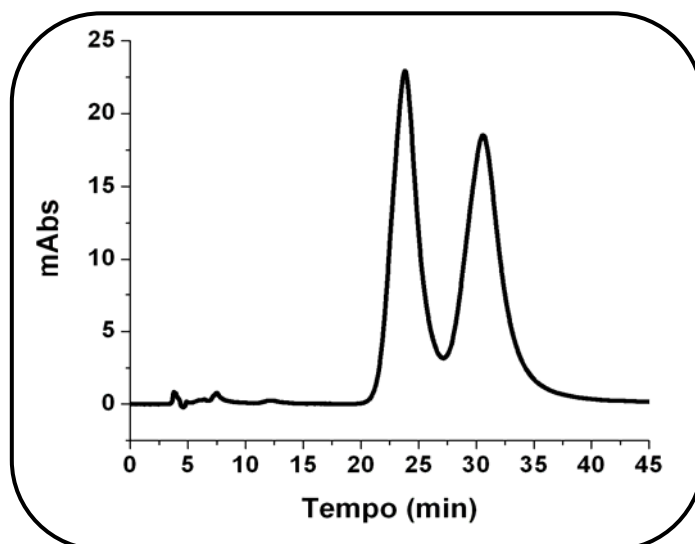


Cromatograma 9 – Coluna: CSP 6 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: omeprazol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/Etanol (85:15)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 302\text{ nm}$

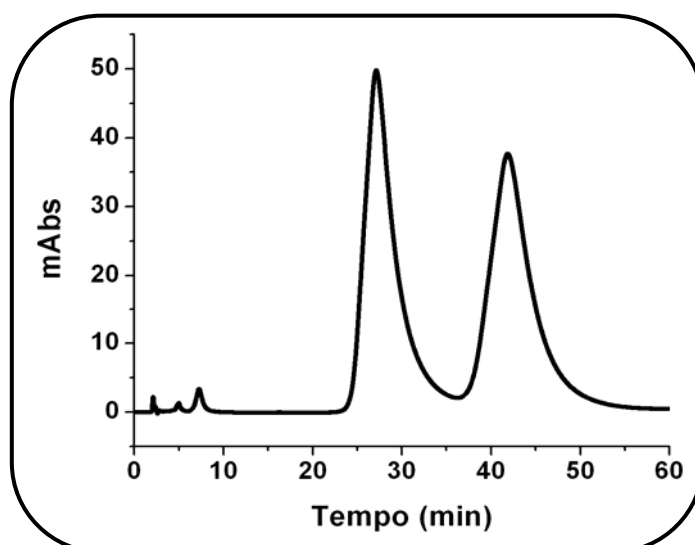


Cromatograma 10 – Coluna: CSP 6 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: albendazol sulfóxido ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/Etanol (85:15)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 290\text{ nm}$

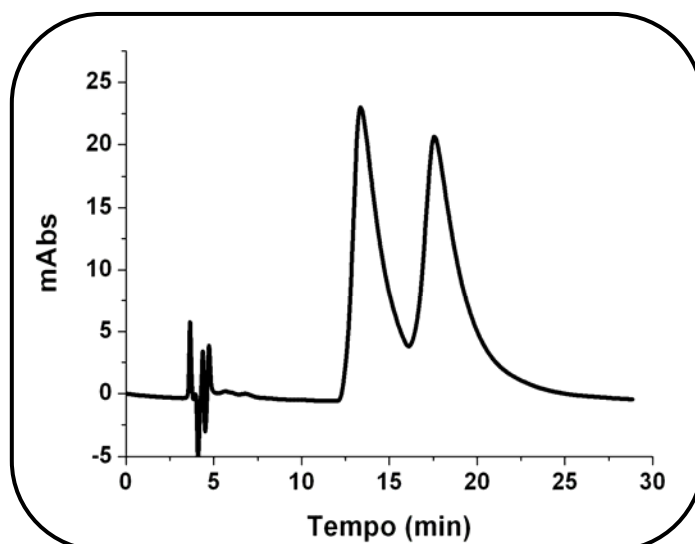


Cromatograma 11 – Coluna: CSP 7 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: omeprazol ( $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/Etanol (85:15)

Vazão:  $0,5\text{mL.min}^{-1}$ ,  $\lambda = 302\text{ nm}$

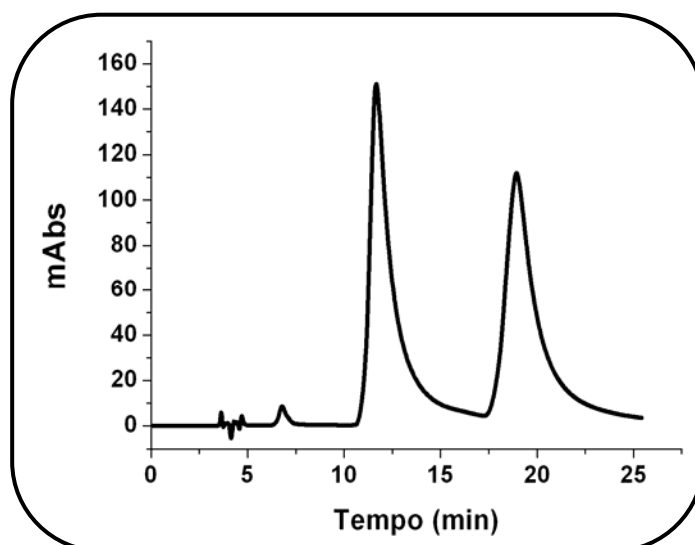


Cromatograma 12 – Coluna: CSP 7 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: albendazol sulfóxido ( $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: *n*-hexano/Etanol (85:15)

Vazão:  $0,5\text{mL.min}^{-1}$ ,  $\lambda = 290\text{ nm}$

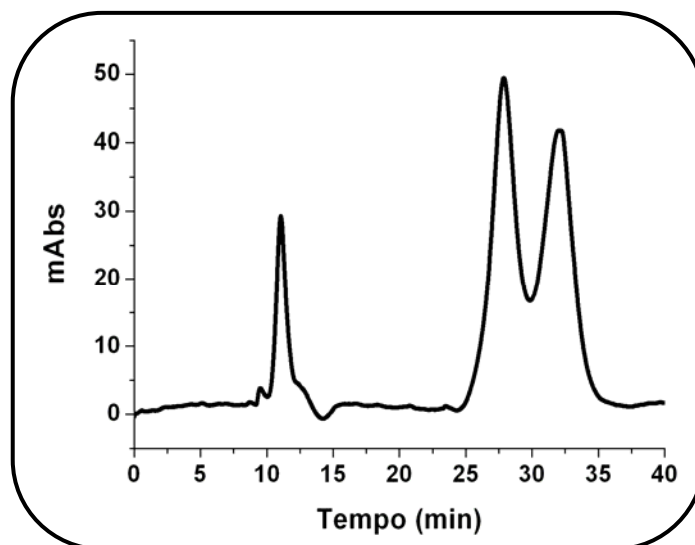


Cromatograma 13 – Coluna: CSP 7 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: Ro ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: MtBE/EA/EtOH (68:28:4)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 282\text{ nm}$

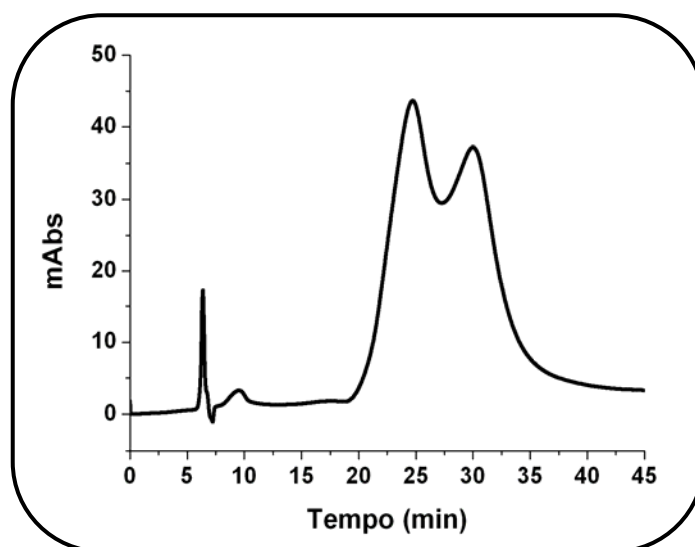


Cromatograma 14 – Coluna: CSP 7 tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose imobilizado em sílica - APS.

Amostra Padrão: albendazol Sulóxido ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Fase Móvel: MtBE/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /EtOH (49:49:2)

Vazão:  $0,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda = 290\text{ nm}$



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)