

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:  
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICO**

**SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO MARCADOR MOLECULAR  
FMOC-POAC POR CLAE EM FASE ESTACIONÁRIA NORMAL E  
REVERSA**

Autor: João Paulo Fernandes Vieira

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas – São Paulo

Setembro – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -UNICAMP

V673s                      Vieira, João Paulo Fernandes  
                                 Separação enantiomérica do marcador molecular  
                                 fmoc-poac por CLAE em fase estacionária normal e  
                                 reversa / João Paulo Fernandes Vieira. --Campinas,  
                                 SP: [s.n.], 2011.

                                 Orientador: Cesar Costapinto Santana.  
                                 Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual  
                                 de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

                                 1. Cromatografia líquida. 2. Quiralidade. I.  
                                 Santana, Cesar Costapinto . II. Universidade Estadual  
                                 de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.  
                                 Título.

Título em Inglês: Enantiomeric separation of fmoc-poac spin label by HPLC  
                                 in normal and reverse stationary phase

Palavras-chave em Inglês: Liquid chromatography, Chirality

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológico

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Clovis Ryuichi Nakaie, Vinícius de Veredas

Data da defesa: 22-09-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por João Paulo Fernandes Vieira e aprovada em 22 de setembro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



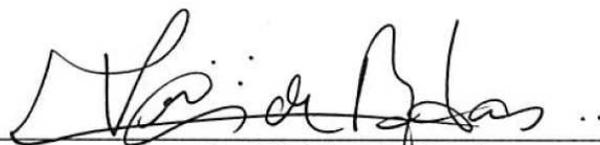
---

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana  
orientador



---

Prof. Dr. Clovis Ryuichi Nakaie



---

Dr. Vinicius de Veredas

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno e orientada pelo Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana.



---

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana.

Campinas – São Paulo

Setembro de 2011

## DEDICATÓRIA

*À Deus por fazer da minha vida uma eterna procura e várias surpresas, mas tudo para me tornar um adulto.*

*A minha família, Filomena, Ana Paula, Tatiana, Henrique, Ana Luisa e Letícia pelo apoio e alegria em vários momentos dessa minha caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me dar forças quando achei que não às tinha. Muitas vezes perdemos muito tempo imaginando como vamos fazer algumas coisas, o que fazer a respeito de dinheiro, trabalho e responsabilidades. Devemos deixar as coisas mais leves e lutar a luta na hora certa. Não devemos perder o presente com infinitas probabilidades do nosso futuro.

Ao Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana pela transmissão de informação, suporte, orientação e dedicação às minhas atividades de pesquisa. Foi uma escolha muito ariscada fazer mestrado na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, pois não tinha uma certeza plena do que estava fazendo. Hoje sei que não há escolhas erradas ou certas, todas as escolhas feitas nos tornam adultos. Trabalhar com o Prof. Cesar foi um ótimo ocorrido na minha vida e uma realização nessa etapa vivida.

Ao Prof. Dr. Clovis Ryuichi Nakaie pelo suporte técnico e transmissão de informações. Um homem torna-se grande quando enfrenta grandes desafios. Todas as vezes que o professor Nakaie comentava sobre artigos, ele olhava em especial para os publicados na revista “Journal American Chemical Society”. Sua vontade em publicar em revistas como essa me motivou em escutá-lo e admirá-lo.

Ao Dr. Vinicius de Veredas pelas contribuições diretas à pesquisa e à amizade. Um homem que nasce em Minas Gerais aprendeu desde muito novo que uma boa conversa vale mais que um ano de livros lidos e escritos sozinhos. Seus conselhos levaram a separação quiral em fase estacionária normal e mais da metade desse trabalho deve-se a ele.

Aos membros do Laboratório de Bioseparações: Absolon, Carla, Anayla, Carol, Rafael e Luisa. Agradeço em especial ao amigo Absolon pelo companheirismo fora e dentro do laboratório, gastando muitas horas dos seus dias me ajudando, sem nunca ter me cobrado nada.

Aos funcionários e pesquisadores do laboratório de biofísica da UNIFESP, em especial a Erick Poletti e Marta, pelo suporte às atividades de pesquisa.

Aos meus amigos que por sua amizade, que muitas vezes sem saber, me incentivaram nas atividades de pesquisa, além de todos que contribuíram para a realização desta pesquisa, em especial à Absolon, Valter e Maria Cecília.

À CNPq pela concessão da bolsa de estudos (Processo 135687/2009-8).

Finalmente agradeço à minha família, que sempre apoiou todas as minhas decisões. Em especial à memória do meu pai, Salvador de Paulo Vieira, que deixou alguns ensinamentos que são sólidos como uma rocha.

*Você gasta uma vida para ter um nome  
Você perde um nome por segundos de desonestidade  
“Salvador de Paula Vieira”*

*As circunstâncias entre as quais você vive determinam sua reputação.*

*A verdade em que você acredita determina seu caráter.*

*A reputação é o que acham que você é.*

*O caráter é o que você realmente é.*

*A reputação é o que você tem quando chega a uma comunidade nova.*

*O caráter é o que você tem quando vai embora.*

*A reputação é feita em um momento.*

*O caráter é construído em uma vida inteira.*

*A reputação torna você rico ou pobre.*

*O caráter torna você feliz ou infeliz.*

*A reputação é o que os homens dizem de você junto à sua sepultura.*

*O caráter é o que os anjos dizem de você diante de Deus.*

*Arnaldo Jabor*

## RESUMO

A enantioseparação de alguns compostos é um brilhante e interessante tópico de muitas áreas da química analítica, principalmente na farmacêutica e biomédica. Sabe-se que apesar dos enantiômeros apresentarem fórmulas e massa molecular iguais, quando expostos em um ambiente biológico podem mostrar grandes diferenças nas suas atividades biológicas. O Fmoc-POAC (9-fluorenilmetiloxycarbonil -2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-oxil-3-amino-4-ácido carboxílico) é um marcador paramagnético quirial com grande potencialidade de uso como derivado marcador de estruturas peptídicas com funções no organismo animal. De acordo com a literatura consultada, não há relatos de escalas semipreparativas na separação enantiomérica desse composto, extremamente necessária para testes de clínicos-analíticos. Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de métodos inovadores na separação enantiomérica do Fmoc-POAC e obtenção dos parâmetros necessários para um aumento de escala. O presente trabalho realizou uma avaliação experimental através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para enantioseparação desse composto, com eluição isocrática e nas colunas quirais de fase estacionária normal e reversa: i) analítica da OD-RH Chiralcel<sup>®</sup> (150x4,6 mm); ii) Analítica Lux Cellulose-2 da Phenomenex<sup>®</sup> (250x4,6 mm); iii) Semipreparativa OD da Chiralcel<sup>®</sup> (150x10 mm); iv) Semipreparativa OD-RH da Chiralcel<sup>®</sup> (250x21 mm). A partir desses ensaios experimentais, foram estimados os parâmetros cromatográficos da enantioseparação do marcador molecular Fmoc-POAC nas colunas estudadas, além de parâmetros de transferência de massa e termodinâmicos. Os resultados desse trabalho foram que todas as colunas estudadas apresentaram a possibilidade de separação enantiomérica do Fmoc-POAC através desses métodos relativamente simples comparados aos apresentados na literatura, com destaque para a coluna de fase estacionária normal Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), com resolução de até 18,4. De acordo com resultados obtidos, temos a possibilidade de realizar a separação e recuperação desse composto, lançando-se mão de técnicas cromatográficas de maior rendimento, como sistemas contínuos de separação cromatográfica.

## ABSTRACT

The enantioseparation of some compounds has interesting application in several areas of analytical chemistry, especially in pharmaceutical and biomedical. It is well known that some compounds with same chemical formulas and molecular mass, when exposed to a biological environment, may show different biological activities. The 9-fluorenylmethylloxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidina-N-oxyl-3-amino-4-carboxylic acid (Fmoc-POAC) is a chiral paramagnetic marker with great potential as a marker for peptide structures with functions in the animal organism. According to the literature, there are no reports of enantiomeric separation of this compound unless in laboratory scale and large scale would be necessary for clinical and analytical testing. This study aimed at the development of innovative methods for the enantiomeric separation of Fmoc-POAC as well as obtaining the necessary parameters for scale up of their purification. The present work carried out an experimental evaluation using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for this compound enantioseparation with isocratic elution and columns with normal and reverse chiral stationary phase: i) Analytical Chiralcel<sup>®</sup> OD-RH (150x4, 6 mm), ii) Analytical Lux Cellulose-2 from Phenomenex<sup>®</sup> (250x4, 6 mm), iii) Semi-preparative Chiralcel OD<sup>®</sup> (150x10 mm), iv) Semi-preparative Chiralcel OD-RH<sup>®</sup> (250x21 mm). From these assays, chromatographic parameters were estimated for the enantioseparation of Fmoc-POAC molecular marker beside parameters related to the thermodynamics and mass transfer. The conclusions in this research were that all columns present the possibility of enantiomeric separation of Fmoc-POAC by methods relatively simple compared to those presented in the literature, specially the column with normal stationary phase Lux Cellulose-2 (250x4, 6 mm) with resolution of up to 18.4. The results indicate the possibility of enantioseparation and recovery of these compounds by high yield continuous chromatography techniques.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
SUMÁRIO.....	x
LISTAS DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELA.....	xvi
INDICES DE EQUAÇÕES.....	xix
NOMENCLATURA.....	xxii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Considerações Gerais .....	1
1.2 Objetivo .....	4
1.3 Estrutura do Trabalho .....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Enantiômeros e Compostos Quirais .....	6
2.2 Separação de Compostos Quirais .....	9
2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	12
2.3.1 Fase Estacionária Quiral .....	14
2.3.1.1 Fase Estacionária Tipo Pirkle.....	17
2.3.1.2 Fase Estacionária Tipo Polissacarídeos Helicoidais.....	19
2.3.2 Fase Móvel .....	22
2.3.3 Equipamentos para CLAE.....	25
2.4 Parâmetros Cromatográficos .....	27
2.4.1 Estudo de Transferência de Massa .....	31
2.4.2 Análise dos Momentos .....	33
2.4.2.1 Gráfico de Van Deemter.....	38
2.4.3 Análise da Termodinâmica de Adsorção.....	39
2.5 Fmoc-POAC .....	43
2.5.1 Aminoácidos.....	44
2.5.2 Marcadores de spin.....	46
2.5.3 Separação Enantiomérica do Fmoc-POAC .....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	52

3.1	Materiais .....	52
3.1.1	Fmoc-POAC .....	52
3.1.2	Composto Inerte .....	52
3.1.3	Fase Estacionária .....	53
3.1.4	Solventes e fase móvel .....	53
3.1.5	Aparelhagem Experimental .....	54
3.2	Metodologias .....	55
3.2.1	Análise de resposta do sistema de detecção .....	55
3.2.2	Definição da fase móvel .....	55
3.2.3	Parâmetros Cromatográficos, transferência de massa e termodinâmicos .....	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	57
4.1	Coluna de Fase Normal .....	57
4.1.1	Análise de Separação Cromatográfica do Fmoc-POAC.....	57
4.1.2	Confirmação dos enantiômeros .....	63
4.1.3	Porosidade do leito e Coeficiente de Partição .....	66
4.1.4	Parâmetros de Transferência de Massa do Fmoc-POAC .....	67
4.1.5	Análise Termodinâmica de Adsorção .....	75
4.1.6	Escala Semipreparativa.....	79
4.2	Coluna de Fase Reversa.....	86
4.2.1	Análise da Separação Cromatográfica do Fmoc-POAC.....	86
4.2.2	Confirmação da separação dos enantiômeros.....	89
4.2.3	Parâmetros de Transferência de Massa do Fmoc-POAC .....	91
4.2.4	Escala Semipreparativa.....	97
5.	CONCLUSÕES.....	99
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Modelo dos três pontos de interação entre os enantiômeros e o seletor quiral (LOURENÇO <i>et al.</i> , 2010; LÄMMERHOFER, 2010).....	10
<b>Figura 2:</b> Representação de fase estacionária do tipo Pirkle e as suas interações com o analito (LOURENÇO <i>et al.</i> , 2010).....	17
<b>Figura 3:</b> Estrutura química da celulose e amilose.....	19
<b>Figura 4:</b> Fase estacionaria de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato).....	20
<b>Figura 5:</b> Estrutura química das fases estacionárias quirais.....	22
<b>Figura 6:</b> Esquema de um cromatográfico líquido de alta eficiência.....	25
<b>Figura 7:</b> Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação dos parâmetros cromatográficos (adaptado de COLLINS <i>et al.</i> , 2006). ....	27
<b>Figura 8:</b> Elemento de volume de uma coluna cromatográfica.....	32
<b>Figura 9:</b> Variação da altura equivalente a um prato teórico (HETP) com a velocidade superficial da fase móvel ( $u_0$ ) de acordo com a equação de Van Deemter. ....	39
<b>Figura 10:</b> Estruturas estereoenantioméricas do composto Fmoc-POAC.....	43
<b>Figura 11:</b> Estruturas estereoenantioméricas do composto POAC.....	47
<b>Figura 12:</b> Cromatograma de separação dos enantiômeros Fmoc-POAC em coluna de fase reversa de celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) da Chiralcel <sup>®</sup> (OD-RH), com partículas de 5 $\mu$ m, tamanho de 150mm x 4,0mm; temperatura de 30°C, vazão de 0,5 mL/minutos, detecção de 265 nm e fase móvel composta por solução salina de 0,1 M de KPF <sub>6</sub> e Acetonitrila na proporção de 80:20 (v:v). ....	50
<b>Figura 13:</b> Estrutura química do 1, 3, 5-terc-butil-benzeno (TTBB).....	52
<b>Figura 14:</b> Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.....	55

<b>Figura 15:</b> Cromatogramas de separação do Fmoc-POAC na concentração de 0,5 mg/mL, injeção de 20 µL, em coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm) e na fase móvel 10% de hexano e 90% de isopropanol (A), 20% de hexano e 80% de isopropanol (B), 30% de hexano e 70% de isopropanol (C).....	59
<b>Figura 16:</b> Cromatogramas de separação do Fmoc-POAC na concentração de 1,0 mg/mL, injeção de 20 µL, em coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm) e na fase móvel 10% de hexano e 90% de isopropanol (A), 20% de hexano e 80% de isopropanol (B), 30% de hexano e 70% de isopropanol (C).....	60
<b>Figura 17:</b> Estrutura química dos compostos Fmoc-POAC, isopropanol, tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose e hexano. ....	61
<b>Figura 18:</b> Espectro de massa (LC-MS) dos enantiômeros do Fmoc-POAC para o primeiro enantiômero do Fmoc-POAC eluido (a) e o segundo enantiômero (b) do Fmoc-POAC eluido. ....	64
<b>Figura 19:</b> Dicroísmo circular do suposto primeiro e segundo enantiômero do Fmoc-POAC eluido, índices $t_{R1}$ e $t_{R2}$ , respectivamente.....	65
<b>Figura 20:</b> Gráfico $t_M$ vs. $L/u_0$ da substância inerte TTBB em diferentes vazões. Coluna Lux Cellulose-2, 250x4,6 mm, partículas de 5µ, Phenomenex <sup>®</sup> , em temperatura ambiente. ....	67
<b>Figura 21:</b> Gráfico $t_R$ vs. $L/u_0$ para a obtenção da constantes de equilíbrio ( $K_P$ ) do Fmoc-POAC na coluna analítica de fase normal Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm).....	69
<b>Figura 22:</b> Gráfico de Van Deemter para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido em diferentes temperaturas na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), em diferentes temperaturas e fase móvel composta por hexano e isopropanol na proporção 90:10 (v/v). ....	70
<b>Figura 23:</b> Gráfico de Van Deemter para o Fmoc-POAC na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm); a) primeiro enantiômero do Fmoc-POAC eluido e b) segundo enantiômero do Fmoc-POAC eluido. ....	71

<b>Figura 24:</b> Perfis cromatográficos do Fmoc-POAC na concentração de 1 mg/mL, em coluna Lux Cellulose-2 Phenomenex <sup>®</sup> , em diferentes temperaturas.....	76
<b>Figura 25:</b> Dependência do fator de retenção $k$ com a temperatura para os enantiômeros do Fmoc-POAC .....	77
<b>Figura 26:</b> Dependência do fator de retenção $\alpha$ com a temperatura para os enantiômeros do Fmoc-POAC .....	77
<b>Figura 27:</b> Perfil cromatográfico da separação enantiomérica do Fmoc-POAC, na concentração de 0,5 mg/mL, com injeção de 100 $\mu$ L, fase móvel composta de hexano e isopropanol na proporção 90:10 (v/v), em coluna OD, 150x10 mm, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ °C). .....	80
<b>Figura 28:</b> Gráfico $t_R$ vs. $L/u_o$ para o composto inerte ( $t_M$ ), primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido, em coluna semipreparativa OD, 150x10 mm, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ °C). .....	82
<b>Figura 29:</b> Gráfico de Van Deemter para os enantiômeros do Fmoc-POAC na coluna semipreparativa OD, 150x10 mm, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ °C), para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, índices $t_{R1}$ e $t_{R2}$ , respectivamente.....	83
<b>Figura 30:</b> Cromatograma da separação enantiomérica do Fmoc-POAC em diferentes concentrações na coluna semipreparativa OD, 150x10 mm em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ ) °C na vazão de 2 mL/minutos. ....	85
<b>Figura 31:</b> Cromatograma da separação quiral do Fmoc-POAC na concentração de 0,5 mg/mL, injeção de 20 $\mu$ L, em coluna OD-RH (150x4,6 mm). ....	88
<b>Figura 32:</b> Estrutura química dos compostos Fmoc-POAC, tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, acetonitrila e acetato de trietilamônio.....	89
<b>Figura 33:</b> Espectro de massa dos enantiômeros do Fmoc-POAC em espectrofotômetro de massa (LC-MS), a) primeiro composto do Fmoc-POAC eluido, b) segundo composto do Fmoc-POAC eluido. ....	90

<b>Figura 34:</b> Resultado do dicroísmo para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna OD-RH (150x4,6 mm).....	90
<b>Figura 35:</b> Gráfico $t_R$ vs. $L/u_0$ para o composto inerte ( $t_M$ ), primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC na coluna analítica de fase reversa OD-RH (150x4,6 mm).....	93
<b>Figura 36:</b> Gráfico de Van Deemter para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC na coluna OD-RH (150x4,6 mm), temperatura ambiente ( $27\pm 2$ °C) e detecção no comprimento de onda 220 nm. ....	94
<b>Figura 37:</b> Cromatograma do Fmoc-POAC na coluna semipreparativa OD-RH da Chiralcel <sup>®</sup> , 250x21 mm, 5 $\mu$ m, com fase estacionária reversa composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, conhecida comercialmente como OD-RH. ....	98

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Diferenças farmacodinâmicas de alguns fármacos quirais.....	8
<b>Tabela 2:</b> Fases estacionárias quirais e requisitos de utilização .....	16
<b>Tabela 3:</b> Valores de polaridade de eluentes utilizados como fase móvel em cromatografia .....	24
<b>Tabela 4:</b> Tempo de retenção ( $t_R$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), fator de retenção ( $K$ ) e resolução ( $R_S$ ) para a separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC em diferentes fases móveis pela coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), índices de 1 e 2 para o primeiro e segundo enantiômero, respectivamente.....	58
<b>Tabela 5:</b> Tempo de retenção dos enantiômeros ( $t_R$ ) e substância inerte ( $t_M$ ), número de pratos ( $N$ ) e altura equivalente para um prato teórico (HETP) para a separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC em diferentes temperaturas pela coluna analítica Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), onde índices 1 e 2 são o primeiro e segundo enantiômero eluidos, respectivamente.....	68
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros Van Deemter e transferência de massa para a enantiosseparação do Fmoc-POAC em coluna analítica Lux Cellulose-2 de fase normal, 250x4,6 mm, para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, $t_{R1}$ e $t_{R2}$ , respectivamente.....	72
<b>Tabela 7:</b> Média dos coeficientes de transferência de massa para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido em coluna analítica de fase estacionária normal Lux Cellulose-2, de tamanho 250x4,6 mm, em diferentes temperaturas., para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido. ....	73
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros cromatográficos para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido em diferentes temperaturas, em coluna de fase normal, Lux cellulose-2, Phenomenex <sup>®</sup> .....	75

**Tabela 9:** Parâmetros termodinâmicos para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido em coluna de fase normal, Lux cellulose-2 Phenomenex<sup>®</sup> (250x4,6 mm)..... 78

**Tabela 10:** Eficiência da separação enantiomérica do Fmoc-POAC em diferentes vazões de fase móvel na coluna OD, 150x10 mm, para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, índices 1 e 2, respectivamente. .... 80

**Tabela 11** Número de pratos ( $N$ ) e altura equivalente para um prato teórico (HETP) para a separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC em diferentes vazões em coluna semipreparativa OD, 150x10 mm, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C), partículas com o tamanho de 20 $\mu$ m, conhecida comercialmente OD para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, índices 1 e 2, respectivamente..... 83

**Tabela 12:** Parâmetros de Van Deemter e transferência de massa para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna semi-preparativa OD da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 150x10 mm, partículas de 20 $\mu$ m, de fase estacionária normal composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)em celulose , em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ ) °C, para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, índices  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$ , respectivamente. .... 84

**Tabela 13:** Coeficientes de transferência de massa para para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna semi- preparativa OD da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 150x10 mm, partículas de 20 $\mu$ m, de fase estacionária normal composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) em celulose, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ ) °C..... 84

**Tabela 14:** Tempo de retenção ( $t_R$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), fator de retenção ( $K$ ) e resolução ( $R_S$ ) para o primeiro e segundo enantiômero do Fmoc-POAC, índices de 1 e 2 respectivamente, em diferentes fases móveis na coluna OD-RH (150x4,6 mm), vazão 1,3 mL/min e detecção no comprimento de onda 220 nm ..... 87

**Tabela 15:** Tempo de retenção ( $t_R$ ), número de partos ( $N$ ), altura equivalente de um prato teórico (HETP), tempo de retenção da substância inerte ( $t_M$ ) para o Fmoc-POAC em coluna

OD-RH (150x4,6 mm), índices de 1 e 2 para o primeiro e segundo enantiômero, respectivamente. .... 92

**Tabela 16:** Parâmetros de transferência de massa para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna OD-RH (150x4,6 mm). .... 95

**Tabela 17:** Coeficientes de transferência de massa para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna OD-RH (150x4,6 mm) em fase móvel composta por 40% de acetonitrila e 60% de solução 0,1% de TEAA, com o pH igual a 3,5 ..... 96

## INDICES DE EQUAÇÕES

(R)-An + (S)-An + (R)-So → (R)-An-(R)-So + (S)-An-(R)-So (1) ..... 15

$t'_R = t_R - t_M$  (2) ..... 28

$K = \frac{N_e}{N_m} = \frac{t'_R}{t_M}$  (3) ..... 28

$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}}$  (4) ..... 29

$R_S = 2 \cdot \frac{t_{R_2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} = 1,18 \cdot \frac{t_{R_2} - t_{R1}}{W_1^{h\frac{1}{2}} + W_2^{h\frac{1}{2}}}$  (5) ..... 29

$HETP = \frac{\sigma^2}{t_R^2} L = \frac{L}{N}$  (6) ..... 29

$N = \frac{t_R}{\tau_e} = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2$  (7) ..... 30

$N \propto \frac{D_P}{d_P^2} t_R$  (8) ..... 30

$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W^{h\frac{1}{2}}}\right)^2$  (9) ..... 30

(Acumulo)<sub>i</sub> = (fluxo de i)<sub>entrada</sub> - (fluxo de i)<sub>saída</sub> (10) ..... 32

(Acumulo)<sub>i</sub> = (Acúmulo na fase líquida)<sub>i</sub> - (Acúmulo na fase sólida)<sub>i</sub> (11) ..... 32

(Acumulo)<sub>i</sub> =  $\frac{\partial [C_i \cdot ((A)_{secção} \cdot \varepsilon \cdot \Delta z)]}{\partial t} + \frac{\partial [C_i \cdot ((A)_{secção} \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \Delta z)]}{\partial t}$  (12) ..... 33

Entrada de i por convecção =  $(u)_z \cdot ((A)_{secção} \cdot \varepsilon) \cdot (C_i)_z$  (13) ..... 33

Entrada de i por convecção =  $(u)_{z+\Delta z} \cdot ((A)_{secção} \cdot \varepsilon) \cdot (C_i)_{z+\Delta z}$  (14) ..... 33

$$\text{Entrada de } i \text{ por dispersão axial} = D_L \left( \frac{\partial C_i}{\partial z} \right)_z \cdot (A)_{\text{secção}} \cdot \varepsilon \quad (15)$$

$$\text{Saida de } i \text{ por dispersão axial} = D_L \left( \frac{\partial C_i}{\partial z} \right)_{z+\Delta z} \cdot (A)_{\text{secção}} \cdot \varepsilon \quad (16) \dots\dots\dots 33$$

$$M_n = \int c(t, z = L) t^n dt \quad (17) \dots\dots\dots 34$$

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^\infty c(t, z = L) t^n dt}{\int_0^\infty c(t, z = L) dt} \quad (18) \dots\dots\dots 34$$

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^\infty c(t, z = L) (t - \mu_1)^n dt}{\int_0^\infty c(t, z = L) dt} \quad (19) \dots\dots\dots 35$$

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{u_0} [\varepsilon + (1 - \varepsilon) \varepsilon_p] + \frac{t_0}{2} \quad (20) \dots\dots\dots 35$$

$$\mu_2 = \sigma^2 = \frac{2L}{u_0} \left\{ \frac{D_L}{u_0^2} [\varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p]^2 + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p^2 \cdot \frac{R^2}{15} \left[ \left( \frac{1}{D_m} + \frac{5}{K_f R} \right) \right] \right\} + \frac{t_0^2}{12} \quad (21) \dots\dots\dots 35$$

$$HETP = \frac{\sigma^2}{t_R^2} L = 2 \frac{D_L}{u} + 2u \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K_p}{K_m} \left[ 1 + \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) K_p \right]^{-2} \quad (22) \dots\dots\dots 35$$

$$t_R = [\varepsilon_T + (1 - \varepsilon) \cdot (1 - \varepsilon_p) K_p] \cdot \frac{L}{u_0} \quad (23) \dots\dots\dots 36$$

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p \quad (24) \dots\dots\dots 36$$

$$\frac{1}{K_m} = \frac{R^2}{15 \cdot (1 - \varepsilon)} \cdot \left( \frac{1}{D_m} + \frac{5}{K_f R} \right) = \frac{d_p}{6K_f} + \frac{d_p^2}{60\varepsilon_p D_p} \quad (25) \dots\dots\dots 36$$

$$D_p = \left( \frac{\varepsilon_p}{2 - \varepsilon_p} \right)^2 \cdot \frac{D_m}{\varepsilon_p} \quad (26) \dots\dots\dots 36$$

$$Bi_M = \frac{d_p K_m}{D_m K_p} \quad (27) \dots\dots\dots 36$$

$$Sh = \frac{d_p K_f}{D_m} = \frac{1,09}{\varepsilon} (Sc)^{\frac{1}{3}} (Re)^{\frac{1}{3}} \quad (28) \dots\dots\dots 37$$

$$D_m = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(\phi M)^{\frac{1}{2}} T}{\mu V_b^{0,6}} \quad (29) \dots\dots\dots 37$$

$$Re = \frac{d_p \cdot \varepsilon \cdot u}{\eta} \quad (30) \dots\dots\dots 37$$

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (31) \dots\dots\dots 37$$

$$HETP = A + \frac{B}{u_0} + C u_0 \quad (32) \dots\dots\dots 38$$

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (33) \dots\dots\dots 38$$

$$B = 2\gamma_1 D_m \quad (34) \dots\dots\dots 38$$

$$C = 2 \cdot \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K_p}{K_m} \left[ 1 + \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) K_p \right]^{-2} \quad (35) \dots\dots\dots 38$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ = -RT \ln \left( \frac{k}{\phi} \right) \quad (36) \dots\dots\dots 40$$

$$\ln k = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} + \ln \phi = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \Delta S^* \quad (37) \dots\dots\dots 40$$

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta \Delta G^\circ}{RT} = -\frac{\Delta \Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta \Delta S^\circ}{R} \quad (38) \dots\dots\dots 41$$

## NOMENCLATURA

$\mu$	viscosidade dinâmica da solução
$A$	coeficiente da equação de Van Deemter
$B$	coeficiente da equação de Van Deemter
$Bi_M$	número de Biot mássico
$C$	coeficiente da equação de Van Deemter
$C_i$	concentração no líquido do soluto
$D_L$	dispersão axial
$D_m$	coeficiente de difusão molecular efetivo
$D_p$	coeficiente de difusão nos poros
$d_p$	diâmetro da partícula
$HETP$	Altura equivalente de um prato teórico (cm)
$K$	fator de retenção
$K_f$	coeficiente de transferência de massa externo
$K_m$	coeficiente global de transferência de massa
$K_p$	constante de partição
$L$	comprimento da coluna
$M$	massa molecular
$N$	número de pratos
$R$	constante de gases ideais
$Re$	número de Reynolds
$R_s$	resolução cromatográfica
$Sc$	número de Shimidt
$Sh$	número de Sherwood
$T$	temperatura
$T$	temperatura absoluta
$t_M$	tempo de corrida da substância inerte
$t_R$	tempo de retenção
$u$	velocidade intersticial
$u_0$	velocidade superficial
$V_b$	volume molar para o ponto de ebulição

$\Delta G^\circ$	<i>Energia livre de Gibbs</i>
$\Delta H^\circ$	<i>Entalpia de adsorção</i>
$\Delta S^\circ$	<i>Entropia de adsorção</i>
$\Delta\Delta G^\circ$	<i>Varição de energia livre de Gibbs</i>
$\Delta\Delta H^\circ$	<i>Varição de entalpia de adsorção</i>
$\Delta\Delta S^\circ$	<i>Varição de entropia de adsorção</i>
$\eta$	<i>viscosidade cinemática da solução</i>

### *SÍMBOLOS GREGOS*

$\tau_e$	<i>tempo necessário para equilíbrio</i>
$\varepsilon$	<i>porosidade do leito</i>
$\varepsilon_P$	<i>porosidade da partícula</i>
$\varepsilon_T$	<i>porosidade total</i>
$\Phi$	<i>índice de proporção de fases</i>
$\alpha$	<i>seletividade</i>
$\mu_1$	<i>primeiro momento</i>
$\mu_2$	<i>segundo momento</i>
$\sigma^2$	<i>variância</i>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (2009) e o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), aproximadamente 30% do total de óbitos registrados no Brasil são devidos a doenças cardiovasculares e estima-se que 17 milhões de brasileiros são portadores destas enfermidades. O governo investiu em programas de ações contra essas doenças, no período de 2004 à 2008, um valor de aproximadamente R\$ 325 milhões. Diante de números tão altos, é evidente a necessidade de estudos relacionados ao entendimento dos mecanismos que envolvem anomalias cardiovasculares denominados sistemas renina-angiotensina e caliceína-cinina, onde, tais mecanismos tem como os principais peptídeos vasoativos atuantes à angiotensina II (AII, DRVYIHPF) e bradicinina (BK, RPPGFSPFR) (NAKAIE *et al.*, 1983; NAKAIE *et al.*, 2002).

A marcação das estruturas moleculares desses peptídeos podem fornecer seus dados conformacionais lançando-se mão de técnicas como ressonância paramagnética de elétrons (RPE), fluorescência e outras espectroscopias. Obter marcadores moleculares que desempenham o papel de sonda paramagnética desses peptídeos é um desafiante e interessante tópico na pesquisa da biofísica, sendo que, até o momento, foi proposto um marcador molecular chamado Fmoc-POAC, com características muito promissoras na marcação desses peptídeos (NAKAIE *et al.*, 1983; NAKAIE *et al.*, 2002).

O Fmoc-POAC (9-fluorenilmetiloxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-oxil-3-amino-4-ácido carboxílico) é um composto obtido pela reação de síntese do composto POAC e Fmoc. O composto POAC (2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-oxil-3-amino-4-ácido carboxílico), descrito inicialmente por Rassat & Rey (1967) na sua forma racêmica, é um marcador de spin do tipo  $\beta$ -aminoácido, apresentando uma estrutura pirrolidínica e um radical livre nítróxido, além de um grupamento amínico e carboxílico no carbono 3 e 4, respectivamente, da sua estrutura molecular. Para viabilizar a sua introdução em cadeias peptídica, foi necessária a proteção de seu grupamento amínico com o protetor 9-

fluorenilmetiloxycarbonila, conhecido como Fmoc, gerando, portanto, o marcador de spin e derivado de aminoácido denominado Fmoc-POAC (TOMINAGA *et al.*, 2001, patente EPM-5, PI 9903137-0, 1999).

De acordo com a estrutura do Fmoc-POAC, os carbonos 3 e 4 da sua estrutura molecular são centros quirais, conferindo características enantioméricas para esse marcador. Os enantiômeros desses fármacos podem apresentar atividades e potencialidades diferentes, resultando em uma significativa influência na suas utilizações em tratamentos e diagnósticação de doenças. A possibilidade da obtenção das formas enantiomericamente puras do Fmoc-POAC torna-se, portanto, essencial para o desenvolvimento desta linha de pesquisa, de interesse bioquímico-clínico (NAKAIE *et al.*, 1983; NAKAIE *et al.*, 2002).

Sabe-se que os compostos quirais são imagens especulares umas das outras, com a característica de não se sobreporem, além de apresentarem a mesma massa molecular (ORLANDO *et al.*, 2007; SOLOMOS, 2000). Podemos citar como exemplo de compostos quirais os aminoácidos, os quais possuem um significativo papel em muitas áreas da química farmacêutica, sendo usados como fármacos terapêuticos e em estudos de sistemas biológicos (BRUSHAN *et al.*, 2008; ILISZ *et al.*, 2008; ILISZ *et al.*, 2009; PÉTER *et al.*, 2003; WINKLER *et al.*, 2009; XIANG *et al.*, 2010). Os aminoácidos são divididos em  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -aminoácidos, sendo que os  $\beta$ -aminoácidos são utilizados como blocos de construção quiral e também freqüentemente incorporado em peptídeos como marcadores moleculares (BRUSHAN *et al.*, 2008; WINKLER *et al.*, 2009). A obtenção desses  $\beta$ -aminoácidos na sua forma enriquecida ou enântiopura é de extrema importância para a sua comercialização e utilização, como é o caso do Fmoc-POAC.

A técnica empregada mais relevante para separações enantioméricas é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e que pode ser dividido em métodos diretos e indiretos (ILISZ *et al.*, 2008; ILISZ *et al.*, 2009; PÉTER *et al.*, 2003; WENG *et al.*, 2008;). O método *direto* utiliza um seletor quiral imobilizado na fase estacionária da coluna e os analitos formam complexos diastereoisômeros com esse seletor. Os enantiômeros são eluídos em diferentes tempos, dependendo dos seus fatores de retenção no seletor imobilizado. Para o método *indireto*, os analitos formam complexos diastereoisômeros em uma solução com o seletor quiral sem serem imobilizados na fase

estacionária da coluna. Os enantiômeros são fracionados por cromatografia líquida aquiral que discrimina esses complexos diastereoisôméricos. As vantagens do método direto consistem no menor número de etapas necessárias, menor tempo tanto de purificação quanto de recuperação, além da menor relação entre a quantidade de seletor e o componente quiral a ser separado (COLLINS *et al.*, 2006; ILISZ *et al.*, 2008; PÉTER *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2006).

A separação enantiomérica do Fmoc-POAC iniciou com estudos de difração de raio X, que indicaram apenas a presença de configuração *trans* para este marcador molecular, restando, portanto, a desafiadora separação do enantiômero 3S4S e 3R4R (TOMINAGA *et al.*, 2001). Estudos posteriores sugeriram a viabilidade da separação quiral do Fmoc-POAC em condições analíticas, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por métodos diretos utilizando a fase estacionária reversa quiral e separação quiral por métodos indiretos (PÉTER *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2008; WRIGHT *et al.*, 2003).

Um único relato da enantiosseparação do Fmoc-POAC de forma isocrática pelo método direto foi encontrado na obra de Péter *et al.* (2003), que reportaram a sua separação em fase estacionária reversa, utilizando a coluna analítica OD-RH (150x4,6 mm), da Chiralcel<sup>®</sup>, com uma resolução igual a 1,11 e picos sem linha de base. Wright *et al.*, (2003) e Wright *et al.*, (2008) separaram as formas racêmicas do Fmoc-POAC, via esterificação com o composto binafitol e posterior separação dos ésteres enantioméricos obtidos, via cromatografia e cristalização.

Somente separações enantioméricas do Fmoc-POAC em escala analítica foram realizados (PÉTER *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2008), sendo necessário o desenvolvimento de métodos de separação em escala semipreparativa e preparativa, com o objetivo de verificar uma possível diferença de potencialidade dos enantiômeros desse composto em atividades bioquímico-clínico. Além dessa necessidade, é de grande valia para esses estudos o desenvolvimento de novos protocolos de separação desse compostos, oferecendo novas rotas de separação ou melhorando os resultados existentes na literatura.

## 1.2 Objetivo

O presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar novos protocolos de separação enantiomérica do Fmoc-POAC em colunas quirais de forma isocrática via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esse objetivo principal abrangeu a obtenção de parâmetros cromatográficos, transferência de massa e termodinâmicos da separação enantiomérica desse composto, além de oferecer novas rotas para a sua separação ou melhorando os resultados existentes na literatura.

## 1.3 Estrutura do Trabalho

O marcador molecular Fmoc-POAC foi sintetizado no laboratório de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) conforme Tominaga *et al.*, (2001). Os ensaios experimentais foram realizados no departamento de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, no laboratório de Bioseparações.

O método aplicado para a separação enantiomérica do Fmoc-POAC foi a cromatografia quiral no sistema CLAE, lançando-se mão do método direto em escala analítica para obter os parâmetros cromatográficos, transferência de massa e termodinâmicos dessa separação e extrapolá-los para colunas semipreparativa. As colunas quirais e as fases estacionárias utilizadas foram :

- i) Coluna quiral analítica da Chiralcel<sup>®</sup>, conhecida comercialmente como OD-RH, com partículas de 5 µm, tamanho de 150x4,6 mm, utilizando a fase estacionária reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.
- ii) Coluna quiral analítica da Phenomenex<sup>®</sup>, conhecida comercialmente como Lux Cellulose-2, partículas de 5 µm, tamanho de 250x4,6 mm, utilizando a fase estacionária normal tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose.

iii) Coluna quiral semipreparativa da Chiralcel<sup>®</sup>, conhecida comercialmente como OD, com partículas de 10 µm, tamanho de 150x10 mm, utilizando a fase estacionária normal tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.

iv) Coluna quiral semipreparativa da Chiralcel<sup>®</sup>, conhecida comercialmente como OD-RH, com partículas de 5 µm, tamanho de 250x21 mm, utilizando a fase estacionária reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Enantiômeros e Compostos Quirais

A estereoquímica foi uma importante virada no campo da investigação tridimensional da estrutura das moléculas. Foi marcada pelas publicações de van't Hoff e LeBel, que chegaram a conclusão de que a orientação espacial em torno de um átomo de carbono era tetrahédrica, quando o átomo de carbono estivesse ligado a quatro outros átomos. Mas o fundador da estereoquímica foi na realidade Louis Paster, pela separação da forma racêmica de um sal de ácido tartárico, em 1848, através da capacidade de alguns compostos de desviar a luz plano polarizada que levou à descoberta do fenômeno do enantiomerismo (SOLOMOS, 2000; ORLANDO *et al.*, 2007).

Os isômeros são compostos diferentes que têm a mesma massa e fórmula molecular. Os estereoisômeros, que são isômeros, diferem somente pela disposição dos átomos no espaço e podem ser subdivididos em duas categorias gerais: os enantiômeros e os diastereoisômeros. No caso dos enantiômeros, as moléculas são imagens especulares umas das outras, com a característica de não se sobreporem, onde, somente os compostos ditos quirais, que não possuem elemento de simetria, apresentam essa característica. Para os diastereoisômeros, as moléculas não são imagens especulares sobreponíveis umas das outras (COLLINS *et al.*, 2006; ORLANDO *et al.*, 2007; SOLOMOS, 2000).

Uma mistura contendo partes iguais de cada um dos enantiômeros chama-se modificação racêmica, mistura racêmica ou racemato. Todos os outros isômeros ópticos que não são enantiômeros e determinados isômeros geométricos são denominados estereoisômeros. Os enantiômeros são capazes de desviar a luz polarizada com a mesma intensidade, mas com direções opostas, ou capazes de interagir com macromoléculas biológicas de maneira enantioselectiva. Dessa forma, para separar os enantiômeros, é necessário uma estrutura molecular também quiral, ou seja, um ambiente quiral capaz de reconhecer e diferenciar as duas moléculas (COLLINS *et al.*, 2006; LÄMMERHOFER, 2010).

O ambiente fisiológico dentro de um organismo vivo é quiral e as formas das moléculas enantioméricas podem diferenciar drasticamente nas suas atividades biológicas (COLLINS *et al.*, 2006; ORLANDO *et al.*, 2007; ISTVÁN *et al.*, 2008; ILISZ *et al.*, 2009; LÄMMERHOFER, 2010). Como exemplo de moléculas quirais, os 19 aminoácidos que constituem as proteínas de ocorrência natural dos 20 aminoácidos existentes são quiral, exceto a glicina (SOLOMOS, 2000; ISTVÁN *et al.*, 2008).

Os fármacos quirais podem apresentar diferenças estereoseletivas significativas quanto à potência, toxicidade, absorção e metabolismo, Tabela 1. A síntese e comercialização de fármacos quirais iniciou com misturas racêmicas e consideradas seguras, mas, vários casos foram registrados da existência de potencialidade desses compostos, levando à vários impactos farmacológicos e toxicológicos (ILISZ *et al.*, 2009; LÄMMERHOFER, 2010; ORLANDO *et al.*, 2007; PÉREZ-FERNANDEZ *et al.*, 2010; REKOSKE *et al.*, 2001; ROUSSEAU *et al.*, 2011).

**Tabela 1:** Diferenças farmacodinâmicas de alguns fármacos quirais

Substância	Configuração <i>R</i>	Configuração <i>S</i>
Talidomida	Sedativo	Teratogênico
Verapamil	Antitumoral	Antiarrítmico
Cloranfenicol	Antibacteriano	Inativo
Propranolol	Contraceptivo	Anti-hipertensivo
Etambutol	Causa Cegueira	Tuberculostático

Fonte: Adaptado (FEDERSEL, 1993)

O exemplo que provavelmente foi o mais documentado sobre os problemas causados com o consumo de fármacos na forma de mistura enantiomérica seja a talidomida. Durante vários anos, até 1963, a droga talidomida foi usada para aliviar a náusea matinal das mulheres grávidas e logo depois foi descoberto que a talidomida era causa de terríveis defeitos congênitos em muitas crianças nascidas depois do uso dessa droga (ORLANDO *et al.*, 2007; REKOSKE *et al.*, 2001; SOLOMOS, 2000).

Mesmo depois dessa tragédia ocorrida com a talidomida, antes de 1990, a pureza quiral em fármacos foi uma questão acadêmica. Essas informações foram de grande

potencial para o seu entendimento e classificação da biotransformação dessas substâncias, mas de pouca importância para um lançamento de um produto. De posse desses fatos, a FDA's (Food and Drug Administration), uma entidade americana de saúde, publicou em 1992 que embora substâncias de fármacos utilizadas anteriormente foram consideradas bem sucedidas, seguramente desenvolvidas e implementadas como misturas racêmicas, ocorreram vários casos em que enantiômeros apresentaram diferentes impactos farmacológicos e toxicológicos que resultaram em problemas terapêuticos. Atualmente, as agências mundiais regulamentadoras de saúde exigem um estudo dos enantiômeros isolados, incluindo a avaliação de racemização do centro quiral e preconizando a comercialização de fármacos quirais na forma de enantiômeros puros ou enriquecidos (ORLANDO *et al.*, 2007; YASHIMA, 2001). Essa condições cobradas pelo governo aliado ao conhecimento de possíveis problemas desse tipo de droga levou as indústrias farmacêuticas a apresentarem um grande interesse na separação dos enantiômeros desses fármacos quirais, com diferentes estudos farmacocinéticas e farmacodinâmicas, levando a um alto valor agregado desses fármacos e conquistas de novas patentes. Além disso, é de extrema importância o surgimento de procedimentos simples e de baixo custo de purificação desses enantiômeros (SOLOMOS, 2000; YASHIMA, 2001; REKOSKE *et al.*, 2001; ORLANDO *et al.*, 2007; LÄMMERHOFER, 2010).

Fármacos com centros quirais são ainda comercializadas como misturas racêmicas mesmo sabendo que na maioria dos casos um dos enantiômeros é mais ativo do que o outro e um desses enantiômeros pode gerar efeitos colaterais (ILISZ *et al.*, 2009; UCCELLO-BARRETA *et al.*, 2010; LÄMMERHOFER, 2010; ROUSSEAU *et al.*, 2011), mas, em contra partida, as vendas de fármacos enantioméricos enriquecidos alcançaram valores de US\$96,4 milhões em 1998 (YASHIMA, 2001). Entre 1992 e 2000, o mercado mundial para compostos químicos opticamente puros aumentaram de 30 bilhões de dólares para uma estimativa de 100 bilhões de dólares, com apenas quase duas dezenas de companhias especializadas em separação quiral. O crescimento da produção de substâncias enantiopuras ou enriquecidas enantioméricamente tem correspondido com o crescimento de métodos assimétricos em sínteses e separação, as quais podem fornecer o requerido material (REKOSKE *et al.*, 2001).

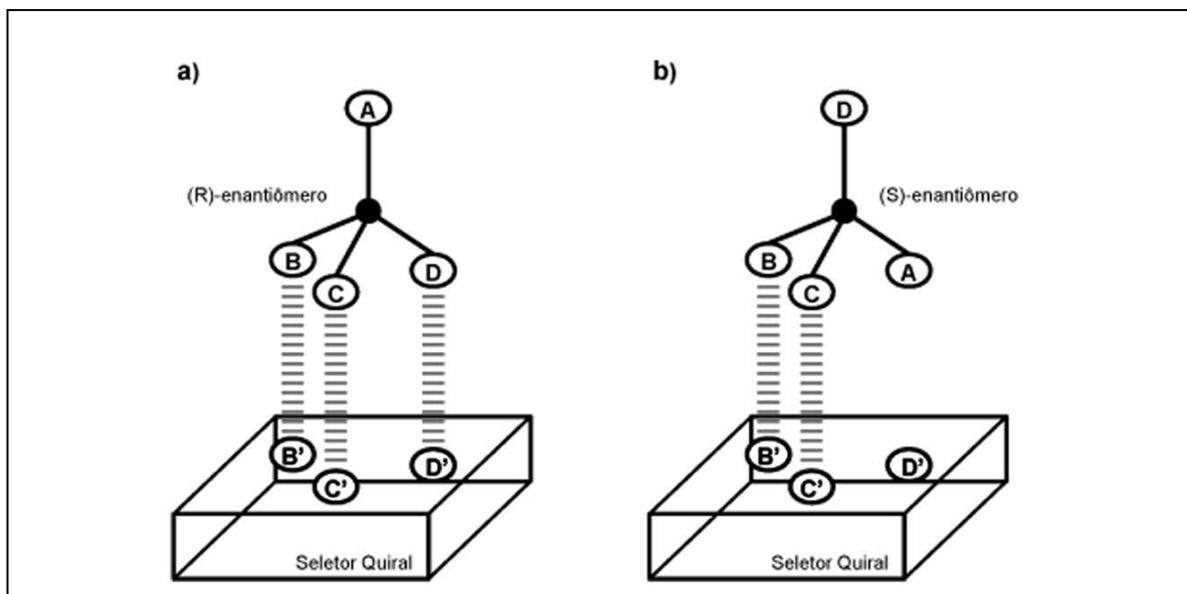
## 2.2 Separação de Compostos Quirais

A sínteses de compostos racêmicos são muito mais simples de serem elaborados, além da maior facilidade de produção em relação à preparação de compostos enantiopuros (FAIGL *et al.*, 2008). Pequenas quantidades de amostras enantiopuras podem ser preparadas e posteriormente realizar testes preliminares de diferenças de potencialidades entre os enantiômeros. Existindo diferenças entre os enantiômeros, com a afirmação de que um dos enantiômeros é mais efetivo que o outro, ocorre à necessidade de obter grandes quantidades do enantiômero com maior potencialidade, onde uma produção em larga escala deve ser desenvolvida. Dificilmente a síntese direta desse enantiômero vai suprir essa necessidade, levando a utilização de produção do enantiômero de forma racêmica e elaboração de um método viável de resolução, onde a obtenção dos enantiômeros enriquecidos é muito mais simples que encontrar um procedimento enantioselativo (FAIGL *et al.*, 2008).

Métodos de separação de componentes quirais por resolução cromatográfica são os mais utilizados além de um desafiante tópico de pesquisas em muitas áreas da química analítica, especificamente nos campos farmacêuticos e bioquímicos, onde formas enantiopuras ou enriquecidas são amplamente requeridas. Pesquisas têm sido feitas no desenvolvimento de métodos de separação quiral bio-analíticos e a busca de um completo entendimento da sua farmacocinética e metabolismo (MONE *et al.*, 2011). A separação de moléculas contendo centros quirais tem atraído intenso interesse, principalmente isômeros enantioméricos de aminoácidos, dentro da indústria farmacêutica nestes últimos 20 anos e mais tempo em estudos de conhecimento bioquímico dessas moléculas (YASHIMA, 2001; ILISZ *et al.*, 2008; ROUSSEAU *et al.*, 2011). Uma ampla variedade de técnicas para obter essa purificação tem sido desenvolvida e algumas técnicas são imitação da maneira em que o sistema biológico distingue a quiralidade e outros exploram as menores diferenças em propriedades físicas ou interação com outras estituições químicas (REKOSKE *et al.*, 2001; ILISZ *et al.*, 2008; LOURENÇO *et al.*, 2010).

A fundamental base para a distinção de enantiômeros, sendo em um sistema biológico ou cromatográfico, é a transformação de enantiômeros em diastereoisômeros ou a criação de uma relação diastereoisomérica entre enantiômeros ligantes e um receptor.

Atualmente a técnica mais utilizada é a separação enantiomérica por cromatografia líquida direta com fases estacionárias quirais, a qual utiliza adsorventes quirais que são na maioria dos casos suportes de sílica porosa esférica funcionalizada em um quiral seletor que é covalentemente ligado ou fisicamente adsorvido nesse suporte (BACHECHI *et al.*, 2006; LÄMMERHOFER, 2010). De acordo com Solomos, (2000); Orlando *et al.*, (2007); Lourenço *et al.*, (2010), a primeira técnica de relativo sucesso na resolução de enantiômeros foi a cromatografia em papel, tendo sido eficiente na separação de alguns aminoácidos aromáticos. Baseado nestes trabalhos, Dagliesh, em 1952, propôs o modelo de “interação de três pontos” entre enantiômeros e o seletor quiral. 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 stereoquímica do analito. Além disso, as interações devem ser de sítios distintos tanto no enantiômero quanto no seletor quiral (Figura 1a). O outro enantiômero interage somente com dois sítios do seletor quiral (Figura 1b).



**Figura 1:** Modelo dos três pontos de interação entre os enantiômeros e o seletor quiral (LOURENÇO *et al.*, 2010; LÄMMERHOFER, 2010)

De acordo com Lämmerhofer, (2010) e Lourenço *et al.*, (2010), o modelo original considera que apenas as interações atrativas são responsáveis pela discriminação quiral.

Atualmente é aceito que as interações repulsivas também participam do mecanismo de resolução enantiomérica. 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 a interação coulômbica, ligação de hidrogênio e interação estérica (muito fortes), interação  $\pi$ - $\pi$  e íon-dipolo (fortes), interação dipolo-dipolo (intermediária), interação dipolo-dipolo induzido (fraca) e dispersão de London (muito fraca), as quais estabilizam os complexos transientes do enantiômeros e seletores quirais. As interações coulômbicas e do tipo  $\pi$ - $\pi$  podem ser atrativas ou repulsivas, a estérica é repulsiva e as demais são todas atrativas (COLLINS *et al.*, 2006; BACHECHI *et al.*, 2006; LÄMMERHOFER, 2010; LOURENÇO *et al.*, 2010; UCCELLO-BARRETA *et al.*, 2010). A aplicação da teoria dos três pontos levou as técnicas de separação quiral, conhecidas como cristalização, resolução cinética, combinação de reação e resolução, resolução cromatográfica (REKOSKE *et al.*, 2001), onde esta última é a mais aplicada considerado industrias farmacêuticas e químicos de alto valor agregado (BACHECHI *et al.*, 2006; ILISZ *et al.*, 2009; XIANG *et al.*, 2010)

Diferentes técnicas de cromatografia podem ser usadas para conseguir uma separação enantioméricas, como cromatografia gasosa, cromatografia com fluido supercrítico, eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (XIANG *et al.*, 2010). A técnica mais relevante para separações enantioméricas é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual pode ser dividida em dois métodos, direta e indireta (PÉTER *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2006; ILISZ *et al.*, 2008; WENG *et al.*, 2008; ILISZ *et al.*, 2009; XIANG *et al.*, 2010) e rotineiramente utilizada em várias pesquisas e atividades de laboratório, onde sua tecnologia é de particular importância para indústria farmacêutica em descobertas de fármacos e controle de qualidade de fármacos enantioméricas (BACHECHI *et al.*, 2006; LÄMMERHOFER, 2010).

O método direto utiliza um seletor quiral imobilizado na fase estacionária da coluna e os analitos formam complexos diastereoisômeros com esse seletor e eluidos em diferentes tempos, dependendo de fatores de retenção de cada enantiômeros no seletor imobilizado. Os métodos indiretos, os analitos formam complexos diastereoisômeros em uma solução

com um agente quirál derivatizador sem ser imobilizados na fase estacionária da coluna e separados depois por cromatografia líquida aquiral que discriminam esses complexos diastereoisômero. As vantagens do método direto são menor número de etapas realizados, menor tempo de purificação e recuperação, menor relação entre a quantidade de seletor e o componente quirál a ser separado (PÉTER *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2006; COLLIS *et al.*, 2006; ILISZ *et al.*, 2008; WENG *et al.*, 2008; ILISZ *et al.*, 2009). Em muitos casos, a única maneira de realizar a resolução para um par de enantiômeros é através da seleção de uma coluna apropriada, variando a porcentagem ou o tipo de modificador orgânico para controlar a retenção dos enantiômeros. Em alguns casos, com amostras e colunas específicas, a resolução também depende do pH, do tipo e da concentração do tampão ou da temperatura (COLLINS *et al.*, 2006). O conhecimento do mecanismo de reconhecimento quirál abre novas perspectivas de projetos de seletores quirais dotados de uma ampla aplicabilidade, os quais tem sido usados em cromatografia enantioseletivas como polissacarídeos, ciclodextranas, proteínas, seletores do tipo Pirkle, alcalóides e antibióticos macrocíclicos (UCCELLO-BARRETA *et al.*, 2010).

### 2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A enantioseparação por técnicas cromatográficas, particularmente a separação direta de enantiômeros por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) avançou significativamente a partir da década 1980. Esse procedimento de resolução tornou-se um dos métodos mais usuais de enantioseparação nos campos que delinham fármacos, agroquímicos e produtos naturais não somente para determinar sua pureza ótica, mas também para obter esses isômeros óticos em grandes escalas. Particularmente, no campo da indústria farmacêutica, a aplicação da técnica CLAE quirál tem sido essencial para pesquisas e desenvolvimento de fármacos quirais, onde investigação de farmacocinética e atividades fisiológicas, toxicológicas e metabólicas de ambos os enantiômeros é necessário antes do seu uso em atividades bioquímicas-clínicas (YASHIMA, 2001).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes

interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fase móvel e estacionária torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (CASS & DEGANI, 2001; COLLINS *et al.*, 2006).

Os termos e expressões “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” foram descritos pela primeira vez em 1906 por Tswett, um botânico russo que separou os componentes de um extrato de folhas usando uma coluna de vidro recheadas com vários sólidos e arrastou os diferentes componentes com éter de petróleo, que originou em várias faixas colorida. Embora a técnica seja conhecida como cromatografia (do grego “chrom” – cor e “graphie” – escrever), ela não depende da cor. A faixa colorida obtida por Tswett serviu somente para facilitar a identificação dos componentes separados (COLLINS *et al.*, 2006).

A principal diferença entre a cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é que esta utiliza fases estacionárias compostas de micropartículas entre 3 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Estas fases estacionárias, por serem muito menos permeáveis, tornam-se necessário a utilização de bombas de alta pressão e precisão para eluir a fase móvel por dentro da coluna (CASS & DEGANI, 2001; COLLINS *et al.*, 2006).

O procedimento CLAE tem sido usado para produção de relativamente pequenas quantidades de substâncias quirais desde que foram inventadas suas fases estacionárias com reconhecedores quirais. A adequada combinação de fases estacionárias e fases móveis permitem que a mistura enantiomérica possa ser separadas e os enantiômeros sejam eluidos em diferentes tempos e com bom rendimento na recuperação. Foi uma das primeiras técnicas a ganhar uma aceitação prática generalizada e divide-se em escalas analíticas, semipreparativa e preparativas. Em escala analítica, utilizam-se colunas de diâmetros pequenos e a quantidades pequenas de componentes e conseqüentemente, uma separação enantiomérica com baixo rendimento, adequado para análises e testes iniciais. Na escala semipreparativa e preparativa utiliza quantidades significativas de analito e através de significativas injeções de misturas de enantiômeros e coletando o efluente da coluna em segmentos de tempos apropriado, obtém a separação com uma pureza enantiomérica ou

enriquecida com um rendimento aceitável para a recuperação. No entanto, essa técnica emprega uma quantidade substancial de solventes e requer como investimento um capital significativo na forma de fases estacionárias caras e equipamentos de alta pressão. Além disso, o produto obtido é extremamente diluído, resultando em significantes gastos de energia para recuperar o composto desejado (REKOSKE *et al.*, 2001).

Novas adaptações do uso do CLAE em escala semipreparativa e preparativa têm sido inventadas para atender as suas questões desfavoráveis. Uma das mais importantes destas técnicas é a adaptação de uma chamada de leito móvel simulado (SMB). Este método de separação atende as limitações descritas do CLAE, aumentando a eficiência em relação ao consumo de solventes, concentração de adsorbato e utilização de fase estacionária (REKOSKE *et al.*, 2001).

Cromatografia por leito móvel simulado (SMB) é uma técnica de cromatografia mais recente, podendo ser aplicada na separação enantiomérica, permitindo separações em larga escala, as quais em escalas preparativas chegam a obter escala de toneladas de enantiômeros enriquecidos, os quais podem acelerar a produção de fármacos quirais com alto grau de pureza (YASHIMA, 2001; LÄMMERHOFER, 2010).

### 2.3.1 Fase Estacionária Quiral

A possibilidade de resolver um par de enantiômero não é fácil de prever a partir de sua estrutura mesmo com o conhecimento sobre a macroestrutura da fase estacionária quiral (PERSSON *et al.*, 2001). A forma, estrutura e desenvolvimento de uma fase estacionária quiral (FEQ) capaz de um reconhecimento quiral efetivo de uma ampla faixa de enantiômeros é o ponto chave da técnica de separação quiral em CLAE. Várias FEQ para CLAE tem sido preparadas e comercializadas, as quais consistem em pequenas moléculas quirais ou polímeros quirais imobilizados sob um suporte como uma sílica gel (YASHIMA, 2001; PERSSON *et al.*, 2001). Diferentes enantiômeros podem ser resolvidos pela mesma fase estacionária quiral quando os enantiômeros apresentam orientações conformacionais similares ou devido a similaridade do ambiente ao redor do centro quiral (FAIGL *et al.*, 2008).

Para diferenciar os enantiômeros um do outro, tanto química como físico-quimicamente, faz-se necessário a formação de um par de diastereoisômeros, transitórios ou não, os quais são mostrados na reação abaixo (1), segundo Collins *et al.*, (2006).



Onde (R)-An e (S)-An são os analitos dos enantiômeros R e S, respectivamente; (R)-So é o seletor quiral; (R)-An-(R)-So e (S)-An-(R)-So são os pares de diastereoisômeros dos analitos dos enantiômeros R e S com o seletor quiral.

De acordo com Lourenço *et al.*, (2010), os processos envolvidos na formação dos complexos diastereoisoméricos transitórios analito/fase estacionária quiral 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 às interações fortes. Mesmo assim, usualmente a escolha do seletor quiral é feita considerando as interações mais fortes entre os enantiômeros e a fase estacionária quiral (FEQ).

A separação de um par de enantiômeros torna-se fácil quando se dispõe de uma coluna cromatográfica com fase estacionária quiral seletiva para o soluto em questão. No entanto, não existe uma fase estacionária universal capaz de solucionar todos os problemas de separação, mas sim diversas fases com diferentes princípios de separação, como pode ser visto na Tabela 2 (COLLINS *et al.*, 2006).

O uso de polímeros quirais como um adsorvente enantiosseletivo é uma rota extensamente utilizada, com as vantagens de baixo custo, ampla disponibilidade e normalmente não necessitam de muito tempo na preparação. Entretanto, adsorventes biopoliméricos às vezes tendem a ter pobres propriedades mecânicas e cromatográficas, com alta polaridade e estrutura porosa. Essas características proporcionam um comportamento cinético desfavorável (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Uma rota alternativa utiliza fases estacionárias quirais sintéticas preparadas para um tipo específico de separação, com boas propriedades mecânicas e cromatográficas. Tentativas para melhorar as propriedades cromatográficas e enantiosseletivas da celulose

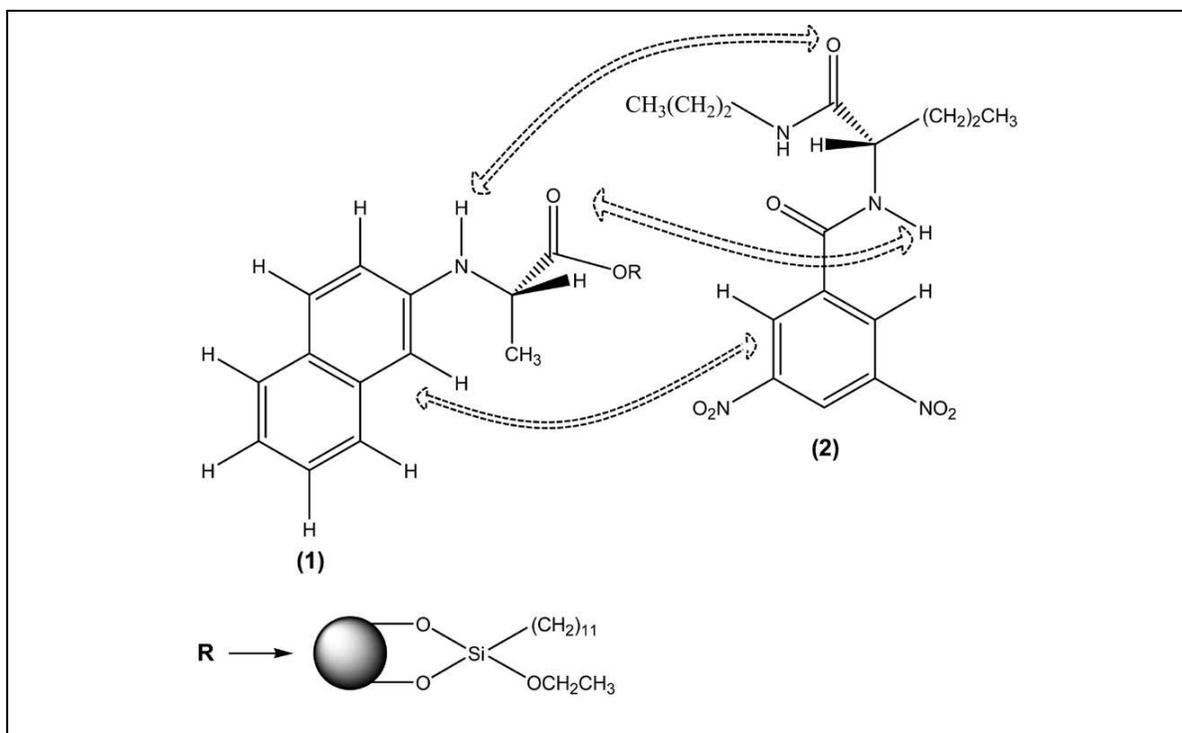
tem se concentrado na derivação dos grupamentos hidroxilas para diminuir a polaridade do material e prover um aumento na interação entre a fase estacionária quiral e enantiômeros analito (PIRKLE & POCHAPSKY, 1989). Os tipos de fases estacionárias quirais podem ser classificados de uma maneira geral em cinco grupos, dependendo dos processos de reconhecimento quiral que operam durante a separação. As fases são do tipo Pirkle; Fases com polissacarídeos helicoidais; Fases com cavidades quirais; Complexação ternária do ligante e fases protéicas (LOURENÇO *et al.*, 2010).

**Tabela 2:** Fases estacionárias quirais e requisitos de utilização

Tipo da fase estacionária	Mecanismo de reconhecimento quiral	Requisitos do analito	Requisitos da fase móvel
Fases protéicas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas	Grupos ionizáveis (amina ou ácidos); grupos aromáticos	Somente fase reversa
Fases de polímeros helicoidais	Complexação de inclusão, interações atrativas	Capacidade de ligação de hidrogênio ou interações dipolo; fator estéreo próximo a centro quirais	Fase reversa, fase normal ou solventes orgânicos polares
Fases com cavidades (ciclodextrina e éteres coroas)	Complexação hóspede-hospedeiro ou complexação de inclusão, ligação de hidrogênio	Grupos polares, polarizáveis e aromáticos	Fase reversa ou normal
Fases do tipo doador-receptor (tipo Pirkle)	Ligação de hidrogênio, interações $\pi$ - $\pi$ , dipolo, atrações e repulsões eletrostáticas	Capacidade para ligar por interações $\pi$ ou ligações de hidrogênio; grupo aromático	Fase normal ou reversa
Fases por troca de ligante	Complexos de coordenação a metais	$\alpha$ -amino e $\alpha$ -hidroxiaminoácidos	Fase reversa

### 2.3.1.1 Fase Estacionária Tipo Pirkle

Pirkle (1979) relatou que para resolução quiral acontecer deve haver pelo menos três interações simultâneas entre uma fase estacionária quiral e um enantiômero soluto, por isso uma ou mais interações devem ser estereoquimicamente dependentes. Interações típicas envolvidas no processo de reconhecimento quiral são interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ , ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas e estéricas. A Figura 2 apresenta uma representação da fase estacionária do tipo Pirkle. Observa-se nessa Figura as 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.



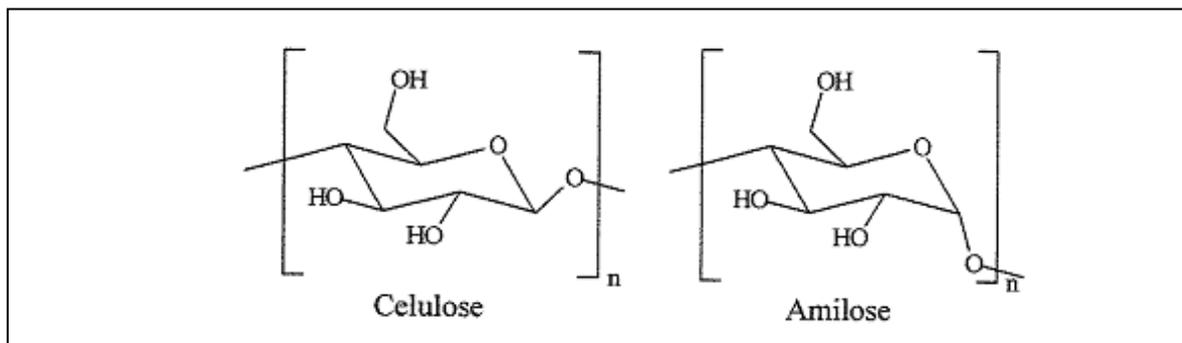
**Figura 2:** Representação de fase estacionária do tipo Pirkle e as suas interações com o analito (LOURENÇO *et al.*, 2010).

De acordo com a Pirkle *et al.*, (1986), sistemas com interação  $\pi$ - $\pi$ , a rigidez conformacional dos anéis aromáticos participa da formação do complexo diastereoisoméricos e, como consequência, apenas dois grupos funcionais ligados ao centro estereogênico do analito precisam interagir com os grupos funcionais do seletor quiral.

O entendimento detalhado das interações entre a fase estacionária quiral e o soluto enantiomérico conduz à possibilidade de prever a ordem de eluição de enantiômeros individuais (PRYDE, 1989). Baseados nos resultados obtidos na primeira geração de fases quirais, Pirkle desenvolveu uma teoria de reciprocidade que diz: "A interação diastereoisomérica que permite a uma coluna derivada de um dado composto quiral A resolver uma determinada mistura racêmica B também permite à coluna derivada do composto B resolver a mistura racêmica A". Este fato levou ao surgimento de uma segunda geração de fases estacionárias quirais de Pirkle, derivadas de N-(3,5-dinitrobenzoil) aminoácidos ( $\pi$ -ácido, *in nature*) (CASS & DEGANI, 2001). A terceira geração de fases quirais de Pirkle ( $\pi$ -básica, *in nature*) foi resultado direto da teoria de reciprocidade (CASS & DEGANI, 2001). As fases  $\pi$ -receptor mais frequentemente utilizada são derivadas do aminoácido fenilglicina (DNBPG) ou leucina (DNBLeu) covalentemente ou ionicamente ligada ao gel de 3-aminopropilsílica. Estas fases são comercialmente disponíveis tanto para separações analíticas quanto para separações preparativas de enantiômeros (FRANCOTTE, 1994).

### 2.3.1.2 Fase Estacionária Tipo Polissacarídeos Helicoidais

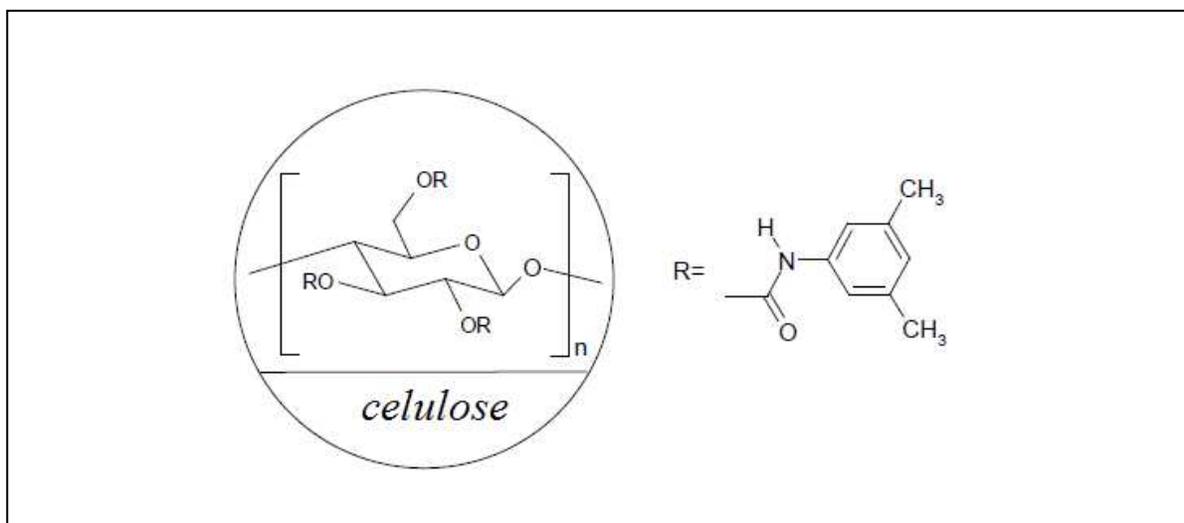
Fases do tipo polissacarídeos helicoidais funcionam por uma combinação de reações complementares entre o enantiômero soluto e o polissacarídeo imobilizado, geralmente celulose ou amilose (HEARD & BRAIN, 1994), cujas estruturas são mostradas na Figura 3.



**Figura 3:** Estrutura química da celulose e amilose.

Uma variedade de polissacarídeos, tais como celulose, amilose, quitosana, quitina e xilana, foram eficientemente derivados e usados como seletores quirais para separação de diferentes classes de compostos quirais. Além disso, diversas fases estacionárias quirais baseadas em tris-benzoatos, tris-fenilcarbamatos e tris-benzilcarbamatos de polissacarídeos adsorvidos em 3-aminopropilsílica macroporosa foram também desenvolvidas (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Atualmente, as mais utilizadas são amilose e celulose devido os melhores resultados de separações das misturas racêmicas, ocasionadas pela sua configuração quiral e serem mais favoráveis à conversão em uma variedade de derivados, como acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamato, garantindo assim, um maior número de sítios para o reconhecimento quiral, a Figura 4 ilustra um exemplo de uma fase estacionária quiral a base de celulose e fenilcarbamato.



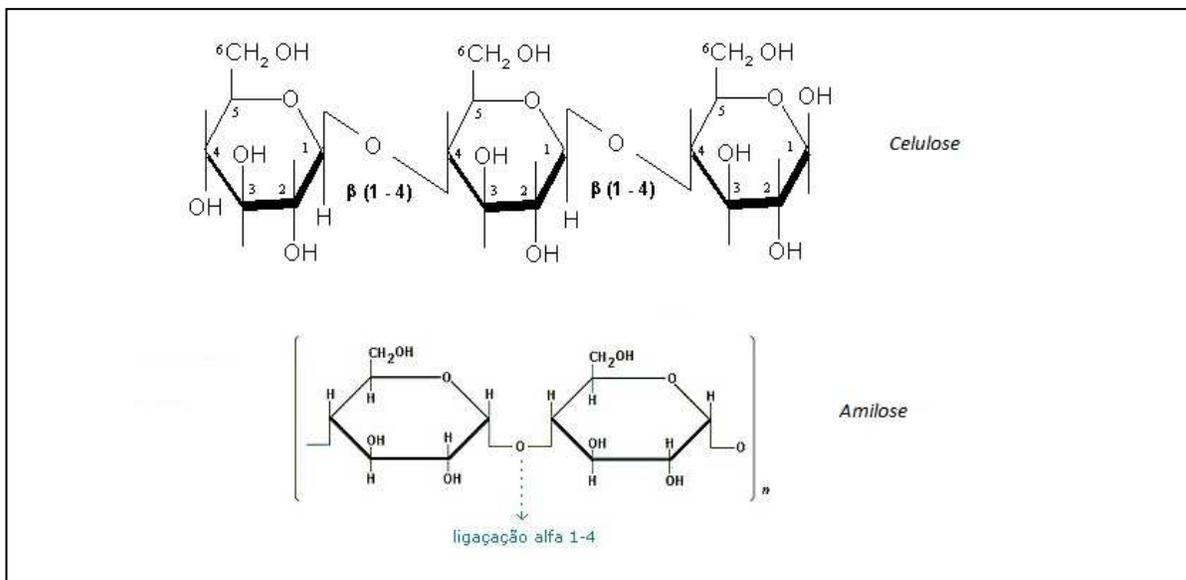
**Figura 4:** Fase estacionaria de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)

A celulose e amilose têm fornecido fases estacionárias notavelmente versáteis e extremamente poderosas tanto para fins analíticos como para fins preparativos. As fases estacionárias quirais baseadas tris-fenilcarbamatos de celulose e amilose são as mais estudadas e utilizadas, devido à elevada estabilidade e grande capacidade de discriminação e resolução de uma ampla variedade de compostos. A enantioseletividade destas fases varia fortemente com o tipo de grupo derivatizado ligado à molécula de glicose do polissacarídeo. Essa característica tem sido extensivamente explorada para modular a habilidade de reconhecimento quiral destas fases estacionárias baseadas em polissacarídeos (LOURENÇO *et al.*, 2010). As habilidades de reconhecimento quiral de polissacarídeos com fenilcarbamatos são muito influenciadas pela metade fenil, devido a grande influência na polaridade desse modificador quando substituído. Isto sugere que a maioria dos importantes sítios de adsorção para discriminação quiral de derivados fenilcarbamatos podem ser o grupo polar do carbamato (YASHIMA, 2001).

A estrutura quiral possui diferentes sítios de ligações que atribuem à fase estacionária uma seletividade e retenção de um número razoavelmente grande de compostos quirais. Os átomos de cloro, oxigênio e nitrogênio, presentes na estrutura da FEQ, conferem a formação de ligações de hidrogênio, além disso, o átomo de cloro por ser fortemente eletronegativo, é responsável por interações dipolo com os componentes quirais de interesse. A existência do fenil na estrutura do polímero constitui as interações do tipo  $\pi$ -

$\pi$ . Por último, a estrutura linear da celulose, citada anteriormente, confere os efeitos estereoespecíficos. Pode ocorrer a formação dos complexos de inclusão, decorrente do encaixe da porção aromática do analito na cavidade quiral da fase estacionária. (ali *et al.*, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2010). Os complexos diastereoisoméricos formados são estabilizados por interações estéricas e ligação de hidrogênio (LOURENÇO *et al.*, 2010).

O grupo polar do carbamato é direcionado de uma forma que sua estrutura fique mais interna na cadeia polimérica e o grupo aromático hidrofóbico mais externo. Desta forma, enantiômeros que migram da parte externa da cadeia polimérica podem eficientemente interagir com a parte polar dos carbamatos localizados na parte fenil via ligações de hidrogênio com os grupos NH e C=O e dipolo-dipolo interações com C=O. Contudo, a natureza do substituinte sob os grupos fenil afeta a polaridade do carbamato residual, o qual leva a diferentes forças de resolução quiral (YASHIMA, 2001). As cadeias poliméricas formadas pelos carboidratos amilose e celulose são de forma helicoidal e linear, respectivamente. Esses polímeros estão entre os mais abundantes biopolímeros ativos opticamente e possuem estruturas perfeitamente definidas e com capacidade de resolver enantiômeros incluindo derivados de aminoácidos (YASHIMA, 2001). Ambos carboidratos tem sua corrente polimérica formada por unidades de D<sub>(+)</sub> glicose e a diferença entre as suas estruturas são o tipo de ligação formada. A celulose apresenta na sua cadeia polimérica ligações do tipo  $\beta$  (1-4) e a amilose cadeia polimérica  $\alpha$ -1-4 e a Figura 5 ilustra essas diferenças conformacionais. Ambos possuem cavidades quirais, que são responsáveis pela resolução quiral. A amilose por ser helicoidal, possui cavidades bem definidas, tornando-a diferente da correspondente celulose análoga, que parece ser mais de natureza linear e rígida (ali *et al.*, 2007). As cavidades formadas pela estrutura terciária da amilose e celulose, são capazes de reter moléculas estereosseletivamente (COLLINS *et al.*, 2006).



**Figura 5:** Estrutura química das fases estacionárias quirais

### 2.3.2 Fase Móvel

Reconhecimento quiral é comumente considerado como um processo biomolecular de interações entre a fase estacionária quiral e o substrato quiral ainda com a presença de uma fase móvel que assume um papel modulador das forças destas interações. Eluentes e solventes são grandes determinantes de preferências conformacionais e de estados de ionização de seletores quirais e solutos (LÄMMERHOFER, 2010).

A fase móvel decide a respeito da utilização de uma fase estacionária quiral de acordo com seu potencial de enantioconhecimento quiral intrínseco, sendo uma importante ferramenta para investigações de quais interações são envolvidas. Sua escolha é fundamental para separações de enantiômeros, pois influencia diretamente na separação e rendimento da purificação quiral (LÄMMERHOFER, 2010).

Parâmetros importantes como seletividade da separação, tempo de retenção e solubilidade do racemato são altamente influenciados por mudanças de composição da fase móvel. Em alguns casos, o impacto da fase móvel é tão forte que mudanças na sua composição causam inversão da ordem de eluição dos enantiômeros na cromatografia. Por essas razões, antes de executar uma separação em escalas semipreparativas ou preparativa,

torna-se necessário estabelecer a ordem de eluição de ambos enantiômeros nas fases estacionárias e móveis iguais as otimizadas em condições analíticas (COLLINS *et al.*, 2006).

Os modos de eluição da fase móvel em relação a fase estacionária podem ser utilizadas nos três modos de eluição, normal, reverso e polar orgânico (LOURENÇO *et al.*, 2010). Cass *et al.*, (2003) investigaram diferentes modos de eluição em fase estacionária tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e amilose e concluíram que os três modos de eluição podem ser usados sem a perda do desempenho das colunas ou 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.

As principais características que as fases móveis utilizadas em CLAE devem apresentar um alto grau de pureza, fácil purificação, dissolver a amostra sem decompor os seus componentes, não decompor ou dissolver a fase estacionária, ter baixa viscosidade. Além dessas características, serem compatíveis com o tipo de detector utilizado e terem polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra (CASS *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2006). Quanto maior a viscosidade da fase móvel, menor a viscosidade de transferência de massa, menor a eficiência, menor a permeabilidade da coluna e maior a pressão necessária de escoamento (COLLINS *et al.*, 2006).

Modificações da fase móvel com diferentes eluentes é a maneira mais usual para o desenvolvimento da separação de uma amostra em CLAE. A eluição da fase móvel pode ser dos tipos, isocrática ou por gradiente. A eluição isocrática é aquela na qual a força cromatográfica da fase móvel permanece constante durante toda a separação. A eluição por gradiente é aquela na qual a composição da fase móvel varia durante a separação, de modo que a força cromatográfica aumente gradativamente. A eluição isocrática é o modo preferido de eluição devido a sua simplicidade, conveniência, reprodutibilidade das análises e menor custo (COLLINS *et al.*, 2006).

A força cromatográfica do solvente é atribuída em função da polaridade da fase estacionária. Dessa forma, o solvente denomina-se forte quando possui grau de polaridade semelhante ao da fase estacionária, caso contrário, denomina-se fraco. Em cromatografia

líquida em fase estacionária normal, a qual a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, solventes polares são denominados fortes e os mais apolares são fracos. Em cromatografia em fase estacionária reversa, na qual a fase estacionária é mais apolar que a fase móvel, solventes fortes são os mais apolares e fracos são os polares. Portanto, fases móveis fortes em fase estacionária reversa são os que possuem maior proporção de solvente apolar. Em cromatografia de fase reversa, o fator de retenção da amostra ( $K$ ), aumenta para os compostos mais hidrofílicos. Quando um ácido ou uma base sofrem ionização, passando de espécies neutras para espécies com carga, tornam-se menos hidrofóbicas, diminuindo significativamente sua retenção na fase estacionária reversa (COLLINS *et al.*, 2006).

A Tabela 3 apresenta os valores de polaridade, viscosidade e comprimento de onda com maior absorbância de alguns eluentes utilizados como fase móvel em cromatografia. A polaridade é definida na série eluotrópica, tabelada na escala de Snyder ( $P'$ ), para cromatografia em fase normal e reversa (COLLINS *et al.*, 2006).

**Tabela 3:** Valores de polaridade de eluentes utilizados como fase móvel em cromatografia

Eluentes	$P'$	$\mu$ (mPa.s) em 25°C	uv (nm)
Acetonitrila	5,8	0,34	190
Ácido acético	6	1,16	250
Água	10,2	0,89	...
Hexano	0,1	0,29	200
Isopropanol	3,9	2,3	210
Trietilamina	1,9	0,38	280

Considerando as possíveis fases móveis que podem ser utilizadas em diferentes fases estacionárias quirais, a seletividade dos seletores quirais para um determinado analito, utilizando diferentes eluentes, podem ser otimizados com a adição de aditivos como trietilamina e dietilamina na fase móvel. Utilizando fase estacionária reversa, a seletividade dos seletores quirais para um determinado analito pode ser otimizada com a utilização de tampão e ajuste de pH (COLLINS *et al.*, 2006).

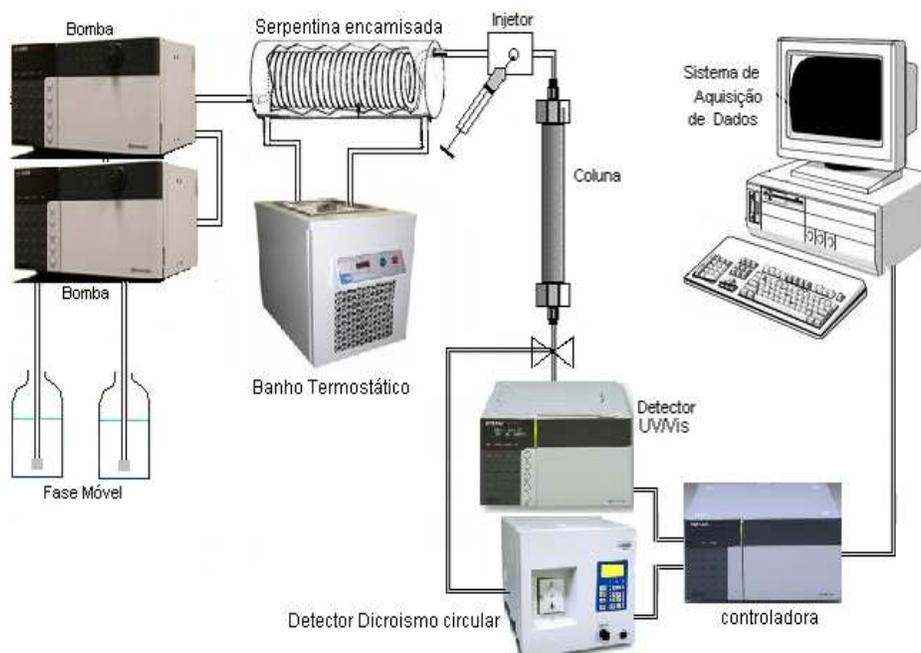
Se compostos iônicos ou ionizáveis precisam ser separados, geralmente a análise cromatográfica necessita ser realizada em um valor de pH bem definido. Para compostos ácidos, a solução tampão com o pH uma unidade menor que o  $pK_a$  resulta em espécies não

dissociadas. Solução tampão com o pH uma unidade maior que o pKa produz espécies ionizáveis, ou seja, ânions. Compostos ácidos perdem um próton e tornam-se ionizáveis à medida que o pH aumenta, já compostos básicos, ganham um próton e tornam-se ionizáveis à medida que o pH diminui. Portanto, à medida que o pH aumenta, a retenção de compostos ácidos em fase reversa diminui e a retenção de compostos básicos aumenta. Usa-se o controle de pH da fase móvel para promover a separação de solutos iônicos. A retenção é maior quando o composto estiver na forma não-ionizada (COLLINS *et al.*, 2006).

Controla-se o pH na fase móvel com adição de ácido acético, fosfórico ou tampão como acetato ou fosfato para ajustar o pH no intervalo de 2-5. Para intervalos de pH entre 7-8, usa-se  $\text{NH}_4\text{OH}$ , trietilamina, dibutilamina ou fosfatos alcalinos na fase móvel.

### 2.3.3 Equipamentos para CLAE

A Figura 6 apresenta um esquema básico de um aparelho cromatográfico a líquido, dentro de uma ampla variedade de aparelhos existentes que se diferenciam pelo custo, versatilidade e complexidade (COLLINS *et al.*, 2006).



**Figura 6:** Esquema de um cromatográfico líquido de alta eficiência.

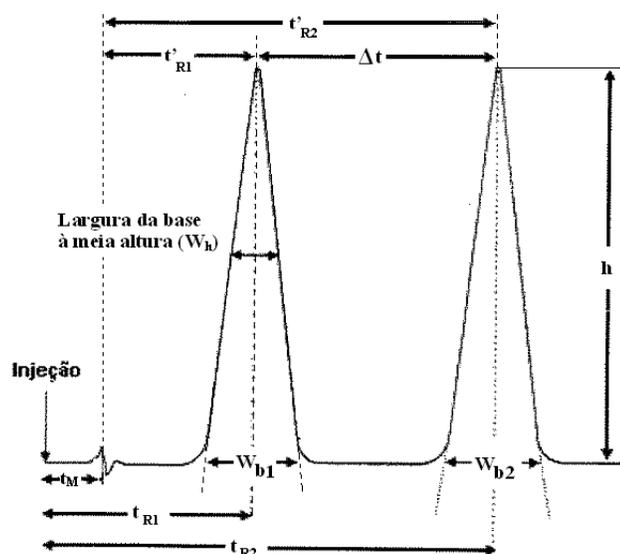
A cromatografia líquida de alta eficiência constitui em uma fase móvel bombeada sob alta pressão e uma quantidade de amostra é introduzida por meio de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela fase móvel através da coluna. Na coluna, a velocidade de eluição dos compostos é inversamente proporcional à interação destes com o material de recheio, e a separação depende do número de pratos. A fase móvel, contendo os compostos da amostra, ao sair da coluna chega ao detector que gera um sinal proporcional à concentração do soluto, que é enviado para um sistema de registro e tratamentos dos dados, produzindo um cromatograma. O detector é o componente de alto valor econômico e sofisticado do sistema cromatográfico, o qual mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra ou da solução que a contém e envia um sinal para registro, geralmente, diretamente proporcional à concentração do componente na amostra. Esse sinal é gerado assim que o efluente sai da coluna e chega ao detector. Dentro os vários detectores, os mais utilizados em cromatografia quiral são os detectores por absorvância no ultravioleta e no visível, espectrômetros de massa, rotação ótica e dicróismo circular (COLLINS *et al.*, 2006). O funcionamento dos detectores espectrofotométricos baseia-se na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética. Normalmente isso ocorre desde a região do ultravioleta até o infravermelho, em um dado comprimento de onda (COLLINS *et al.*, 2006; AHUJA, 2000). A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar, bem como sobre a estrutura do analito. O espectrômetro de massas é um instrumento sofisticado e constituído de três partes: fonte de ionização, muitas vezes denominadas interface, analisador de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados. Diferenças nesses três componentes diferenciam os tipos de técnicas de espectrometria de massas empregadas em cromatografia de alta eficiência. Em todas elas, após a injeção da amostra no espectrofotômetro de massas, ocorre a produção de íons pela fonte de ionização, uma vez que sua detecção é limitada a espécies carregadas. Uma vez formada os íons, eles são *analisados* pelo analisador de massas de acordo com a sua razão massa/carga (COLLINS *et al.*, 2006).

Detectores de rotação ótica são chamados de detectores óticoquiral. A rotação ótica é uma rota para detecção e quantificação de compostos quirais (AHUJA, 2000) e são

apenas utilizados especialmente para análise de enantiômeros (COLLINS *et al.*, 2006; AHUJA, 2000). O dicroísmo circular é um detector de rotação ótica que relata a diferença de absorbância da luz direita ou esquerda circular polarizada e analisa essa absorbância diferencial e quantificada para uma ampla faixa de comprimento de onda de absorbância (AHUJA, 2000).

## 2.4 Parâmetros Cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos analíticos de separação de compostos são úteis para a avaliação e verificação da eficiência de separação na coluna cromatográfica (COLLINS *et al.*, 2006; SEWELL E CLARKE, 1987). A Figura 7 apresenta alguns termos técnicos necessários para auxiliar nas definições dos parâmetros cromatográficos.



**Figura 7:** Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação dos parâmetros cromatográficos (adaptado de COLLINS *et al.*, 2006).

**Legenda:**  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  – tempos de retenção do 1º e 2º componente;  $w_{b1}$  e  $w_{b2}$  – largura da base do pico na linha de base;  $w_h$  – largura da base do pico à meia altura;  $t_M$  – tempo morto (refere-se ao componente não retido na coluna);  $t'_{R1}$  e  $t'_{R2}$  – tempos de retenção ajustados;  $h$  – altura do pico;  $\Delta t$  – diferença entre os tempos de retenção ajustados.

Segundo Collins *et al.*, (2006), o tempo de retenção ( $t_R$ ) engloba todo o tempo do percurso das moléculas do soluto em movimento com a fase móvel e a soma do tempo de permanência das moléculas do soluto na fase estacionária dentro do sistema cromatográfico.

Sendo assim, o tempo de retenção é ajustado por um tempo morto ( $t_M$ ). O tempo morto é determinado por um constituinte que não interage com a fase estacionária. A equação (2) é utilizada para determinar esse tempo.

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2)$$

De acordo com Cass & Degani (2001) e Collins *et al.*, (2006), o fator de retenção é a razão entre o número de moléculas do soluto na fase estacionária ( $N_e$ ) e o número de moléculas do soluto na fase móvel ( $N_m$ ). O fator de retenção pode ser adquirido entre a razão do tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e o tempo morto ( $t_M$ ). Através da Equação (3) pode-se calcular o fator de retenção.

$$K = \frac{N_e}{N_m} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (3)$$

O valor de  $K$  tem relação direta com a eficiência e o alargamento dos picos, este valor não pode ser baixo e, tão pouco, alto. Assim, valor de  $K$  baixo significa fraca interação dos solutos com a fase estacionária (FE) e para valores elevados possui uma forte interação com a FE. No entanto, a força de interação pode ser também governada pela fase móvel (FM) empregada. Ou seja, valor de  $K$  baixo indica uma FM muito forte e/ou pouca interação do soluto com a FE, enquanto um  $k$  elevado tem indício de uma forte interação com a FE e/ou o eluente é muito fraco (CASS & DEGANI, 2001). Segundo Collins, Braga e Bonato (2006), o intervalo ideal de fator de retenção é  $1 \leq k \leq 10$ ; entretanto, para análise de múltiplos componentes, também aceita-se  $0,5 \leq k \leq 20$ . Portanto, o primeiro parâmetro normalmente ajustado no sistema cromatográfico deve ser o fator de retenção. Para otimização desse fator é aplicado um procedimento empírico por tentativa e erro.

Outro termo na cromatografia em coluna é o fator de separação ( $\alpha$ ), o qual mede a seletividade de separação entre duas bandas adjacentes (CASS & DEGANI, 2001). O fator

de separação ( $\alpha$ ) é a razão entre os fatores de retenção de dois picos adjacentes, que também são relacionados com tempos de retenção ajustados (COLLINS *et al.*, 2006). A Equação (4) é utilizada para calcular esse fator.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (4)$$

A resolução ( $R_S$ ) é outra medida quantitativa de separação do sistema de cromatografia em coluna. Leva em conta as larguras das bandas, além de seus respectivos tempos de retenção. É calculada a partir da distância entre os dois picos adjacentes dividido pela média das larguras de suas respectivas bases, conforme apresentado na Equação (5). Segundo Collins, Braga e Bonato (2006), para valores de  $R_S \leq 1$ , os picos são poucos separados, se eles estiverem em proporções iguais dentro de uma mistura binária. Já valores iguais a 1,25 indicam uma melhor separação, contudo, servem somente para mensurar a quantidade presente na mistura, enquanto  $R_S$  maior que 1,5 indica separação completa.

$$R_S = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1^{h_{\frac{1}{2}}} + W_2^{h_{\frac{1}{2}}}} \quad (5)$$

Segundo Cass & Degani (2001); Collins, Braga e Bonato (2006), o HETP “em inglês *height equivalent to a theoretical plate*” ou altura equivalente a um prato teórico é definido pela razão entre a altura ou comprimento da coluna (L) e o número de pratos (N), representado pela Equação (6). Cada etapa em que a molécula alcança o equilíbrio corresponde a um “estágio de equilíbrio” ou um “prato teórico”. Quanto maior o número de pratos teóricos, maior a chance de resolução. A altura equivalente a um prato é função da geometria da coluna e empacotamento, das condições de operação, das propriedades do soluto e das interações do soluto com a fase móvel e com a fase estacionária. Em uma separação cromatográfica em que o empacotamento da coluna e o soluto já são definidos, H é função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel ( $u_0$ ) (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b).

$$HETP = \frac{\sigma^2}{t_R^2} L = \frac{L}{N} \quad (6)$$

Segundo Cass & Degani (2001); Guiochon (2006), o número de pratos ( $N$ ) é considerado como sendo a razão do tempo de retenção ( $t_R$ ) e o tempo necessário para alcançar um equilíbrio,  $\tau_e$ , conforme Equação (7). Calcular  $\tau_e$  é baseado em uma estimativa derivada da lei de Fick, que afirma que o tempo requerido para atingir equilíbrio entre o centro da esfera e a solução ao redor da esfera é proporcional ao  $dp^2$  e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão o poro ( $D_p$ ), conforme apresentado pela Equação (8).

$$N = \frac{t_R}{\tau_e} = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (7)$$

$$N \propto \frac{D_p}{d_p^2} t_R \quad (8)$$

Onde  $D_p$  inclui as contribuições do coeficiente de difusão na fase móvel impregnada à partícula, o coeficiente de impedimento devido à tortuosidade, a contração da rede dos poros e a difusão superficial. Isto mostra que, para aumentar a eficiência da coluna, é necessário aumentar o tempo de retenção, bem como aumentar o coeficiente de difusão pela melhoria da estrutura da rede dos poros no interior das partículas, aumentar o coeficiente de difusão de massa, no qual é proporcional a  $D_p$  e diminuir o tamanho médio das partículas (GUIOCHON, 2006).

De acordo com Cass & Degani (2001), cada prato mede a eficiência das condições cromatográficas através dos tempos de retenção obtidos ( $t_R$ ) e do alargamento de bandas ( $W$ ). Essa eficiência da coluna, caracterizada pelo espalhamento do pico de um composto durante sua eluição, é apresentada pela Equação (9).

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{W^{h_{\frac{1}{2}}}} \right)^2 \quad (9)$$

### 2.4.1 Estudo de Transferência de Massa

Para efeito de simplificação, várias hipóteses são assumidas na construção do modelo para a transferência de massa de um analito em coluna cromatográfica, as quais são listadas abaixo (CREMASCO *et al.*, 2001):

A coluna é unidimensional. Esta consideração implica na uniformidade no sentido radial, ou seja, todas as propriedades físicas, assim como as concentrações de cada componente, são constantes em uma dada seção transversal do leito. Desta forma as equações de balanço de massa terão duas variáveis independentes, o tempo  $t$  e a coordenada axial  $z$ . A consideração dessa hipótese é muito comum na abordagem de sistemas com uma dimensão claramente predominante, como é o caso das colunas cromatográficas que possuem um comprimento bem maior que seu diâmetro externo.

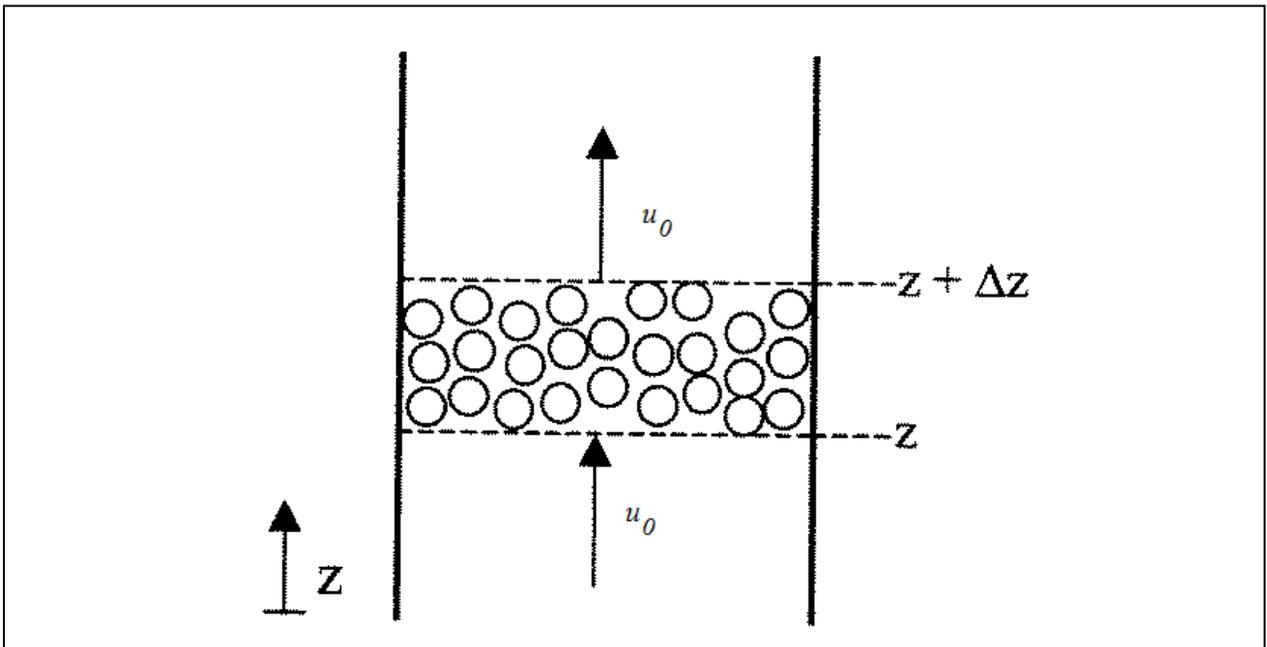
A fase líquida é incompressível. Com esta consideração, a massa específica da fase móvel fica constante, assim como a vazão e a velocidade da mesma ao longo da coluna. A incompressibilidade da fase líquida também é uma consideração muito comum nos balanços de massa.

O sistema é isotérmico. Em princípios, balanços de energia deveriam acompanhar os balanços de massa, sendo incluídos no sistema de equações. No entanto, na prática fenômenos térmicos associados à migração dos componentes através do leito parecem ser muito reduzidos e não ter mostrado efeitos detectáveis (GUIOCHON, 1994). Por isso, equações representativas do balanço de energia não estarão presentes no sistema.

A fase sólida será considerada homogênea, ou seja, um valor médio de concentração  $\langle q \rangle_i$  englobará tanto a massa do soluto  $i$  adsorvida sobre o sólido (superfície externa da partícula e parede dos poros) quanto a massa de  $i$  na fase líquida presente no interior dos poros das partículas. Esta concentração será dada pela razão entre essa massa total de  $i$  no sólido incluindo os poros. A concentração na fase líquida ( $C_i$ ) será dada pela razão entre a massa de  $i$  presente na fase líquida (excluindo a fase líquida que preenche os poros do sólido) e o volume de líquido nos interstícios entre as partículas.

O coeficiente de dispersão axial é considerado constante. A dependência com a pressão do coeficiente de dispersão axial em líquidos é desprezível. Considera-se também que este parâmetro não depende da concentração de soluto, o que é verdade para compostos usados em cromatografia líquida, que raramente excedem 5% em peso (GUIOCHON, 1994).

Considerando um elemento de volume para o balanço de massa, apresentado na Figura 8,  $i$  como o componente a ser adsorvido em ambas as fases, estacionária e móvel, no sistema .



**Figura 8:** Elemento de volume de uma coluna cromatográfica

A equação básica de balanço de massa do componente  $i$  no elemento de volume da Figura 10 é dada por:

$$(\text{Acumulo})_i = (\text{fluxo de } i)_{\text{entrada}} - (\text{fluxo de } i)_{\text{saída}} \quad (10)$$

O termo de acúmulo é dado pela soma de dois termos, o acúmulo na fase líquida e o acúmulo na fase sólida:

$$(\text{Acumulo})_i = (\text{Acúmulo na fase líquida})_i - (\text{Acúmulo na fase sólida})_i \quad (11)$$

Considerando que os volumes de líquido e de sólido no elemento de volume mostrado na Figura 10 são dados respectivamente por  $((A)_{secção} \cdot \varepsilon \cdot \Delta z)$  e  $((A)_{secção} \cdot (1-\varepsilon) \cdot \Delta z)$ , tem se:

$$(\text{Acumulo})_i = \frac{\partial [C_i \cdot ((A)_{secção} \cdot \varepsilon \cdot \Delta z)]}{\partial t} + \frac{\partial [C_i \cdot ((A)_{secção} \cdot (1-\varepsilon) \cdot \Delta z)]}{\partial t} \quad (12)$$

O componente  $i$  se movimenta através do elemento de volume mostrado da Figura 10 de duas formas: com o movimento convectivo do líquido e com a dispersão axial. Cada um destes termos será abordado separadamente na montagem do balanço.

O termo convectivo é dado pela concentração de  $i$  multiplicada pela vazão da fase líquida, sendo esta última dada pela velocidade intersticial do líquido ( $u$ ) multiplicada pela área intersticial, que por sua vez é dada por  $((A)_{secção} \cdot \varepsilon)$ :

$$\text{Entrada de } i \text{ por convecção} = (u)_z \cdot ((A)_{secção} \cdot \varepsilon) \cdot (C_i)_z \quad (13)$$

$$\text{Entrada de } i \text{ por convecção} = (u)_{z+\Delta z} \cdot ((A)_{secção} \cdot \varepsilon) \cdot (C_i)_{z+\Delta z} \quad (14)$$

O conceito de dispersão axial engloba dois fenômenos: A difusão molecular no sentido oposto ao sinal do gradiente de concentrações e a não-homogeneidade do fluxo, ou seja, a difusão turbilhonar. Ambos os fenômenos são representados no coeficiente de dispersão axial  $D_L$  e desta forma, tem-se:

$$\text{Entrada de } i \text{ por dispersão axial} = D_L \left( \frac{\partial C_i}{\partial z} \right)_z \cdot (A)_{secção} \cdot \varepsilon \quad (15)$$

$$\text{Saida de } i \text{ por dispersão axial} = D_L \left( \frac{\partial C_i}{\partial z} \right)_{z+\Delta z} \cdot (A)_{secção} \cdot \varepsilon \quad (16)$$

## 2.4.2 Análise dos Momentos

Os mecanismos que governam a velocidade de cada enantiômero em atravessar uma coluna e o espalhamento no leito são difusão, sorção, dispersão axial e vazão não ideal. Com uma cuidadosa escolha dos experimentos e o modelo teórico apropriado, constantes

de equilíbrio, dispersão axial e coeficientes de difusão de poro em colunas podem ser obtidos a partir de estudos de duas propriedades de eluição dos enantiômeros, chamadas de tempo de retenção e a variância. Coeficiente de difusão, dispersão axial e constante de equilíbrio podem ser convenientemente obtidas pelo estudo da resposta de um pulso de entrada em uma coluna, comumente chamada de análise de pulso. Análise de pulso, na forma da equação de altura equivalente para um prato teórico (HETP), tem sido usada para estudar uma variedade de sistemas cromatográficos (ARNOLD *et al.*, 1985), baseada na teoria dos momentos estatísticos de Kubin (KUBIN, 1965).

Os cálculos dos momentos dos picos por integração numérica dos dados experimentais é propensa a erros. Pequenas quantidades de impurezas, rejeitos ou mudanças na linha de base do detector podem causar grandes variações no segundo ou maiores momentos, embora esses erros possam ser diminuídos com a realização de ensaios com uma maior reprodutibilidade e precisão (ARNOLD *et al.*, 1985b).

Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta (lei de Henry). A inclinação desta reta pode ser determinada a partir do primeiro momento de um pulso do soluto, o qual é associado ao tempo de retenção do soluto. Parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos a partir do segundo momento (MIYABE, K.; SUZUKI, M., 1992). De acordo com (GUIOCHON *et al.*, 2004; ARNOLD *et al.*, 1985a), por definição dos momentos de uma distribuição, n-ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento  $z = L$  é calculado pela Equação (17). Esse n-ésimo momento absoluto ou normalizado é apresentado na Equação (18) e o n-ésimo momento central de acordo com a Equação (19).

$$M_n = \int c(t, z = L)t^n dt \quad (17)$$

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z = L)t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z = L)dt} \quad (18)$$

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z=L)(t - \mu_1)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z=L) dt} \quad (19)$$

Por definição, o momento zero ( $\mu_0$ ) de um perfil de concentração de um pico eluente é simplesmente a área do pico. O primeiro momento de um pico cromatográfico ( $\mu_1$ ) ou simplesmente ( $\mu$ ) é o centro da gravidade do perfil de concentração e está relacionado ao tempo de retenção do pico e conseqüentemente á força de ligação como a força de equilíbrio e a força de adsorção, escritos conforme Ruthven (1984) pela Equação (20). O primeiro momento irá coincidir com o tempo de retenção do pico somente quando este é simétrico (ARNOLD *et al.*, 1985a; ARNOLD *et al.*, 1985b).

O segundo momento ( $\mu_2$ ) é a variação do pico, escritos conforme (Ruthven,1984; ARNOLD *et al.*, 1985b) pela Equação (21), o qual está cromatograficamente relacionado ao espalhamento do pico, causado pela não linearidade das isotermas de adsorção, resistência à transferência de massa e desvios de equilíbrio (WANG; CHING, 2002). Quando o pico cromatográfico de eluição for Gaussiano,  $\bar{\mu}_2$  torna-se igual à variância  $\sigma^2$  (ARNOLD *et al.*, 1985b). Combinando a Equação (20) e (21) com a Equação (6), temos a Equação (22).

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{u_0} [\varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p] + \frac{t_0}{2} \quad (20)$$

$$\mu_2 = \sigma^2 = \frac{2L}{u_0} \left\{ \frac{D_L}{u_0^2} [\varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p]^2 + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p^2 \cdot \frac{R^2}{15} \left[ \left( \frac{1}{D_m} + \frac{5}{K_f R} \right) \right] \right\} + \frac{t_0^2}{12} \quad (21)$$

$$HETP = \frac{\sigma^2}{t_R^2} L = 2 \frac{D_L}{u} + 2u \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K_p}{K_m} \left[ 1 + \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) K_p \right]^{-2} \quad (22)$$

A constante de equilíbrio ( $K_p$ ) pode ser estimado pelo gráfico  $t_R$  vs.  $L/u_0$  para os enantiômeros de acordo com a Equação 22, considerado que a porosidade da partícula seja 0,45 de acordo com (RUTHVEN, 1984). O termo  $K_m$  é um termo chamado de coeficiente

global de transferência de massa para um modelo de força linear, relatado para o filme de fluido e coeficiente de transferência de massa da partícula. Sabe que a resistência a transferência de massa global ( $1/K_m$ ) é composto por 2 mecanismos separados de transferência de massa, resistência a transferência de massa interno e externo, apresentado pela Equação (25), onde  $d_p$  é o diâmetro da partícula,  $D_p$  é o coeficiente de difusão do poro e  $K_f$  é o coeficiente de transferência de massa externo. (MA, Z.; WANG, N. H. L., 1997). De acordo com (CREMASCO *et al.*, 2001), o  $D_p$  pode ser correlacionado com o coeficiente de difusão molecular efetivo ( $D_m$ ) por Mackie e Meares (1995), Correlação (26).

$$t_R = [\varepsilon_T + (1 - \varepsilon) \cdot (1 - \varepsilon_p) K_p] \cdot \frac{L}{u_0} \quad (23)$$

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p \quad (24)$$

$$\frac{1}{K_m} = \frac{R^2}{15 \cdot (1 - \varepsilon)} \cdot \left( \frac{1}{D_m} + \frac{5}{K_f R} \right) = \frac{d_p}{6K_f} + \frac{d_p^2}{60\varepsilon_p D_p} \quad (25)$$

$$D_p = \left( \frac{\varepsilon_p}{2 - \varepsilon_p} \right)^2 \cdot \frac{D_m}{\varepsilon_p} \quad (26)$$

Podem-se diferenciar esses dois mecanismos de resistências a transferência de massa por intermédio do número de Biot mássico ( $Bi_M$ ), o qual é definido pela Equação (27).  $Bi_M$  tendendo a zero, considera-se que o processo que rege a transferência de massa está situado externamente ao meio onde há o fenômeno difusivo e a resistência interna é desprezível em face a externa.  $Bi_M$  tendendo ao infinito, com valores maiores que 50, diz-se que a resistência externa ao fenômeno de transferência de massa é desprezível em face ao fenômeno difusivo que está situado externamente ao meio que há o fenômeno difusivo de acordo com Cremasco (2009).

$$Bi_M = \frac{d_p K_m}{D_m K_p} \quad (27)$$

O  $K_f$  pode ser obtido pela Correlação (28) de Wilson e Geankoplis (1996), a qual é válida para sistemas líquidos com a limitação de que  $0,0015 < Re < 55$ . Onde Sh, Sc e Re

são os números dimensionais de Sherwood, Schmidt e Reynolds.  $D_m$  é o coeficiente de difusão molecular efetivo, que pode ser estimado pela equação de Wilke-Chang, Equação (29) de acordo com (GUIOCHON *et al.*, 1994; ARNOLD *et al.*, 1985b ). O número de Reynolds ( $Re$ ), o qual é definido pela Equação (30).

$$Sh = \frac{d_p K_f}{D_m} = \frac{1,09}{\epsilon} (Sc)^{\frac{1}{3}} (Re)^{\frac{1}{3}} \quad (28)$$

$$D_m = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(\phi M)^{\frac{1}{2}} T}{\mu V_b^{0,6}} \quad (29)$$

$$Re = \frac{d_p \cdot \epsilon \cdot u}{\eta} \quad (30)$$

De acordo com a Equação (29),  $\phi$  denota o coeficiente de associação, o qual leva em conta a interação molecular do soluto-solvente devido a ligações de hidrogênio para os solventes utilizados, considera  $\phi$  igual a um para solventes orgânicos.  $M$  é a massa molecular,  $\mu$  é a viscosidade dinâmica da solução,  $\eta$  é a viscosidade cinemática da solução,  $T$  é a temperatura absoluta e  $V_b$  é o volume molar para o ponto de ebulição (CREMASCO, 2002).

De acordo com Arnold *et al.*, (1985); Guiochon, Shirazi e Katti (1994), considera-se que a dispersão axial resulta de dois mecanismos diferentes, difusão molecular na direção axial e difusão turbilhonar que é proporcional a velocidade do fluido. Como primeira aproximação, estes efeitos se somam de forma que o coeficiente de dispersão seja representado pela Equação (31). Onde,  $D_m$  é o coeficiente de difusão molecular,  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$  são constantes que possuem normalmente valores 0,7 e 0,5 respectivamente (RUTHVEN, 1984), mas de acordo com (ARNOLD *et al.*, 1985b), para moléculas muito grandes ou cromatografia líquida, esse termo é desconsiderado.

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (31)$$

### 2.4.2.1 Gráfico de Van Deemter

Uma outra abordagem para estudos de transferência de massa de uma coluna para um determinado soluto é pela equação de Van Deemter (ARNOLD *et al.*, 1985a; GUIOCHON *et al.*, 1994), conforme Equação (32).

$$HETP = A + \frac{B}{u_0} + Cu_0 \quad (32)$$

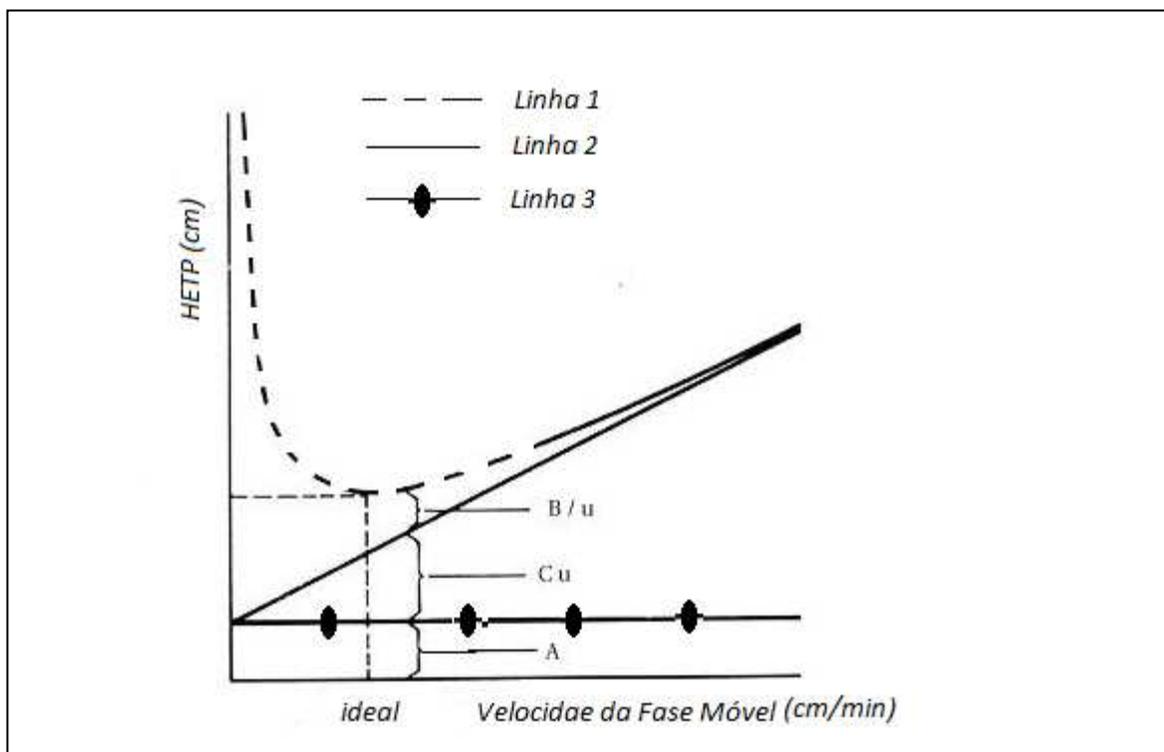
Os termos A, B e C da Equação (32) são coeficientes empíricos (GUIOCHON, 2002; COLLINS *et al.*, 2006). O primeiro termo A, Equação (33), refere-se ao alargamento dos picos devidos aos caminhos tortuosos seguidos pelas moléculas da amostra, que descreve o efeito da difusão turbilhonar. Para minimizar este termo é necessário usar colunas com diâmetros internos pequenos, bem recheados e partículas com tamanho pequeno e uniforme. O termo B, Equação (34), está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel, conhecida como difusão longitudinal. O aumento da densidade ou viscosidade da fase móvel provoca uma diminuição na difusão do soluto. O termo C, Equação (35), é uma função dos efeitos de transferência de massa do soluto entre as fases móveis e estacionárias (COLLINS *et al.*, 2006).

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (33)$$

$$B = 2\gamma_1 Dm \quad (34)$$

$$C = 2 \cdot \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K_p}{K_m} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K_p \right]^{-2} \quad (35)$$

A Figura 9 apresenta o gráfico da variação do HETP com a velocidade superficial da fase móvel de acordo com a Equação (32) de Van Deemter, a qual apresenta três linhas com trassados diferentes, sendo um traçado curvo (Linha 1), uma linear (Linha 2) e um constante (Linha 3). A distância do eixo da abcissa e Linha 3 do gráfico HETP vs.  $u_0$  representa o termo A. A distância entre a Linha 1 e a Linha 2 (parte linear do gráfico HETP vs.  $u_0$ ) representa o termo  $B/u_0$  e o termo  $C \cdot u_0$  é representado pela distância da Linha 3 e Linha.



**Figura 9:** Variação da altura equivalente a um prato teórico (HETP) com a velocidade superficial da fase móvel ( $u_0$ ) de acordo com a equação de Van Deemter.

### 2.4.3 Análise da Termodinâmica de Adsorção

De acordo com Rojkovicová *et al.*, (2004); Lindner *et al.*, (2004); István *et al.*, (2008) e Lämmerhofer, (2010) a separação direta de enantiômeros é baseada na formação de complexos diastereoisoméricos reversíveis, criados por interações intermoleculares dos enantiômeros com o seletor quiral. Esse processo pode ser caracterizado por parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ ) (LEHOTAY *et al.*, 2004; WENG *et al.*, 2008; LÄMMERHOFER, 2010). O processo de equilíbrio entre o seletor quiral e o analito pode ser explicado pelo balanço de energia dos seus estados complexados e livres, freqüentemente estudados com base em considerações termodinâmicas. A constante de equilíbrio ou fator de retenção ( $K$ ) do analito e o seletor quiral quantificam a força de ligação entre o seletor quiral e o enantiômero. Essa força de ligação pode ser relacionada com a variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), a qual é composta por contribuições de

entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e entropia ( $\Delta S^\circ$ ) em um processo em equilíbrio (WENG *et al.*, 2008; LÄMMERHOFER, 2010).

Essas contribuições de  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  podem ser estimadas a partir de uma útil aproximação através do gráfico de Van't Hoff e obtendo os aspectos dos mecanismos de retenção e discriminação dos enantiômeros em fases estacionárias quirais (LINDNER *et al.*, 2004; WENG *et al.*, 2008; LÄMMERHOFER, 2010). De acordo com o método de Van't Hoff, se a fase estacionária não altera em conformação, a variação de  $\ln k$  vs.  $1/T$  deve ser uma correlação linear com inclinação igual a  $\Delta H^\circ/R$  e intersecção igual a  $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$ , permitindo o cálculo dos parâmetros termodinâmicos na transferência global do soluto da fase móvel para a fase estacionária (WENG *et al.*, 2008; LÄMMERHOFER, 2010). Esse entendimento permite contribuir para modificações das condições operacionais na separação dos enantiômeros e da própria fase estacionária (BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004).

O benefício de ligações fortes dirigidas por ligações intermoleculares mensuradas por variações de entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) do processo de complexação entre o seletor quiral e o analito é usualmente valido por um aumento da ordem ou diminuição da desordem dos complexos formados (LÄMMERHOFER, 2010).

As variações na energia de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) na transferência do soluto entre as fases móveis e estacionárias são expressas pela Equação (36). A dependência da retenção cromatográfica do soluto em relação à temperatura é usualmente expressa em termos do fator de retenção  $k$  através da Equação (37), onde  $\Delta G^\circ$  é a energia molar de Gibbs do soluto,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  são a entalpia e entropia de transferência do soluto a partir da fase móvel para a fase estacionária, respectivamente,  $T$  é a temperatura absoluta,  $R$  a constante dos gases e  $\Phi$  a proporção de fase (CHEONG *et al.*, 2004; WENG *et al.*, 2008; LÄMMERHOFER, 2010).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln \left( \frac{k}{\phi} \right) \quad (36)$$

$$\ln k = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} + \ln \phi = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \Delta S^* \quad (37)$$

Diferentes interações entre os dois enantiômeros e a fase estacionária podem ser expressas como a diferença em energia molar para os dois enantiômeros, calculadas a partir do fator de separação ( $\alpha$ ) através da Equação (38) de acordo com Küsters e Spöndlin (1996); Weng *et al.*, (2008). O gasto de energia para o processo de dessolvatação é idêntico para os enantiômeros de um composto quiral, enquanto que para o processo de ressolvatação, depois da formação de complexos de diastereoisômeros podem ser energeticamente distintos, provando que um componente é mais fraco num processo global de reconhecimento quiral (LÄMMERHOFER, 2010).

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta\Delta G^\circ}{RT} = -\frac{\Delta\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta\Delta S^\circ}{R} \quad (38)$$

Utilizando os dados cromatográficos de separação dos enantiômeros e fazendo o gráfico de Van't Hoff, se tivermos uma correlação linear na faixa de temperatura pesquisada, o correlativo parâmetro termodinâmico é independente da temperatura e podemos obtê-lo a partir da inclinação e a interseção da linha reta do gráfico. A característica linear também sugere que a conformação da fase estacionária quiral não muda dentro dessa faixa de temperatura. Os parâmetros termodinâmicos derivados pelo gráfico de Van't Hoff são aparentemente, não intrínsecos, onde as interações enantioseletivas para os sites de adsorção quiral e interações não enantioseletivas para sites de adsorção aquiral não podem ser separadas utilizando esse método (WENG *et al.*, 2008).

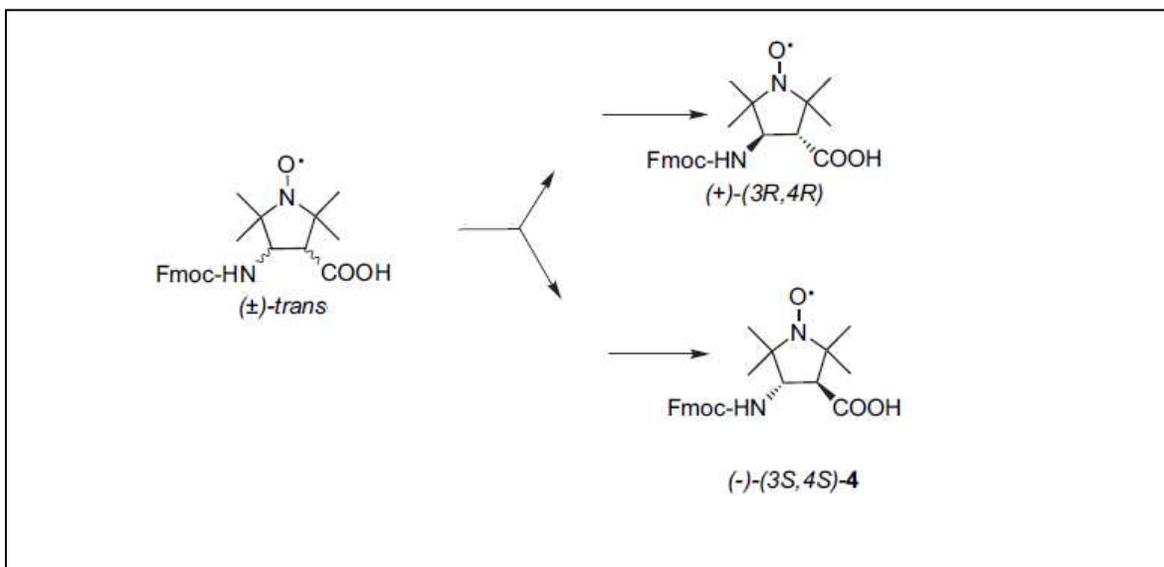
Normalmente a contribuição da entalpia é mais efetiva, uma vez que os dois complexos diastereoisoméricos diferem no número de interações (duas ou três). Algumas vezes, porém, o que predomina é a grande diferença na entropia de formação dos dois complexos, situação que ocorre, por exemplo, quando há uma 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. Entretanto, há uma temperatura específica onde a entalpia e a entropia se anula. Nesta temperatura há formação dos complexos diastereoisoméricos e, portanto, reconhecimento quiral, mas não ocorre discriminação dos enantiômeros. Para que haja discriminação quiral são necessárias temperaturas maiores ou menores do que esta temperatura específica (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Weng *et al.*, (2008) cita que as separações enantioméricas obtidas com os valores de  $\Delta\Delta H^\circ$  e  $\Delta\Delta S^\circ$  negativos indica que a entalpia coordena a enantioseparação, enquanto valores positivos indica que a entropia coordena a separação. Uma análise de  $\Delta H^\circ$  pode ser feita considerando que seu valor significa o calor de adsorção, mensurada pela variação de entalpia no processo global de adsorção. A retenção dos enantiômeros em CLAE na maioria das vezes é dominada por processos de adsorção que são dirigidas por interações covalentes (geralmente tipos eletrostáticos). Na maioria dos casos, ocorre também uma oposição a efeitos entrópicos (desestabilidade), conhecida como efeito de compensação. Isto pode ser prontamente explicado pelo aumento da ordem ou perda do grau de liberdade e assim perda da entropia do estado complexado (adsorvido). Uma ampla variedade de diferentes em sistemas fases estacionárias quirais-analitos-fase móvel tem mostrado que na maioria dos casos a calor de adsorção são negativos (reações exotérmicas), uma situação que usualmente torna evidente em um decréscimo na retenção com o aumento da temperatura. Além disso, retenção e reconhecimento quiral em fases estacionárias quirais é usualmente controlada entalpicamente, onde  $|\Delta H^\circ| > |\Delta S^\circ|$  e  $|\Delta\Delta H^\circ| > |\Delta\Delta S^\circ|$ . Contudo, um comportamento oposto chamado adsorção controlada entropicamente, onde a enantioseletividade é melhorada com o aumento da temperatura, tem sido observada em vários casos (LÄMMERHOFER, 2010).

Estudos termodinâmicos podem render valiosas informações a respeito da contribuição da entalpia e entropia na retenção e separação quiral. Essas quantidades termodinâmicas são entidades macroscópicas, as quais não fornecem informações microscópicas detalhadas a respeito de contribuições de grupos estruturais individuais ou tipos de interação envolvendo em eventos de ligação do seletor quiral e seletor responsável pelo reconhecimento quiral. Para este propósito, métodos espectroscópicos como RMN (ressonância magnética nuclear), difração de raio X por cristalografia bem como modelagens moleculares tem sido proposto. Estas abordagens termodinâmicas extras são outros meios de estudar como as fases estacionárias estão retendo solutos quirais e obter diferenças microscópicas entre os enantiômeros (LÄMMERHOFER, 2010).

## 2.5 Fmoc-POAC

O Fmoc-POAC, (9-fluorenilmetiloxicarbonil)-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil-4-amino-4-ácido carboxílico, é um marcador de spin do tipo  $\beta$ -aminoácido formado com a junção da estrutura 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-oxil-3-amino-4-carboxílico (POAC), um derivado de radicais livres de nitróxido TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi), patente [EPM-5, Patente PI 9903137-0(1999)], com o protetor Fmoc (TOMINAGA *et al.*, 2001), apresentado na Figura 12. Estudos iniciais de difração de raio X indicaram apenas a presença de configuração *trans* para este marcador molecular, apresentado na Figura 10. Restando, portanto, também a desafiadora separação do enantiômero 3S4S e 3R4R, (TOMINAGA *et al.*, 2001; WRIGHT *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2008).



**Figura 10:** Estruturas estereoenantioméricas do composto Fmoc-POAC

O Fmoc-POAC pode ser inserido em peptídeos como angiotensina II (AII, DRVIIHPF), abrindo portas para muitos estudos e aplicações químicas e biológicas desse  $\beta$ -aminoácido, incluindo investigações estruturais (TOMINAGA *et al.*, 2001).

O Fmoc-POAC e POAC são capazes de reagirem e ser acoplados com grupos amino e carboxílicos presentes em macromoléculas como peptídeos. Apresentam propriedades paramagnéticas e facilmente detectadas por ressonância paramagnética de elétrons ou

outros métodos de espectroscopia como fluorescência e NMR. Esses compostos apresentaram características que superaram a utilização de outro marcador de spin até então utilizado, (4-amino-1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-3-ácido carboxílico), chamado de TOAC (NAKAIE *et al.*, 2001).

### 2.5.1 Aminoácidos

Um grande número de aminoácidos são encontrados na natureza na sua forma livre ou como constituintes de outras biomoléculas como, peptídeos, proteínas, coenzimas e hormônios. Aminoácidos não protéicos são aqueles que não são encontrados em proteínas e originados durante a biosíntese protéica, os quais são usados como blocos construtores para a síntese de análogos de peptídeos biologicamente ativos, antibióticos, hormônios e inibidores enzimáticos (BRUSHAN *et al.*, 2009).

A síntese de  $\beta$ -aminoácidos, possuidores de radical livre de nitróxido, é utilizada para obter ou preparar blocos construtores de análogos de peptídeos biologicamente ativos modificados, também chamados de marcadores de spin, os quais são utilizados para a determinação de estruturas finas de receptores (CORVAJA *et al.*, 2000; STEER *et al.*, 2002; LANGER *et al.*, 2002; PÉTER *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2008). A síntese desse tipo de composto tem sido assunto de muitos esforços na área de síntese orgânica, particularmente depois que foi demonstrado que seus oligômeros podem dobrar em conformações helicoidais estáveis e serem utilizados em estudos de caracterização de peptídeos através das técnicas de RMN, RPE e cristalografia de raio X (PÉTER *et al.*, 2003; GADEMANN *et al.*, 2003).

Existem poucos relatos na literatura de aminoácidos marcadores de spin. Até no ano de 2001, somente o marcador de spin TOAC (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil-4-amino-4-ácido carboxílico) tinha sido usado com sucesso em marcações de seqüência de peptídeos para estudos de conformação biológica. Devido a limitações do aminoácido TOAC, como problemas de marcação interna dos peptídeos e baixa nucleofilicidade, foi sugerido o marcador de spin POAC (2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-oxil-3-amino-4-ácido carboxílico)

e a utilização de um protetor da função amina Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonila) acoplado nesse marcador (TOMINAGA *et al.*, 2001; WHIGHT *et al.*, 2003).

Grande parte dos sistemas biológicos de interesse não apresenta centros paramagnéticos, tornando-se necessário a utilização de sondas paramagnéticas, usualmente conhecidas como marcadores de spin. Estas sondas são amplamente empregadas devido a grande à sua grande sensibilidade do espectro de RPE à sua mobilidade, bem como extraordinária estabilidade química do fragmento paramagnético (radical nitróxido), mesmo submetido em condições extremas de pH e temperatura (SALMON *et al.*, 2007).

De acordo com as características do Fmoc-POAC que permite sua inserção em qualquer posição na seqüência de peptídeos (TOMINAGA *et al.*, 2001; SCHREIER *et al.*, 2004), sua aplicação em estudos biológicos com o peptídeo angiotensina II (AII, DRVYIHHPPF), um hormônio vasoativo envolvido em vários processos fisiológicos que tem sido ativamente investigado ao longo das últimas quatro décadas para determinar a relação entre sua estrutura e sua função biológica (NAKAIE *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2009). Outro peptídeo vasoativo que pode se aplicar o Fmoc-POAC para esses estudos conformacionais e sua função biológica é a bradicinina (BK, RPPGFSPFR) (REGOLI *et al.*, 1980; NAKAIE *et al.*, 2002). Ambos os peptídeos AII e BK desempenham papel relevante na geração de anomalias cardiovasculares e a marcação de suas estruturas com o composto Fmoc-POAC pode ser de grande valor para obter dados conformacionais por ressonância paramagnética de elétrons (RPE), fluorescência e outras espectroscopias das suas estruturas (WILSON, 2000).

A estrutura dos peptídeos e suas flexibilidades são de interesse para a bioquímica para entendimento preciso dos fatores e fenômenos que coordena um peptídeo a adotar certa estrutura e interagir com outros peptídeos, proteínas e membrana das células. As ferramentas utilizadas para estudar essas características podem ser ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raio-X e recentemente ressonância paramagnética de elétrons (RPE), também conhecida de ressonância de spin de elétrons. Dessas técnicas de espectroscopia viáveis para a investigação da conformação, dinâmica de peptídeos e estudos de sistemas biológicos, a ressonância paramagnética de elétrons (RPE) tem sido usada por uma extensão considerada (SCHREIER *et al.*, 2004; SALMON *et al.*, 2007). A

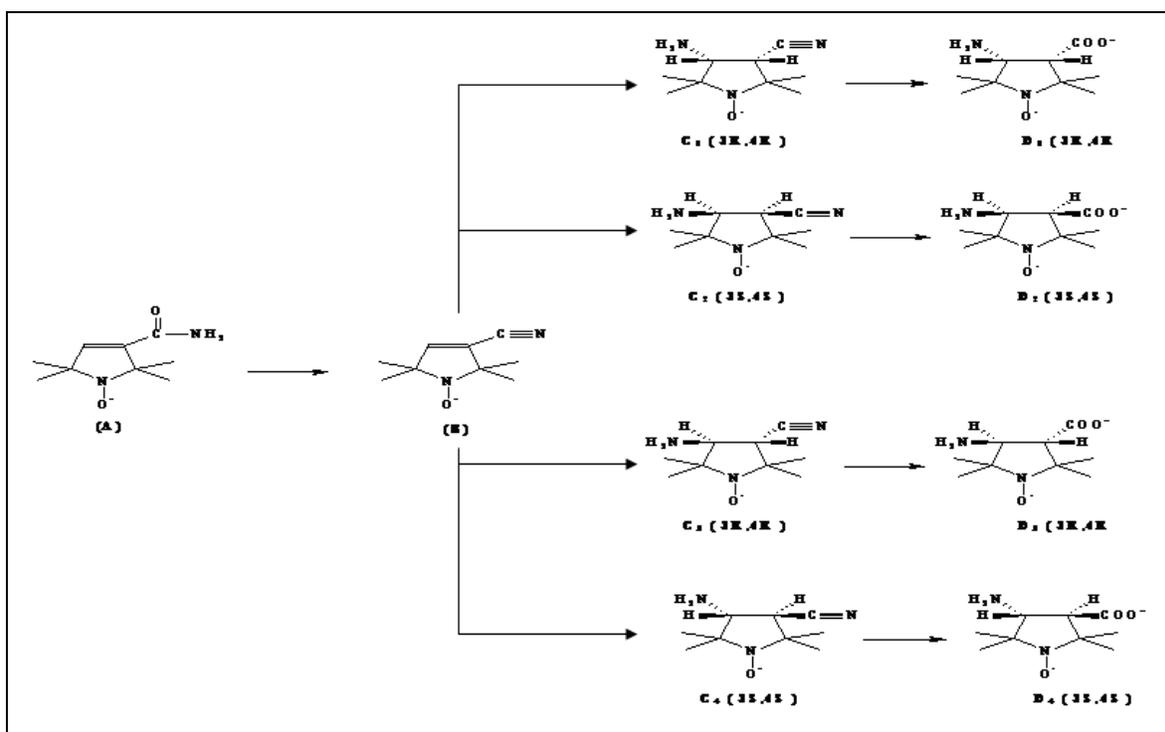
RPE tem apresentado mais vantagens em relações às outras técnicas por ser mais sensível, além de poder ser feita em solução ou em sólidos, obtendo um espectro em tempo real para uma resolução de 1 milissegundo (WILSON, 2000; UCCELLO-BARRETTA *et al.*, 2010).

Essas técnicas de espectroscopia são ferramentas que funcionam como quantificadores da energia requerida para virar um spin de uma partícula na presença de um campo eletromagnético, exceto que a partícula a ser estudada não tenha já este spin virado, no caso de elétrons desemparelhados. Embora qualquer entidade química com um elétron desemparelhado (tal como um radical) pode dar origem a um espectro de RPE, uma fonte de elétrons desemparelhados usada em freqüentes investigações de RPE, chamada de marcadores de spin, são os nitróxidos ou metais. Esses marcadores de spin são fixados em moléculas a serem estudadas (WILSON, 2000). Com a fixação desses marcadores de spin em peptídeos e a utilização das técnicas de RMN, cristalografia de raio-X ou ressonância paramagnética de elétrons (RPE), pode-se quantificar distancias e orientações entre cadeias de aminoácidos (WILSON, 2000; KOLEV *et al.*, 2010). Esses fatores explicam porque os radicais nitróxido, desde o seu desenvolvimento há mais de 30 anos tem sido uma importante ferramenta em muitos estudos de biofísica, especialmente de membranas e peptídeos (SALMON *et al.*, 2007). Embora a estrutura de peptídeos em três dimensões tem sido determinadas ao longo das décadas passadas, cristalização de peptídeos é ainda um maior obstáculo para trabalhos de difração de raio X devido a presença de centros quirais (KOLEV *et al.*, 2010).

### 2.5.2 Marcadores de spin

O composto POAC (, descrito inicialmente por Rassat & Rey (1967) na sua forma racêmica, é um marcador de spin do tipo  $\beta$ -aminoácido, contendo uma estrutura pirrolidínica, um radical livre nitróxido, um grupamento amínico no C3 e carboxílico em C4. Compostos com radicais livres estáveis de nitróxido como POAC são de contínuo interesse para usá-los como marcadores moleculares em estudos de conformação e mobilidade estrutural de sistemas biológicos, além de armadilhas de elétrons de radicais e como agente oxidantes (COLUMBUS *et al.*, 2002; NAKAIE *et al.*, 2002; WRIGHT *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2008). De acordo com a Figura 11, nota-se que este composto

apresenta dois carbonos assimétricos (C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>), dificultando, portanto, a viabilidade do seu emprego, já que sempre haverá uma mistura racêmica com 4 componentes. Felizmente, estudos de difração de raio X indicaram apenas a configuração *trans* para este marcador, restando portanto a desafiadora separação dos enantiômeros 3S4S e 3R4R (TOMINAGA *et al.*, 2001).



**Figura 11:** Estruturas estereoenantioméricas do composto POAC

Para viabilizar a sua introdução em cadeias peptídica, foi necessária a proteção de seu grupamento amínico com o protetor 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc), gerando, portanto, o produto inédito, marcador de spin e derivado de aminoácido denominado Fmoc-POAC (TOMINAGA *et al.*, 2001, patente EPM-5, PI 9903137-0, 1999), permitindo sua inserção em qualquer posição na seqüência de peptídeos (TOMINAGA *et al.*, 2001; SCHREIER *et al.*, 2004).

O Fmoc-POAC possui diferentes grupos funcionais que podem ser dissociados como hidroxila, amina e carboxilas. Compostos com essas características apresentam variação nas suas estruturas de acordo com o pH onde estão diluídos, levando a característica de que o

pH do tampão governa a carga dos analitos a serem separados. A eletromigração dos seletores quirais oposta a direção do analito é entendida como benéfica para a enantioseparação desde que aumente a migração dos enantiômeros livres em direção ao seletor quiral para a formação dos complexos enantioméricos (PROKHOROVA *et al.*, 2010).

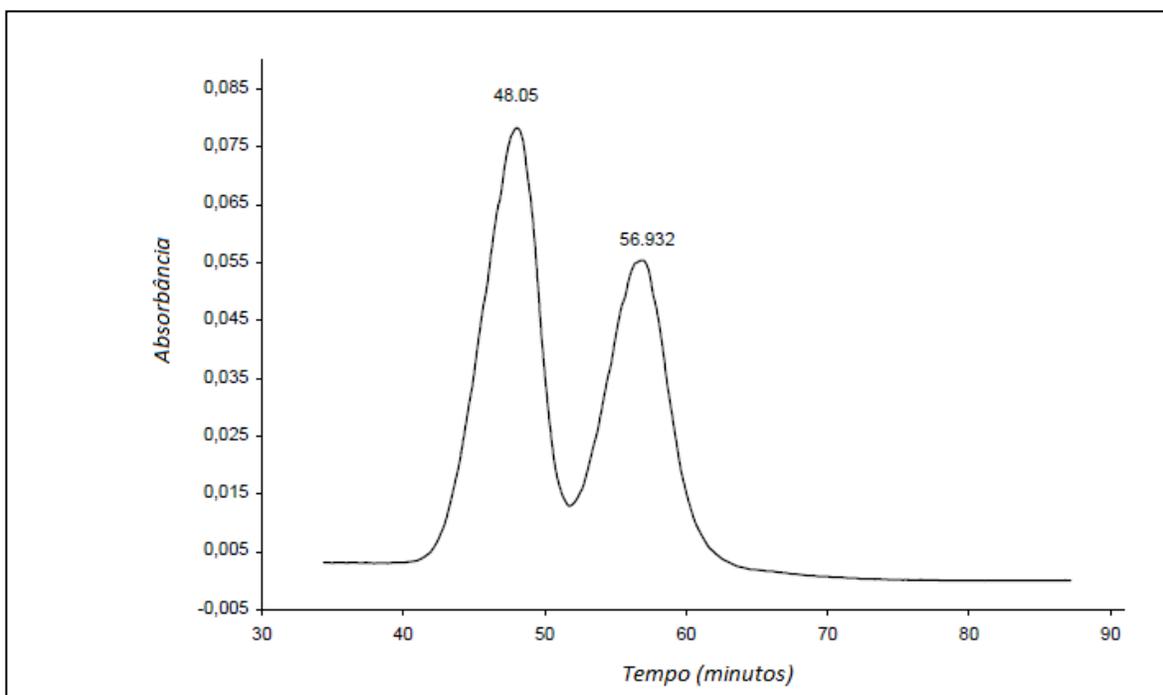
O primeiro trabalho existente na literatura a respeito da marcação de peptídeos com enantiômeros enriquecidos de  $\beta$ -aminoácidos foi publicado por Wright *et al.*, (2010). Esses autores tiveram como resultado a excelente marcação de  $\beta$ -hexapeptídeos protegidos com POAC além de afirmarem que esse composto é um marcador de spin com ótimos resultados para estudos de conformação helicoidais em aminoácidos marcados duplamente. Todas as marcações nos peptídeos utilizando a forma enriquecida do POAC foram feitas com o enantiômero (3R,4R).

### 2.5.3 Separação Enantiomérica do Fmoc-POAC

A separação dos isômeros enantioméricos de aminoácidos ou moléculas contendo centros quirais tem atraído intenso interesse dentro das indústrias farmacêuticas nas últimas décadas e a longo tempo dentro dos estudos bioquímicos (ILISZ *et al.*, 2008). Compostos quirais como Fmoc-POAC podem apresentar diferenças estereoseletivas significativas quanto à potência, toxicidade, absorção e metabolismo (REKOSKE *et al.*, 2001; ORLANDO *et al.*, 2007; PÉREZ-FERNANDEZ *et al.*, 2010; LÄMMERHOFER, 2010 ). A possibilidade de se isolar as formas enantioméricas do Fmoc-POAC é essencial para a utilização desse composto (PÉREZ-FERNANDEZ *et al.*, 2010) como marcador de spin na realização dos estudos de estrutura peptídica (WILSON, 2000), pois a investigação da farmacocinética e atividades fisiológicas, toxicológicas e metabólicas de ambos os enantiômeros é necessária antes do seu uso em atividades bioquímicas-clínica (YASHIMA, 2001).

Wright *et al.*, (2003) obteve pela primeira vez ambos enantiômeros do Fmoc-POAC em um estado enriquecido, representando um foco para mais investigações como um método geral para a separação desses  $\beta$ -aminoácidos. Através de uma separação

cromatográfica quiral pelo método indireto, os enantiômeros foram separados pela formação de ésteres de binaftol, mas a configuração completa dos enantiômeros do Fmoc-POAC não foi obtida porque não consegui cristalizar seus enantiômeros enriquecidos. A caracterização foi baseada na configuração absoluta dos enantiômeros ésteres de binaftol, os quais foram cristalizados, caracterizados e extrapolados sua configuração para os enantiômeros do Fmoc-POAC depois da retirada do binaftol. Estudos posteriores sugeriram a viabilidade de separação em coluna quiral do Fmoc-POAC, mas apenas em condições de CLAE analítica em coluna de fase reversa. Petér *et al.*, (2003) apresentou a separação enantiomérica do Fmoc-POAC em uma coluna de fase reversa de celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) da Chiralcel<sup>®</sup> (OD-RH), em diferentes fases móveis. Esses autores obtiveram como melhor resultado a resolução de 1,11 na fase móvel composta de solução aquosa de 0,1 M de KPF<sub>6</sub> e acetonitrila na proporção de 80:20 (v:v), temperatura de 30°C, vazão de 0,5 mL/minuto e detecção de 265 nm, apresentado na Figura 12. Esses autores afirmaram que o fator de retenção diminui com o aumento do conteúdo orgânico modificado. A aplicação da solução aquosa de KPF<sub>6</sub> na fase móvel melhorou a separação dos enantiômeros. Com o aumento da concentração salina, o fator de retenção diminui e resulta geralmente em uma melhora nas formas do pico e uma melhora na sua resolução. A diminuição da temperatura da coluna ou da vazão resultou em pequenos efeitos na resolução no componente Fmoc-POAC.



**Figura 12:** Cromatograma de separação dos enantiômeros Fmoc-POAC em coluna de fase reversa de celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) da Chiralcel® (OD-RH), com partículas de 5  $\mu\text{m}$ , tamanho de 150mm x 4,0mm; temperatura de 30°C, vazão de 0,5 mL/minutos, detecção de 265 nm e fase móvel composta por solução salina de 0,1 M de  $\text{KPF}_6$  e Acetonitrila na proporção de 80:20 (v:v).

Peter *et al.*,(2003) concluiu que uma melhora significativa foi alcançada na separação dos componente quirais do composto POAC com a utilização do Fmoc protegendo o esse  $\beta$ -aminoácidos, afirmando a importância da interação do grupo fluorenilmetiloxicarbonil como ligante selectante e o grupo tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) como seletor no mecanismo de reconhecimento quiral. Com a utilização do Fmoc protegendo o POAC, ocorreu um aumento da interação entre o seletor e selectante, quase resultando em separações em base de linha. Esses autores também realizaram ensaios com a coluna quiral de Celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) da Chiralcel® (OD-H) de fase normal, a qual utiliza o mesmo seletor da coluna Chiralcel OD-RH, mas sua aplicação é de fase normal. Foram obtidos nos ensaios cromatográficos picos não resolvidos dos enantiômeros com a fase móvel composta por hexano e isopropanol em diferentes proporções.

Wright *et al.*, (2008) obteve a separação quiral do *trans*-Fmoc-POAC por outros métodos indiretos de separação, além daqueles já publicados Wright *et al.*, (2003), mas seguindo a estratégia da formação de ésteres de binaftol. Foi feita a primeira completa caracterização do Fmoc-POAC através do dicroísmo circular e difração de raio X. Esses autores afirmaram que o enantiômero Fmoc-POAC-Binaftol (-) (3R, 4R) teve uma solubilidade sensivelmente pobre em solventes apolares em relação ao enantiômero Fmoc-POAC-Binaftol (+) (3S, 4S).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma avaliação experimental da enantioseparação do marcador de spin Fmoc-POAC (9-fluorenilmetiloxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-oxil-3-amino-4-ácido carboxílico) em coluna quiral de escala analítica e semipreparativa, em fase estacionária normal e reversa por eluição isocrática.

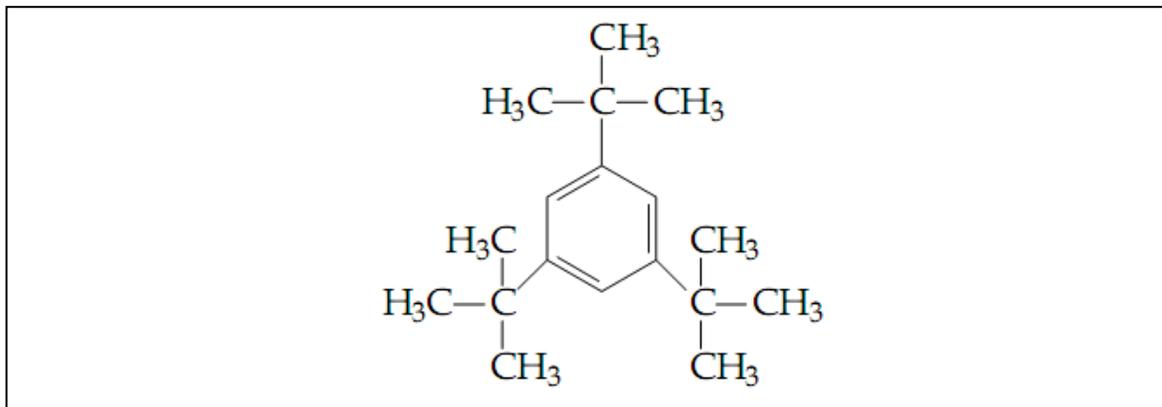
#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Fmoc-POAC

O marcador de peptídeos Fmoc-POAC foi sintetizado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e encaminhado para o laboratório de Bioseparações da Faculdade de Engenharia Química - FEQ - UNICAMP.

##### 3.1.2 Composto Inerte

O composto 1, 3, 5-terc-butil-benzeno (Sigma-Aldrich), conhecido como TTBB, foi o composto inerte utilizado, utilizado para determinar a porosidade total das colunas de FEQs, devido ao seu poder de penetrar por todos os interstícios da coluna e das partículas, sem haver resistência à transferência de massa ou interação com a fase estacionária (SANTOS *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2002). A estrutura química do referido composto é mostrada na Figura 13.



**Figura 13:** Estrutura química do 1, 3, 5-terc-butil-benzeno (TTBB)

### 3.1.3 Fase Estacionária

As colunas cromatográficas e fases estacionárias utilizadas na pesquisa foram:

- i) Coluna analítica da Chiralcel<sup>®</sup> de fase reversa, com partículas de 5 µm, tamanho de 150x4,6 mm, OD-RH, contendo a fase estacionária tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.
- ii) Coluna analítica da Phenomenex<sup>®</sup> de fase normal, com partículas de 5 µm, tamanho de 250x4,6 mm, Lux Cellulose-2, contendo a fase estacionária tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose.
- iii) Coluna semipreparativa da Chiralcel<sup>®</sup> de fase normal, com partículas de 20 µm, tamanho de 150x10 mm, OD, contendo a fase estacionária tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.
- iv) Coluna semipreparativa da Chiralcel<sup>®</sup> de fase reversa, com partículas de 5 µm, tamanho de 250x21 mm, OD-RH, contendo a fase estacionária tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.

### 3.1.4 Solventes e fase móvel

Os reagentes usados nos ensaios foram: Acetonitrila (MeCN), J. T. Baker (Xalostoc, Estados Unidos); 1,3,5-Tri-ter-butyl-benzene (TTBB), Aldrich (Steinheim, Alemanha); n-hexano, J. T. Baker (Xalostoc, Estados Unidos); isopropanol, J. T. Baker (Xalostoc, Estados Unidos); Trietilamina, Sigma-Aldrich, (St. Louis-MO, Estados Unidos); Ácido acético, Sigma-Aldrich, (St. Louis-MO, Estados Unidos). Após preparadas às fases móveis, estas foram filtradas em membrana de 0,45 Millipore e acondicionadas em frascos lacrados. Soluções aquosas usadas em colunas de fase estacionária reversa foram preparadas com água Milli-Q, filtrada em membrana 0,45 µm, tipo FHLC04700, Millipore (São Paulo, Brasil). Os eluentes foram degaseificados em banho de ultra-som por um tempo de 15 minutos.

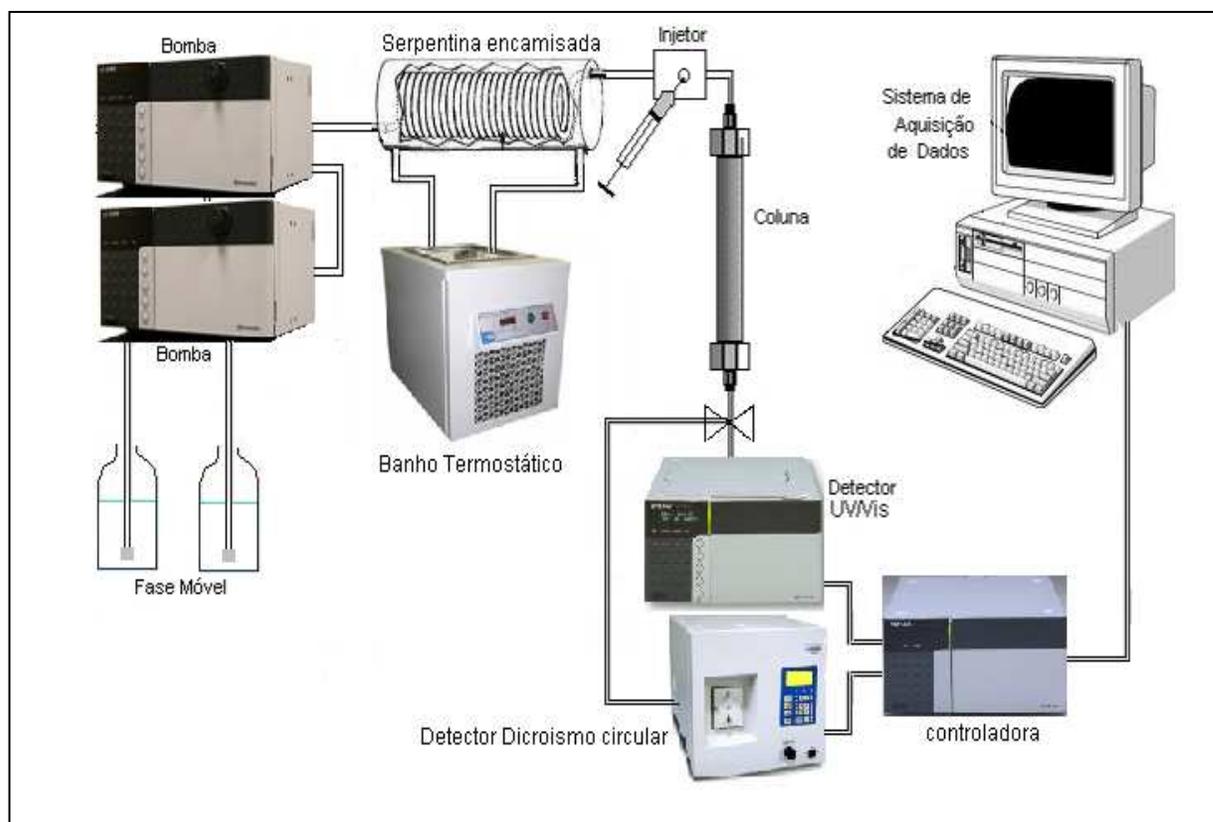
O tampão de acetato de trietilamônio (TEAA, 0,1%) foi preparado por titulação de 0,1% (v/v) de solução aquosa de 0,1% de trietilamina (TEA) e titulada com ácido acético até o pH no valor de 3,5.

### 3.1.5 Aparelhagem Experimental

A obtenção de parâmetros cromatográficos através de experimentos de separação enantiomérica foram realizados nos seguintes equipamentos:

- i) Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), composto por duas bombas ( modelo LC-20 AT e LC-10AD, Shimadzu), dois detectores ( modelo SPD-20A da Shimadzu e CD-2095 Plus da Jasco) e um sistema de aquisição de dados computadorizado (software LCsolution) para ensaios analíticos.
- ii) Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modelo 2695, Waters), detector ( modelo 2489, Waters) e um sistema de aquisição de dados computadorizado (software Empower-Pro) para ensaios analíticos e semipreparativos.
- iii) Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modelo DELTA 600, Waters), detector ( modelo 2487, Waters), controladora (modelo DELTA 600, Waters) e um registrador de aquisição de dados (modelo Servogor 124, Kipp & Zonem) para ensaios semipreparativos.

Para a confirmação da separação dos enantiômeros do Fmoc-POAC foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em série com um espectrofotômetro de massa (EM). O equipamento CLAE foi composto por módulo de separação (modelo e2695, Waters), detector ( modelo 2489, Waters) e um sistema de aquisição de dados computadorizado (software Chromatogram). O equipamento EM (modelo 3100, Waters). Para a realização do espectro de absorvância da amostra de Fmoc-POAC na fase móvel foi utilizado um espectrofotômetro (GENESYS), usando o software visionlite-scan. A Figura 14 ilustra um dos sistemas cromatográfico utilizado no presente trabalho.



**Figura 14:** Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência

## 3.2 Metodologias

### 3.2.1 Análise de resposta do sistema de detecção

Foi feita uma leitura da absorvância da amostra em vários comprimentos de onda, chamada de leitura de varredura, para obter qual o maior comprimento de onda de absorvância do composto Fmoc-POAC.

### 3.2.2 Definição da fase móvel

Inicialmente realizou-se uma averiguação sobre as fases móveis recomendadas para serem utilizadas nas fases estacionárias em questão. As recomendações foram obtidas no manual fornecido pelo próprio fabricante das colunas utilizadas.

Nas colunas analíticas e semipreparativas de fase estacionária reversa OD-RH, utilizou como fase móvel o solvente acetonitrila e a solução aquosa de 0,1% de TEAA, com o pH ajustado em 3,5.

Nas colunas analíticas e semipreparativas de fase estacionária normal, conhecidas como Lux Cellulose-2 e OD, utilizaram-se como fase móvel os solventes hexano e isopropanol.

Prepararam-se soluções padrões de Fmoc-POAC numa concentração de 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL, solubilizadas nas respectivas fases móveis: hexano/isopropanol e acetonitrila/TEAA com pH 3,5. Foram realizadas injeções de 20 µL das soluções de Fmoc-POAC, verificando-se as resoluções dos picos cromatográficos e tempos de retenção para diferentes proporções de fases móveis. Os cromatogramas foram visualizados na região do ultravioleta, com comprimento de onda de 265 nm nas colunas de fase normal e 220 nm nas colunas de fase reversa.

### 3.2.3 Parâmetros Cromatográficos, transferência de massa e termodinâmicos

Com a definição dos solventes a serem utilizados nas colunas em questão, foi avaliado as possíveis fases móveis capazes de realizar a separação enantiomérica do Fmoc-POAC, variando a proporção de solvente.

Os parâmetros cromatográficos foram avaliados de acordo com Cass & Degani, (2001) e Collins; Braga; Bonato, (2006). Os parâmetros de transferência de massa foram calculados de acordo com Ruthven, (1984), Arnold *et al.*, (1985a), Arnold *et al.*, (1985b), Guiochon, (1994) e Cremasco *et al.*, (2001). Os parâmetros termodinâmicos foram calculados de acordo com Cheong *et al.*, (2004), Weng *et al.*, (2008) e Lämmerhofer, (2010).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta sessão serão apresentados os resultados dessa pesquisa a partir dos experimentos realizados no Laboratório de Bioseparações da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, além de um estudo sobre os fenômenos que interferem no processo de eluição dos enantiômeros no leito fixo empacotado.

### 4.1 Coluna de Fase Normal

Foram estimados os parâmetros cromatográficos de separação enantiomérica, efeitos de transferência de massa e termodinâmicos do marcador molecular Fmoc-POAC em coluna analítica quiral Lux Cellulose-2 (Phenomenex<sup>®</sup>) de fase estacionária normal composta de tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose. Uma aplicação dessa separação cromatográfica analítica foi feita em escala semipreparativa com a coluna quiral OD (Chiralcel<sup>®</sup>) de fase estacionária normal composta de tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.

#### 4.1.1 Análise de Separação Cromatográfica do Fmoc-POAC

Os eluentes utilizados nessa coluna foram hexano e isopropanol em diferentes proporções (v/v) através da eluição isocrática, procurando uma maior resolução dos picos do Fmoc-POAC, vazão de 1,0 mL/min e injeção de 20 $\mu$ L. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 265 nm de acordo com o espectro de varredura feito para obter o comprimento de onda que ocorre a maior absorbância do componente Fmoc-POAC na fase móvel utilizada. Os resultados médios obtidos em análises em duplicata para a separação cromatográfica nessas condições estão apresentados na Tabela 4 e nos cromatogramas da Figura 15 e 16.

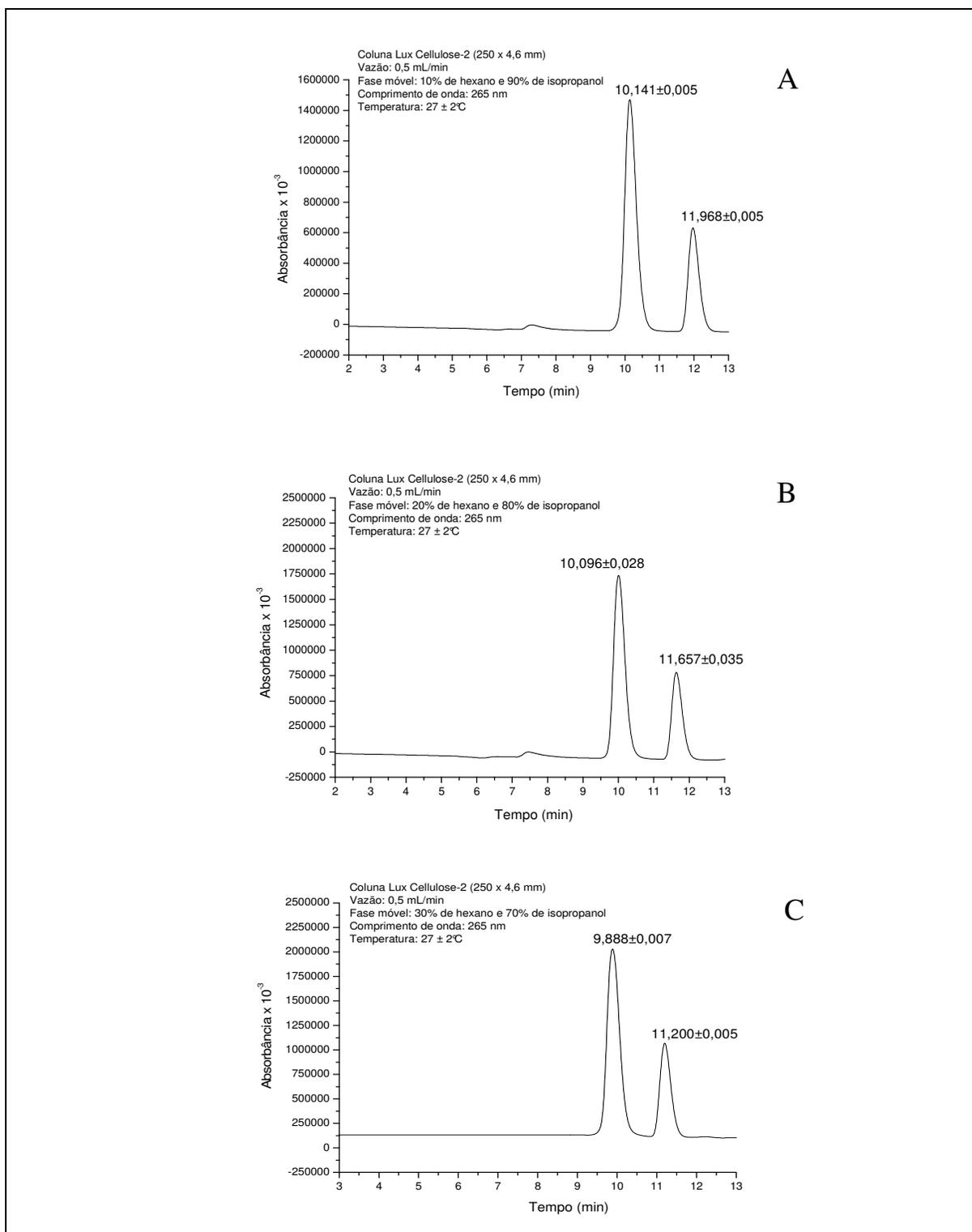
**Tabela 4:** Tempo de retenção ( $t_R$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), fator de retenção ( $K$ ) e resolução ( $R_S$ ) para a separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC em diferentes fases móveis pela coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), índices de 1 e 2 para o primeiro e segundo enantiômero, respectivamente.

Hexano:Isopropanol (v:v)	$t_{R1}$	$t_{R2}$	$\alpha$	$K_1$	$K_2$	$R_S$
10:90	10,141±0,005	11,968±0,005	1,476±0,001	0,61±0,001	0,90±0,001	2,95±0,105
20:80	10,096±0,028	11,657±0,035	1,44±0,001	0,59±0,004	0,85±0,006	2,85±0,019
30:70	9,888±0,007	11,200±0,005	1,36±0,001	0,57±0,001	0,78±0,001	2,36±0,004
70:30	5,267±0,013	6,189±0,036	1,436±0,008	0,67±0,004	0,96±0,011	2,912±0,160
80:20	5,357±0,006	7,633±0,074	2,032±0,028	0,70±0,002	1,42±0,024	6,758±0,100
90:10	6,103±0,009	13,982±0,004	3,67±0,013	0,94±0,003	3,44±0,001	18,40±0,031

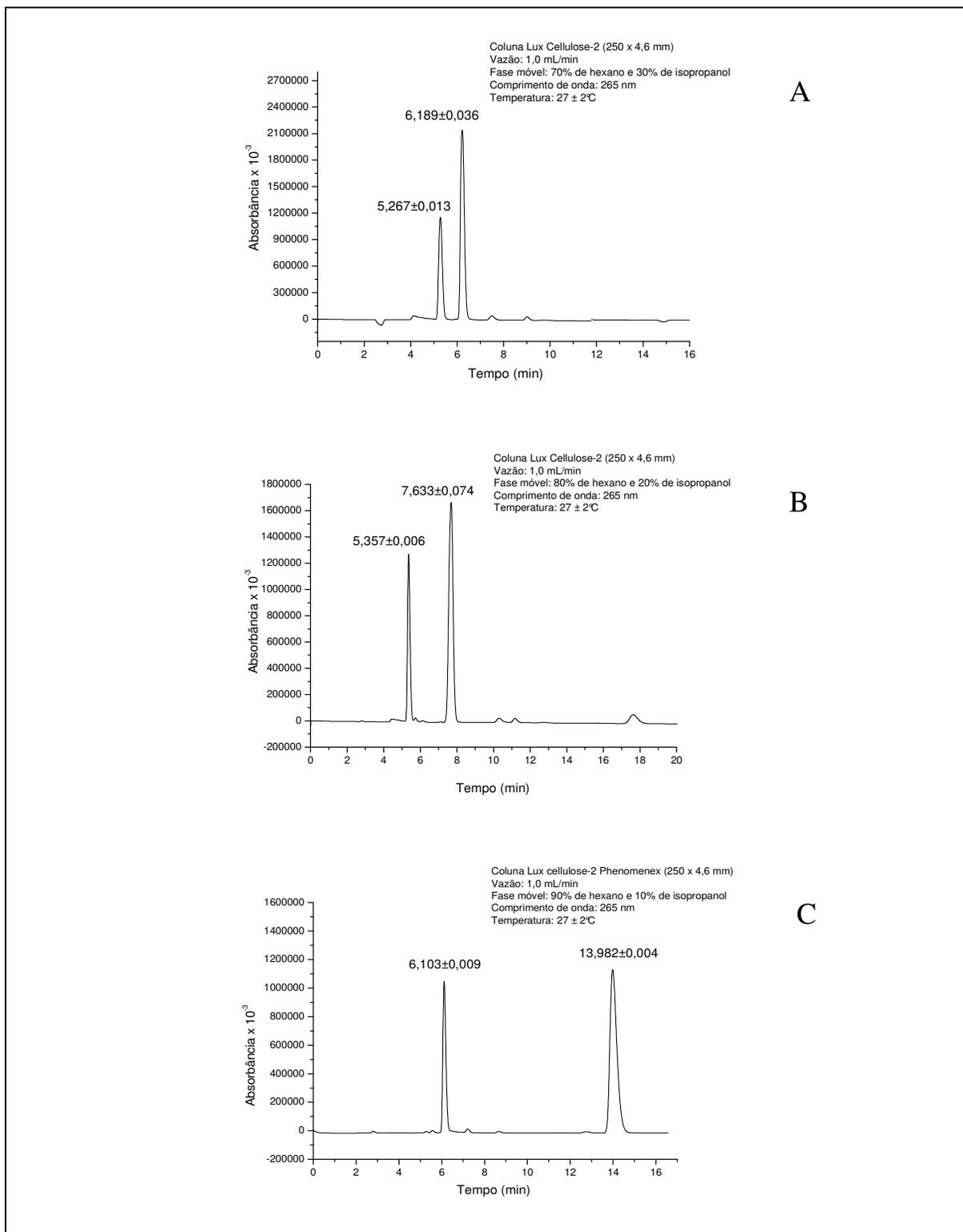
De acordo com Collins *et al.*, (2006), para valores de  $R_S \geq 1,5$ , indicam uma separação completa dos compostos em uma coluna cromatográfica. Analisando os resultados deste estudo, Tabela 4, todas as fases móveis utilizadas nessa pesquisa realizaram uma completa separação quiral dos enantiômeros do composto Fmoc-POAC na coluna analítica Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), com destaque para a fase móvel 90:10 (v/v) de hexano e isopropanol, com uma resolução de 18,40±0,031.

De acordo com a Tabela 4, considerando a proporção predominante de isopropanol em relação ao hexano na fase móvel, ensaios 10:90, 20:80, 30:70, pode se observar que ocorreu a diminuição dos seguintes parâmetros cromatográficos, tempo de retenção ( $t_R$ ), o fator de seletividade ( $\alpha$ ), fator de retenção ( $k$ ) e a resolução ( $R_S$ ) a medida que diminui a fração mássica do isopropanol na fase móvel.

Para proporções predominante de hexano em relação ao isopropanol, ensaios 90:10, 80:20, 70:30, pode se observar que ocorreu o aumento dos seguintes parâmetros cromatográficos, tempo de retenção ( $t_R$ ), o fator de seletividade ( $\alpha$ ), fator de retenção ( $k$ ) e a resolução ( $R_S$ ) a medida que diminui a fração mássica do isopropanol. A Figura 15 e 16 apresentam os cromatogramas da separação quiral do Fmco-POAC em diferentes fases móveis.

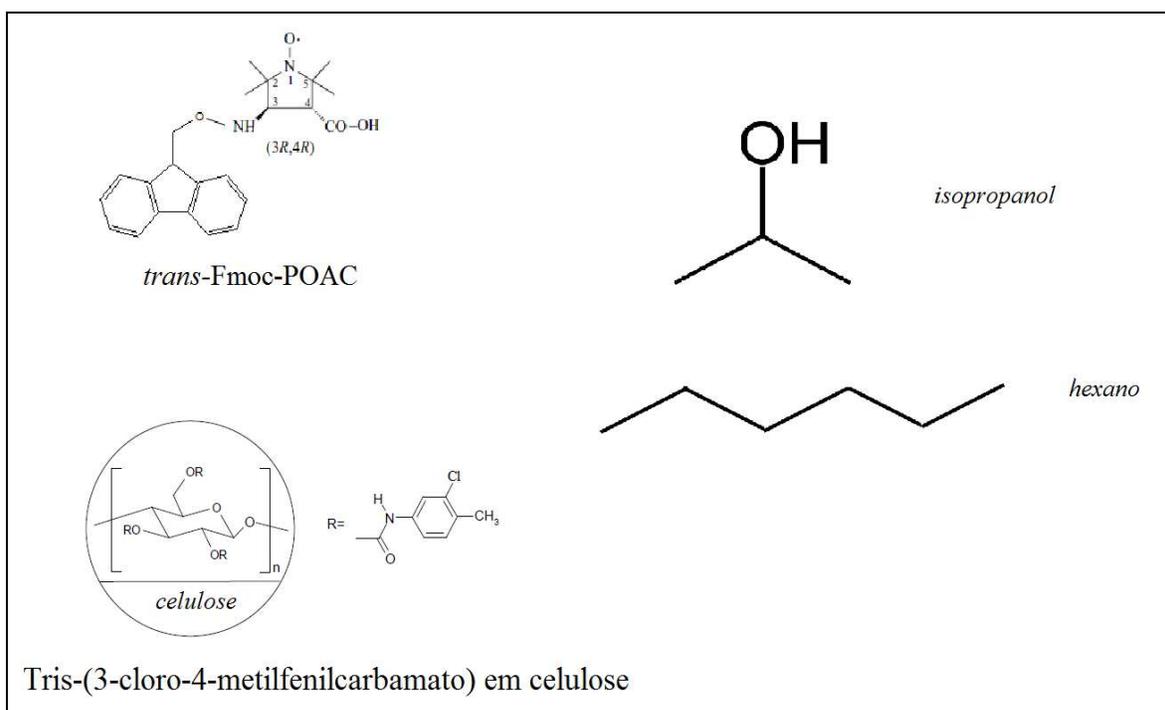


**Figura 15:** Cromatogramas de separação do Fmoc-POAC na concentração de 0,5 mg/mL, injeção de 20 µL, em coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), eluídos na fase móvel 10% de hexano e 90% de isopropanol (A), 20% de hexano e 80% de isopropanol (B), 30% de hexano e 70% de isopropanol (C).



**Figura 16:** Cromatogramas de separação do Fmoc-POAC na concentração de 1,0 mg/mL, injeção de 20 µL, em coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), eluidos na fase móvel 70% de hexano e 30% de isopropanol (A), 80% de hexano e 20% de isopropanol (B), 90% de hexano e 10% de isopropanol (C).

De acordo com os resultados da separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm) de fase estacionária normal composta de tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose, apresentados na Tabela 4, foi observado que todas as diferentes fases móveis compostas por hexano e isopropanol utilizadas nessa pesquisa resultaram em uma boa separação quiral. As estruturas químicas do analito quiral em estudo, os solventes da fase móvel e os componentes da fase estacionária foram apresentados na Figura 17.



**Figura 17:** Estrutura química dos compostos Fmoc-POAC, isopropanol, tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose e hexano.

De acordo com Collins *et al.*, (2006), os componentes utilizados na fase móvel, composta dos eluentes hexano e isopropanol, para a separação enantiomérica do Fmoc-POAC possuem polaridades diferentes, com os valores iguais à 0,1 e 3,9 na escala de Snyder ( $P'$ ), respectivamente. Quanto maior os valores ( $P'$ ), maior a polaridade dos solventes orgânicos. Portanto, o hexano é considerado apolar e já o isopropanol é um composto razoavelmente polar. A ligeira polaridade deste último se deve à hidroxila no carbono 2, podendo ser solubilizado em água.

Para o composto Fmoc-POAC, a parte Fmoc tem alta hidrofobicidade, favorecendo sua solubilidade no hexano, mas a POAC possui aminas, hidroxilas e o radical livre que caracteriza esse composto como polar, sendo mais solúvel em soluções polares. Quanto maior a proporção de eluente polar na fase móvel, maior será a afinidade e solubilidade do Fmoc-POAC pela mesma. Dessa forma, o Fmoc-POAC, por ser polar, tem uma maior afinidade na fase estacionária normal composta de tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose em relação a fase móvel composta de hexano e isopropanol, ocorrendo uma migração do analito da fase móvel para a fase estacionária e formando complexos diastereoisomeros com a fase estacionária quiral. O Fmoc-POAC é retardado pelas ligações de hidrogênio e interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  com a fase estacionária durante sua eluição pela fase móvel.

De acordo com a fase estacionária estudada na separação quiral do Fmoc-POAC, tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose, seus diferentes sítios de ligações atribuem uma seletividade e retenção para esse marcador molecular. Os átomos de oxigênio e nitrogênio presentes em suas estruturas conferem a formação de ligações de hidrogênio, além da existência do fenil contribuindo para as interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ . A estrutura linear da celulose confere os efeitos estereoespecíficos entre os distereoisomeros e a formação dos complexos de inclusão, decorrente do encaixe da porção aromática do analito na cavidade quiral da fase estacionária (COLLINS *et al.*, 2006; ali *et al.*, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2010).

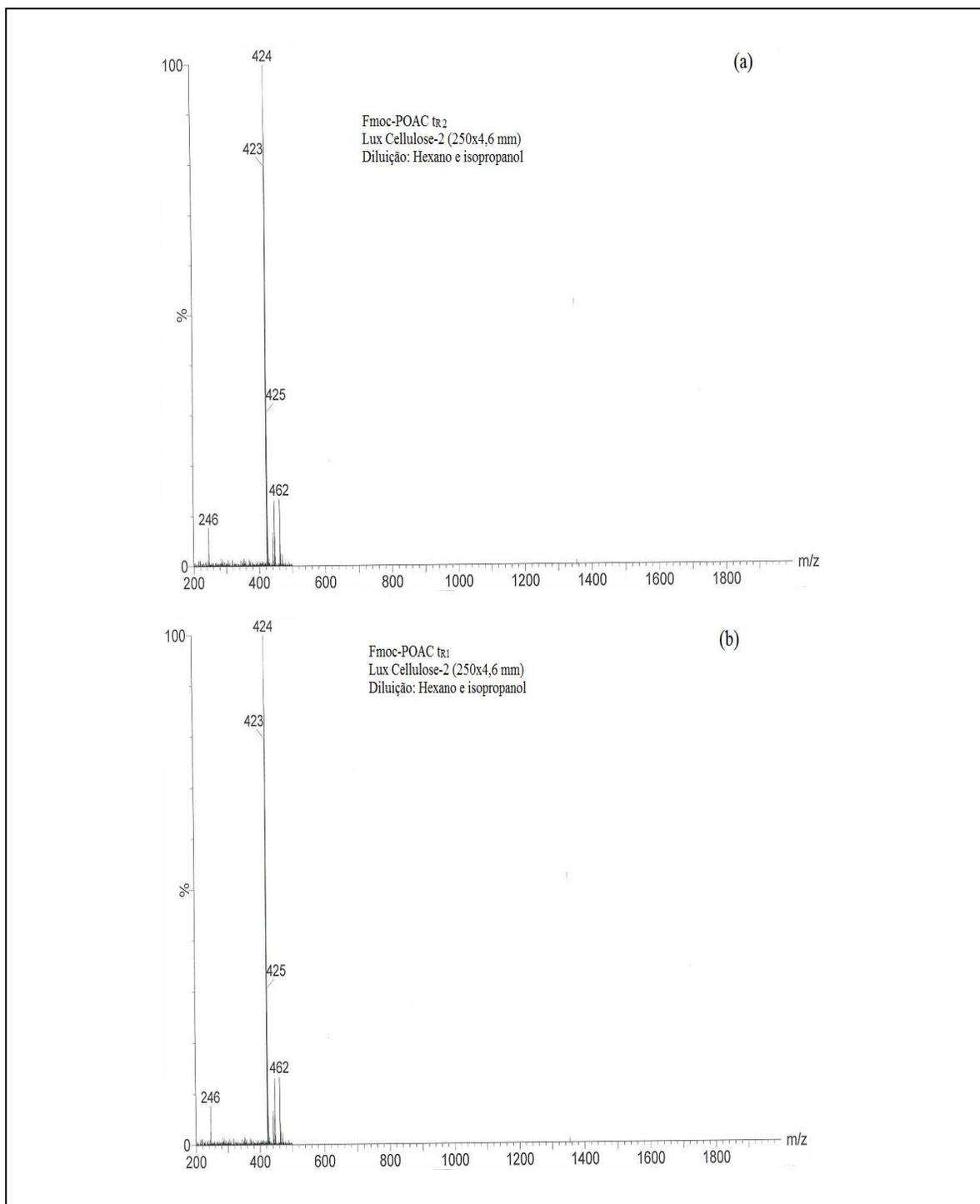
De acordo com Péter *et al.*, (2003), foi estudada a separação cromatograficas do marcador molecular Fmoc-POAC, eluido por hexano, isopropanol e etanol, em diferentes proporções, na coluna da Chiralcel<sup>®</sup>, OD-H, com partículas de 5  $\mu$ m, tamanho de 150x4,6 mm, em fase estacionária reversa composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. Esses autores tiveram como resultados picos não resolvidos da enantioseparação do Fmoc-POAC. Em comparação aos resultados obtidos pelos autores citados anteriormente, os resultados obtidos nessa pesquisa foram uma resolução enantiomérica com linha de base do Fmoc-POAC através da coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), utilizando como fase móvel os solventes hexano e isopropanol. Acredita-se que o átomo de cloro na estrutura na fase estacionária da coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm) foi responsável pelos melhores

valores de resolução na separação do Fmoc-POAC em relação a estrutura na fase estacionária da coluna OD-H (150x4,6 mm), citado por Peter *et al.*, (2003). Valores de resolução acima de 2 são considerados como uma boa separação cromatográfica (CASS & DEGANI, 2001). Esse átomo, devido a sua alta eletronegatividade, confere maiores interações como dipolo ou ligações de hidrogênio entre a fase estacionária e o Fmoc-POAC (ali *et al.*, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2010).

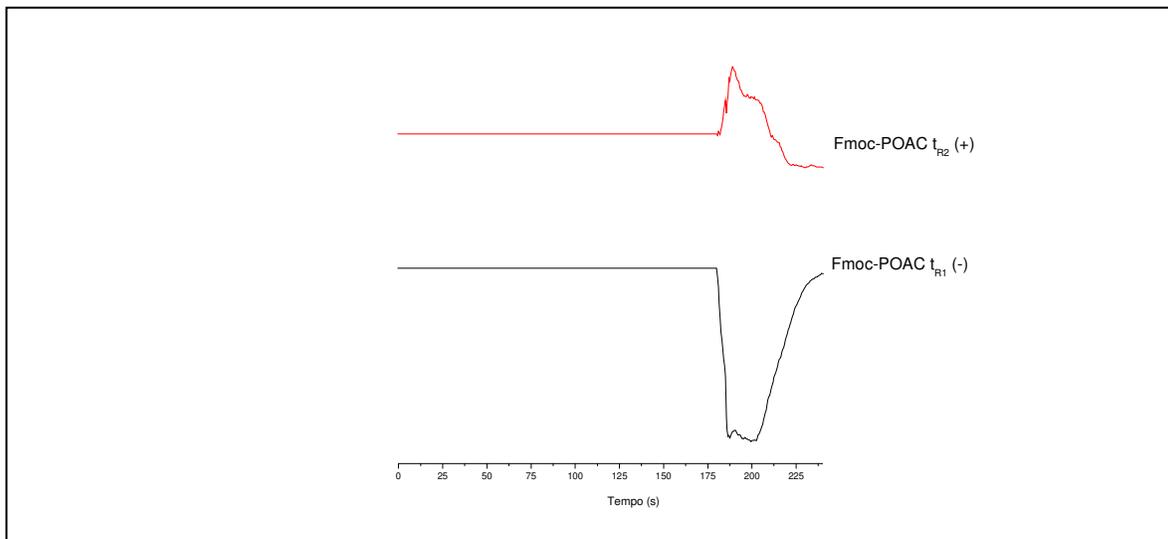
#### 4.1.2 Confirmação dos enantiômeros

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, todas as diferentes fases móveis compostas por hexano e isopropanol resultaram em uma boa separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), com destaque para a proporção 90/10 (v/v).

Foram obtidas bandas cromatográficas bem definidas do Fmoc-POAC, restando a confirmação da separação enantiomérica através da caracterização do pico cromatográfico e a configuração enantiomérica dos enantiômeros responsáveis pelos picos. Foram recuperados os compostos responsáveis por cada pico cromatográfico e caracterizados por dicroísmo e espectrometria de massa e infravermelho. A Figura 18 apresenta os resultados do espectro de massa dos enantiômeros e a Figura 19 apresenta os resultados do dicroísmo circular. De acordo com Solomos (2000); Collins *et al.*, (2006); Orlando *et al.*, (2007), os isômeros são compostos diferentes que têm a mesma fórmula molecular. Dentro da classe dos isômeros, tem-se os estereoisômeros, que diferem somente pela disposição dos átomos no espaço e podem ser subdivididos em duas categorias gerais: os enantiômeros e os diastereoisômeros. Os enantiômeros são caracterizados como isômeros que possuem a capacidade de desviarem a luz plano polarizada em direções opostas.



**Figura 18:** Espectro de massa (LC-MS) dos enantiômeros do Fmoc-POAC para o primeiro enantiômero do Fmoc-POAC eluido (a) e o segundo enantiômero (b) do Fmoc-POAC eluido.



**Figura 19:** Dicroísmo circular do suposto primeiro e segundo enantiômero do Fmoc-POAC eluido, índices  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$ , respectivamente.

O Fmoc-POAC é um composto com massa molecular igual 423g/mol, com fórmula química  $C_{24}H_{27}O_5N_2$ . De acordo com a Figura 18, os compostos eluidos tiveram uma massa molecular igual a 423g/mol e 424 g/mol. O resultado de 424 g/mol para a massa molecular tem um aumento de uma unidade da massa real do Fmoc-POAC. Esse aumento pode ser um erro aceitável devido o composto estar muito diluído. Ambos os compostos analisados tiveram a mesma massa molecular, portanto, os dois compostos eluidos após a injeção do Fmoc-POAC são isômeros.

O dicroísmo circular analisa a absorvância diferencial da luz circular polarizada e quantificada para uma ampla faixa de comprimento de onda de absorvância (AHUJA, 2000), apenas utilizados para análise de enantiômeros (COLLINS *et al.*, 2006). Os enantiômeros são capazes de desviar a luz polarizada com a mesma intensidade, mas com direções opostas (COLLINS *et al.*, 2006; LÄMMERHOFER, 2010). De acordo com a Figura 19, os isômeros dos compostos do Fmoc-POAC eluidos em diferentes tempos desviaram a luz circular polarizada e portanto foram considerados como enantiômeros, sendo que o primeiro enantiômero eluido considera-se como o composto negativo (-) e o segundo enantiômero eluido como o composto positivo (+).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 19, o marcador de peptídeo Fmoc-POAC, quiralmente separado e obtido seus enantiômeros enriquecidos, apresentaram

características peculiares quando analisados em dicroísmo circular, com sinais positivos e negativos, além da caracterização desses enantiômeros, pois o primeiro enantiômero eluído ( $t_{R1}$ ) com a fase móvel composta por hexano e isopropanol (90:10 v/v) na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm) foi o enantiômero Fmoc-POAC (-), enquanto o segundo enantiômero eluído ( $t_{R2}$ ) foi Fmoc-POAC (+).

Wright *et al.*, (2008) realizou a primeira caracterização completa do Fmoc-POAC através do dicroísmo circular e difração de raio X. Esses autores afirmaram que o enantiômero (+)(3R,4R)-Fmoc-POAC-Binaftol tem uma solubilidade sensivelmente menor em solventes apolares em relação ao enantiômero (-)(3S,4S)-Fmoc-POAC-Binaftol, além da configuração positiva (+) para o enantiômero (3R,4R)-Fmoc-POAC. Comparando esses resultados com os resultados obtidos nessa pesquisa, acredita-se que o enantiômero ( $t_{R2}$ ) eluído na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), caracterizado como Fmoc-POAC (-), seja o Fmoc-POAC (-) (3S, 4S), por apresentar a configuração negativa no dicroísmo circular. Essa afirmação se deve ao conhecimento de que dificilmente um enantiômero muda sua configuração positiva ou negativa no dicroísmo circular com a mudança do solvente que o dilui (ELIEL *et al.*, 1994).

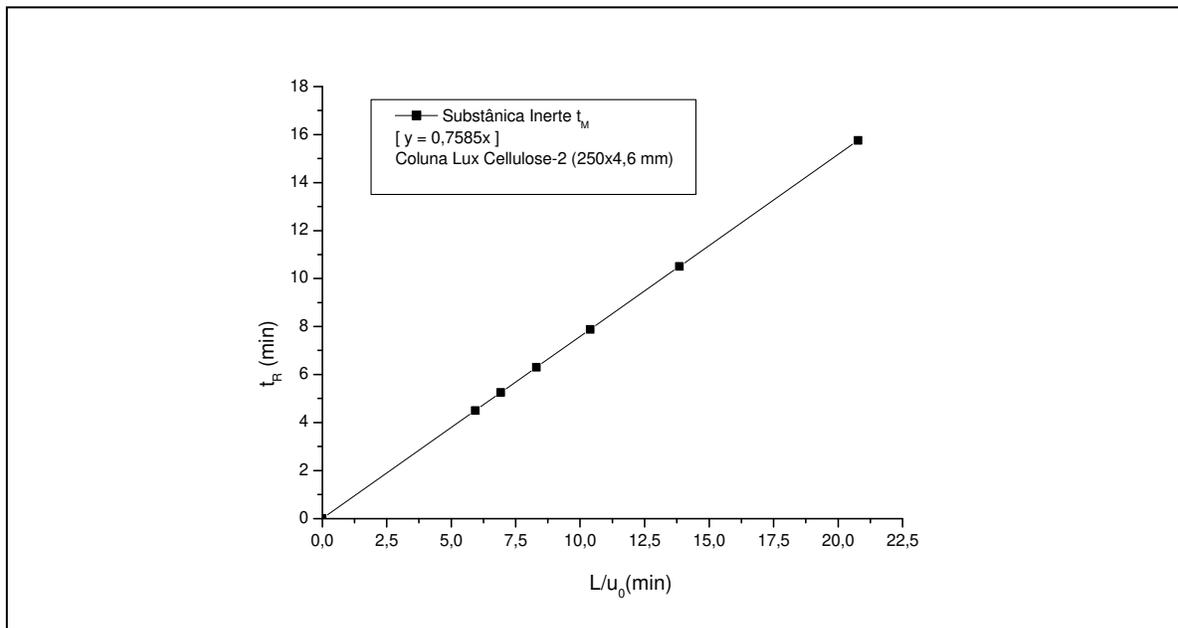
De acordo com a literatura consultada, todas as abordagens realizadas na separação quiral do POAC e Fmoc-POAC foram por métodos cromatográficos indiretos que envolvia solventes polares (PÉTER *et al.*, 2003; WHIGHT *et al.*, 2003; WHIGHT *et al.*, 2008a; WHIGHT *et al.*, 2008b) ou métodos cromatográficos indiretos com colunas quirais de fase estacionária reversa que utilizam solventes polares para eluição (PÉTER *et al.*, 2003). De acordo com Whight *et al.*, (2010),  $\beta$ -hexapeptídeos foram marcados apenas com o POAC (+) (3R, 4R) para estudos conformacionais. Provavelmente foi utilizado apenas esse enantiômero POAC (+) (3R, 4R) devido aos métodos de separação enantiomérica, até então descritos na literatura, serem nas condições polares, além das etapas de reação do marcador molecular nos peptídeos ser com reagentes polares, facilitando o uso do marcador de peptídeo POAC (+) (3R,4R).

#### 4.1.3 Porosidade do leito e Coeficiente de Partição

De acordo com Cremasco *et al.*, (2001), a inclinação da reta do gráfico  $t_M$  vs.  $L/u_0$  é igual a porosidade total da coluna ( $\varepsilon_T$ ), apresentado na Figura 20, onde ( $L$ ) é o comprimento da coluna, ( $u_0$ ) igual a velocidade superficial da coluna e ( $t_M$ ) igual ao tempo de retenção da substância inerte. Segundo Ruthven (1984), a porosidade da partícula ( $\varepsilon_p$ ) é aproximadamente 0,45 e a Correlação (24), correlaciona a porosidade total com a porosidade do leito e da partícula. Portanto, a porosidade do leito prevista através da correlação de Ruthven (1984) para a coluna analítica Lux Cellulose-2, 250x4,6 mm de 5 $\mu$  Phenomenex<sup>®</sup> é igual a 0,561.

$$t_R = [\varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p] \cdot \frac{L}{u_0} = \varepsilon_T \cdot \frac{L}{u_0} \quad (23)$$

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p \quad (24)$$



**Figura 20:** Gráfico  $t_M$  vs.  $L/u_0$  da substância inerte TTBB em diferentes vazões. Coluna Lux Cellulose-2, 250x4,6 mm, partículas de 5 $\mu$ , Phenomenex<sup>®</sup>, em temperatura ambiente.

#### 4.1.4 Parâmetros de Transferência de Massa do Fmoc-POAC

O estudo de transferência de massa foi realizado em coluna analítica Lux Cellulose-2 nas condições isocráticas, com os eluentes orgânicos na proporção 90% hexano e 10%

isopropanol devido aos melhores resultados de separação enantiomérica e as melhores condições de trabalho para uma possível purificação quiral e recuperação dos enantiômeros nas próximas etapas. Os ensaios cromatográficos foram feitos em duplicatas em diferentes vazões, com o Fmoc-POAC na concentração de 1,0 mg/mL, temperatura ambiente  $27\pm 2^\circ\text{C}$ ;  $30^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  e detecção de 265 nm. Os resultados médios foram apresentados na Tabela 5.

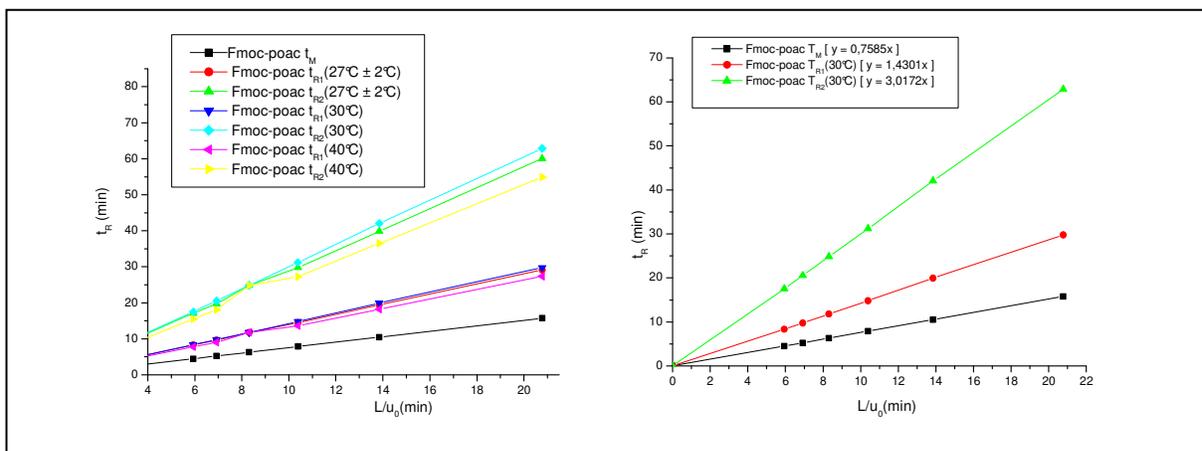
**Tabela 5:** Tempo de retenção dos enantiômeros ( $t_R$ ) e substância inerte ( $t_M$ ), número de pratos ( $N$ ) e altura equivalente para um prato teórico (HETP) para a separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC em diferentes temperaturas pela coluna analítica Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), onde índices 1 e 2 são o primeiro e segundo enantiômero eluidos, respectivamente.

Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Vazão (mL/min)	$t_{r1}$ (min)	$t_{r2}$ (min)	$t_M$ (min)	$N_1$	$N_2$	$HETP_1$	$HETP_2$
27	0,200	29,151	60,074	15,757	12317,3	13035,4	0,00203	0,00192
27	0,300	19,426	39,868	10,505	13548,3	13466,5	0,00185	0,00186
27	0,400	14,518	29,785	7,879	14041,8	13351,2	0,00178	0,00187
27	0,500	11,790	24,846	6,303	14304,0	13251,4	0,00175	0,00189
27	0,600	9,664	19,761	5,252	13831,0	12481,5	0,00181	0,00200
27	0,700	8,346	17,113	4,502	13054,2	11215,5	0,00192	0,00223
30	0,200	29,770	62,873	15,757	11886,0	16346,0	0,00210	0,00153
30	0,300	19,946	42,072	10,505	13856,9	17195,7	0,00180	0,00145
30	0,400	14,801	31,207	7,879	14644,3	17219,9	0,00171	0,00145
30	0,500	11,790	24,846	6,303	14958,1	16680,8	0,00167	0,00150
30	0,600	9,750	20,529	5,252	14677,4	15889,4	0,00170	0,00157
30	0,700	8,352	17,539	4,502	14381,2	14540,9	0,00174	0,00172
40	0,200	27,358	54,902	15,757	10990,7	13651,1	0,00227	0,00183
40	0,300	18,255	36,494	10,505	12864,3	15421,7	0,00194	0,00162
40	0,400	13,634	27,252	7,879	13481,1	15709,4	0,00185	0,00159
40	0,500	11,790	24,846	6,303	14883,5	15404,1	0,00168	0,00162
40	0,600	9,045	18,058	5,252	14431,2	15059,5	0,00173	0,00166
40	0,700	7,769	15,500	4,502	14110,2	14558,4	0,00177	0,00172

A Figura 21 apresenta o gráfico  $t_R$  vs.  $L/u_0$  para a obtenção das constantes de equilíbrio ( $K_P$ ) do Fmoc-POAC na coluna analítica de fase normal Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm). De acordo com Cremasco *et al.*, (2000), a inclinação da reta no gráfico comprimento da coluna ( $L$ ) dividido pela velocidade superficial da coluna ( $u_0$ ) versus

tempo de retenção da substância inerte ( $t_R$ ) é igual a porosidade total da coluna. Com a inclinação da reta do gráfico  $t_R$  vs.  $L/u_0$  para os enantiômeros podemos obter a constante de equilíbrio ( $K_P$ ), definida pela Equação (23) e apresentada na Tabela 6.

$$t_R = \left[ \varepsilon_T + (1 - \varepsilon) \cdot (1 - \varepsilon_p) K_P \right] \cdot \frac{L}{u_0} \quad (23)$$

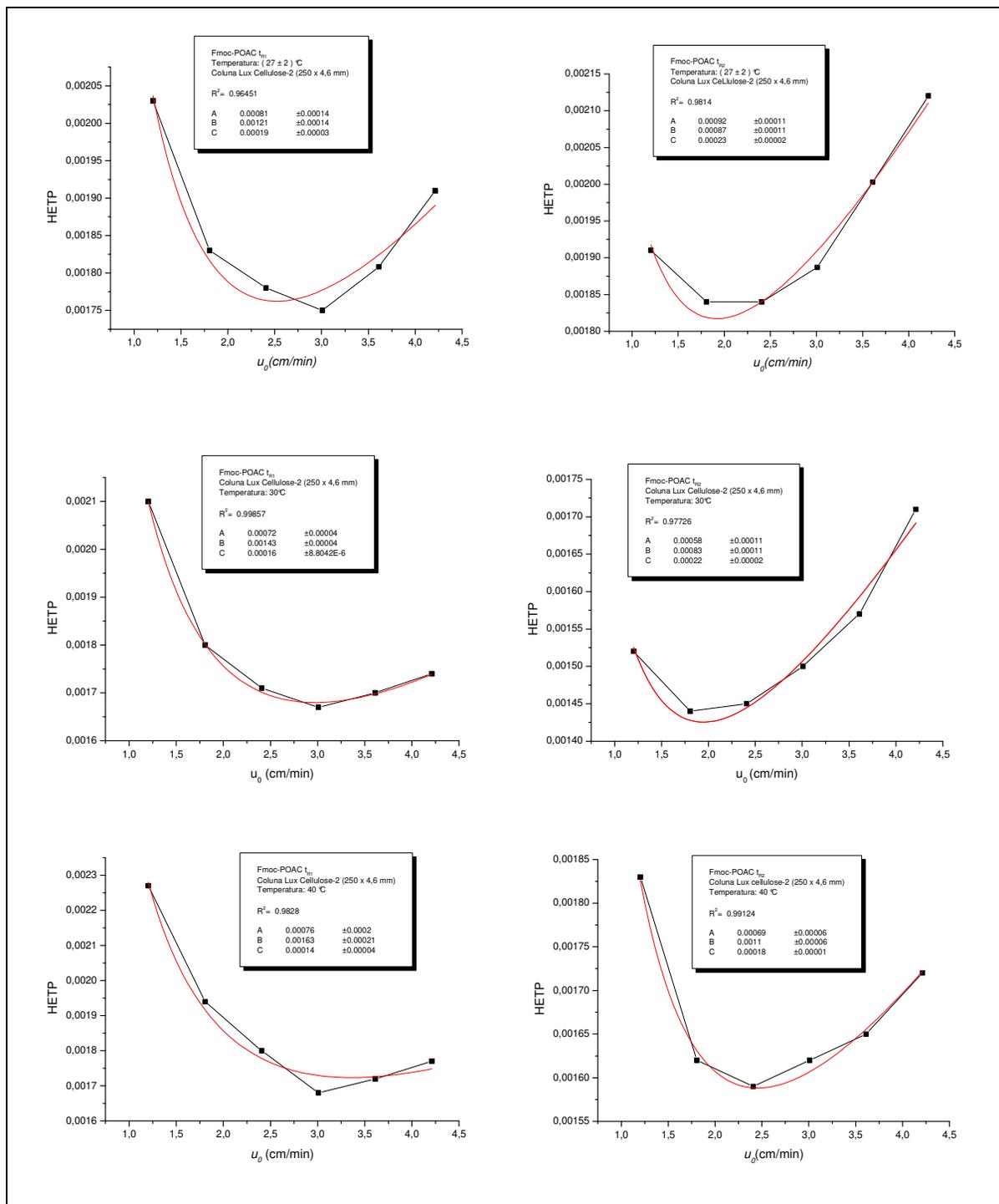


**Figura 21:** Gráfico  $t_R$  vs.  $L/u_0$  para a obtenção da constantes de equilíbrio ( $K_P$ ) do Fmoc-POAC na coluna analítica de fase normal Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm).

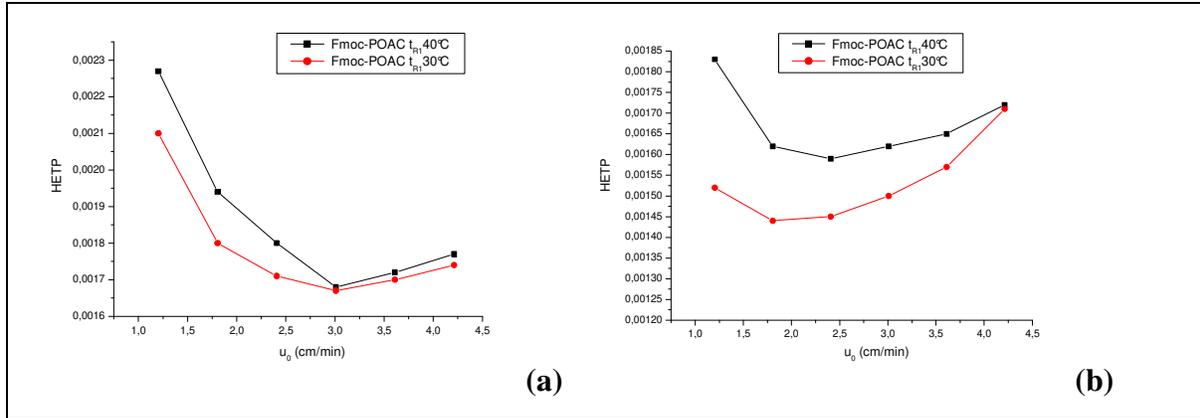
Os parâmetros de transferência de massa e coeficientes de dispersão axial da coluna cromatográfica podem ser avaliados pela altura equivalente de um prato teórico (HETP), a qual é definida pela Equação (22) de acordo com Ruthven (1984); Böcker *et al.* (2002); Da Silva Jr. *et al.* (2005). O gráfico HETP vs.  $u_0$ , conhecido como gráfico de Van Deemter, onde pode-se apresentar a seguinte equação para o HETP, Equação (32). Correlacionando as Equações (22) e (32), pode-se obter os parâmetros de transferência de massa do Fmoc-POAC na coluna quiral Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm). A Figura 22 e 23 apresenta a curva de Van Deemter para os enantiômeros do Fmoc-POAC.

$$HETP = \frac{\sigma^2}{t_R^2} L = 2 \frac{D_L}{u} + 2u \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K_P}{K_m} \left[ 1 + \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) K_P \right]^{-2} \quad (22)$$

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (32)$$



**Figura 22:** Gráfico de Van Deemter para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido em diferentes temperaturas na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), em diferentes temperaturas e fase móvel composta por hexano e isopropanol na proporção 90:10 (v/v).



**Figura 23:** Gráfico de Van Deemter para o Fmoc-POAC na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm); a) primeiro enantiômero do Fmoc-POAC eluido e b) segundo enantiômero do Fmoc-POAC eluido.

Os termos A, B e C da Equação (32) são coeficientes empíricos (GUIOCHON, 2002). O primeiro termo A, Correlação (33), refere-se ao alargamento dos picos devidos aos caminhos tortuosos seguidos pelas moléculas da amostra, que descreve o efeito da difusão turbilhonar. Para minimizar este termo é necessário usar colunas com diâmetros internos pequenos, bem recheados e partículas com tamanho pequeno e uniforme. O termo B, Correlação (34), está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel, conhecida como difusão longitudinal. O termo C, Correlação (35), é uma função dos efeitos de transferência de massa do soluto entre as fases móveis e estacionárias (COLLINS *et al.*, 2006). De acordo com Guiochon *et al.* (1994) e Da Silva Jr. *et al.* (2005), considera-se que a dispersão axial resulta de dois mecanismos diferentes, difusão molecular e difusão turbilhonar. Como primeira aproximação, estes efeitos se somam de forma que o coeficiente de dispersão axial ( $D_L$ ) seja representado pela Equação (31).

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (33)$$

$$B = 2\gamma_1 Dm \quad (34)$$

$$C = 2 \cdot \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K_p}{\kappa_m} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K_p \right]^{-2} \quad (35)$$

$$D_L = \gamma_1 Dm + \gamma_2 d_p u \quad (31)$$

A Tabela 6 apresenta os parâmetros de transferência de massa calculados a partir da Equação (32) utilizando o gráfico de Van Deemter. De acordo com os resultados obtidos, as constantes de equilíbrio ou coeficiente de partição ( $K_p$ ) diminuem com o aumento da temperatura. As constantes de transferência de massa ( $K_m$ ) aumentam com o aumento da temperatura. A resistência a transferência de massa ( $1/K_m$ ), diminui com o aumento da temperatura. Diferentes valores em função da temperatura para cada enantiômero é devido a diminuição da viscosidade da fase móvel com o aumento da temperatura, facilitando a migração do Fmoc-POAC para a fase estacionária.

**Tabela 6:** Parâmetros Van Deemter e transferência de massa para a enantioseparação do Fmoc-POAC em coluna analítica Lux Cellulose-2 de fase normal, 250x4,6 mm, para o primeiro e segundo enantiômero eluidos,  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$ , respectivamente.

	T (°C)	$D_L$ ( $\text{cm}^2/\text{min}$ )	$K_p$	$K_m$ ( $\text{min}^{-1}$ )	A	B	C
$t_{R1}$	27	$0,000605+0,00041*u_0$	2,67	2303	$0,00081\pm 0,00014$	$0,00121\pm 0,00014$	$0,00019\pm 0,00003$
	30	$0,000715+0,00036*u_0$	2,78	2696	$0,00072\pm 0,00004$	$0,00143\pm 0,00004$	$0,00016\pm 0,00002$
	40	$0,000815+0,00038*u_0$	2,34	2855	$0,00076\pm 0,00002$	$0,00163\pm 0,00021$	$0,00016\pm 0,00004$
$t_{R2}$	27	$0,000435+0,00046*u_0$	8,83	1577	$0,00092\pm 0,00011$	$0,00087\pm 0,00011$	$0,00014\pm 0,00002$
	30	$0,000415+0,00029*u_0$	9,35	961	$0,00058\pm 0,00011$	$0,00083\pm 0,00011$	$0,00022\pm 0,00002$
	40	$0,000550+0,00035*u_0$	7,88	1333	$0,00069\pm 0,00006$	$0,0011\pm 0,00006$	$0,00018\pm 0,00001$

A resistência a transferência de massa global ( $1/k_m$ ) é composto por 2 mecanismos separados de transferência de massa, resistência a transferência de massa interno e externo, apresentado pela Equação (25), onde  $d_p$  é o diâmetro da partícula,  $D_p$  é o coeficiente de difusão do poro e  $K_f$  é o coeficiente de transferência de massa externo. (MA, Z.; WANG, N. H. L., 1997).

Podem-se diferenciar esses dois mecanismos de resistências por intermédio do número de Biot mássico ( $Bi_M$ ), o qual é definido pela Equação (27).  $Bi_M$  tendendo a zero, considera-se que o processo que rege a transferência de massa está situado externamente ao meio onde há o fenômeno difusivo e a resistência interna é desprezível em face a externa.  $Bi_M$  tendendo ao infinito, com valores maiores que 50, diz-se que a resistência externa ao

fenômeno de transferência de massa é desprezível em face ao fenômeno difusivo que está situado internamente ao meio onde ocorre a transferência de massa (CREMASCO, 2002).

$$\frac{1}{K_m} = \frac{d_p}{6K_f} + \frac{d_p^2}{60\varepsilon_p D_p} \quad (25)$$

$$Bi_M = \frac{d_p K_m}{D_m K_p} \quad (27)$$

O  $K_f$  pode ser obtido pela Correlação (28) de Wilson e Geankoplis (1996), a qual é válida para sistemas líquidos com a limitação de que  $0,0015 < Re < 55$ . Onde  $Sh$ ,  $Sc$  e  $Re$  são os números dimensionais de Sherwood, Schmidt e Reynolds.  $D_m$  é o coeficiente de difusão molecular efetivo, que pode ser estimado pela equação de Wilke-Chang, Equação (29) (GUIOCHON *et al.*, 1994). O número de Reynolds ( $Re$ ), o qual é definido pela Equação (30).

$$Sh = \frac{d_p K_f}{D_m} = \frac{1,09}{\varepsilon} (Sc)^{\frac{1}{3}} (Re)^{\frac{1}{3}} = \frac{1,09}{\varepsilon} Pe_{M_p}^{\frac{1}{3}} = \frac{1,09}{\varepsilon} \left( \frac{d_p \cdot \varepsilon \cdot u}{D_m} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (28)$$

$$D_m = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(\phi M)^{\frac{1}{2}} T}{\mu V_b^{0,6}} \quad (29)$$

$$Re = \frac{d_p \cdot \varepsilon \cdot u}{\eta} \quad (30)$$

Onde,  $\phi$  denota o coeficiente de associação, o qual leva em conta a interação molecular do soluto-solvente devido a ligações de hidrogênio para os solventes utilizados. Considera-se  $\phi$  igual a um para solventes orgânicos.  $M$  é a massa molecular,  $\mu$  é a viscosidade dinâmica da solução,  $\eta$  é a viscosidade cinemática da solução,  $T$  é a temperatura absoluta e  $V_b$  é o volume molar para o ponto de ebulição.

A Tabela 7 apresenta os resultados de transferência de massa do Fmoc-POAC na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm).  $K_m$  foi calculado a partir da Equação (35), utilizando os coeficientes da equação de Van Deemter. Os valores de  $Re$  ficaram na faixa

de 0,0013 à 0,0044 para as diferentes vazões adotadas nos ensaios cromatográficos, que permite adotar a Equação (28) para estimar  $K_f$ . De posse de  $K_f$ , podemos estimar  $D_p$  com a Equação (25). Os valores de  $K_f$  foram cerca de 100.000 vezes maiores que os valores obtidos para  $D_p$  e podemos considerar que a resistência interna dos poros das partículas regem a transferência de massa dos enantiômeros do Fmoc-POAC ou até mesmo considerar que não ocorre transferência de massa dentro dos poros da partícula na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), utilizando a fase móvel hexano e isopropanol na proporção 90:10 (v/v). Acredita-se que esse fenômeno ocorre devido ao tamanho muito pequeno das partículas do leito fixo empacotado para colunas cromatográficas de alta eficiência, com partículas de 5 $\mu$ m. Outro valor que confirma a não transferência de massa dos enantiômeros do Fmoc-POAC nos poros das partículas é os valores obtidos de  $Bi_M$ , com valores maiores ou próximos de 50, considera-se que o processo que rege a transferência de massa está situado internamente ao meio onde há o fenômeno difusivo e a resistência externa de transferência de massa é desprezível em face a interna (CRESMASCO, 2002).

**Tabela 7:** Média dos coeficientes de transferência de massa para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido em coluna analítica de fase estacionária normal Lux Cellulose-2, de tamanho 250x4,6 mm, em diferentes temperaturas., para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido.

Fmoc-POAC	$T$ ( $^{\circ}C$ )	$K_m$ ( $s^{-1}$ )	$1/K_m$ (s)	$D_m$ ( $cm^2/s$ )	$Bi_M$	$D_p$ ( $cm^2/s$ )	$K_f$ ( $cm.s^{-1}$ )	$Re$
$tr_1$	27	38,367	0,026	$2,66.10^{-5}$	270,4	$2,51.10^{-6}$	0,094	0,0013<Re<0,0044
	30	44,895	0,022	$2,83.10^{-5}$	285,6	$2,96.10^{-6}$	0,098	
	40	54,345	0,018	$3,43.10^{-5}$	338,9	$3,59.10^{-6}$	0,112	
$tr_2$	27	15,978	0,063	$2,66.10^{-5}$	34,1	$1,02.10^{-6}$	0,094	
	30	15,997	0,063	$2,83.10^{-5}$	30,3	$1,02.10^{-6}$	0,098	
	40	22,188	0,045	$3,43.10^{-5}$	41,1	$1,42.10^{-6}$	0,112	

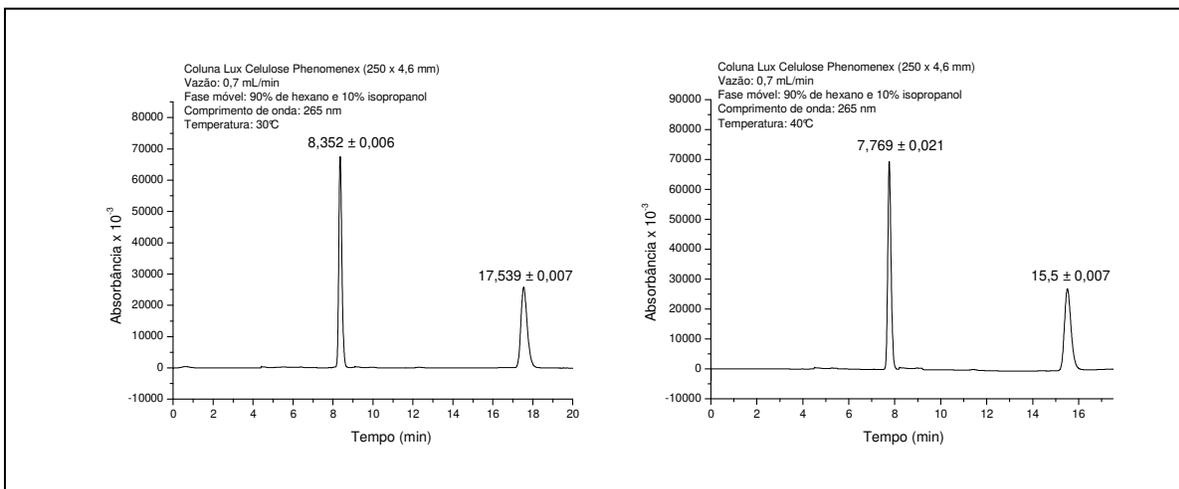
#### 4.1.5 Análise Termodinâmica de Adsorção

De acordo com Rojkovicová *et al.*, (2004), Lindner *et al.*, (2004), István *et al.*, (2008) e Lämmerhofer, (2010), a separação direta de enantiômeros é baseada na formação de complexos diastereoisoméricos reversíveis, criados por interações intermoleculares dos enantiômeros com o seletor quiral. Esses complexos podem ser caracterizados por parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ ) (LEHOTAY *et al.*, 2004; WENG *et al.*, 2008; LÄMMERHOFER, 2010).

Foram obtidos os parâmetros termodinâmicos do Fmoc-POAC na coluna analítica Lux Cellulose-2 da Phenomenex<sup>®</sup>, tamanho de 250x4,6 mm, com partículas de 5 $\mu$ m, conhecida comercialmente como Lux Cellulose-2, com a fase estacionária normal composta por tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose. Os eluentes utilizados nessa coluna forma hexano e isopropanol nas proporções 90:10 (v/v), em diferentes temperaturas. Os resultados médios obtidos em duplicata para a separação quiral nessas condições estão apresentados na Tabela 8 e nos cromatogramas da Figura 24.

**Tabela 8:** Parâmetros cromatográficos para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido em diferentes temperaturas, em coluna de fase normal, Lux cellulose-2, Phenomenex<sup>®</sup>

<i>Temperatura (°C)</i>	$t_{R1}$	$t_{R2}$	$\alpha$	$K_1$	$K_2$
25	8,518±0,017	18,143±0,013	3,40±0,005	0,90±0,003	3,03±0,005
30	8,352±0,006	17,539±0,007	3,39±0,003	0,85±0,001	2,89±0,002
40	7,769±0,021	15,500±0,007	3,37±0,023	0,73±0,005	2,44±0,002

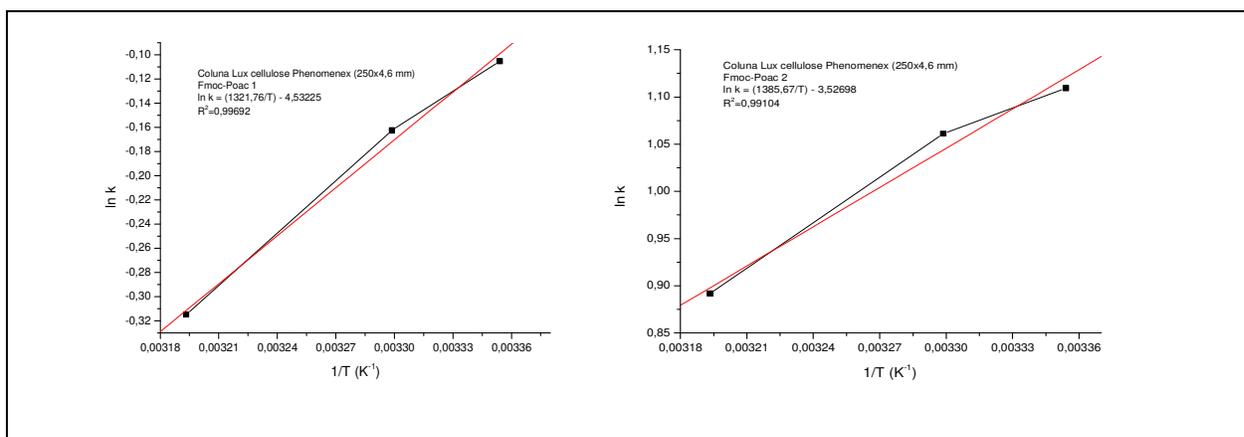


**Figura 24:** Perfis cromatográficos do Fmoc-POAC na concentração de 1 mg/mL, em coluna Lux Cellulose-2 Phenomenex<sup>®</sup>, em diferentes temperaturas.

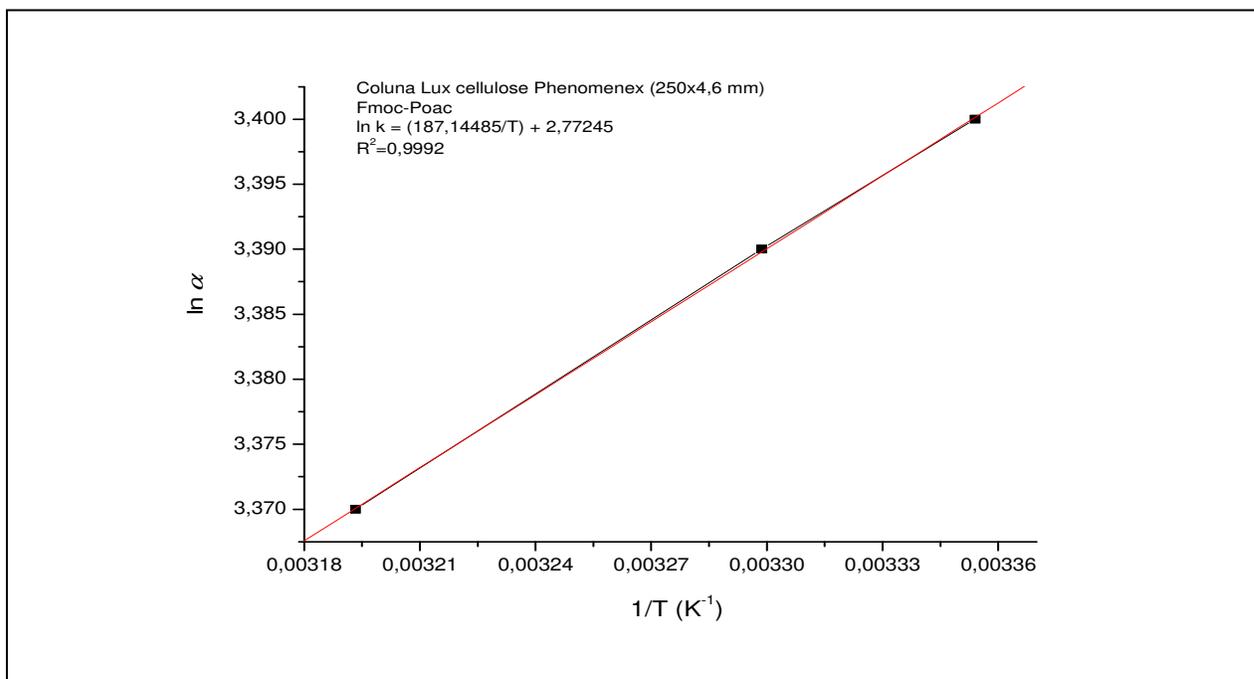
Esses parâmetros de  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  podem ser estimados a partir de uma útil aproximação através do gráfico de Van't Hoff (LINDNER *et al.*, 2004; WENG *et al.*, 2008; LÄMMERHOFER, 2010), o qual apresenta uma correlação linear com inclinação igual a  $\Delta H^\circ/R$  e intersecção igual a  $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$  para um gráfico  $\ln k$  vs.  $1/T$ , permitindo o cálculo dos parâmetros termodinâmicos na transferência global do soluto da fase móvel para a fase estacionária (WENG *et al.*, 2008; LÄMMERHOFER, 2010). A Figura 25 apresenta o gráfico  $\ln k$  vs.  $1/T$  para a obtenção dos valores da entalpia e a entropia de adsorção para ambos os enantiômeros de Fmoc-POAC. A Figura 26 apresenta o gráfico  $\ln \alpha$  vs.  $1/T$ , para a obtenção dos valores de  $\Delta \Delta H^\circ$  e  $\Delta \Delta S^\circ$ .

Os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ ) foram determinados pela Equação (37) através da relação linear entre  $\ln k$  vs.  $1/T$  (fator de retenção e temperatura absoluta, respectivamente) e apresentados na Tabela 9. A determinação dos parâmetros termodinâmicos torna-se uma aproximação útil para analisar os aspectos dos mecanismos de retenção e discriminação em fases estacionárias quirais, baseadas na formação de complexos diastereoisoméricos reversíveis, criados por interações intermoleculares dos enantiômeros com o seletor quiral. (LINDNER *et al.*, 2004; ROJKOVICOVÁ *et al.*, 2004; LINDNER *et al.*, 2004). A linearidade do gráfico  $\ln k$  vs.  $1/T$  para determinada faixa de temperatura sugere que a conformação da fase estacionária quiral não muda nessa faixa de temperatura estudada (WENG *et al.*, 2008).

$$\ln k = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} + \ln \phi = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \Delta S^* \quad (37)$$



**Figura 25:** Dependência do fator de retenção  $k$  com a temperatura para os enantiômeros do Fmoc-POAC



**Figura 26:** Dependência do fator de retenção  $\alpha$  com a temperatura para os enantiômeros do Fmoc-POAC

Os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta\Delta H^\circ$  e  $\Delta\Delta S^\circ$ ) foram determinados pela Equação (38) através da relação linear entre  $\ln \alpha$  vs.  $1/T$  (fator de separação e temperatura absoluta, respectivamente) e apresentados na Tabela 9.

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta\Delta G^\circ}{RT} = -\frac{\Delta\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta\Delta S^\circ}{R} \quad (38)$$

**Tabela 9:** Parâmetros termodinâmicos para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluido em coluna de fase normal, Lux cellulose-2 Phenomenex<sup>®</sup> (250x4,6 mm)

Enantiômero	$\Delta H^\circ$ (KJ/mol)	$\Delta S^\circ$ (J/mol)	$\Delta\Delta H^\circ$ (J/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/mol)
Fmoc-POAC $t_{R1}$	-11,01	-37,68	-458,72	8,65
Fmoc-POAC $t_{R2}$	-11,52	-29,32		

A retenção e reconhecimento quiral em fases estacionárias quirais é usualmente controlada entalpicamente, onde  $|\Delta H^\circ| > |\Delta S^\circ|$  e  $|\Delta\Delta H^\circ| > |\Delta\Delta S^\circ|$ , uma vez que os dois complexos diastereoisoméricos diferem no número de interações (duas ou três). (LOURENÇO *et al.*, 2010). A discriminação quiral ocorre quando há a predominância da entalpia ou da entropia, além de se considerar que a conformação da fase estacionária quiral não muda dentro da faixa de temperatura estudada quando o gráfico  $\ln \alpha$  vs.  $1/T$  apresenta características lineares (LOURENÇO *et al.*, 2010; LÄMMERHOFER, 2010). De acordo com Weng *et al.*, (2008), separações enantioméricas obtidas com os valores de  $\Delta\Delta H^\circ$  e  $\Delta\Delta S^\circ$  negativos indicam que a entalpia coordena a enantiosseparação, enquanto valores positivos indicam que a entropia que coordena.

De acordo com a pesquisa realizada, a fase estacionária quiral da coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), não apresentou alterações conformacionais para a faixa de temperatura de 25-40°C. Os fatores de retenção ( $K$ ) dos enantiômeros do Fmoc-POAC decrescem com o aumento de temperatura juntamente com os fatores de seletividade ( $\alpha$ ), apresentando resultados termodinâmicos peculiares para ensaios cromatográficos analíticos, os quais, geralmente, apresentam à predominância da entalpia em relação a entropia.

#### 4.1.6 Escala Semipreparativa

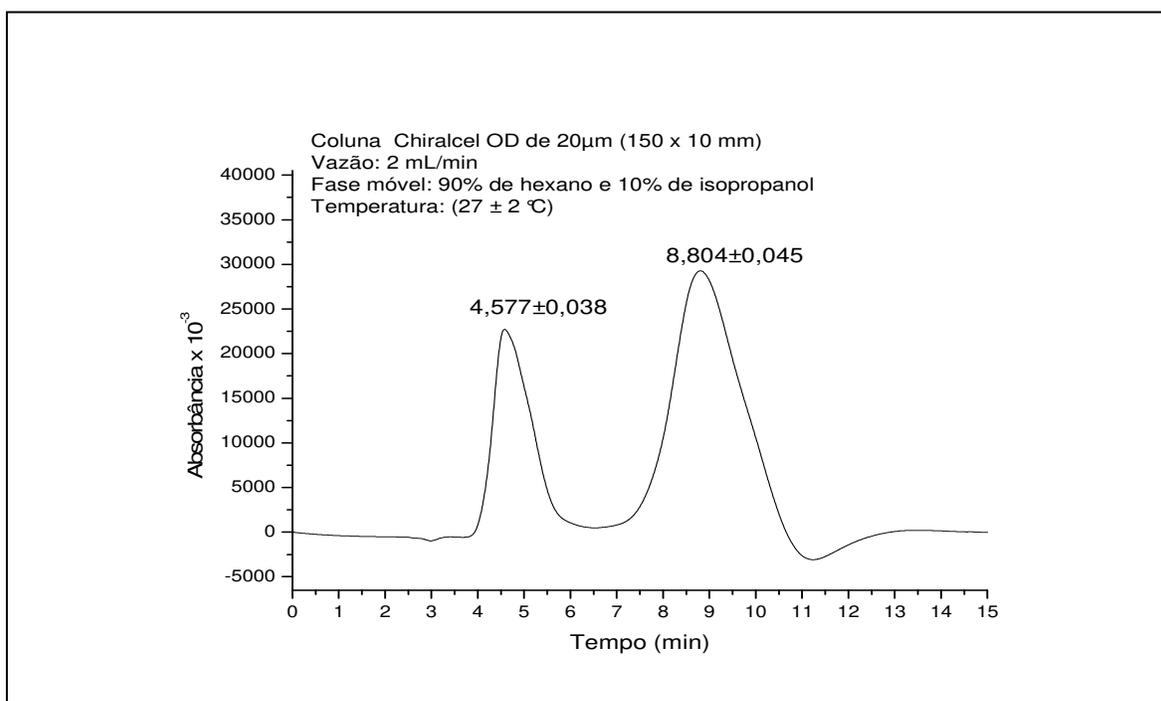
Foi utilizada uma coluna semipreparativa OD da Chiralcel<sup>®</sup>, 150x10 mm, tamanho de partícula igual a 20 $\mu$ m, conhecida comercialmente como OD, de fase estacionária normal composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. A utilização dessa fase estacionária foi baseada em ensaios experimentais realizados anteriormente com a coluna analítica Lux Cellulose-2, 250x4,6 mm, de fase estacionária normal, composta por tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose, a qual tem uma composição química muito próxima da fase estacionária da coluna OD.

Os resultados médios foram apresentados na Tabela 10 e o cromatograma de separação enantiomérica do Fmoc-POAC na Figura 27. A fase móvel utilizada foi composta de hexano e isopropanol na proporção 90:10 (v:v) devido aos bons resultados de separação em escala analítica com a fase estacionária da coluna Lux Cellulose-2, composta por tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose, muito similar com a fase estacionária da coluna OD, composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. Os resultados de resolução ( $R_S$ ) apresentados na Tabela 10 confirmam a fase estacionária normal composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose como uma opção para a obtenção dos enantiômeros do Fmoc-POAC em escala semipreparativa, utilizando a fase móvel composta por hexano e isopropanol. A separação enantiomérica do Fmoc-POAC nesta coluna teve resoluções menores do que as obtidas em coluna analítica de fase estacionária normal Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), embora todos os resultados foram maiores que 1,5. O aumento do tamanho da partícula aumenta o alargamento dos picos e conseqüentemente, diminuição da resolução (GUIOCHON, 2002; COLLINS *et al.*, 2006), por tanto, acredita-se que o aumento de escala e o aumento do tamanho da partícula da fase estacionária OD (150x10 mm) em relação a coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm) influenciou na diminuição da resolução do composto Fmoc-POAC.

De acordo com Collins *et al.*, (2006), valores de  $R_S \geq 1,5$ , indicam uma separação completa dos compostos em uma coluna cromatográfica. Analisando os resultados deste estudo, apresentados na Tabela 10, observa-se que ocorreu a completa separação quiral dos enantiômeros do composto Fmoc-POAC na coluna analítica OD (450x10 mm).

**Tabela 10:** Eficiência da separação enantiomérica do Fmoc-POAC em diferentes vazões de fase móvel na coluna OD, 150x10 mm, para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, índices 1 e 2, respectivamente.

Vazão (mL/min)	$t_{R1}$	$t_{R2}$	$t_M$	$\alpha$	$K_1$	$K_2$	$R_s$
1,500	6,302	12,083	3,996	3,507	0,577	2,024	1,738
1,750	5,385	10,248	3,431	3,490	0,569	1,987	1,754
2,000	4,648	8,874	3,007	3,575	0,546	1,951	1,967
3,000	3,107	5,994	1,995	3,596	0,557	2,005	1,860
4,000	2,349	4,551	1,503	3,603	0,563	2,028	1,796



**Figura 27:** Perfil cromatográfico da separação enantiomérica do Fmoc-POAC, na concentração de 0,5 mg/mL, com injeção de 100  $\mu$ L, fase móvel composta de hexano e isopropanol na proporção 90:10 (v/v), em coluna OD, 150x10 mm, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C).

Com os picos cromatográficos do Fmoc-POAC bem definidos, é necessário a confirmação da separação enantiomérica através da caracterização do pico cromatográfico (COLLINS *et al.*, 2006), portanto, foram recuperados esses compostos separados pela coluna OD (150x10 mm) e injetados na coluna Lux Cellulose-2 (250x4,6 mm), a qual, em

ensaios experimentais anteriores, já foi definido um protocolo de separação e caracterização do Fmoc-POAC, chegando a conclusão que os compostos separados pela coluna OD (150x10 mm) são os enantiômeros do Fmoc-POAC e os enantiômeros ( $t_{R1}$ ) e ( $t_{R2}$ ) eluídos são os enantiômeros Fmoc-POAC (+) (3R, 4R) e Fmoc-POAC (-) (3S, 4S), respectivamente.

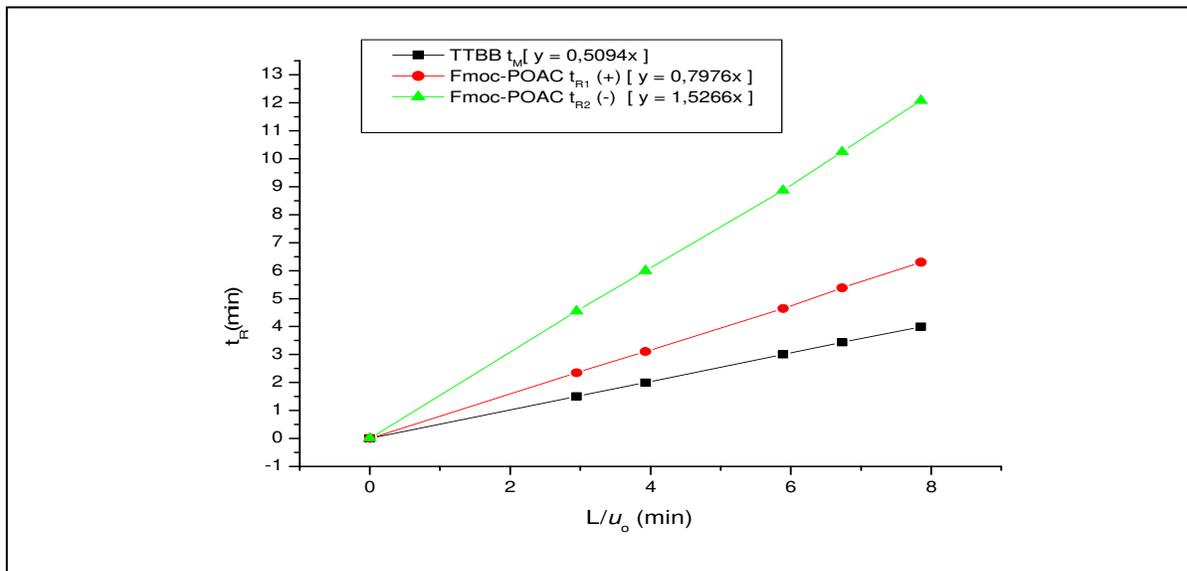
De acordo com Péter *et al.*, (2003), foi estudada a separação cromatográfica do marcador molecular Fmoc-POAC, eluído por hexano, isopropanol e etanol, em diferentes proporções, na coluna da Chiralcel<sup>®</sup> OD-H, com partículas de 5  $\mu\text{m}$ , tamanho de 150x4,6 mm, conhecida comercialmente como OD-H em fase estacionária normal composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. Os resultados desses autores foram perfis cromatográficos sem linha de base, com todos valores de resolução abaixo de 1,5.

De posse dos tempos de retenção ( $t_R$ ) e tempo morto ( $t_M$ ) apresentados na Tabela 10 para a coluna OD (150x10 mm), pode-se calcular a porosidade total da coluna ( $\varepsilon_T$ ), a porosidade do leito ( $\varepsilon$ ) e os coeficientes de partição ( $K_P$ ) dos enantiômeros entre a fase estacionária e fase móvel de acordo com Cremasco *et al.*, (2001). A inclinação da reta do gráfico  $t_M$  vs.  $L/u_0$  é igual a porosidade total da coluna ( $\varepsilon_T$ ), conhecido como o primeiro momento, definida pela Equação (23) e onde  $L$  é o comprimento da coluna,  $u_0$  é a velocidade superficial da coluna,  $t_M$  é o tempo de detecção da substância inerte. Segundo Ruthven (1984), a porosidade da partícula ( $\varepsilon_P$ ) é, aproximadamente, 0,45 e com a correlação (36), calcula-se a porosidade total com a porosidade do leito e da partícula. Portanto, a porosidade do leito prevista através da correlação de Ruthven (1984) para a coluna semipreparativa OD, da Chiralcel<sup>®</sup>, 20 $\mu\text{m}$ , 150x10 mm, conhecida comercialmente como OD, de fase estacionária normal composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose é igual a 0,108.

$$t_R = \left[ \varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p \right] \cdot \frac{L}{u_0} = \varepsilon_T \cdot \frac{L}{u_0} \quad (20)$$

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p \quad (24)$$

De acordo com Cremasco *et al.*, (2000), utilizando os resultados apresentados na Tabela 10, podemos obter a constante de equilíbrio ( $K_P$ ), calculando a inclinação da reta do gráfico  $t_R$  vs.  $L/u_0$  para os enantiômeros, definida pela Equação (23), Figura 28.

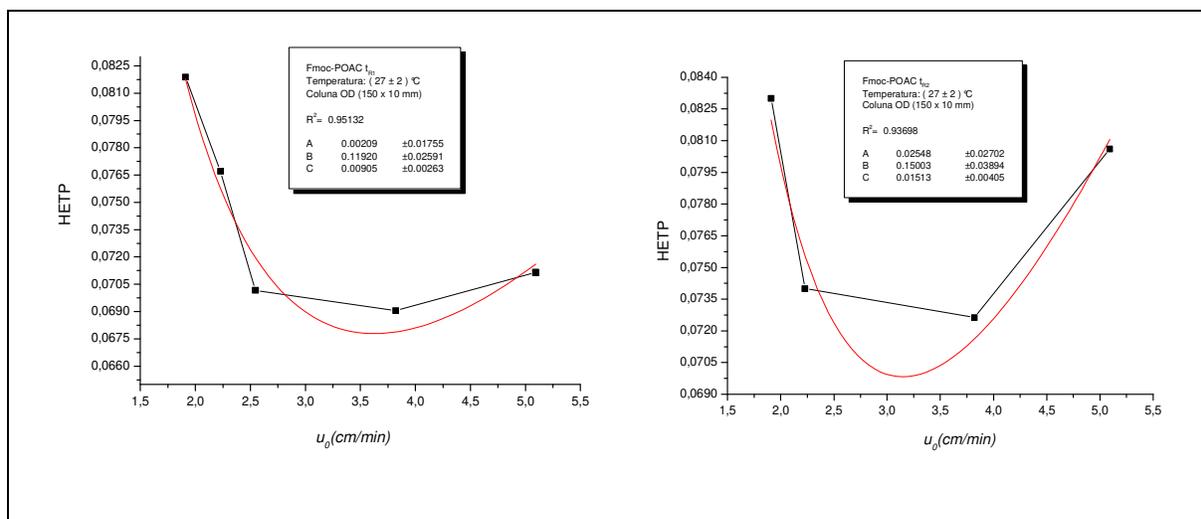


**Figura 28:** Gráfico  $t_R$  vs.  $L/u_0$  para o composto inerte ( $t_M$ ), primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero do Fmoc-POAC eluído, em coluna semipreparativa OD, 150x10 mm, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C).

Os parâmetros de transferência de massa e coeficientes de dispersão axial da coluna cromatográfica podem ser avaliados pela altura equivalente de um prato teórico (HETP), a qual é definida pela Equação (22) de acordo com a equação de Van Deemter de acordo com Ruthven (1984); Böcker *et al.* (2002); Da Silva Jr. *et al.* (2005), onde HETP depende do coeficiente de dispersão axial ( $D_L$ ), o coeficiente global de transferência de massa ( $K_m$ ), velocidade intersticial ( $u$ ) e a constante de equilíbrio ( $K_P$ ) de acordo com Cremasco *et al.* (2001). O HETP pode ser calculado pelo gráfico HETP vs.  $u_0$ , conhecido como gráfico de Van Deemter, onde podemos apresentar uma nova equação para o HETP, Equação (32). A Figura 29 apresenta a curva de Van Deemter para os enantiômeros do Fmoc-POAC.

**Tabela 11:** Número de pratos ( $N$ ) e altura equivalente para um prato teórico (HETP) para a separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC em diferentes vazões, utilizando a coluna semipreparativa OD, 150x10 mm, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C), 20 $\mu$ m para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, índices 1 e 2, respectivamente

Vazão (mL/minutos)	$u_o$ (cm/minutos)	$N_1$	$N_2$	$HETP_1$	$HETP_2$
1,5	1,91	125 $\pm$ 3,20	121 $\pm$ 1,98	0,07985 $\pm$ 0,00204	0,083 $\pm$ 0,00136
1,75	2,228	129 $\pm$ 1,15	127 $\pm$ 10,41	0,0774 $\pm$ 0,00069	0,07932 $\pm$ 0,00652
2	2,546	154 $\pm$ 11,67	161 $\pm$ 9,56	0,06522 $\pm$ 0,00495	0,06205 $\pm$ 0,00367
3	3,82	145 $\pm$ 0,02	126 $\pm$ 11,97	0,06905 $\pm$ 0,00001	0,07998 $\pm$ 0,00762
4	5,093	144 $\pm$ 3,46	124 $\pm$ 5,82	0,06949 $\pm$ 0,00167	0,08061 $\pm$ 0,00377



**Figura 29:** Gráfico de Van Deemter para os enantiômeros do Fmoc-POAC na coluna semipreparativa OD, 150x10 mm, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C), para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, índices  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$ , respectivamente.

As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados de transferência de massa do Fmoc-POAC na coluna OD (150x10 mm), onde os parâmetros  $K_m$ ,  $D_P$  e  $K_f$  foram calculados a partir do gráfico de Van Deemter e as Equações (35), (26) e (25). Os valores de  $K_f$  foram cerca de 10 vezes maiores que os valores obtidos para  $D_P$  para o primeiro enantiômero eluido ( $t_{R1}$ ) e na mesma grandeza para o segundo enantiômero eluido ( $t_{R2}$ ).

**Tabela 12:** Parâmetros de Van Deemter e transferência de massa para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna semi-preparativa OD da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 150x10 mm, partículas de 20 $\mu$ m, de fase estacionária normal composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) em celulose, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ ) °C, para o primeiro e segundo enantiômero eluidos, índices  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$ , respectivamente.

Fmoc-POAC	$D_L$ ( $cm^2/min$ )	$K_P$	$K_m$ ( $min^{-1}$ )	A	B	C
$t_{R1}$	$0,0596+0,00104*u_0$	0,59	36,74	$0,0209\pm 0,01755$	$0,11920\pm 0,02591$	$0,00905\pm 0,00263$
$t_{R2}$	$0,07501+0,01274*u_0$	2,07	6,45	$0,02548\pm 0,02702$	$0,15003\pm 0,03894$	$0,01513\pm 0,00405$

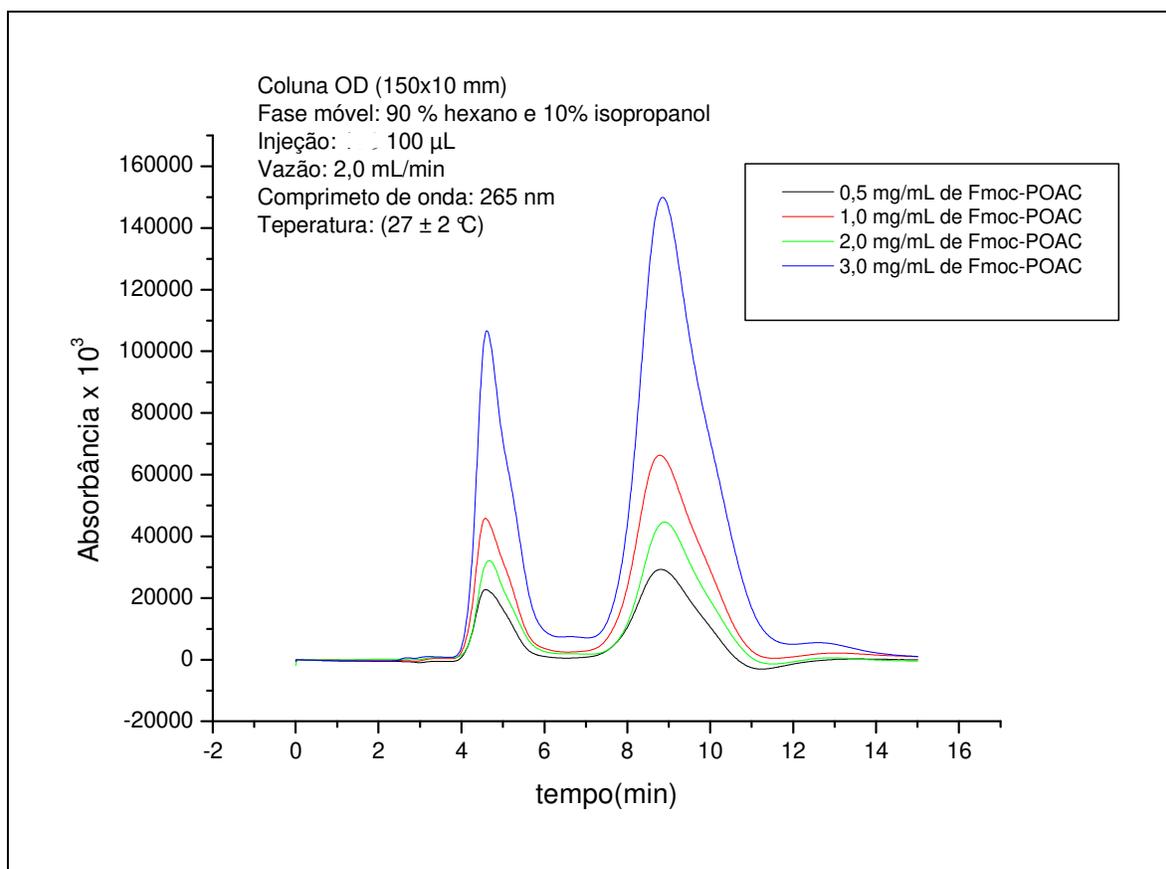
**Tabela 13:** Coeficientes de transferência de massa para para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna semi- preparativa OD da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 150x10 mm, partículas de 20 $\mu$ m, de fase estacionária normal composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) em celulose, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ ) °C.

Fmoc-POAC	$K_m$ ( $s^{-1}$ )	$1/K_m$ (s)	$D_m$ ( $cm^2/s$ )	$Bi_M$	$D_P$ ( $cm^2/s$ )	$K_f$ ( $cm.s^{-1}$ )	$Re$
$t_{R1}$	0,525	1,906	0,0000283	15,78	$5,3.10^{-6}$	$4,38.10^{-5}$	0,0004<Re<0,0011
$t_{R2}$	0,115	8,707	0,0000283	0,98		$0,98.10^{-5}$	

De acordo com a Tabela 12, a resistência a transferência de massa é diferente para os enantiômeros do Fmoc-POAC. O primeiro enantiômero eluido, Fmoc-POAC ( $t_{R1}$ ), tem uma resistência global de transferência de massa menor que o segundo enantiômero eluido Fmoc-POAC ( $t_{R2}$ ) devido a menor atração desse enantiômero pela fase estacionária quiral. De acordo com o valor do  $Bi_M$ , igual a 15,78, o Fmoc-POAC ( $t_{R1}$ ) apresenta uma tendência de migrar dentro dos poros das partículas e também de migrar externamente à partícula, fenômeno chamado de resistência a transferência de massa misto. Mas os valores 10 vezes maiores de  $K_f$  em relação ao  $D_P$  para o Fmoc-POAC ( $t_{R1}$ ) leva considerar que as partículas do Fmoc-POAC ( $t_{R1}$ ) são eluidos mais pelo caminho externo das partículas no leito fixo. De acordo com o valor do  $Bi_M$  igual a 0,98 para o Fmoc-POAC ( $t_{R2}$ ), esse enantiômero apresenta uma resistência à transferência de massa interna nos poros das partículas desprezível em relação a resistência externa à partícula. De acordo com essa pesquisa ,

acredita-se que a resistência interna e externa rege a transferência de massa para o primeiro enantiômero, Fmoc-POAC ( $t_{R1}$ ), e apenas a externa para o segundo enantiômero, Fmoc-POAC ( $t_{R2}$ ), devido ao maior tamanho das partículas do leito fixo empacotado para colunas cromatográficas de alta eficiência, com partículas de  $20\mu\text{m}$ .

Foram realizados ensaios cromatográficos de sobrecarga do Fmoc-POAC na coluna semipreparativa OD,  $150 \times 10$  mm,  $20\mu\text{m}$ , da Chiralcel<sup>®</sup>, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ ) °C. Foi injetado  $100\mu\text{L}$  em diferentes concentrações, na vazão de 2 mL/minuto, apresentado na Figura 30. A massa máxima injetada nos ensaios foi de 0,3 mg de Fmoc-POAC.



**Figura 30:** Cromatograma da separação enantiomérica do Fmoc-POAC em diferentes concentrações na coluna semipreparativa OD,  $150 \times 10$  mm em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$ ) °C na vazão de 2 mL/minutos.

## 4.2 Coluna de Fase Reversa

Foram estimados os parâmetros cromatográficos de separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC e calculados os efeitos de transferência de massa do seus enantiômeros em coluna analítica da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 150x4,6 mm, com partículas de 5µm, conhecida comercialmente OD-RH, composta pela fase estacionária reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. Uma aplicação dessa separação cromatográfica analítica foi feita em escala semipreparativa com a coluna da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 250x21 mm, com partículas de 5µm, conhecida comercialmente OD-RH, composta pela fase estacionária reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. Uma discussão dos resultados foi feita de acordo com a bibliografia consultada, além da confirmação da capacidade de separação cromatográfica dos enantiômeros do composto Fmoc-POAC com o seletor quiral utilizado nessas colunas.

### 4.2.1 Análise da Separação Cromatográfica do Fmoc-POAC

Foi utilizada a coluna analítica OD-RH da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 150x4,6 mm, com partículas de 5µm, conhecida comercialmente OD-RH, composta pela fase estacionária reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. Foram realizados ensaios cromatográficos em duplicata em diferentes proporções dos eluentes acetonitrila e solução de 0,1% de acetato de trietilamônio (TEAA) com pH ajustado em 3,5 para estimar os melhores parâmetros cromatográficos e uma melhor resolução desse enantiômero. Foi utilizado o método de eluição isocrática, com uma separação pelo método direto, além da determinação dos parâmetros de transferência de massa do Fmoc-POAC na coluna quiral utilizada. O Fmoc-POAC foi injetado na concentração de 0,5 mg/mL, temperatura ambiente 27±2°C e detecção de 220 nm. Os resultados médios foram apresentados na Tabela 14 e o cromatograma de separação na Figura 31.

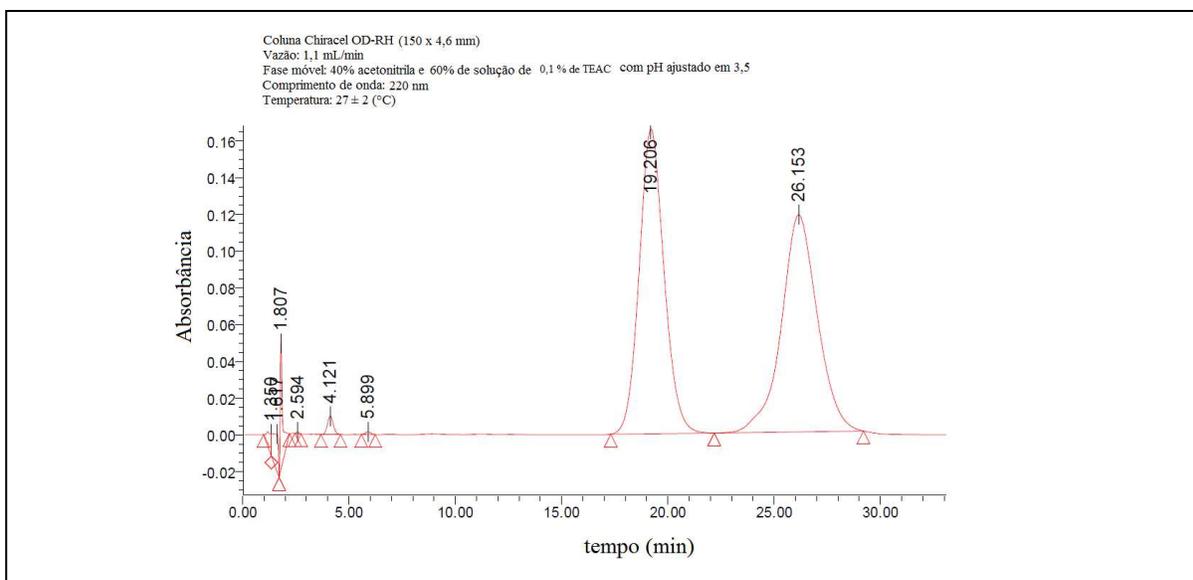
De acordo com Collins *et al.*, (2006), para valores de  $R_S \geq 1,5$ , indicam uma separação completa dos compostos em uma coluna cromatográfica. Utilizando os resultados de separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC de dessa pesquisa, apresentados na Tabela 14, foi observado a separação enantiomérica desse composto na fase móvel 40% de acetonitrila e 60 de solução de 0,1% de TEAA, com pH

ajustado em 3,5, utilizando a coluna OD-RH (150x4,6 mm) de fase estacionária normal composta de tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose.

Quando os compostos ácidos sofrem ionização, em cromatografia de fase reversa, diminuem significativamente seu tempo de retenção na fase estacionária, passando de espécies neutras para espécies com carga e tornando-se menos hidrofóbicas, e conseqüentemente diminuem seu o fator de retenção ( $K$ ) (COLLINS *et al.*, 2006). O Fmoc-POAC é um composto ionizável, com características anfóteras, podendo comportar com ácido ou base, de acordo com a acidez do solvente em que está diluído. Quando diminui o pH da fase móvel, acredita-se que o Fmoc-POAC permanecerá na sua forma não ionizável e aumentou sua retenção na fase estacionária.

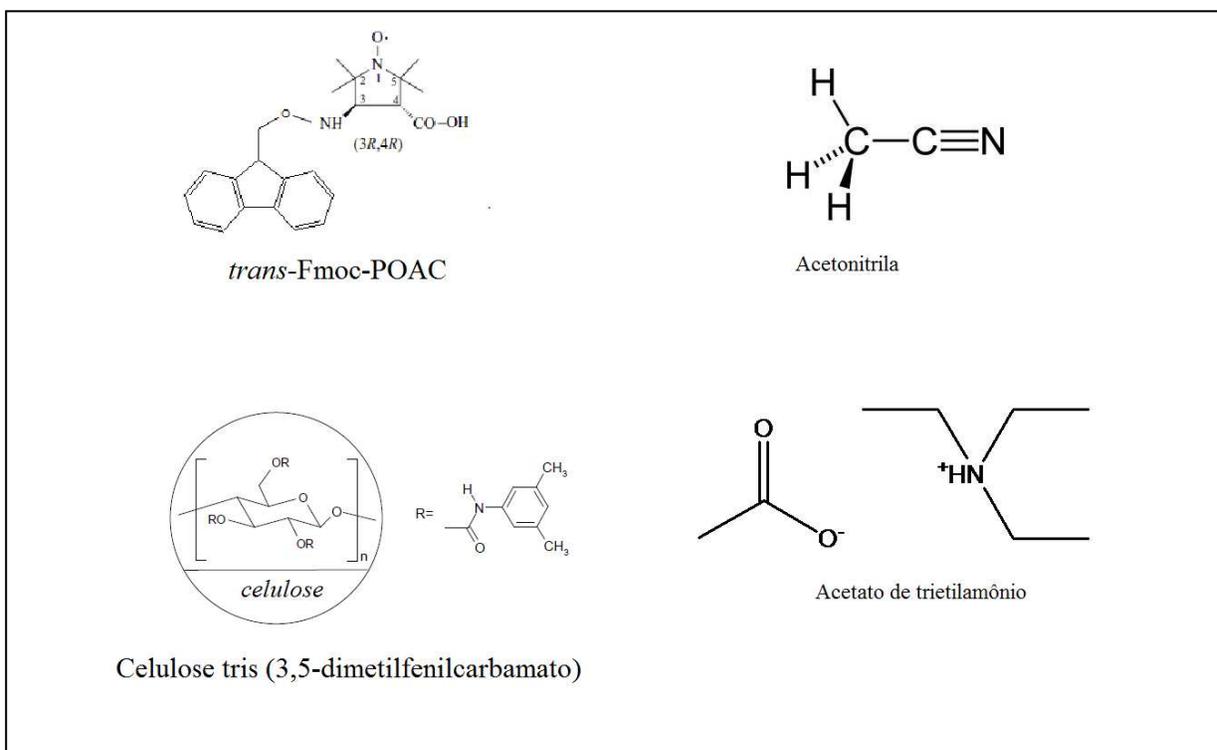
**Tabela 14:** Tempo de retenção ( $t_R$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), fator de retenção ( $K$ ) e resolução ( $R_s$ ) para o primeiro e segundo enantiômero do Fmoc-POAC, índices de 1 e 2 respectivamente, em diferentes fases móveis na coluna OD-RH (150x4,6 mm), vazão 1,3 mL/min e detecção no comprimento de onda 220 nm

Acetonitrila:TEAA pH 3,5 (v:v)	$t_{R1}$	$t_{R2}$	$\alpha$	$K_1$	$K_2$	$R_s$
50:50	-	-	-	-	-	-
40:60	16,144±0,011	21,96±0,013	1,399±0,000	9,78±0,01	13,69±0,01	1,27±0,10
30:60	-	-	-	-	-	-



**Figura 31:** Cromatograma da separação quiral do Fmoc-POAC na concentração de 0,5 mg/mL, injeção de 20  $\mu$ L, em coluna OD-RH (150x4,6 mm).

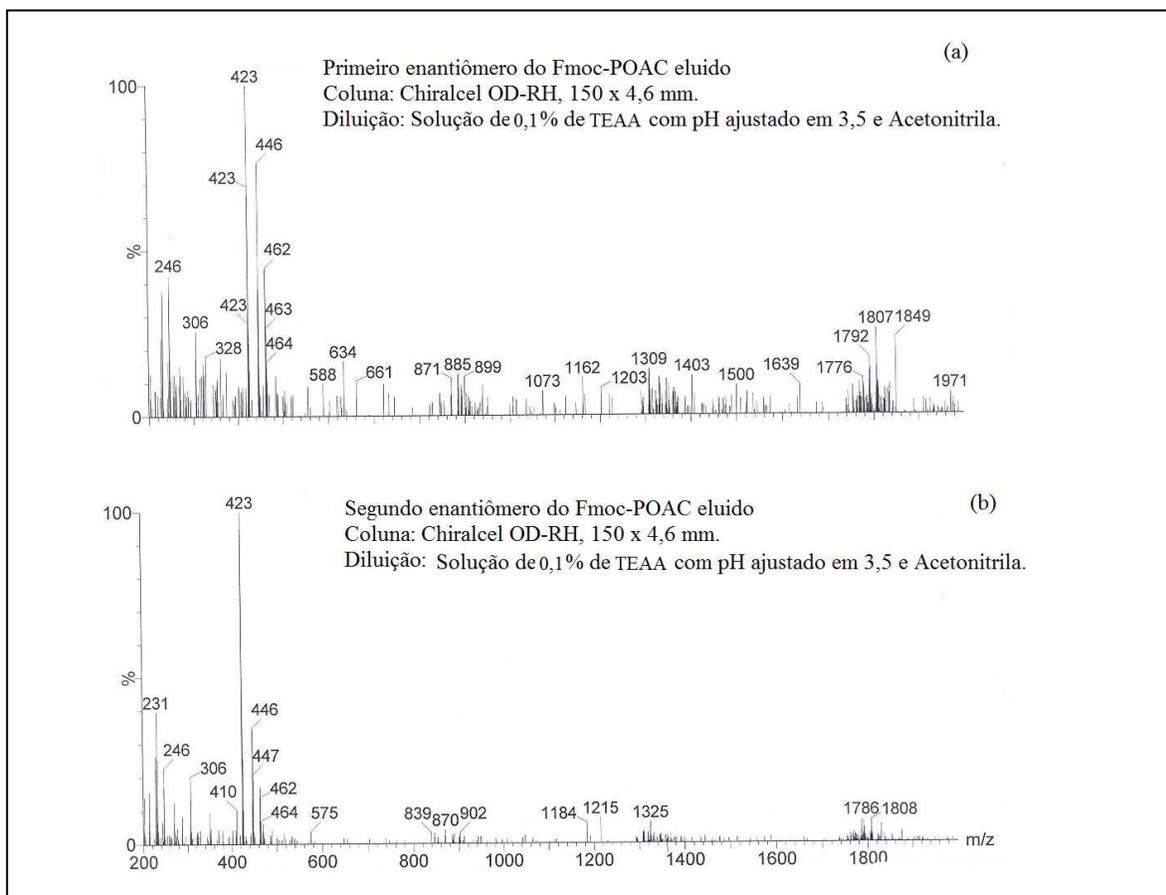
As estruturas químicas dos compostos utilizados como fase móvel, fase estacionária e analito estão na Figura 32. A estrutura quiral possui diferentes sítios de ligações que atribuem à fase estacionária uma seletividade e retenção de um número razoavelmente grande de compostos quirais. Os átomos de oxigênio e nitrogênio, presentes na estrutura da FEQ, conferem a formação de ligações de hidrogênio. A existência do fenil na estrutura do polímero constitui as interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ . A estrutura linear da celulose confere os efeitos estereoespecíficos, além da formação dos complexos de inclusão, decorrente do encaixe da porção aromática do analito na cavidade quiral da fase estacionária. (ali *et al.*, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2010).



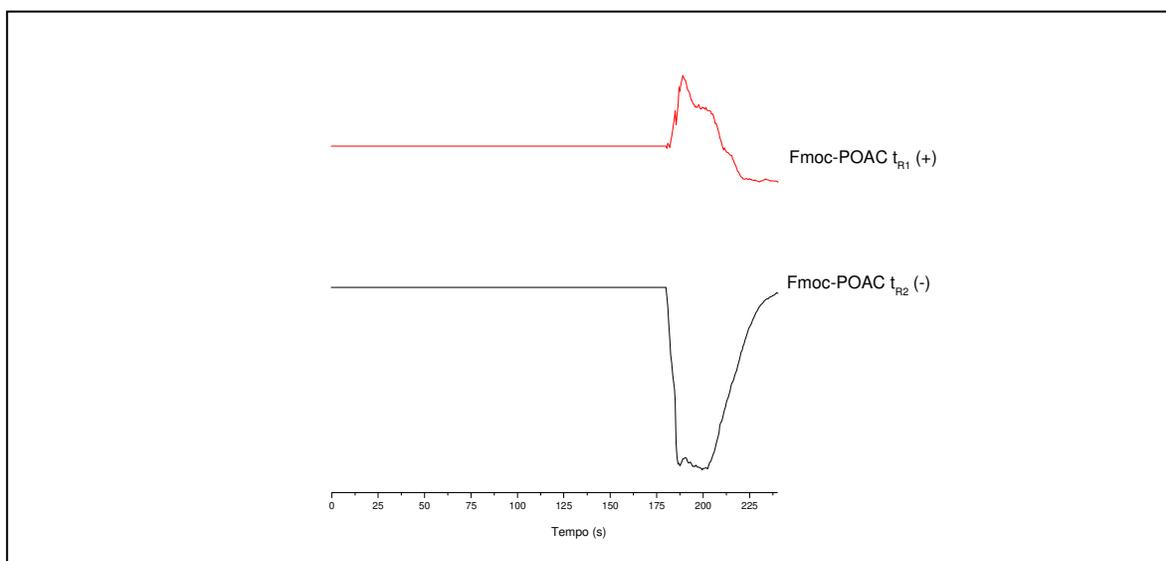
**Figura 32:** Estrutura química dos compostos Fmoc-POAC, tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, acetonitrila e acetato de trietilamônio.

#### 4.2.2 Confirmação da separação dos enantiômeros

De acordo com resultados obtidos, os picos cromatográficos, através do método CLAE, apresentam uma boa resolução na separação cromatográfica do Fmoc-POAC, tornando-se necessário a confirmação da separação enantiomérica através da sua caracterização (COLLINS *et al.*, 2006). Foram recuperados os compostos responsáveis por cada pico cromatográfico e caracterizados por dicroísmo e espectrometria de massa e infravermelho. A Figura 33 apresenta os resultados do espectro de massa e a Figura 34 apresenta os resultados do dicroísmo circular para os enantiômeros.



**Figura 33:** Espectro de massa dos enantiômeros do Fmoc-POAC em espectrofotômetro de massa (LC-MS), a) primeiro composto do Fmoc-POAC eluido, b) segundo composto do Fmoc-POAC eluido.



**Figura 34:** Resultado do dicroísmo para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna OD-RH (150x4,6 mm).

O Fmoc-POAC é um composto com massa molecular igual 423g/mol, com fórmula química  $C_{24}H_{27}O_5N_2$ . De acordo com a Figura 33, ambos os compostos eluidos tiveram uma massa molecular igual a 423g/mol e portanto foram considerados como isômeros. De acordo com a Figura 34, os compostos do Fmoc-POAC eluidos em diferentes tempos, desviaram a luz plano polarizada e portanto, além de serem isômeros, foram considerados como enantiômeros. O primeiro enantiômero eluido considera-se como o composto positivo (+) e o segundo enantiômero eluido como o composto negativo (-). Esse resultado é similar aos obtidos por Peter *et al.*, (2003), utilizando a mesma fase estacionária, obteve a mesma ordem de eluição dos enantiômeros do Fmoc-POAC na fase móvel acetonitrila e solução salina de KPF<sub>6</sub>.

Wright *et al.*, (2008) realizou a primeira caracterização completa do Fmoc-POAC através do dicroísmo circular e difração de raio X. Esses autores afirmaram que o enantiômero (+)(3R,4R)-Fmoc-POAC-Binaftol tem uma solubilidade sensivelmente menor em solventes não polares em relação ao enantiômero (-)(3S,4S)-Fmoc-POAC-Binaftol, além de obter a configuração completa do Fmoc-POAC. Extrapolando esses resultados para os resultados obtidos nesse trabalho, o primeiro enantiômero eluido na coluna OD-RH (150x4,6 mm) de fase estacionária normal composta de tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, utilizando a fase móvel 40% de acetonitrila e 60 de solução de 0,1% de TEAA, com pH ajustado em 3,5, foi o enantiômero (+)(3R,4R)-Fmoc-POAC.

Enantiômeros puros não apresentam diferenças físico-químicas como solubilidade, polaridade, mas diastereoisômeros ou enantiômeros que não estão totalmente puros, não características físico-químicas iguais (SOLOMOS, 2000; ELIEL *et al.*, 1994). De acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa, os enantiômeros não estão puros enantiomericamente, mas sim enriquecidos enantiomericamente, devido a diferenças de solubilidade dos enantiômeros.

#### 4.2.3 Parâmetros de Transferência de Massa do Fmoc-POAC

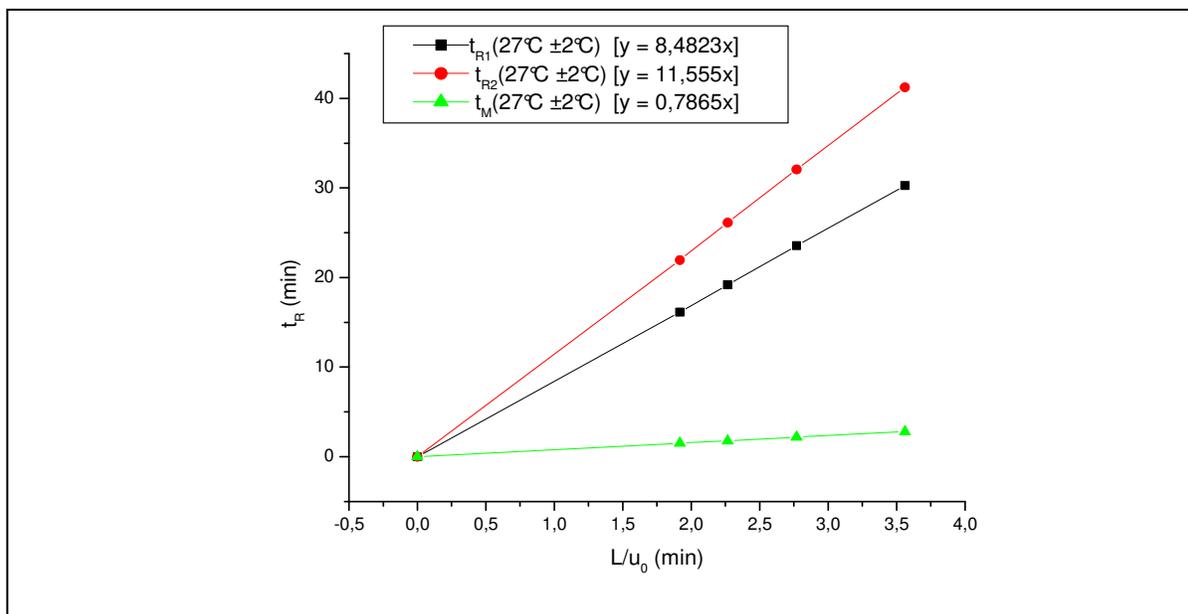
Foi utilizada a coluna analítica OD-RH da Chiralcel®, com partículas de 5µm, tamanho de 150x4,6 mm, conhecida comercialmente como OD-RH, composta pela fase estacionária

reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. O estudo de transferência de massa do marcador molecular foi realizado nas condições isocráticas, com os eluentes, acetonitrila e solução de 0,1% de acetato de trietilamônio (TEAA), com pH ajustado em 3,5, na proporção 40:60 (v/v), respectivamente. Essa fase móvel foi escolhida devido aos melhores resultados obtidos quando usada na separação enantiomérica do Fmoc-POAC. Os ensaios cromatográficos foram feitos em duplicatas em diferentes vazões, com o Fmoc-POAC na concentração de 0,5 g/L, temperatura ambiente ( $27\pm 2^\circ\text{C}$ ) e detecção de 220 nm. Os resultados médios da separação quiral foram apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15:** Tempo de retenção do Fmoc-POAC ( $t_R$ ), número de pratos ( $N$ ), altura equivalente de um prato teórico ( $HETP$ ), tempo de retenção da substância inerte ( $t_M$ ) para o Fmoc-POAC em coluna OD-RH (150x4,6 mm), índices de 1 e 2 para o primeiro e segundo enantiômero, respectivamente.

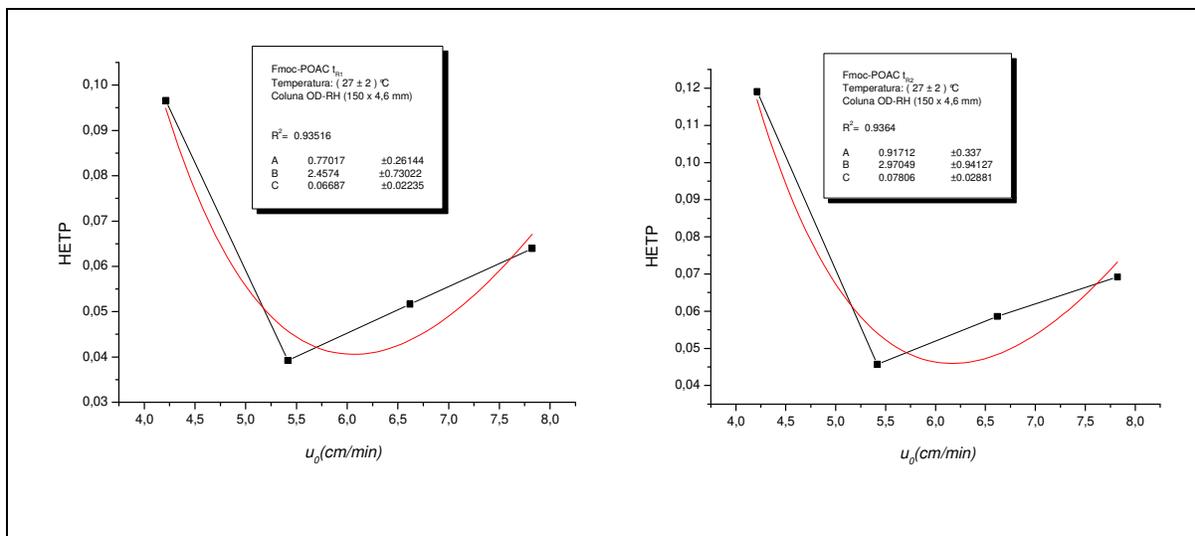
Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Vazão (mL/min)	$t_{r1}$ (min)	$t_{r2}$ (min)	$t_M$ (min)	$N_1$	$N_2$	$HETP_1$	$HETP_2$
27 $\pm$ 2	0,7	30,261	41,246	2,8	155,272	125,963	0,09661	0,11908
27 $\pm$ 2	0,9	23,541	32,066	2,18	382,293	327,925	0,03924	0,04574
27 $\pm$ 2	1,1	19,185	26,127	1,78	347,611	301,775	0,04315	0,04971
27 $\pm$ 2	1,3	16,144	21,96	1,51	234,607	216,78	0,06394	0,0692

De acordo com Cremasco *et al.* (2001), com a inclinação da reta do gráfico  $t_M$  vs.  $L/u_0$  podemos obter a porosidade total ( $\epsilon_T$ ), definida pela Equação (20), onde  $L$  é o comprimento da coluna,  $u_0$  é a velocidade superficial da coluna,  $t_M$  é o tempo de detecção da substância inerte. Considerando-se a inclinação da reta do gráfico  $t_R$  vs.  $L/u_0$  para os enantiômeros, podemos obter a constante de equilíbrio ( $K_P$ ), apresentada na Tabela 16, definida pela Equação (23). Segundo Ruthven (1984), a porosidade da partícula ( $\epsilon_P$ ) é, aproximadamente, 0,45 e a Correlação (24), correlaciona a porosidade total com a porosidade do leito e da partícula. Portanto, de acordo com a Figura 35, a porosidade do leito prevista através da correlação de Ruthven (1984) para a coluna analítica OD-RH, 5 $\mu\text{m}$ , 150x4,6 mm, da Chiralcel<sup>®</sup>, composta pela fase estacionária reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, é igual a 0,6118.



**Figura 35:** Gráfico  $t_R$  vs.  $L/u_0$  para o composto inerte ( $t_M$ ), primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluído do Fmoc-POAC na coluna analítica de fase reversa OD-RH (150x4,6 mm).

Os parâmetros de transferência de massa e coeficientes de dispersão axial da coluna cromatográfica podem ser avaliados pela altura equivalente de um prato teórico (HETP), a qual é definida pela Equação (21) de acordo com a equação de Van Deemter apresentado por Ruthven (1984); Böcker *et al.* (2002); Da Silva Jr. *et al.* (2005), onde HETP depende do coeficiente de dispersão axial ( $D_L$ ), o coeficiente de transferência de massa ( $K_m$ ), velocidade intersticial ( $u$ ) e a constante de equilíbrio ( $K_P$ ) de acordo com Cremasco *et al.* (2001). O HETP pode ser calculado pelo gráfico HETP vs.  $u_0$ , conhecido como gráfico de Van Deemter, onde podemos apresentar uma nova equação para o HETP, Equação (29). A Figura 36 apresenta a curva de Van Deemter para os enantiômeros do Fmoc-POAC.



**Figura 36:** Gráfico de Van Deemter para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluído do Fmoc-POAC na coluna OD-RH (150x4,6 mm), temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C) e detecção no comprimento de onda 220 nm.

Os termos A, B e C da Equação de Van Deemter, Equação (29) são coeficientes empíricos (GUIOCHON, 2002). O primeiro termo A, Equação (30), refere-se ao alargamento dos picos devidos aos caminhos tortuosos seguidos pelas moléculas da amostra, que descreve o efeito da difusão turbilhonar. Para minimizar este termo é necessário usar colunas com diâmetros internos pequenos, bem recheados e partículas com tamanho pequeno e uniforme. O termo B, Equação (31), está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel, conhecida como difusão longitudinal. O termo C, Equação (32), é uma função dos efeitos de transferência de massa do soluto entre as fases móveis e estacionárias (COLLINS *et al.*, 2006). De acordo com Guiochon *et al.* (1994) e Da Silva Jr. *et al.* (2005), considera-se que a dispersão axial resulta de dois mecanismos diferentes, difusão molecular e difusão turbilhonar. Como primeira aproximação, estes efeitos se somam de forma que o coeficiente de dispersão axial ( $D_L$ ) seja representado pela Equação (28). A Tabela 16 apresenta os parâmetros de transferência de massa calculados a partir da Equação (32) utilizando o gráfico de Van Deemter.

**Tabela 16:** Parâmetros de transferência de massa para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna OD-RH (150x4,6 mm).

Fmoc-POAC	T(°C)	$D_L$ (cm <sup>2</sup> /min)	$K_p$ (min <sup>-1</sup> )	$K_m$ (min <sup>-1</sup> )	A	B	C
$t_{R1}$	27	1,345+0,425 $u_0$	36,04	1,10	0,85084 ± 0,111	2,68973 ± 0,312	0,07316 ± 0,009
$t_{R2}$	27	1,606+0,500 $u_0$	50,43	0,69	1,00129 ± 0,180	3,21288 ± 0,505	0,08462 ± 0,015

O  $K_p$  está relacionado proporcionalmente as interações químicas dos enantiômeros com a fase estacionária reversa tris-(2,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. O  $K_p$  influencia nas forças de atração e repulsão, como ligações de hidrogênio ou interações  $\pi$ - $\pi$ , dos enantiômeros do Fmoc-POAC e a fase estacionária. O Fmoc-POAC ( $t_{R2}$ ) teve uma maior interação com a fase estacionária e conseqüentemente uma valor de  $K_p$

De acordo com a fórmula química do Fmoc-POAC, sua massa molecular é igual 423g/mol. Sabe que a resistência a transferência de massa global ( $1/k_m$ ) é composto por 2 mecanismos separados de transferência de massa, resistência a transferência de massa interna e externa, apresentado pela Equação (25), onde  $d_p$  é o diâmetro da partícula,  $D_p$  é o coeficiente de difusão do poro e  $K_f$  é o coeficiente de transferência de massa externo. (MA, Z.; WANG, N. H. L., 1997).

Podem-se diferenciar esses dois mecanismos de resistências por intermédio do número de Biot mássico ( $Bi_M$ ), o qual é definido pela Equação (27). Valores de  $Bi_M$  tendendo a zero, considera-se que o processo que rege a transferência de massa está situado externamente ao meio onde há o fenômeno difusivo e a resistência interna é desprezível em face a externa. Em condições que o  $Bi_M$  tendendo ao infinito ou com valores maiores que 50, diz-se que a resistência externa ao fenômeno de transferência de massa é desprezível em face ao fenômeno difusivo interno e o fenômeno que rege a transferência de massa é a transferência interna (CREMASCO, 2002).

O  $K_f$  pode ser obtido pela Correlação (28) de Wilson e Geankoplis (1996), a qual é valida para sistemas líquidos com a limitação de que  $0,0015 < Re < 55$ . Onde Sh, Sc e Re são os números dimensionais de Sherwood, Schmidt e Reynolds.  $D_m$  é o coeficiente de difusão molecular efetivo, que pode ser estimado pela equação de Wilke-Chang, Equação

(29) (GUIOCHON *et al.*, 1994). O  $D_m$  pode ser comparado com  $D_P$  por Mackie e Meares (1995), conforme Equação (26). O número de Reynolds ( $Re$ ), o qual é definido pela Equação (30). O símbolo  $\emptyset$  denota o coeficiente de associação do solvente do composto, o qual leva em conta a interação molecular do soluto-solvente. Considera-se  $\emptyset$  igual a 2,6 para solventes para a água e 1 para a acetonitrila.  $M$  é a massa molecular,  $\mu$  é a viscosidade dinâmica da solução,  $\eta$  é a viscosidade cinemática da solução,  $T$  é a temperatura absoluta e  $V_b$  é o volume molar para o ponto de ebulição. A Tabela 17 apresenta os parâmetros de transferência de massa dos enantiômeros do Fmoc-POAC na coluna OD-RH (150x4,6 mm), em fase móvel composta de acetonitrila e solução de 0,1% de acetato de trietilamônio (TEAA), com pH ajustado em 3,5, na proporção 40:60 (v/v).

**Tabela 17:** Coeficientes de transferência de massa para o primeiro ( $t_{R1}$ ) e o segundo ( $t_{R2}$ ) enantiômero eluido do Fmoc-POAC em coluna OD-RH (150x4,6 mm) em fase móvel composta por 40% de acetonitrila e 60% de solução 0,1% de TEAA, com o pH igual a 3,5

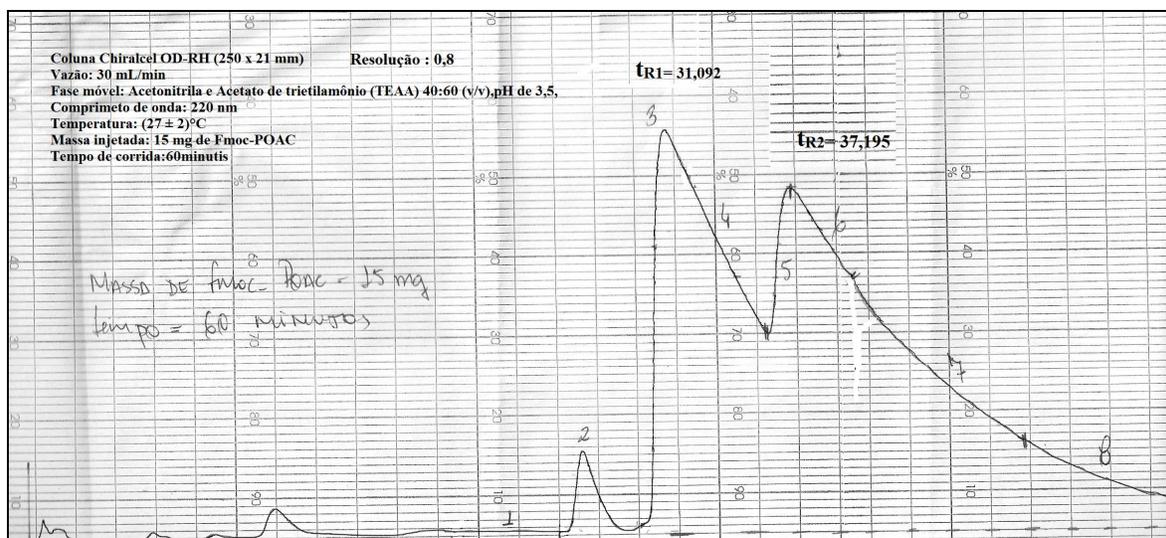
Fmoc-POAC	$K_m (s^{-1})$	$1/K_m (s)$	$D_m (cm^2/s)$	$Bi_M (cm^{-1})$	$D_P (cm^2/s)$	$K_f (s^{-1})$	$Re$
tr1	0,018	55	$2,7 \cdot 10^{-5}$	0,009	$1,0 \cdot 10^{-11}$	0,0704	0,00324 < $Re$ < 0,0060
tr2	0,012	86	$2,7 \cdot 10^{-5}$	0,004		0,1161	

De acordo com os resultados de transferência de massa do Fmoc-POAC na coluna OD-RH (150x4,6 mm) apresentados na Tabela 17, o coeficiente global de transferência de massa ( $K_m$ ) foi calculado a partir da Equação (35), através dos coeficientes da equação de Van Deemter. Os valores de  $Re$  ficaram na faixa de 0,0032 à 0,0060 para as diferentes vazões adotadas nos ensaios cromatográficos, que permite adotar a Equação (28) para calcular  $K_f$ . De posse de  $K_f$ , podemos calcular  $D_P$  com a Equação (25). Os valores de  $K_f$  foram  $10^{10}$  vezes maiores que os valores obtidos para  $D_P$  e podemos considerar que a transferência de massa dos enantiômeros do Fmoc-POAC ocorre principalmente no filme externo à partícula do leito, além da possibilidade de afirmar que o Fmoc-POAC não difundiu dentro da partícula. Observando os valores de  $Bi_M$  que foram próximo ao valor de zero, podemos considerar que a resistência externa aos poros da partícula regem a

transferência de massa (CRESMASCO, 2002). Portanto, mesmo considerando os tamanhos das partículas do leito fixo empacotado para colunas cromatográficas de alta eficiência, com o tamanho de 5 $\mu$ m, o diâmetro pequeno dos poros não foi o responsável pela limitação da partícula em se movimentar dentro de seus poros utilizando a fase móvel composta de acetonitrila e solução de 0,1% de acetato de trietilamônio (TEAA), com pH ajustado em 3,5, na proporção 40:60 (v/v). Acredita-se que a viscosidade da fase móvel seja a grande responsável pela alta resistência a transferência de massa dos enantiômeros do Fmoc-POAC.

#### 4.2.4 Escala Semipreparativa

Foi utilizada uma coluna semipreparativa OD-RH da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 250x21 mm, com partículas de 5 $\mu$ m, conhecida comercialmente como OD-RH, composta pela fase estacionária reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. A utilização dessa fase estacionária foi baseada em ensaios experimentais realizados anteriormente com a coluna analítica OD-RH (150x4,6 mm), de fase estacionária reversa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, os quais tiveram picos resolvidos na separação cromatográfica do Fmoc-POAC na fase móvel composta por acetonitrila e solução de 0,1 % de Acetato de trietilamônio (TEAA), com pH ajustado em 3,5, na proporção 40:60 (v/v). Os ensaios experimentais foram realizados em duplicatas para a obtenção dos parâmetros cromatográficos nessa coluna semipreparativa, utilizando a mesma fase móvel e a mesma fase estacionária da escala analítica. A Figura 37 apresenta o cromatograma da separação quiral do composto Fmoc-POAC, com uma resolução de 0,8.



**Figura 37:** Cromatograma do Fmoc-POAC na coluna semipreparativa OD-RH da Chiralcel<sup>®</sup>, 250x21 mm, 5 $\mu$ m, com fase estacionária reversa composta por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, conhecida comercialmente como OD-RH.

Analisando o perfil cromatográfico do Fmoc-POAC na coluna semipreparativa OD-RH, Figura 37, os picos 1 e 2 são considerados impurezas. Os picos 3 e 4 são considerados os enantiômeros do Fmoc-POAC, os quais são os enantiômeros (+) e (-), respectivamente, devido a confirmação por espectrometria de massa e dicroísmo circular. Nomeou-se o pico 3 como  $t_{R1}$ , com uma altura de 10,2 cm em papel milimétrico. Nomeou-se o pico 4 como  $t_{R2}$ , com uma altura de 8,7 cm em papel milimétrico. Entre os picos  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$ , quando se forma um vale e os picos não possuem uma separação de linha de base, calcula-se sua resolução baseada na altura do ponto mínimo desse vale formado (CASS & DEGANI, 2001). Analisando o cromatograma apresentado na Figura 39, a altura do vale formado entre os picos  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  é 4,9 cm em papel milimétrico. Pelos resultados, a relação em porcentagem entre o vale e o pico  $t_{R2}$  é igual a 56%. Considerando que os enantiômeros do Fmoc-POAC é uma mistura racêmica, a resolução dos enantiômeros é igual à 0,8. Com as mesmas condições cromatográficas de separação aplicadas anteriormente, foi injetado uma massa de 50 mg, com resolução semelhante a obtida no cromatograma acima.

## 5. CONCLUSÕES

O trabalho realizado indicou a viabilidade da separação enantiomérica do Fmoc-POAC em escala analítica e semipreparativa para as colunas de fases estacionárias normais e reversas, de forma isocrática através de CLAE, as quais foram: i) Lux Cellulose-2 da Phenomenex<sup>®</sup>, tamanho de 250 mm x 4,6 mm, partículas de 5  $\mu\text{m}$ . ii) OD da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 150 mm x 10 mm, partículas de 20  $\mu\text{m}$ . iii) OD-RH da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 150 mm x 4,6 mm, partículas de 5  $\mu\text{m}$ . iii) OD-RH da Chiralcel<sup>®</sup>, tamanho de 250 mm x 10 mm, partículas de 5  $\mu\text{m}$ .

Os resultados dos parâmetros cromatográficos da enantioseparação do Fmoc-POAC na coluna Lux Cellulose-2 (150x4,6 mm) tiveram resoluções maiores que dois, com destaque para a proporção 90% de hexano e 10% isopropanol, com uma resolução de  $18,40 \pm 0,031$ . De acordo com os parâmetros termodinâmicos, a fase estacionária ficou estável nas temperaturas estudadas e a enantioseparação foi direcionada pelo fator entálpico. Os resultados de parâmetros de transferência de massa encontrados para constante global de transferência de massa ( $K_m$ ), constante de partição ( $K_P$ ), Biot mássico ( $Bi_M$ ), coeficiente de difusão do poro ( $D_P$ ) e o coeficiente de transferência de massa externo ( $K_f$ ) levaram a concluir que o leito empacotado teve uma transferência de massa do Fmoc-POAC preferencialmente externa à partícula.

Os resultados dos parâmetros cromatográficos da enantioseparação do Fmoc-POAC na coluna OD (150x10 mm) tiveram resoluções maiores que 1,5 utilizando a fase móvel na proporção 90% de hexano e 10% isopropanol. Os resultados de parâmetros de transferência de massa encontrados para constante global de transferência de massa ( $K_m$ ), constante de partição ( $K_P$ ), Biot mássico ( $Bi_M$ ), coeficiente de difusão do poro ( $D_P$ ) e o coeficiente de transferência de massa externo ( $K_f$ ) levaram a concluir que a transferência de massa do Fmoc-POAC no leito empacotado foi misto, com tendências de migração interna e externa na partícula.

Os resultados dos parâmetros cromatográficos da enantioseparação do Fmoc-POAC na coluna OD-RH (150x4,6 mm) tiveram resoluções de 1,27 para a fase móvel 40% de acetonitrila e 60% de solução 0,1% de acetato de trietilamônio com pH ajustado em 3,5.

Outras proporções desses solventes como fase móvel não tiveram resultados de separação. Os resultados de parâmetros de transferência de massa encontrados para constante global de transferência de massa ( $K_m$ ), constante de partição ( $K_P$ ), Biot mássico ( $Bi_M$ ), coeficiente de difusão do poro ( $D_P$ ) e o coeficiente de transferência de massa externo ( $K_f$ ) levaram a concluir que a transferência de massa do Fmoc-POAC no leito empacotado foi preferencialmente externo a partícula.

Os resultados dos parâmetros cromatográficos da enantioseparação do Fmoc-POAC na coluna OD-RH (250x21 mm) teve uma resolução de 0,8 para a fase móvel composta de 40% de acetonitrila e 60% de solução 0,1% de acetato de trietilamônio com pH ajustado em 3,5. A utilização dessa coluna quirais permitiu a separação e recuperação do Fmoc-POAC em valores de miligramas, até então não relatado na literatura consultada.

Os resultados obtidos de separação enantiomérica do Fmoc-POAC em coluna de fase estacionária normal, de eluição isocrática, foi um avanço para estudos de purificação quirais desse peptídeos, sem relatos bibliográficos. Um primeiro passo a purificação quirais e recuperação do Fmoc-POAC em escala semipreparativa foi dado, com uma separação enantiomérica nas colunas OD (150x10 mm) e OD-RH (250x21 mm), com injeções de até 50 mg de Fmoc-POAC por corrida cromatográfica, oferecendo uma alternativa para separação enantiomérica do marcador molecular Fmoc-POAC através de bateladas ou uma possível utilização do leito móvel simulado.

Acredita-se que a coluna de fase reversa seja a mais adequada para a separação e recuperação do Fmoc-POAC devido à maior solubilidade do Fmoc-POAC racêmico em solventes polares e a possibilidade de injetar maiores cargas desse composto nessa coluna, embora as colunas quirais de fase estacionária normal apresentarem maiores resoluções.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, S. **Chiral separations by chromatography**, New York - USA. Oxford University Press, 2000.

ALI, I., ABOUL-ENEIN, H. Y. **Chiral separation techniques**, Edited by G. Subramarian. Third edition, 2007.

ARNOLD, F. H., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Analysis of affinity separations II: The characterizations of affinity columns by pulse techniques. **Chemical Engineering Journal**, v. 30, p- B25-B36, 1985.

ARNOLD, F. H., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Liquid chromatography plate height equations. **Journal of Chromatography**, v. 330, p. 159-166, 1985b.

BACHECHI, F., FLIEGER, M. A selector/selectand molecular complex for the study of enantiodiscriminative processes. **Struct Chem**, v. 17, p. 509-517, 2006.

BERLINER, L. J. **Biological Magnetic Resonance**, Plenum Press: New York, 1998, vol. 14.

BHOOLA, K. D., ELSON, C. J., DIEPPE, P. A. Kinins-key mediators in inflammatory arthritis. **British Journal of Rheumatology**, v. 31, p. 509-518, (1992).

BÖCKER, S., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M., FLEURY, C., SCHENKEL, B. Design of chromatographic separations on reversed phase. **Separation Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 1725-1745, 2002.

BRUSHAN, R., KUMAR, V., TANWAR, S. Chromatography separation of enantiomers of non-protein  $\alpha$ -amino acids after derivatization with Marfey's reagent. **Amino Acids**, v.36, p. 571-579, 2009.

BRUSHAN, R., KUMAR, R. Enantioresolution of DL-penicillamine. **Biomedical Chromatography**, v. 24.p. 66-82, 2010.

- BRUSHAN, R., KUMAR, R. Indirect enantioseparation of  $\alpha$ -amino acids by reversed-phase liquid chromatography using new chiral derivatizing reagents synthesized from s-triazine chloride. **Journal of Chromatography A**, v. 1201, p. 35–42, 2008.
- CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por PLC: Fundamentos, estratégias e validação**, São Carlos: Editora da UFSCar, Série Apontamentos, 2001.
- CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G., CASSIANO, N. M. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.26, p. 2083, 2003.
- CHEONG, W. J., KANG, G. W., KO, J. H. Thermodynamic Study of Enantioseparation of Arylpropionic Acids with the Chirex 3001 Stationary Phase. **Journal of Liquid chromatography & Related technologies**, v. 27, n.4, p. 595-610, 2004.
- COLLINS, H, BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**, Campinas-SP, Editora Unicamp, São Paulo, 2006.
- COLUMBUS, L. HUBBELL, W.L. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, p. 288, 2002.
- CORVAJA, C., SARTORI, E. , TOFOLETTI, A., FORMAGGIO, F., CRISMA, M., TONIOLO, C., MAZALEYRAT, J. P. ,WAKSELMAN, M. **Chemistry - A European Journal**, v. 6, p. 2775, 2000.
- CREMASCO, M. A. **Fundamentos de transferência de massa**, Campinas-SP , Editora Unicamp, São Paulo, 2002.
- CREMASCO, M. A., HRITZKO, B. J., XIE, Y., WANG, N. H. L. Parameters estimation for amino acids adsorption in a fixed bed by moment analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. 181-194, 2001.
- ELIEL, E. L., WILEN, S. H., MANDER, L. N. **Stereochemistry of Organic Compounds**, Wiley.Interscience, N.York, 1994.
- FAIGL, F., FOGASSY, E., NÓGRÁDI, M., PÁLOVICS, E., SCHINDLER, J. Strategies in optical resolution: a practical guide. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.19, p. 519-536, 2008.

FEDERSEL, H. J. Drug chirality: scale - up, manufacturing and control. **Chemtec**, v.23, p. 24-33, 1993.

FEITOSA, G. S., CARVALHO, E. N. de. Sistema renina-angiotensina e insuficiência cardíaca: o uso dos antagonistas do receptor da angiotensina II. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 3, p- 250-54, 2000.

GADEMANN, K, HANE, A, RUEPING, M, JAUN, B, SEEBACH, D. The fourth helical secondary structure of beta-peptides: The (P)-2(8)-helix of a beta-hexapeptide consisting of (2R,3S)-3-amino-2-hydroxy acid residues. **Angewandte chemie-international edition**, v.42, p.1534-1537, 2003.

GOSENS, J. F., FOULON, C., BAILLY, C., GIGG, D. C. H., BONTE, J. P., VACCHER, C. Chiral resolution of enantiomers of homocamptothecin derivatives, antitumor topoisomerase I inhibitors, using high performance liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phases. **Chromatographia**, v.59, p. 305-313, 2004.

GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 965, p. 129-161, 2002.

GUIOCHON, G., SHIRAZI, S. G., KATTI, A. M. **Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography**, Boston: Academic Press, MA, 1994. 701 p

GUIOCHON, G., The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, p. 6-49, 2006.

ILISZ, I, BERKECZ, R., PÉTER, A. Review: Retention mechanism of high-performance liquid chromatography enantioseparation on macrocyclic glycopeptide –based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1845-1860, 2009.

ILISZ, I., BERKECZ, R., PÉTER, A. Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatography separation of amino acid enantiomers: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 1-15, 2008.

- KOLOV, T., SPITELLER, M., KOLEVA, B. Spectroscopic and structural elucidation of amino acid derivatives and small peptides: experimental and theoretical tools. **Amino acids**, v. 38, p. 45-50, 2010.
- KUBIN, M. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 30, p. 1104, 1965.
- LÄMMERHOFER, M. Review: Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, p. 814-856, 2010.
- LANGER, O. KAHLIG, H. ZIERLER-GOULD, K. BATS, J.W. MULZER, MARCHETTO, R., SCHREIER, S., NAKAIE, C. R. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, p.11042, 1993.
- LEHOTAY, J., ROJKOVICOVÁ, T., KRUPCIK, J., FEDURCOVÁ, A., CIZMARIK, J., ARMOSTRONG, D. W., Study of the mechanism of enantioseparation. VII. Effect of temperature on retention of some enantioseparation of phenylcarbamic acid derivatives on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 11, p. 1653-1670, 2004.
- LINDNER, W., GYIMESI-FORRÁS, K., KÖKÖSI, J., SZÁSZ, G., GERGELY, A. Liquid chromatography enantiomer separations of novel quinazolinone derivatives on quinine carbamate based chiral stationary phases using hydro-organic mobile phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 59-67, 2004.
- LOURENÇO, T. de C., CASSIANO, N. M. , CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 10,p. 2155-2164, 2010.
- MA, Z., WANG, N-H, L. Standing wave analysis of SMB chromatography: Linear systems. **AIChE Journal**, v. 43, 2488-2508, 1997.
- MACKIE, S. J., MEARES, P. The diffusion of electrolytes in a cation-exchange resin membrane. **Proceedings of the Royal Society of London**, p. 498-506, 1955.

MAIER, N. M., FRANCO, P., LINDER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 3-33, 2001.

MARCHETTO, R., SCHREIER, S., NAKAIE, C. R. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, p.11042, 1993.

MCCONATHY, J., OWENS, M. J., Primary care companion, **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 5, p.70, 2003.

**Ministério da Saúde (2009).**

[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23616](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23616). Acessado em 29 de setembro de 2010.

MIYABE, K., GUIOCHON, G. Kinetic Study of the Concentration Dependence of the Mass Transfer Rate Coefficient in Anion-Exchange Chromatography of Bovine Serum Albumin. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 740-752, 1999.

MIYABE, K., SUZUKI, M. Chromatography of liquid-phase adsorption on octadecylsilylsilica gel. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 38, p. 901-910, 1992.

MONE, M.K., CHANDRASEKHAR, K. B. Development of liquid chromatography enantiômero separation methods and validation for the estimation of (R)-enantiomer in eslicarbazepine acetate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 248-251, 2011.

NAKAIE, C. R, TOMINAGA, M.,DE MATTOS PAIVA, A. C., DOS REIS BARBOSA, S., MARCHETTO, R., SCHREIER, S, MATTO, P. A. C., BARBOSA, S. D. R, MARCHETTO, R., NAKAIE, R., DE MATTOS, P. C., DOS REIS, B. S. Synthesis of 4-Fmoc-aminopyrrolidine-3-carboxylic acid N-oxide, its deprotected amino acid, and coupling products used as paramagnetic label for chemical and biological macromolecules e. g. peptides. **US Patent 6797829-B1**, 2001.

NAKAIE, C. R., SILVA, E.G., CILLI, E.M., MARCHETTO, R., SCHRIRER, S., PAIVA, T.B., PAIVA, A.C.M. Synthesis and pharmacological properties of TOAC-labeled angiotensin and bradykin analogs. **Peptides**, v. 23, p. 63-70, 2002.

NAKAIE, C. R., SCHREIER, S. E PAIVA, A.C.M. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 742, p. 63-71, 1983.

OLANDO, R. M., CARDOSO FILHO, N., GIL, E. S., STRINGHETTA, J. P. S. Importância farmacêutica de fármacos quirais. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 4, p. 08-14, 2007.

ORLANDO, R. M., FILHO, N. C., GIL, E. S., STRINGHETTA, J. P. S., **Importância farmacêutica de fármacos quirais**, v. IV (1), p. 08-14, 2007.

PEREZ-FERNANDEZ, V., GARCIA, M. A., MARINA, M. L. Review: Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 968–989, 2010.

PERSSON, B. A., ANDERSSON, S., Review: Unusual effects of separation conditions o chiral separations. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 195-203, 2001.

PÉTER, A., TÖRÖK, R., WRIGHT, K., WAKSELMAN, M., MAZALEYRAT, J. P. Liquid chromatography enantioseparation of spin-labelled  $\beta$ -amin acids. **Journal of chromatography A**, v. 1021, p. 1-10, 2003.

PIRKLE, W. H., POCHAPSKY, T. C. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, p.5627, 1986.

PROKHOROVA, A. F. , SHAPOVALOVA, E. N., SHPIGUN, O.S., Review: Chiral analysis of pharmaceutical by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selectors. **Jorunal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53. p. 1170-1179, 2010.

RASSAT, A., REY, P. Nitroxide 23. Preparation of amino-acid fre radicals and their complex salts. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, v. 2, p. 122-130, 1967.

REGOLI, D., BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins.

**Pharmacological Reviews**, v. 32, p. 1-46, 1980.

REGOLI, D., BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **The American**

**Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 32, p. 1-46, 1980.

REKOSKE, J. E. Chiral separations. **AIChE Journal**, v. 47, p. 2-5, 2001.

ROJKOVIČOVÁ, T., LEHOTAY, J., KRUPCIK, J., FEDURCOVÁ, A., CIZMARIK, J.,

ARMOSTRONG, D. W. Study of the mechanism of enantioseparation. VII. Effect of

temperature on retention of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivatives on a

teicoplanin aglycone chiral stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography &**

**Related Technologies**, v. 27, n. 11, p. 1653-1670, 2004

ROUSSEAU, A., GILLOTIN, F., CHIAP, P., BODOKI, E., CROMMEN, J., FILLET, M.,

SERVAIS, A. Generic systems for the Enantioseparation of basic drugs in NACE using

single-isomer anionic CDs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54,

p. 154-159, 2011.

RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption Process**. New York: John

Wiley & Sons, 1984. 433 p.

SALMON, C. E. G., NETO, D. de S., TABAK, M., FILHO, A. J. da C. Simulação de

espectro de ressonância eletrônica (RPE) através do programa NLSL. **Química Nova**, v.

30, p. 1240-1248, 2007.

SCHREIER, S., BARBOSA, S., CASALLAOVO, F., CILLI, R. M., PAIVA, A. C., &

NAKAIE, C. R. Conformational basis for the biological activity of TOAC-labeled

angiotensin II and Bradykinin: Electron paramagnetic resonance, circular dichroism, and

fluorescence studies. **Biopolymers**, p. 389-402, 2004.

SEWELL, P. A., CLARKE, B., **Chromatographic separations**, John Wiley & Sons, 1987.

SHEN, S., MA, S., LEE, H., MANOLESCU, C., GRINBERG, M., YEE, N.,

SENANAYAKE, C., GRINBERG, N. HPLC enantiomeric separation of aromatic amines

using crown ether tetracarboxylic acid. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, p. 153-166, 2010.

SINGH, A. K., KEDOR-HACKMANN, E. R. M., SANTORO, M. I. R. M.. Development and validation of chiral HPLC method for quantitative analysis of atenolol and metoprolol enantiomers in tablet preparations. **Journal of AOAC International**, v.84, p. 1724-1729, 2001.

SINGH, A. K., KEDOR-HACKMANN, E. R. M., SANTORO, M. I. R. MIRITELLO. Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 553-566, 2006.

SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. Stereochemistry: Chiral molecules. In: **Organic Chemistry**. 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. chap. 5, p. 184-210.

STEER, D.L. LEW, R.A. PERLMUTTER, P. SMITH, A.I. AGUILAR, M.I. **Curr.TOMINAGA, M., BARBOSA, S.R., POLETTI, E.F. , ZUKERMAN- SCHPECTOR, J. , MARCHETTO, R., SCHREIER, S. , PAIVA, A.C.M., NAKAIE, C.R., Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p.1027, 2001.

STEWART, J. M. Biopolymers. **Peptide Science**, v. 37, p-173, 1995.

TIMMERMANS, P. B. M. W. M., WONG, P. C., CHIU, A. T., HERBLIN, W. F., SMITH, R. D. New perspectives in angiotensin system control. **Journal of Human Hypertension**, in press, 1993.

TOMINAGA, M., BARBOSA, S.R., POLETTI, E.F. , ZUKERMAN- SCHPECTOR, J. , MARCHETTO, R., (SCHREIER, BARBOSA, & CASALLAOVO, 2004), S. , PAIVA, A.C.M., NAKAIE, C.R., **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p.1027, 2001.

TONIOLO, C., MAZALEYRAT, J. P. ,WAKSELMAN, M. **Chemistry - A European Journal**, v. 6, p. 2775, 2000. v. 30, p. 25-36, 1985a.

- UCCELLO-BARRETA, G. VANNI, L., BALZANO, F. Review: Nuclear magnetic resonance approaches to the rationalization of chromatography enantio-recognition process. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 928-940, 2010.
- WANG, X., CHING, C. B. Kinetic and equilibrium study of the separation of three chiral center drug, nadolol, by CLAE on a novel perphenyl carbamoylated  $\beta$ -cyclodextrin bonded chiral stationary phase. **Separation Science Technology**, v. 37, p. 2567-2586, 2002.
- WANKAT, P. C. **Rate-Controlled Separations**, Ed. Blackie Academic & Professional, 1994.
- WENG, W., GUO, H., ZHAN, F., FANG, H., WANG, Q., YAO, B., LI, S. Chromatographic enantioseparations of binaphthyl compounds on an immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, p. 178-184, 2008.
- WILKE, C. R., CHANG, P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions, **A.I. Ch. E. J.**, v. 1, p. 264-270, 1955.
- WILSON, E. J., GEANKOPLIS, C. J. Liquid mass transfer at very low Reynolds number in packed beds. **Ind. Eng. Chem. Fundamen.**, v. 5, p. 9-14, 1966.
- WILSON, E. K. A new amino acid TOAC, a novel spin label used in EPR studies, help illuminate peptide structure. **Science & Technology**, p. 54-59, 2000.
- WINKLER, M., KLEMPIER, N. Enantioseparation of nonproteinogenic amino acids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 1789-1796, 2009.
- WRIGHT, K., DUTOT, L., WAKSELMAN, M., MAZALEYRAT, J. P., CRISMA, M., FORMAGGIO, F., TONIOLO, C. Synthesis, resolution and assignment of absolute configuration of trans 3-amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-4-carboxylic acid (POAC), a cyclic, spin-labelled  $\beta$ -amino acid. **Tetrahedron**, v. 64, p. 4416-4426, 2008.
- WRIGHT, K., FORMAGGIO, F., TONIOLO, C., TÖRÖK, R., PÉTER, A., WAKSELMAN, M. MAZALEYRAT, J. P. First access the spin-labelled  $\beta$ -amino acid

POAC in an enantiopure state by resolution through its binaphthyl esters. **Tetrahedron**, v. 44, p. 4183-4186, 2003.

WRIGHT, K., WAKSELMAN, M., MAZALEYRAT, J. P., FRANCO, L., FORMAGGIO, F., TONIOLO, C. Synthesis and conformational characterization of hexameric  $\beta$ -peptide foldamers by using double POAC spin labelling and cw-EPR. **Chemistry**, v. 16, p. 11160-11166, 2010.

XIANG, Y., SLUGGETT, G. W. Development and validation of a GC method for quantitative determination of enantiomeric purity of a proline derivative. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 878-883, 2010.

YASHIMA, E. Review: Polysaccharide-based chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography enantioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 105-125, 2001.