

UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS COMO FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL EM CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO*

Edson Ferreira da Silva, Maria da Conceição Klaus V. Ramos, Francisco Radler de Aquino Neto

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Ilha do Fundão - CT, bloco A, 21949-900 - Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 16/11/95; aceito em 9/5/96

THE USE OF CYCLODEXTRINS DERIVATIVES AS CHIRAL STATIONARY PHASES IN HRGC. The use of cyclodextrins (1) as chiral stationary phases in HRGC is highlighted after a brief discussion and historical background (isolation, characterization, structure, chemical reactivity, molecular dimensions, physico-chemical properties and possible mechanism of chiral recognition). Also, the reasons why *o*-alkylated cyclodextrin derivatives are most often used as chiral phases, is discussed. Techniques for preparing capillary columns and some preliminary results from our laboratory are presented.

Keywords: cyclodextrins; HRGC; chiral stationary phases.

INTRODUÇÃO

Dando continuidade às investigações sobre o fenômeno de quiralidade molecular, o uso da cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) na análise de substâncias oticamente ativas mostrou ser uma técnica extremamente importante¹⁻³.

A dificuldade de determinação da composição enantiomérica (excesso enantiomérico, e.e.) é central para todas as pesquisas contemporâneas preocupadas com a síntese, caracterização e uso de compostos quirais. A CGAR constitui um dos métodos analíticos mais poderosos para resolução (separação) de compostos enantioméricos que possam ser vaporizados. Esta técnica tem como vantagens a simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e sensibilidade⁴⁻⁷.

A partir de 1987 vem sendo estudada mais intensivamente a separação de compostos quirais, utilizando-se derivados das ciclodextrinas como fase estacionária líquida (filme) em CGAR⁸. A sua disponibilidade e versatilidade vem ampliando o campo de sua aplicação, criando novas fronteiras quirais, para serem exploradas (p.ex., análise de resíduos de pesticidas no meio ambiente⁹, resolução de moléculas de grande importância como precursores quirais e de intermediários em síntese de compostos biologicamente ativos¹⁰, simultânea estereodiferenciação de vários compostos flavorizantes quirais possuindo funcionalidades diversificadas^{11,12}, determinação da composição enantiomérica dos constituintes quirais dos óleos essenciais¹³, resolução de alguns bi-fenilas policlorados¹⁴, autenticação de flavonóides contidos em produtos alimentícios e perfumes¹⁵).

CICLODEXTRINAS

Definição

As ciclodextrinas¹⁶ são oligopolissacarídeos cíclicos, não redutores, não higroscópicos e hidrossolúveis, que formam vários hidratos estáveis.

Histórico

As ciclodextrinas, também conhecidas como cicloamiloses ou ciclomalto-oligos, foram isoladas por Villiers¹⁷ em 1891,

a partir do produto de degradação enzimática do amido, pela ação da amilase do *Bacillus macerans*, embora sua caracterização como oligopolissacarídeo cíclico somente tenha sido realizada em 1903, por Schardinger e Unters¹⁸.

Por volta de 1938, Freudenberg e colaboradores^{19,20} determinaram que as ciclodextrinas são constituídas de unidades de glicopirranose, unidas pela ligação $\alpha(1,4)$, como na amilase. Após dez anos, Freudenberg e Cramer¹² examinaram a habilidade das ciclodextrinas em formar complexos de inclusão molecular.

As ciclodextrinas (α, β, γ e δ) foram isoladas e caracterizadas, contendo de seis a nove unidades de glicopirranose, respectivamente. Mais recentemente, ciclodextrinas com mais de doze unidades de glicopirranose, também foram isoladas^{22,23}. Todavia, somente α, β e γ -ciclodextrinas são disponíveis comercialmente (Fig.1)².

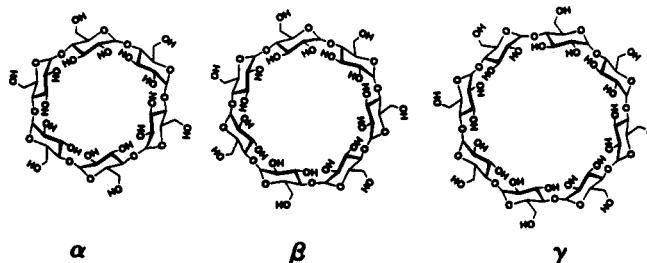


Figura 1. Estruturas moleculares das α, β e γ -ciclodextrinas²⁴.

Estrutura Química

Cada uma das unidades de glicopirranose (quiral) das ciclodextrinas possui uma conformação cadeira rígida C-1, C-4 (Fig. 1)²⁴. Tanto no estado sólido como em solução a conformação macrocíclica das ciclodextrinas, corresponde a uma estrutura cônica invertida, mais precisamente toroidal, onde os grupos hidroxila secundários situados nos carbonos C-2 e C-3 estão localizados na base superior, enquanto os grupos hidroxila primários em C-6, na base inferior (Fig. 2)²⁵.

A ausência de grupos hidroxila livres orientados para o interior da cavidade faz com que esta apresente um caráter hidrofóbico enquanto a parte externa uma caráter hidrofílico²⁶.

A estrutura macrocíclica rígida das ciclodextrinas é decorrente da formação de pontes de hidrogênio intramoleculares estáveis entre os grupos hidroxila secundários O3-H...O'2 e O3...H-O'2.

* Parte dos resultados foi apresentada na 18ª Reunião Anual da SBQ, Caxambu, MG, 1995.

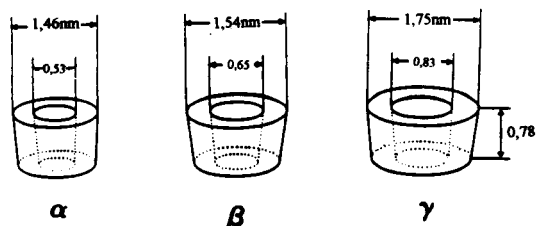


Figura 2. Estrutura toroidal das ciclodextrinas²⁵.

Propriedades das Ciclodextrinas

Algumas propriedades físicas importantes das ciclodextrinas são listadas na tabela 1.

O grupo hidroxila em C-2 é mais ácido do que em C-3 e o grupo hidroxila em C-6 é menos impedido estericamente. Conseqüentemente, isso leva à uma diferenciação dos grupos hidroxila que podem ser atacados regioselectivamente. Isto permite que as ciclodextrinas sejam transformadas em derivados monofuncionalizados²⁷, bifuncionalizados²⁸ e trifuncionalizadas²⁹, acarretando numa modificação de suas propriedades físico-químicas³⁰⁻³⁴.

Essencialmente, a assimetria molecular das ciclodextrinas, provém do fato de que os ciclooligômeros contêm somente unidades de D-glicopirranose. Como conseqüência de suas origens biotecnológicas a partir do amido natural, somente os enantiômeros dextrorrotatórios das ciclodextrinas são conhecidos; as formas racêmica e levorotatória, não foram até agora encontradas.

Análises espectroscópicas indicam que a conformação das ciclodextrinas em solução é idêntica à do cristalino.

As ciclodextrinas são estáveis em solução alcalina. No entanto, são suscetíveis à hidrólise ácida. Hidrólise ácida parcial das ciclodextrinas produz glicose e uma série de maltosacarídeos acíclicos³⁵. Sob condições experimentais normais (pH maior do que 3,5 e temperatura abaixo de 60°C), as ciclodextrinas são razoavelmente estáveis.

Embora possa ocorrer clivagem da ligação $\alpha(1,4)$ -glicosídica na irradiação- γ , de β e γ -ciclodextrinas nas formas cristalinas³³, estas são bastante resistentes à presença de luz na faixa do ultravioleta-visível e infravermelho.

Mecanismo de Separação

O fenômeno de inclusão é vastamente usado em métodos de separação, especialmente em cromatografia³⁶.

Recentemente, tem-se dado bastante atenção na inclusão de compostos por ciclodextrinas e seus derivados.

A relativa estabilidade das ciclodextrinas na inclusão de compostos é governada por diversos fatores, tais como: pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, efeito de solvatação, etc.

Com isso, quando o centro quiral está próximo à entrada da cavidade ou tem o substituinte orientado em posição específica, tal que possa formar uma interação com os grupos presentes na entrada da cavidade, a possibilidade de reconhecimento quiral é favorecida.

Dependendo do tamanho e geometria da molécula em relação

à dimensão da cavidade dos derivados das ciclo-dextrinas, diferentes substâncias no tipo de interação podem ser observadas para uma série de arranjos estruturalmente relacionados. Um exemplo disso é o estudo do efeito da inclusão na retenção de compostos com várias estruturas e geometrias (alcanos, hidrocarbonetos aromáticos, álcoois), utilizando ciclodextrinas e seus derivados metilados como fase estacionária quiral em cromatografia gás-sólido^{37,38}. Segundo esses estudos, na cromatografia gás-sólido, o fenômeno de inclusão é predominante nas interações de compostos com dimensões geométricas apropriadas, enquanto a retenção da substância polar é primeiramente determinada pelas interações com os grupos hidroxila das ciclodextrinas. Verificou-se que com o decréscimo da polaridade da ciclodextrina, através da per-metilação dos grupos hidroxila, a estereosseletividade foi evidenciada na separação de álcoois. No entanto, a presença de grupos metila causa impedimento estérico para uma possível penetração da molécula na cavidade da ciclodextrina. Conclui-se então, que a seletividade do processo de inclusão é especialmente importante para a separação de isômeros de posição.

Quando as ciclodextrinas são derivatizadas, as pontes de hidrogênio, mencionadas anteriormente deixam de existir, havendo com isso, uma torção das estruturas dos seus derivados. No entanto quando as ciclodextrinas são derivatizadas com radicais metila, essas torções são minimizadas podendo ainda ser capazes de formar complexos de inclusão. Com isso, a estereosseletividade das ciclodextrinas permetiladas é maior do que das ciclodextrinas não derivatizadas na formação de complexos de inclusão, não levando a uma perda da eficiência do processo cromatográfico de diferenciação quiral. A torção discutida anteriormente foi demonstrada por Krupcik e colaboradores³⁹, através de estudos de modelagem molecular e raios-X das estruturas das α , β e γ -ciclodextrinas.

Aplicações dos Derivados das Ciclodextrinas como Fase Estacionária Quiral em CGAR

A primeira separação enantiomérica usando fase estacionária quiral do tipo inclusão em cromatografia gasosa foi descrita em 1983 por Koscielski e colaboradores⁴⁰, na separação do α e β -pineno em coluna recheada contendo α -ciclodextrina dissolvida em formamida. Esse método também foi utilizado para separações enantiosseletivas em cromatografia preparativa⁴¹. Mais tarde admitiu-se que ciclodextrinas alquiladas poderiam ser empregadas como fase estacionária quiral, em colunas capilares de alta resolução para análise de enantiômeros.

Assim, β -ciclodextrinas per-metiladas (2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina) foram usadas acima de seus pontos de fusão⁴² e abaixo de 76°C⁴³. Os derivados de ciclodextrinas 2,3,6-tri-O-n-pentil- α -ciclodextrina, 2,6-di-O-n-pentil-3-O-acetil- α -ciclodextrina, 2,3,6-tri-O-n-pentil- β -ciclodextrina, 2,6-di-O-n-pentil-3-O-acetil- β -ciclodextrina, 2,3,6-tri-O-n-pentil- γ -ciclodextrina e 2,6-di-O-n-pentil-3-O-butiril- γ -ciclodextrina foram utilizados sob a forma não diluída, na separação enantiomérica de muitas classes de compostos, em coluna capilar de vidro desativada, por König e colaboradores^{44,46}, em 1988. Armstrong e

Tabela 1. Propriedades físicas e características das ciclodextrinas.

	α	β	γ
Nº de unidades de glicopirranose	6	7	8
Massa molecular	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/100mL, 25 °C)	14,5	1,85	23,2
Nº de centros quirais	30	35	40
Valores de pKa	12,33	12,20	12,08
Diâmetro da cavidade (nm)	0,47-0,53	0,60-0,65	0,75-0,83
Volume da cavidade (nm ³)	0,176	0,346	0,510
Ponto de fusão (°C)	275	280	275

colaboradores⁴⁷⁻⁴⁹ sintetizaram derivados de ciclodextrinas mais polares contendo grupos hidroxipropila, hidroxila livre ou trifluoracetila como: 3,6-di-O-metil-2-O-(S)-2-hidroxipropil- α -ciclodextrina, 3,6-di-O-metil-2-O-(S)-2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, 2,6-di-O-n-pentil- α -ciclodextrina, 2,6-di-O-n-pentil- β -ciclodextrina, 2,6-di-O-n-pentil-3-O-trifluoracetil- β -ciclodextrina e Chirasil-Dex e revestiram também, sob a forma não diluída, capilares de sílica fundida.

Em 1987, Schurig e Nowotny⁵⁰ descreveram um trabalho, onde combinaram a enantiosseletividade dos derivados de ciclodextrinas, com a excelente propriedade de revestimento e eficiência dos polissiloxanos. Então, ciclodextrinas alquiladas foram dissolvidas em silicões moderadamente polares como OV-1701. Assim, os derivados de ciclodextrinas puderam ser empregados para separações enantioméricas em cromatografia gasosa de alta resolução, independentemente de seus pontos de fusão e fase de transição.

Colunas capilares de sílica fundida revestida com 2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina em OV-1701 são comercializadas (Chrom-pack). O derivado 2,6-di-O-metil-3-O-trifluoracetil- β -ciclodextrina em OV-1701 mostrou uma grande aplicabilidade em separações enantioméricas de várias classes de compostos^{51,52}.

Um teste quiral (teste de Schurig)⁵³ foi desenvolvido para avaliar a eficiência, enantiosseletividade e inércia da coluna capilar de 2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina, cobrindo todo o intervalo de polaridade, a partir de racematos altamente polares (ácidos carboxílicos não derivatizados, aminas, dióis, álcoois) e apolares (hidrocarbonetos).

Muitos outros derivados de ciclodextrinas vêm sendo descritos na literatura, apresentando bastante sucesso na separação de enantiômeros por cromatografia gasosa de alta resolução⁵⁴⁻⁵⁸. Recentemente, ciclodextrinas n-pentiladas, introduzidas por König e colaboradores⁵⁷⁻⁵⁸, Hardt e König⁵⁹ e Bicchì e colaboradores⁶⁰, foram também diluídas em OV-1701 e encontram-se disponíveis comercialmente (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Mosandl e colaboradores⁶¹ descreveram os derivados 2,3-di-O-acetil-6-O-t-butildimetilsilano- β -ciclodextrina e 2,3-di-O-metil-6-O-t-butildimetilsilano- β -ciclodextrina. Esses derivados mostraram-se bastante versáteis quando aplicados em separações enantioméricas.

A presença de três grupos hidroxila, os quais podem ser alquilados e acilados regioselectivamente, oferece um enorme número de possibilidades de derivados das α , β e γ -ciclodextrinas, embora algumas apresentem dificuldade de obtenção e de purificação.

Colunas capilares revestidas com derivado 2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina diluído em OV-1701⁵², podem resolver um número apreciável de racematos voláteis entre 25-250°C.

Com base em dados da literatura, pode-se dizer que a busca por novos derivados das ciclodextrinas para serem utilizados como fase estacionária quiral em CGAR está quase estagnada. As pesquisas estão atualmente dando maior importância em tentar entender como realmente acontece a separação, utilizando os derivados já descritos na literatura. Uma parte desses estudos refere-se à modificação da polaridade e da concentração dos polissiloxanos, empregados na diluição dos derivados de ciclodextrinas⁶². Um outro estudo muito interessante baseia-se na correlação entre os resultados obtidos através do reconhecimento quiral, por cromatografia gasosa, com aqueles resultantes dos cálculos de modelagem molecular⁶³.

Uma nova classe de fases estacionárias quirais foi desenvolvida a partir de derivados de ciclodextrinas e uma matriz polimérica (polissiloxano), ligadas quimicamente entre si^{64,65}. Em analogia à Chirasil-Val, essa nova fase estacionária quiral polimérica chama-se Chirasil-Dex⁶⁶.

Colunas capilares revestidas com Chirasil-Dex e imobilizadas (Chrompack International) apresentam as seguintes vantagens: uso de uma matriz apolar, resultando em temperaturas baixas de

eluição para amostras polares; um alto grau de inércia, permitindo análises de compostos polares sem que haja necessidade de derivatização; concentração elevada do derivado de ciclodextrina, levando a um aumento do fator de separação α ; maior estabilidade térmica; imobilização por entrecruzamento ("cross-linking") e/ou superfície ligante, e compatibilidade com todas as técnicas de injeção. Essas fases estacionárias quirais mostraram um desempenho superior, quando comparado ao sistema dissolvido^{67,68}.

Recentemente, a 2,6-di-O-metil-3-O-trifluoracetil- β -ciclodextrina (Chirasil-Dex-TFA), ligada quimicamente a uma matriz de polissiloxano e imobilizada, foi também empregada como fase estacionária quiral.

A cromatografia gasosa enantiosseletiva envolvendo derivados de ciclodextrinas é usada em técnicas associadas, incluindo operações de colunas paralelas⁵⁷, cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas⁶⁹, cromatografia gasosa-espectrometria de massas-monitoramento de íons seletivos⁷⁰ e técnicas de cromatografia gasosa-espectrometria de massas-multidimensional⁷¹.

A racionalização do reconhecimento quiral, envolvendo derivados de ciclodextrinas como fase estacionária quiral é dificultada, pois a separação de pares enantioméricos numa certa fase estacionária quiral de derivado de ciclodextrina, muitas vezes não apresenta qualquer dependência lógica com a forma, tipo e funcionalidade da molécula. O processo de reconhecimento quiral pode envolver o mecanismo de inclusão, assim como interações do tipo ponte de hidrogênio e dipolo-dipolo. Nas separações de pares de enantiômeros em que foram empregados derivados lineares como fase estacionária quiral, ficou evidenciado que o processo de reconhecimento quiral por inclusão não é o único pré-requisito nos carboidratos.

Experimental

Os derivados 2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina (PMCD) (Sigma) e 2,3-di-O-metil-6-O-t-butildimetil-silano- β -ciclodextrina (TBCD) (sintetizados de acordo com os procedimentos citados na literatura)^{72,73,74} foram empregados como fase estacionária quiral, em solução a 10% (p/p) nos polimetil-siloxanos OV-1701-OH (7% de fenila, 5% de cianopropila) e SE-54 (5% de fenila, 1% de vinila).

Capilares de vidro (Duran 50) de 20m x 0,3mm, foram lixiviados a 170°C-180°C, com solução de HCl a 20%, desidratados a 280°C-300°C e silanizados de acordo com as técnicas descritas na literatura^{75,76}. Após a desativação, os capilares foram recobertos, pelo método estático^{77,78}, com a solução da fase estacionária em mistura 1:1 (v/v) de pentano e dicloro-metano, o que resultou em um filme com espessura de aproximadamente 0,3 μ m. Em seguida, os capilares foram condicionados lentamente (1°C/min), sob 6 psi de pressão de hidrogênio de 40°C até 170-200°C.

A inércia e a eficiência de separação das colunas foram determinadas pelo teste padronizado de Grob⁷⁹. A eficiência de separação quiral foi avaliada por uma mistura contendo alguns dos racematos presentes no teste de Schurig⁵³ (α -pineno, limoneno, γ -valerolactona, 1-feniletanol, 1-feniletilamina e ácido 2-etil-hexanóico).

As análises por cromatografia gasosa de alta resolução realizaram-se nos cromatógrafos HP-5890, séries I e II, com detectores por ionização em chama a 280°C; as amostras foram injetadas, com divisão de fluxo (taxa 1:20) e injetor na temperatura de 280°C. Hidrogênio foi empregado como gás de arraste na velocidade de 50 cm/s.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação enantiomérica de racematos de diferentes classes funcionais vem sendo investigada nas colunas de vidro

preparadas em nosso laboratório, com as fases PMCD e TBCD. A influência da polaridade dos polissiloxanos diluentes (OV-1701 e SE-54) sobre a separação desses racematos em TBCD também tem sido objeto de estudo. Alguns resultados representativos do comportamento enantiosseletivo dessas colunas para substratos usuais, estão relacionados na tabela 2⁸⁰.

O potencial dessas colunas quirais, em cromatografia gasosa de alta resolução, pode ser ilustrado através de algumas aplicações que serão apresentadas em seguida. O racemato 3-metil-7-fluoro-8-cloro-(2,3-di-hidro)-benzoxacina, obtido por aminação reductiva (H₂, Ni de Raney) de 3-oxoacetoni-3-nitro-6-fluoro-clorobenzeno⁸¹, foi separado em seus enantiômeros, pela primeira vez, na coluna de vidro revestida com PMCD/OV1701-OH (Fig. 3). O composto em questão, vem a ser o principal intermediário da síntese de Afloxacina, princípio ativo do medicamento conhecido como Taravid[®]. Assim, o estabelecimento das condições de análise quiral direta desse intermediário é do maior interesse para o acompanhamento desta síntese.

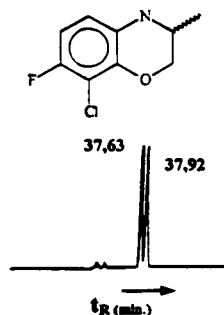


Figura 3. Cromatograma do (±) - 3-metil-7-fluoro-8-cloro-(di-hidro)-benzoxacina⁸¹ em coluna de vidro, de 20m x 0,3mm, d_f = 0,3μm de 10% de PMCD em OV1701-OH. Condições: veja experimental e programação 100°C | 1,5°C/min | 190°C; t_R (tempo de retenção) em minutos.

Os dois pares de enantiômeros do 2-alil-2-carbetoxiciclopentanol, obtidos pela redução de 2-carbetoxi-ciclopentanona com NaBH₄^{82,83} foram separados pela primeira vez, em coluna de vidro recoberta com a fase TBCD/SE-54 (Fig.4A). Nas mesmas condições cromatográficas analisou-se o álcool proveniente da redução enzimática, estereoespecífica, da mesma cetona⁸², verificando-se um excesso enantiomérico de 100% (Fig. 4B). Através da co-injeção desse álcool com a mistura diastereoisomérica da álcoois provenientes da primeira reação, verificou-se o aumento do segundo pico do primeiro par de enantiômeros (Fig. 4C). Essas separações também foram verificadas com a fase PMCD/OV1701-OH.

A separação enantiomérica do racemato 3-fluorolactato de metila, obtido do 3-fluoropiruvato de sódio, após acidificação, esterificação com CH₂N₂ e redução com NaBH₄⁸⁴, foi

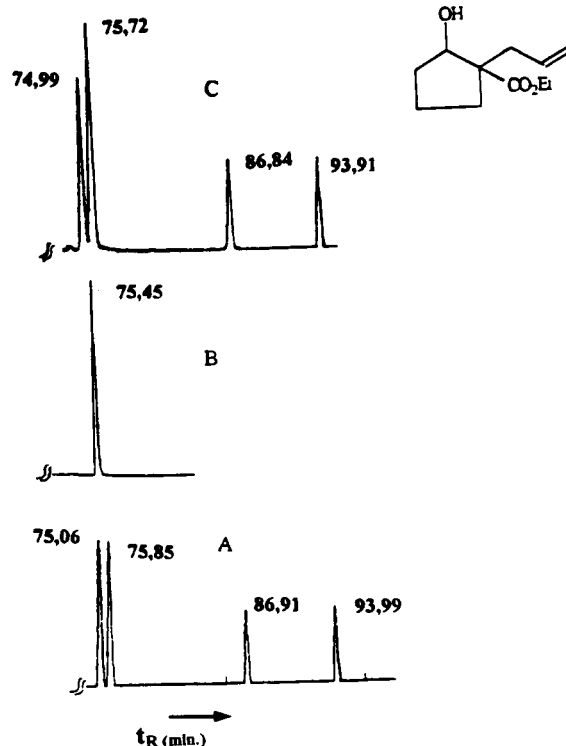


Figura 4. Cromatogramas do 2-alil-2-carbetoxiciclopentanol⁸² em coluna de vidro, de 20m x 0,3mm, d_f = 0,3μm de 10% de TBCD em SE-54. Condições: veja experimental e programação 50°C | 0,5°C/min | 130°C; t_R (tempo de retenção) em minutos. A - dois pares de enantiômeros; B - enantiômero puro; C - co-injeção de A e B.

observada pela primeira vez, na coluna de vidro revestida com a fase PMCD/OV-1701-OH (Fig.5A). Assim, foi possível analisar o 3-fluorolactato de metila proveniente da redução enzimática enantiospecífica do mesmo substrato⁸⁴, constatando-se um excesso enantiomérico de 100% (Fig. 5B). A co-injeção do produto dessa reação com o racemato obtido anteriormente mostrou aumento do pico de maior tempo de retenção (Fig. 5C), indicando ser este pico correspondente ao enantiômero obtido por via enzimática. Com base na enantiospecificidade da enzima empregada, a configuração desse produto deve ser R, o que constitui uma indicação para que a ordem de eluição dos enantiômeros do 3-fluorolactato de metila, em PMCD/OV-1701-OH, veja S→R. Não foi verificada separação enantiomérica desse produto, com a fase TBCD/SE-54, nas condições testadas.

A separação enantiomérica do 3-hidroxi-butirato de etila racêmico (Aldrich), foi obtida em coluna de vidro com TBCD/

Tabela 2. Efeito dos Derivados de Ciclodextrina (PMCD e TBCD) e da Polaridade de Polimetilsiloxanos (OV-1701-OH e SE-54) sobre a Separação Enantiomérica de Compostos Usuais⁸⁰.

COMPOSTOS	T ^o C ¹⁾	TBCD		PMCD			
		OV-1701-OH		OV-1701-OH			
		α ²⁾	R _s ³⁾	α	R _s		
α-Pineno	50	1,04	1,84	1,06	2,47	1,08	1,25
Limoneno	75	1,04	2,35	1,65	2,76	1,02	1,04
Mentol	80	1,00	0,46	1,02	0,95	1,03	1,36
Carvona	75	1,02	0,73	1,03	0,95	-	-
γ-valerolactanol	80	1,05	2,00	1,12	4,25	1,02	1,00
1-Feniletanol	80	1,11	3,62	1,13	3,43	1,14	3,84
1-Feniletilamina	70	1,04	0,60	1,05	1,21	-	-
Ácido 2-etil-hexanóico	70-100 ⁴⁾	- ⁵⁾	-	1,00	0,53	1,02	1,60

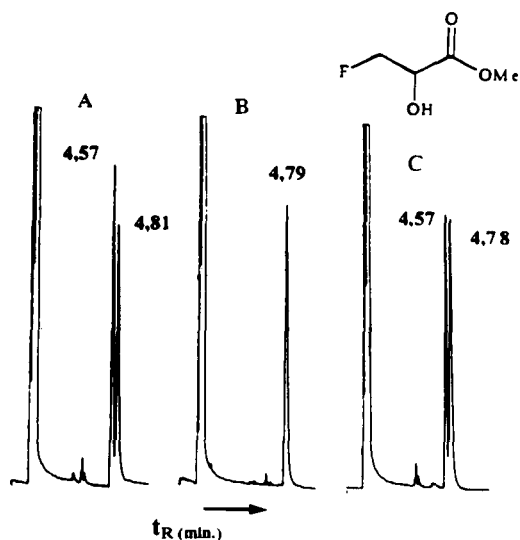


Figura 5. Cromatogramas do 3-fluorolactato de metila⁸⁴ em coluna de vidro, de 20m x 0,3mm, $d_f = 0,3\mu\text{m}$ de 10% de PMCD em OV-1701-OH. Condições: veja experimental e isoterma a 70°C; t_R (tempo de retenção) em minutos. A - racemato obtido por via química; B - enantiômero obtido por via enzimática; C - co-injeção de A e B.

SE-54 (Fig. 6A). Através da análise dos enantiômeros separados (Aldrich) (Fig. 6B e 6C), seguida da co-injeção dos mesmos (Fig. 6D), definiu-se a ordem de eluição dos componentes do racemato, em TBCD/SE-54, como sendo $S \rightarrow R$, além de confirmar a pureza enantiomérica indicada pelo fabricante.

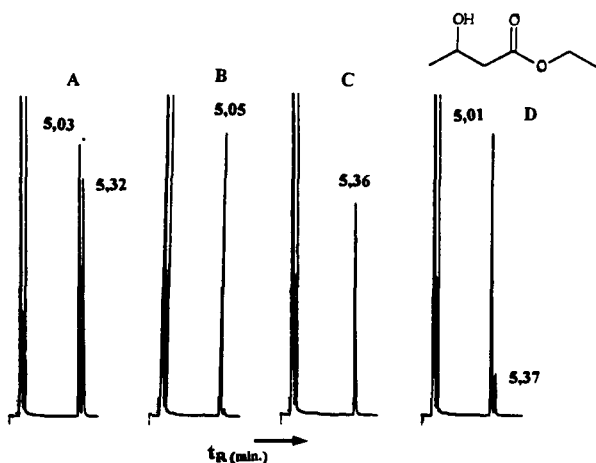


Figura 6. Cromatogramas do 3-hidroxibutirato de etila (Aldrich) em coluna de vidro, de 20m x 0,3mm, $d_f = 0,3\mu\text{m}$ de 10% de TBCD em SE-54. Condições: veja experimental e isoterma a 70°C; t_R (tempo de retenção) em minutos. A - racemato; B-(S) (+)- enantiômero; C-(R)(-)-enantiômero; D - co-injeção de B e C.

Nas condições de análise referidas acima, o 3-hidroxibutirato de etila proveniente da redução enzimática do acetoacetato de etila por uma oxireductase isolada de levedura de panificação⁸⁵, foi analisado, constatando-se um excesso enantiomérico de 100% (Fig. 7A). Através da co-injeção desse produto com os enantiômeros separados (Figs. 7B e 7C), pode-se indicar que o mesmo tem configuração S como era previsto pela estereoespecificidade da reação enzimática.

A separação do racemato 3-hidroxibutirato de metila e a ordem de eluição dos enantiômeros correspondentes foram

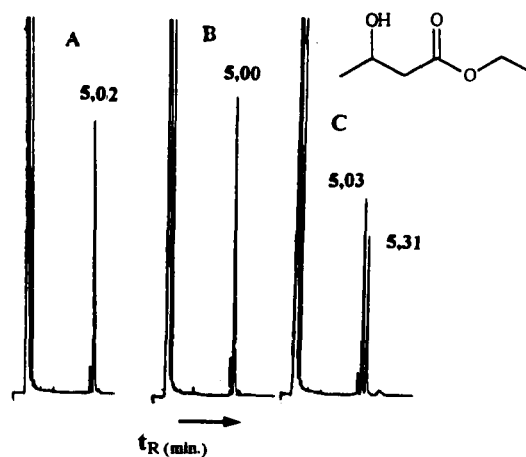


Figura 7. Cromatogramas do 3-hidroxibutirato de etila⁸⁵ em coluna de vidro, de 20m x 0,3mm $d_f = 0,3\mu\text{m}$ de 10% de TBCD em SE-54. Condições: veja experimental e isoterma a 70°C; t_R (tempo de retenção) em minutos. A - enantiômero obtido por via enzimática; B - co-injeção de A com o enantiômero (S) (+); C - co-injeção de A com o enantiômero (R)(-).

descritas na literatura em coluna de sílica com 30% de TBCD em SE-52⁸⁶. A resolução enantiomérica e a seletividade quiral observadas para o 3-hidroxibutirato de etila ($R_s = 1,81$; $\alpha = 1,057$), em coluna de vidro, contendo 10% do derivado de ciclodextrina, foram da mesma ordem de grandeza que as descritas na literatura para o derivado metílico ($R_s = 1,83$; $\alpha = 1,061$) assim como a seqüência de eluição dos enantiômeros foi a mesma, $S \rightarrow R$. Neste caso, a concentração do seletor quiral não constitui um fator crítico para a separação enantiomérica. Devido ao seu caráter polifuncional, os hidroxiésteres descritos neste trabalho constituem importantes blocos de construção para a síntese de compostos biologicamente ativos. A cromatografia gasosa quiral representa um suporte extremamente útil para o acompanhamento de sínteses desta classe de compostos, possibilitando a obtenção de resultados rápidos e reproduzíveis.

Outros derivados de ciclodextrina estão sendo sintetizados, o que ampliará a capacidade analítica do sistema atual, possibilitando a análise de compostos cujas estruturas não são reconhecidas quiralmente por PMCD e TBCD.

Outros trabalhos encontram-se em andamento, inclusive uma avaliação de resultados publicados na literatura e a comparação destes com os resultados obtidos em nosso laboratório, com o objetivo de reunir informações que possam vir a esclarecer melhor a forma como os diferentes derivados de ciclodextrina fazem o reconhecimento quiral, e assim, facilitar a previsão do sistema quiral mais adequado à resolução de um problema específico.

CONCLUSÕES

O emprego de derivados de ciclodextrinas, particularmente PMCD e TBCD, diluídos em SE-54 ou OV1071-OH, como fases estacionárias quirais em cromatografia gasosa de alta resolução aplicadas em colunas de vidro, foi demonstrado através da separação de racematos, da determinação da pureza ótica de reagentes, da determinação do excesso enantiomérico de produtos de sínteses assimétricas, da definição da ordem de eluição dos enantiômeros de um par racêmico e da confirmação da configuração absoluta de produtos de síntese.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e FUJB pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho. Aos professores Joel Jones Junior (DQO-IQ/UFRJ), Ótávio A. C. Antunes (DQI-IQ/UFRJ), Carlos Alberto Manssour Fraga (FF/UFRJ), Eliezer J. L.

Barreiro (FF/UFRJ) e ao grupo de pesquisadores do Laboratório de Enzimologia (DB/IQ/UFRJ) pelo gentil fornecimento dos padrões e produtos analisados.

REFERÊNCIAS

- Morrisson, J. D.; *Asymmetric Synthesis, Academic*; Orland 1985, 1.
- Allenmark, S. G.; *Chromatographic Enantioseparations Methods and Applications*; 2nd ed., Prentice Hall: New Jersey 1991.
- Eliel, E. L.; *Stereochemistry of Organic Compounds*; John Wiley: New York 1994.
- Schurig, V.; *Kontakte (Darmstadt)*, 1986, 1, 3.
- a) Gil-av, E.; Feibush, B.; Sigler-Charle, R.; *Tetrahedron Lett.* 1965, 1009; b) *J. Mol. Evol.* 1975, 6, 131; c) Liu, R. H.; Ku, W. W.; *J. Chromatogr.* 1983, 275, 309.
- a) Frank, H.; Nicholson, G. J.; Bayer, E.; *J. Chromatogr. Sci.* 1974, 15, 174; b) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1978, 17, 363; c) Koppenhofer, B.; Bayer, E.; *J. Chromatogr. Libr.* 1985, 32, 1.
- König, W. A.; *The Practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatographic*; Hüting Heidelberg: New York 1987.
- Schurig, V.; Nowotny, H. P.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 939.
- Hardt, I. H.; Wolf, C.; Gehrcke, B.; Hochmut, D. H.; Pfaffenberger, B.; Hühnerfuss, H.; König, W. A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1994, 17, 859.
- Granville, C. P.; Gehrcke, B.; König, W. A.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr.* 1993, 622, 21.
- a) Dietrich, A.; Mass, B.; Karl, V.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 176; b) Dietrich, A.; Mass, B.; Brand, G.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 769.
- Mosandl, A.; Rettinger, K.; Fischer, K.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1990, 13, 382.
- König, W. A.; Gehrcke, B.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1994, 17, 315.
- König, W. A.; Gehrcke, B.; Runge, T.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1993, 16, 376.
- Casabianca, H.; Graff, J. B.; Jame, P.; Perrchiett, C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1995, 18, 279.
- a) Bergon, R. J.; Villiers, A. C. R.; *Acad. Sic Paris* 1891, 112, 536; b) *J. Chem. Educ.* 1974, 54, 204.
- Villers, A. CR.; *Acad. Sic. Paris* 1891, 112, 536.
- Schardinger, F.; Unters, Z.; *Nahrungs-Genussmittel Gebrauch-Gegenstände* 1903, 6, 865.
- Cramer, F.; *Einschluerbindungen*; Springer: Berlin, 1954.
- Clarke, R. J.; Coates, J. H.; Lincoln, F. S.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1988, 46, 405.
- Freudenberg, K.; Cramer, F.; *Z. Naturforsch* 1948, 3, 464.
- Bender, M. L.; Komiyama, M.; *Cyclodextrins Chemistry*; Springer: Berlin 1978.
- Saenger, W.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1980, 19, 344.
- Szejtli, J.; *Drug Invest.* 1990, 2(suppl), 11.
- Pagington, J. S.; *Chem. Brit.* 1987, 23, 455.
- Jones, S. P.; Grant, J. W.; Hadgraft, J.; Parr, G. D.; *Acta Pharm. Technol.* 1984, 30, 213.
- Croft, A. P.; Bartsch, R. A.; *Tetrahedron* 1983, 39, 1417.
- Melton, L. D.; Slessor, K. N.; *Carbohydr. Res.* 1971, 18, 29.
- Tabushi, I.; Shimokawa, K.; Fugita, K.; *Teatrahedron Lett.* 1977, 1527.
- Hisamatsu, M.; Yamada, T.; *Starch/Starke* 1990, 41, 239.
- Irei, T.; *Pharm. Res.* 1988, 5, 713.
- Pitha, J.; *Int. J. Pharm.* 1986, 29, 73.
- Pitha, J.; *Life Sci.* 1988, 43, 493.
- Szurmai, Z.; *Starch/Starke* 1990, 42, 477.
- Szejtli, J.; *Cyclodextrin Technology*; Kluwer Academic Publishers: Boston 1988.
- Li, S.; Purdy, W. C.; *Chem. Rev.* 1992, 92, 1457.
- Sybilska, D.; Koscielski, T.; *J. Chromatogr.* 1983, 261, 357.
- Mráz, J.; Felt, L.; & Smolková-Kevlemansová, E.; *J. Chromatogr.* 1984, 286, 17.
- Krupcik, J.; Májek, P.; Hrouzek, J.; Skacani, L.; Spánik, I.; Sandra, P.; *Int. Symp. Capillary Chromatogr.* 1994, 1, 300.
- Koscielski, T.; Sybilska, D.; Jurzak, J.; *J. Chromatogr.* 1983, 280, 131.
- Lindström, M.; Norin, T.; Roeraade, J.; *J. Chromatogr.* 1990, 513, 315.
- Juvanez, Z.; Alexander, G.; Sjetli, J.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1987, 10, 105.
- Venema, A.; Tolsma, P. J. A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1989, 12, 32.
- König, W. A.; Lutz, S.; Wenz, G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1988, 27, 979.
- König, W. A.; Lutz, S.; Mischinick, P.; Lübbecke, P.; Brassat, B.; Wenz, G.; *J. Chromatogr.* 1988, 447, 193.
- König, W. A.; *Carbohydr. Res.* 1989, 192, 51.
- Armstrong, D. W.; Li, W.; Chang, C. D.; Pitha, J.; *Anal. Chem.* 1990, 62, 914.
- Armstrong, D. W.; Li, W. Y.; Pitha, J.; *Anal. Chem.* 1990, 62, 214.
- Berthold, A.; Li, W. Y.; Armstrong, D. W.; *Anal. Chem.* 1992, 64, 873.
- Schurig, V.; Nowotny, H. P.; *J. Chromatogr.* 1988, 441, 155.
- Nowotny, H. P.; Schmalzing, D.; Wistuba, D.; Schurig, V.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1989, 12, 383.
- Schurig, V.; Nowotny, H. P.; Schmalzing, D.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1989, 28, 736.
- Schurig, V.; *J. Chromatogr.* 1974, 666, 111.
- Blum, W.; Aichholz, R.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1990, 13, 515.
- König, W. A.; Icheln, D.; Runge, T.; Pffor, I.; Krebs, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1990, 13, 702.
- Bicchi, C.; Artuffo, G.; D'amato, A.; Manzin, V.; Galli, A.; Galli, M.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1993, 16, 209.
- König, W. A.; Krüger, A.; Icheln, D.; Runge, T.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 184.
- König, W. A.; Gehrcke, B.; Icheln, D.; Evers, P.; Dönneke, J.; Wang, W.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 367.
- Hardt, I.; König, W. A.; *J. Microcol. Sep.* 1993, 5, 35.
- Bicchi, C.; Artuffo, G.; D'amato, A.; Manzim, V.; Galli, M.; Galli, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 710.
- Dietrich, A.; Maas, B.; Messer, W.; Bruche, G.; Karl, V.; Kaunzinger, A.; Mosandl, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 590.
- Dietrich, A.; Maas, B. & Mosandl, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1995, 18, 152.
- Kobor, F.; Angermund, K.; Schomburg, G.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1993, 16, 299.
- Fischer, P.; Aichholz, R.; Bölz, V.; Jusza, M.; Krimmer, S.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 427.
- Schurig, V.; Schmalzing, M.; Mussche, P.; Duvekot, C.; Bryten, J. C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1990, 13, 713.
- Yi, G.; Bradshaw, J. S.; Rossiter, B. E.; Malik, A.; Li, W.; Lee, M. L.; *J. Org. Chem.* 1993, 58, 4844.
- Jung, M.; Schurig, V.; *J. Microcol. Sep.* 1993, 5, 11.
- Schmalzig, D.; Jung, M.; Mayer, S.; Rickert, J.; Schurig, V.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 723.
- Mosandl, A.; Hener, V.; Schmarr, H. G.; Rautenschlein, M.; *J. High Resolut. Chromatogr.* 1990, 13, 528.
- Schurig, V.; Scheimer, M.; Jung, M.; Mayer, S. Glausch,

- A.; In Schreier, P.; Winterhalter, P. Ed.; *Progress in Flavour Precursor Studies*; Allured: Carol Stream, IL, 1993, 45.
71. Schreier, P.; In Schreier, P.; Winterhalter, P. Ed.; *Progress in Flavour Precursor Studies*; Allures: Carol Stream, IL, 1993, 45.
72. Bouche, J.; Verzele, M.; *J. Gas Chromatography* **1968**, *6*, 501.
73. Fugedi, P.; *Carbohydr. Res.*, **1989**, *192*, 366.
74. König, W. A.; Icheln, D.; Runge, T.; Ptorr, I.; Krebs, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1990**, *13*, 702.
75. Grob, K.; *Making and Manipulating Capillary Columns for Gas Chromatography*; Heidelberg: Hüethig, 1986, 232.
76. Blum, W.; *J. High Resolut. Chromatogr. & Chromatogr. Column.*, **1985**, *8*, 718.
77. Kaiser, R.; *Chromatographie in der Gas Phase II, Kapilar-Chromatographie*; Bibliographischer Institut Mannheim, 1960, 67.
78. Dijkstra, G.; De Goey, J.; *Gas Chromatography*, Desty, D. H., Ed.; Butterworths: London 1958, 56.
79. Grob, K.; Grob, G.; Grob, J. K.; *J. Chromatogr.*, **1981**, *219*, 13.
80. Manuscrito em andamento.
81. Bolchat, N.; da Silva, F. S. Q.; *Projeto de Síntese de Intermediários Fluorados para a Indústria Farmacêutica*; Fiocruz-Farmanguinhos.
82. Fraga, C. A. M.; *Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Derivados Prostaciclina - Miméticos*; Tese de Doutorado, IQ/UFRJ 1994, 192.
83. Manuscrito em andamento.
84. Gonçalves, L. P. B.; Antunes, O. A. C.; Pinto, G. F.; *Obtenção por via enzimática do (R)-3-Fluorolactato de metila: bloco de construção quiral contendo três átomos de carbono 1,2,3-trissubstituído*; Enzitec: Rio de Janeiro, 1995.
85. Estudo em desenvolvimento no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica do IQ/UFRJ; comunicação pessoal.
86. Maas, B.; Dietrich, A.; Mosandl, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1994**, *17*, 119.