

Tiago de Campos Lourenço, Neila Maria Cassiano e Quezia B. Cass\*

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-970 São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 8/2/10; aceito em 7/6/10; publicado na web em 18/10/10

CHIRAL STATIONARY PHASES FOR HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. The development of Chiral Stationary Phases (CSPs) for high performance liquid chromatography has been studied by various researches around the world, especially, since 1980. This simple interest has been transformed into a tool of great technological value for the industrial community and scholars in general providing the existence of several CSPs, which act through different mechanisms of chiral discrimination. This paper describes the main types of CSPs that are used for the resolution of the majority of chiral compounds.

Keywords: HPLC; chiral stationary phases; chiral resolutions.

## INTRODUÇÃO

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

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

A diferença entre os coeficientes de adsorção de dois enantiômeros em compostos com morfologia assimétrica mostrou ser uma importante técnica de separação desde o início do século XX. Em 1936, Nakamura *et al.*<sup>4</sup> utilizaram cristais enantiomorfos de quartzo para separar pequenas quantidades de aminoclorobis(2,3-butanodionadióximato)cobalto(III),  $[\text{CoCl}(\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)]$ , propondo que a morfologia assimétrica do quartzo é responsável por adsorver mais fortemente um dos enantiômeros. Henderson e Rule,<sup>5</sup> em 1939, separaram o ( $\pm$ )-4-fenilenedi-iminocânfora utilizando lactose sólida. A mistura racêmica foi depositada na parte superior de um tubo contendo o adsorvente e, após sucessivas lavagens com solvente, um dos enantiômeros permaneceu adsorvido no topo do tubo enquanto o outro foi encontrado na parte inferior do mesmo.

A primeira técnica de relativo sucesso na resolução de enantiômeros foi a cromatografia em papel, tendo sido eficiente na separação de alguns aminoácidos aromáticos.<sup>6,7</sup> Baseado nestes trabalhos, Dagliesh, em 1952, propôs o modelo de “interação de três pontos” entre enantiômeros e o seletor quiral.<sup>6</sup> Segundo este modelo, são necessárias três interações simultâneas entre um dos enantiômeros e o seletor quiral, sendo que pelo menos uma delas deve ser dependente da estereoquímica do analito. Além disso, as interações devem ser de sítios distintos tanto no enantiômero quanto no seletor quiral<sup>2</sup> (Figura 1a). O outro enantiômero interage somente com dois sítios do seletor quiral (Figura 1b).

O modelo original considera que apenas as interações atrativas são responsáveis pela discriminação quiral. Atualmente, porém, é aceito que as interações repulsivas também participam do mecanismo

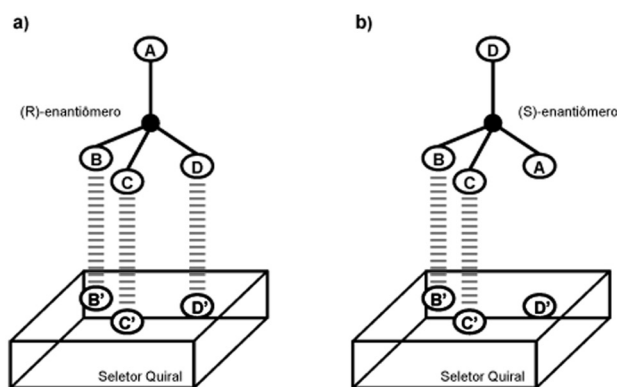


Figura 1. Representação do modelo de “interação de três pontos”

de resolução enantiomérica. Assim, por exemplo, duas interações podem ser repulsivas se uma terceira for atrativa e forte o suficiente para promover a formação de, no mínimo, um dos complexos diastereoisoméricos transitórios enantiômero/seletor quiral.<sup>8</sup> Se as três interações são atrativas, então o enantiômero na Figura 1a estará mais fortemente ligado ao seletor do que o enantiômero na Figura 1b.

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

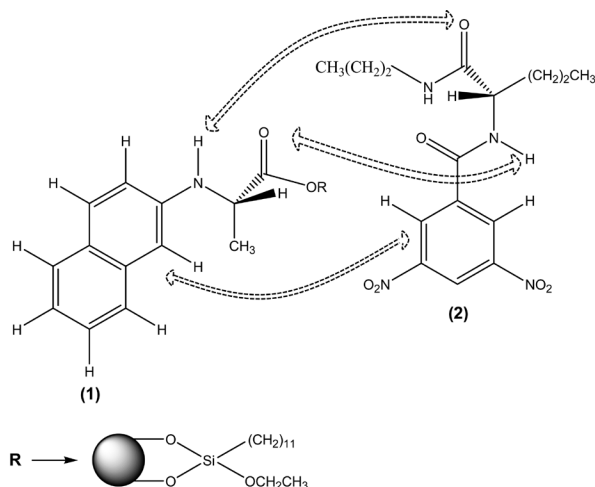
O modelo de “interação de três pontos” é bem aceito no meio científico, principalmente para explicar a discriminação de aminoácidos em fases estacionárias quirais do tipo troca de ligantes. Entretanto, esse mesmo modelo é frequentemente questionado para explicar as separações em seletores quirais de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

Pirkle e Pochapsky<sup>11</sup> demonstraram que para sistemas com interação  $\pi$ - $\pi$ , a rigidez conformacional dos anéis aromáticos participa da formação do complexo diastereoisomérico e, como consequência, apenas dois grupos funcionais ligados ao centro estereogênico do analito precisam interagir com os grupos funcionais do seletor qui-

\*e-mail: quezia@pq.cnpq.br

#Artigo em homenagem ao Prof. Hans Vietler

ral. Segundo esses autores, ocorrem três interações entre o seletor quiral da fase estacionária, (*S*)-metil *N*-(2-naftil)alaninato (**1**), e o enantiômero (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoi)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). Topiol e Sabio<sup>12</sup> denominaram esse modelo como uma “interação pseudo-dois-pontos”.



**Figura 2.** Reconhecimento quiral entre o seletor quiral (*S*)-metil *N*-(2-naftil)alaninato (**1**) e o enantiômero (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoi)leucina *n*-propilamida (**2**). Adaptada da ref. 11

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

Entretanto, há uma temperatura específica onde a entalpia e a entropia se anulam. Nesta temperatura há formação dos complexos

diastereoisoméricos e, portanto, reconhecimento quiral, mas não ocorre discriminação dos enantiômeros. Para que haja discriminação quiral são necessárias temperaturas maiores ou menores do que esta temperatura específica.<sup>8</sup>

Os processos envolvidos na formação dos complexos diastereoisoméricos transitórios analito/fase estacionária quiral não são simples e singulares, visto que várias interações simultâneas são requeridas para discriminar um enantiômero do outro. Nos mecanismos enantiosseletivos, muitas vezes as interações fracas podem desempenhar um papel tão decisivo quanto as interações fortes.<sup>11</sup> Mesmo assim, usualmente a escolha do seletor quiral é feita considerando as interações mais fortes entre os enantiômeros e a fase estacionária quiral (CSP, *Chiral Stationary Phase*).<sup>2</sup>

Se, por um lado, o crescente número de fases estacionárias quirais desenvolvidas e comercialmente disponíveis possibilita a separação dos enantiômeros de uma ampla variedade de compostos, ao mesmo tempo dificulta a escolha da fase estacionária mais apropriada para cada tipo de separação. Em vista disto, Wainer<sup>13</sup> classificou as fases estacionárias em cinco diferentes grupos, de acordo com as interações analito/CSP. Posteriormente, Berthod<sup>2</sup> reclassificou as CSPs de acordo com o tipo de seletor quiral, natural ou sintético, da fase estacionária (Tabela 1).

As fases estacionárias serão apresentadas de acordo com essa classificação.

## SELETORES QUIRAIS NATURAIS

### Proteínas

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

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

As CSPs com proteínas quimicamente ligadas são as mais estáveis e, portanto, as mais utilizadas.<sup>15</sup> O seletor pode ser covalentemente ligado à sílica derivada (aminopropilsílica) através dos grupos amino ou carboxílico da proteína. No primeiro procedimento são utilizados reagentes eletrofílicos como espaçadores, tais quais o suberato de *N,N*-disuccinimidila<sup>16</sup> e o glutaraldeído.<sup>17</sup> Reações com reagentes

**Tabela 1.** Seletores quirais e principais interações com analitos quirais. Adaptada da ref. 2

Seletor quiral	Fases estacionárias quirais	Principais interações
Natural	Proteínas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas
	Ciclodextrinas	Complexo de inclusão e ligação de hidrogênio
	Polissacarídeos	Complexo de inclusão e interações atrativas
	Glicopeptídeos Macroclícos	Complexo de inclusão e interações iônicas
	Cinchona	Interações eletrostáticas
Sintético	Tipo Pirkle	Interação $\pi$ - $\pi$ e ligação de hidrogênio
	Troca de ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo
	Éteres de coroa	Complexo de inclusão e íon-dipolo
	Polímeros sintéticos	Interação $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo
	Polímeros impressos molecularmente (MIPs)	Específico para cada analito

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

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

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

## Ciclodextrinas

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

A molécula de ciclodextrina possui uma estrutura estereoespecífica, na forma de cone truncado. A ausência de grupos hidroxila livres orientados para o interior da cavidade faz com que esta apresente um caráter relativamente hidrofóbico. Por outro lado, a superfície externa é hidrofílica, devido à presença de grupos hidroxila primários e secundários.<sup>25</sup>

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

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

A derivação dos grupos hidroxila primários e secundários possibilitou o desenvolvimento de novas fases com diferentes funcionalidades e polaridades e, conseqüentemente, com diferentes tipos de interações.<sup>27</sup> Dentre os derivados de CD, a fase naftiletilcarbamato de  $\beta$ -ciclodextrina (NEC- $\beta$ -CD), ilustrada na Figura 3, merece destaque pois, além de propiciar as interações descritas anteriormente, um novo centro estereogênico é adicionado à estrutura do seletor quiral.

Armstrong e colaboradores<sup>28</sup> relataram a separação de 121 compostos racêmicos na fase estacionária quiral (*S*)-(1-naftiletil)carbamato de  $\beta$ -ciclodextrina (*S*-NEC- $\beta$ -CD) e de 74 racematos na CSP *R*-NEC- $\beta$ -CD, no modo normal de eluição. A NEC- $\beta$ -CD também é conhecida por ser uma das primeiras CSPs utilizada em eluição multimodal.<sup>29</sup>

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

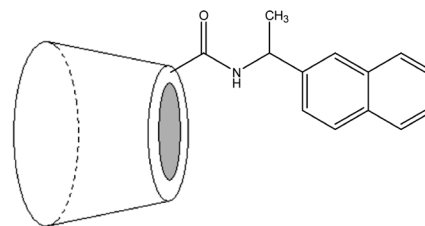


Figura 3. Seletor quiral naftiletilcarbamato de  $\beta$ -ciclodextrina (NEC- $\beta$ -CD). Adaptada da ref. 29

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

## Polissacarídeos

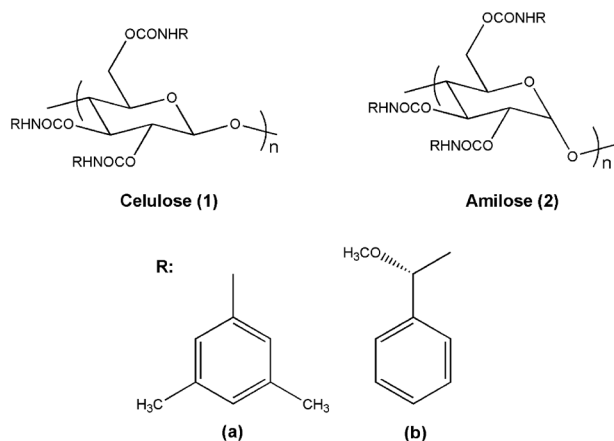
Os polissacarídeos na sua forma nativa são capazes de discriminar enantiômeros e resolver misturas racêmicas. Entretanto, as suas habilidades de reconhecimento quiral não são suficientes para serem utilizados como CSP em cromatografia líquida.<sup>32</sup>

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

Okamoto e colaboradores<sup>36</sup> solubilizaram o triacetato de celulose e o adsorveram em sílica macroporosa. Essa fase mostrou uma capacidade de reconhecimento quiral completamente distinta da fase preparada por Hesse e Hagel, sendo observada inversão na ordem de eluição de enantiômeros.<sup>37</sup> Desde então, diversas CSPs baseadas em tris-benzoatos, tris-fenilcarbamatos e tris-benzilcarbamatos de polissacarídeos adsorvidos em 3-aminopropilsilica macroporosa foram desenvolvidas pelo grupo do Okamoto.<sup>32,36,38-44</sup> Uma variedade de polissacarídeos, tais como celulose, amilose, quitosana, quitina e xilan, foram eficientemente derivados e usados como seletores quirais para separação de diferentes classes de compostos quirais.<sup>39,40,42,43,45</sup>

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

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



**Figura 4.** Fases quirais derivadas de fenilcarbamatatos de celulose e amilose 1(a): tris(3,5-dimetilfenilcarbamatato) de celulose, 2(a): tris(3,5-dimetilfenilcarbamatato) de amilose e 2(b): tris[(S)-1-feniletilcarbamatato] de amilose. Adaptada da ref. 45

As CSPs tris(3,5-dimetilfenilcarbamatato) de celulose e tris(3,5-dimetilfenilcarbamatato) de amilose são comercializadas pela Daicel Chemical Industries, com os nomes Chiralcel<sup>®</sup> OD e Chiralpak<sup>®</sup> AD, respectivamente. Atualmente, a Phenomenex disponibiliza três tipos de colunas quirais baseadas em tris-fenilcarbamatatos, a tris(3,5-dimetilfenilcarbamatato) de celulose (Lux<sup>®</sup> Cellulose-1), a tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamatato) de celulose (Lux<sup>®</sup> Cellulose-2) e a tris(5-cloro-2-metilfenilcarbamatato) de amilose (Lux<sup>®</sup> Amylose-2).

Cass e colaboradores<sup>48,49</sup> investigaram o uso de sílica micro e mesoporosa como suporte para os seletores quirais tris-fenilcarbamatatos de celulose e amilose. Essas CSPs são eficientes na discriminação de compostos quirais, além de serem mais resistentes do que as similares desenvolvidas com sílica macroporosa.<sup>51</sup>

Além dos benzoatos e fenilcarbamatatos, alguns benzilcarbamatatos, particularmente a fase tris[(S)-1-feniletilcarbamatato] de amilose,<sup>39,40,42,52</sup> comercializada pela Daicel com o nome Chiralpak<sup>®</sup> AS (Figura 4), exibem excelentes enantiosseletividades para uma variedade de racematos.<sup>38,53</sup>

As CSPs de derivados de polissacarídeos podem ser utilizadas nos três modos de eluição, normal, reverso e polar orgânico.<sup>38,54,55</sup> Embora os fabricantes destas colunas recomendem colunas específicas para cada modo de eluição, Cass e colaboradores<sup>52,56,57</sup> investigaram a utilização das fases tris(3,5-dimetilfenilcarbamatato) de celulose e amilose e tris[(S)-1-feniletilcarbamatato] de amilose<sup>40,42,52</sup> em eluição multimodal. Os estudos mostraram que as mesmas podem ser usadas nos três modos de eluição sem perda do desempenho das colunas e com alterações na capacidade de discriminação quiral, por mudanças do modificador orgânico ou do modo de eluição, o que aumenta ainda mais a aplicabilidade destas colunas para separações quirais.

A fase tris(3,5-dimetoxifenilcarbamatato) de amilose, não disponível comercialmente,<sup>49</sup> apresentou excelente poder de discrimina-

ção quiral, no modo reverso de eluição, para os enantiômeros do metirapol e metirapona<sup>58</sup> e para os enantiômeros do lansoprazol<sup>59</sup> e do pantoprazol,<sup>60</sup> sendo utilizada com êxito em estudos farmacocinéticos.

Embora as CSPs de polissacarídeos apresentem grande aplicabilidade na resolução de misturas enantioméricas com várias estruturas químicas, alguns solventes cromatográficos pouco usuais, como tetra-hidrofurano (THF), acetato de etila, acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano e tolueno, não podem ser usados como fases móveis, uma vez que podem solubilizar o seletor quiral adsorvido na sílica.<sup>61</sup>

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

A literatura relata diversos métodos de preparo das CSPs de polissacarídeos imobilizadas por ligação covalente direta do seletor quiral ao suporte<sup>62,63,68</sup> ou pela reticulação do polissacarídeo, previamente imobilizado no suporte, por ligações inter cruzadas.<sup>69-72</sup> Algumas técnicas de imobilização combinam as duas estratégias.<sup>73-76</sup>

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

Três tipos de CSPs quimicamente ligadas são comercializadas pela Daicel: a Chiralpak<sup>®</sup> IA, tris(3,5-dimetilfenilcarbamatato) de amilose, a Chiralpak<sup>®</sup> IB, tris(3,5-dimetilfenilcarbamatato) de celulose e a Chiralpak<sup>®</sup> IC, tris(3,5-diclorofenilcarbamatato) de celulose. Essas fases estacionárias apresentam excelente habilidade de reconhecimento quiral para uma série de compostos com diferentes propriedades físico-químicas.<sup>78-80</sup>

Devido ao alto poder de enantiorresolução e grande estabilidade, as CSPs baseadas em derivados de polissacarídeos, adsorvidos ou quimicamente ligados ao suporte, têm sido utilizadas na quantificação de enantiômeros em matrizes biológicas<sup>81-84</sup> e para separações em escala semi-preparativa e preparativa.<sup>85-88</sup>

## Glicopeptídeos macrocíclicos

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

A Astec comercializa seis tipos de CSPs de antibióticos macrocíclicos: com fase de ristocetina A (Chirobiotic<sup>®</sup> R), fases de vancomicina (Chirobiotic<sup>®</sup> V e Chirobiotic<sup>®</sup> V2), fases de teicoplanina (Chirobiotic<sup>®</sup> T e Chirobiotic<sup>®</sup> T2) e teicoplanina aglicona (Chirobiotic<sup>®</sup> TAG).

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

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

A estrutura da ristocetina A possui 38 centros estereogênicos e

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

A teicoplanina (Figura 5) apresenta 23 centros quirais, 4 cavidades macrocíclicas, diferentes grupos funcionais e 3 carboidratos; D-manose, β-D-N-acetil glucosamina e uma unidade hidrofóbica β-D-N-acil glucosamina (com uma cadeia nonil). Desta forma, essa fase quiral possui um caráter mais hidrofóbico que a vancomicina e a ristocetina A.<sup>90,91</sup>

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

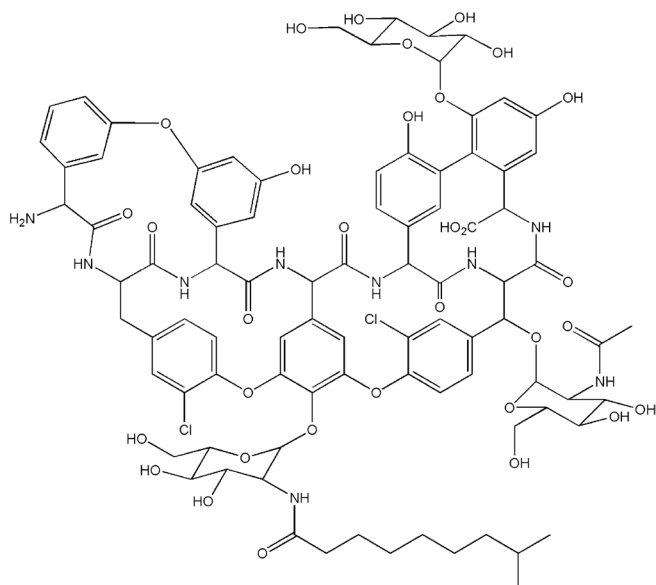


Figura 5. Estrutura química da teicoplanina. Adaptada da ref. 90

Devido à presença das cavidades quirais e de diversos tipos de grupos funcionais, a enantioseparação pode ocorrer por diferentes mecanismos: formação de complexos de inclusão, ligação de hidrogênio, interações π-π, eletrostáticas, estéricas, dipolo-dipolo e dispersão de London. A fase móvel determina quais interações irão predominar no mecanismo de reconhecimento quiral.<sup>90,91</sup>

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

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

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

### Alcaloides de cinchona

Dentre os alcaloides de cinchona, a quinina e a quinidina desta-

cam-se por serem fontes naturais de seletores quirais. A capacidade de resolver enantiômeros é decorrente das características estruturais destes dois alcaloides diastereoisoméricos que possuem um anel planar quinolínic e um anel rígido de quinuclidina, além de cinco centros estereogênicos em cada molécula.<sup>103</sup>

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

As CSPs de carbamatos de quinina e quinidina covalentemente imobilizados em sílica são muito eficientes na resolução de enantiômeros de aminoácidos e outros compostos ácidos,<sup>104-106</sup> especialmente no modo reverso, utilizando-se misturas de solventes orgânicos e tampões aquosos.<sup>104,107</sup> Com fases móveis aquosas tamponadas (pH entre 4 e 7), o grupo ácido do analito encontra-se ionizado (negativamente carregado) e interage com a amina terciária protonada (positivamente carregada) do grupo quinuclidina. Além desta interação iônica intermolecular, ligações de hidrogênio, interações π-π, dipolo-dipolo e estérica também participam do processo de discriminação quiral.<sup>105,107,108</sup>

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

### SELETORES QUIRAIS SINTÉTICOS

#### Tipo “Pirkle”

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

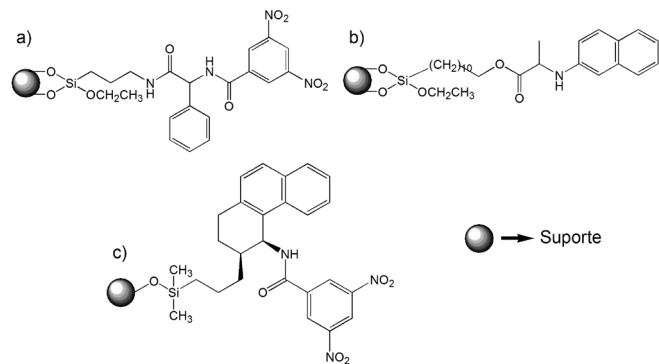


Figura 6. Estruturas químicas das fases estacionárias do tipo “Pirkle”: a) 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina, b) naftalalanina e c) (S,S) Whelk-O® 1. Adaptada da ref. 40

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

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

Enquanto as CSPs  $\pi$ -ácidas são adequadas para separar enantiômeros contendo grupos doadores de elétrons  $\pi$ , as  $\pi$ -básicas discriminam compostos que possuem grupos receptores de elétrons  $\pi$ . As CSPs  $\pi$  ácido-básico são úteis na resolução quiral de compostos com grupos aceptores e/ou doadores de elétrons  $\pi$ .<sup>110</sup> Estas distintas CSPs são utilizadas no modo normal de eluição, apesar de apresentarem poder de discriminação quiral no modo reverso.<sup>111</sup>

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

A fase 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina, DNBPg, (Figura 6a), uma  $\pi$ -ácida, apresentou eficiência na separação de diversas classes de compostos quirais, como sulfóxidos, aminas, aminoácidos, lactonas, hidróxiácidos e mercaptanas.<sup>109</sup> Um exemplo de CSP doadora de elétrons  $\pi$  ( $\pi$ -básica) é a derivada da naftilalanina (Figura 6b), que contém um anel naftaleno em sua estrutura química.<sup>110</sup>

Uma das fases mais eficientes é a Whelk-O<sup>®</sup> 1<sup>113</sup> (Regis Technologies), caracterizada como  $\pi$  ácido-básico (Figura 6c). Essa CSP, inicialmente desenvolvida para resolver o naxopreno,<sup>114</sup> também mostrou excelente enantioselectividade na separação de misturas racêmicas de derivados cetônicos, alcoóis, flavononas, cumarinas, epóxidos e sulfóxidos.<sup>115,116</sup>

Muitos seletores quirais sintéticos, assim como as CSPs do tipo "Pirkle", possuem centro(s) esterogênico(s) definido(s), o que é uma vantagem em relação aos seletores quirais naturais.<sup>117</sup> A inversão na configuração espacial do centro quiral da fase estacionária leva à inversão da ordem de eluição dos enantiômeros, o que é uma importante característica para aplicações em escala analítica e, principalmente, em escala preparativa.<sup>20</sup>

### Troca de ligantes

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

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

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

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

Seletores quirais que possuem grupos hidrofóbicos podem ser fisicamente adsorvidos em suportes sólidos, geralmente sílica alquil

derivada.<sup>119,120,123</sup> Diferentes CSPs preparadas com esse método foram efetivas na enantioseparação de aminoácidos.<sup>124-128</sup>

As CSPs do tipo troca de ligantes apresentam aplicabilidade restrita quando comparadas às outras colunas quirais, visto que conseguem resolver um número limitado de classes de compostos quirais, tais como aminoácidos, hidróxiácidos e aminoalcoóis.<sup>125</sup>

Algumas CSPs desse tipo são comercializadas pela Daicel Chemical Industries, Serva, Phenomenex, Macherey-Nagel, Astec, Regis Technologies e Sumica Chemical Analysis Service.

### Éteres de coroa

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

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

Desde então, diversas CSPs de éteres de coroa foram sintetizadas e avaliadas em relação às suas capacidades de reconhecimento quiral. Hyun *et al.*<sup>134</sup> sintetizaram uma CSP ligando covalentemente o (3,3'-difênil-1,1'-binaft-2,2'-diil)-20-coroa-6 na superfície da sílica. Essa CSP foi efetiva na separação de enantiômeros de vários  $\alpha$ -aminoácidos naturais e sintéticos e com este tipo de imobilização química, fases móveis contendo metanol, etanol e acetonitrila (20-80%) puderam ser utilizadas sem perda do desempenho da coluna.

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

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

De maneira geral, as CSPs de éteres de coroa possuem aplicação restrita a misturas enantioméricas com caráter eletrofílico. Compostos como aminoamidas,<sup>135</sup> aminas,<sup>139</sup> aminoácidos,<sup>141</sup> aminoésteres,<sup>142</sup> aminoalcoóis<sup>143</sup> e aminocetonas<sup>144</sup> são bem resolvidos neste tipo de fase quiral, particularmente com fases móveis ácidas.

Essas CSPs também foram utilizadas na determinação da pureza enantiomérica de substâncias biologicamente ativas como a norefedrina<sup>145</sup> e a tocainida.<sup>146</sup> Em escala preparativa, a presença de aditivos ácidos na fase móvel pode dificultar o isolamento do enantiômero puro.<sup>147</sup>

## Polímeros sintéticos

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

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

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

Armstrong e colaboradores imobilizaram diferentes homopolímeros quirais à superfície da sílica. As CSPs preparadas com os monômeros *trans*-1,2-ciclo-hexanodil-bis-acrilamida (P-CAP®; Astec),<sup>156</sup> *N,N'*-[(1*R*,2*R*)-1,2-difenil-1,2-etanodil]bis-2-propenamida (P-CAP-DP®; Astec)<sup>157</sup> e *trans*-9,10-di-hidro-9,10-etanoantraceno-(1*S*,12*S*)-11,12-ácido dicarboxílico bis-4-vinilfenilamida (DEAVB)<sup>158</sup> apresentaram eficiência na separação de diversos compostos quirais nos modos de eluição normal, normal clorado e polar orgânico.<sup>156-158</sup>

Recentemente, as colunas P-CAP®, P-CAP-DP® e DEAVB foram empregadas na resolução de uma série de 17 sulfóxidos quirais.<sup>159</sup> A DEAVB apresentou alto poder de discriminação quiral para os fármacos omeprazol, pantoprazol, lanzoprazol, rabeprazol e modafinil, no modo multimodal. Pela primeira vez foi demonstrada a capacidade de discriminação quiral dessa fase no modo reverso de eluição.<sup>159</sup> Os cromatogramas da Figura 7 mostram as diferenças na enantiorresolução obtidas para o pantoprazol na coluna P-CAP® no modo normal de eluição e na coluna DEAVB em eluição multimodal.<sup>160</sup>

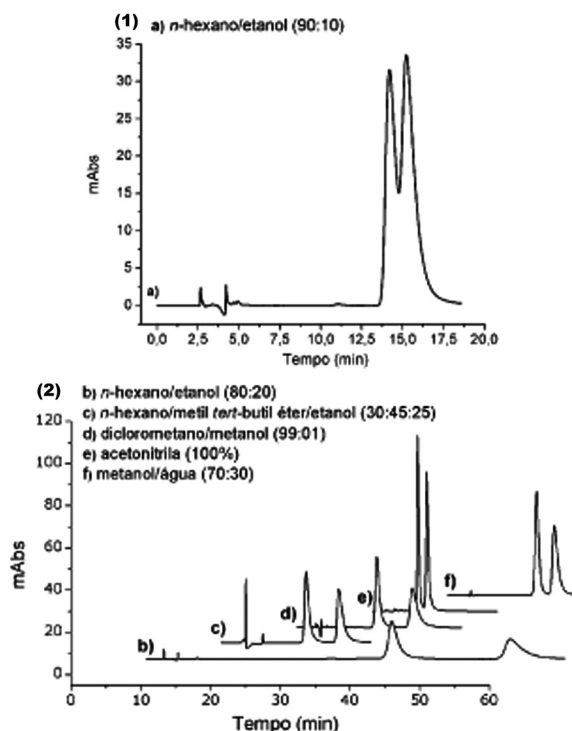
Para todas as CSPs poliméricas, interações  $\pi$ - $\pi$ , estéricas e ligação de hidrogênio participam do mecanismo de discriminação.<sup>2</sup>

## Polímeros impressos molecularmente

O preparo deste tipo de CSP emprega moléculas modelo (geralmente um dos enantiômeros da mistura que se deseja resolver) para criar os sítios de interações estereoquímicas entre o seletor e o analito.<sup>161</sup> A cavidade quiral do MIP tem tamanho, forma e arranjo dos grupos funcionais complementares ao da molécula modelo e, desta forma, pode atuar como sítio de ligação altamente específico.<sup>162,163</sup> Diferentemente dos demais tipos de CSPs, as fases quirais de polímeros impressos molecularmente permitem prognosticar a ordem de eluição dos enantiômeros.<sup>164</sup>

De maneira geral, as CSPs de polímeros impressos molecularmente (MIPs, *Molecular Imprinted Polymers*) são eficientes na separação de misturas racêmicas que tiveram um de seus enantiômeros utilizados como *template*. Porém, ao se resolver misturas enantioméricas de compostos análogos há uma diminuição no fator de retenção e na resolução cromatográfica.<sup>165</sup>

Embora os MIPs sejam usados em escala analítica e preparativa, as CSPs possuem baixa eficiência quando comparadas às outras fases



**Figura 7.** Separação cromatográfica dos enantiômeros do pantoprazol nas colunas de polímeros sintéticos (1) P-CAP no modo normal de eluição e (2) DEAVB em eluição multimodal. Concentração da amostra: 100  $\mu$ g/mL; vazão da fase móvel: 1,0 mL/min;  $\lambda$ : 285 nm; volume de injeção: 10  $\mu$ L

quirais devido a problemas de transferência de massa e heterogeneidade dos sítios de interação, o que causa bandas largas e assimétricas.<sup>166</sup> Outras limitações são a pequena capacidade de carga da coluna e o baixo número de pratos teóricos.<sup>167</sup> Entretanto, devido ao baixo custo de síntese e fácil preparo, uma grande variedade de CSPs tem sido desenvolvidas e usadas na resolução quiral de diferentes fármacos, tais como efedrina,<sup>168</sup> naproxeno, propranolol e timolol,<sup>169</sup> de aminoácidos<sup>170,171</sup> e peptídeos.<sup>172</sup>

## CONCLUSÃO

Esta revisão discutiu os diferentes tipos de seletores quirais usados no preparo de diversas fases estacionárias quirais (CSPs, *Chiral Stationary Phases*) e suas interações com os analitos, as quais são responsáveis pela discriminação quiral. Inúmeras aplicações na resolução de misturas enantioméricas dessas diferentes CSPs também foram apresentadas.

Atualmente, há mais de 100 colunas cromatográficas quirais disponíveis comercialmente e a busca por maiores eficiências impulsiona o desenvolvimento de novas CSPs. Se, por um lado, isto propicia maior potencial para resolução de enantiômeros, por outro, dificulta a escolha da coluna quiral a ser utilizada.

As fases quirais de polissacarídeos e de antibióticos macrocíclicos apresentam excelentes enantiosseletividades para uma ampla variedade de classes de compostos e, assim, são as primeiras fases avaliadas quando não se tem referências de separações enantioméricas para a mistura. Dentre as CSPs de polissacarídeos, as fases tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e a de amilose, e a tris[(*S*)-1-fenil-etilcarbamato] de amilose apresentam propriedades complementares e devem ser avaliadas nos três modos de eluição: normal, reverso e polar orgânico. As fases quirais de antibióticos macrocíclicos, Chirobiotic® R, Chirobiotic® V, Chirobiotic® T e Chirobiotic® TAG também apresentam enantiosseletividades complementares e devem

ser avaliadas preferencialmente no modo polar orgânico e polar iônico seguido do reverso e normal, se necessário. A fase Whelk-O® 1, tipo “Pirkle”, também tem sido amplamente utilizada com essa finalidade por apresentar interações  $\pi$ -ácido-básico e, portanto, ser capaz de resolver uma grande variedade de misturas enantioméricas.

Espera-se que esta revisão sirva de guia na escolha das condições de separação.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à CAPES e FAPESP (2007/06786-5) pelo suporte financeiro e bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

- White, C. A.; Subramanian, G. Em *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*; Subramanian, G., ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1994, cap. 1.
- Berthod, A.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2093.
- Kostyanovsky, R. G.; *Mendeleev Commun.* **2003**, 85.
- Tsuchida, R.; Kobayashi, M.; Nakamura, A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1936**, *11*, 38.
- Henderson, G. M.; Rule, H. G.; *J. Chem. Soc.* **1939**, 1568.
- Dalgliesh, C. E.; *J. Chem. Soc.* **1952**, 3940.
- Kotake, M.; Sakan, T.; Nakamura, N.; Senoh, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2973.
- Davankov, V. A.; *Chirality* **1997**, *9*, 99.
- Yang, J.; Hage, D. S.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *725*, 273.
- Yang, J.; Hage, D. S.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *766*, 15.
- Pirkle, W. H.; Pochapsky, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5627.
- Topiol, S.; Sabio, M.; *J. Chromatogr.* **1989**, *461*, 129.
- Wainer, I. W.; *Clin. Pharmacol.* **1993**, *18*, 139.
- Allenmark, S. G. Em *Chiral Separations by HPLC*; Krstulovic, A. M., ed.; Ellis Horwood: West Sussex, 1989, cap. 11.
- Haginaka, J.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 253.
- Oda, Y.; Asakawa, N.; Abe, S.; Yoshida, Y.; Sato, T.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1991**, *572*, 133.
- Allenmark, S. G.; *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*, 2<sup>nd</sup> ed.; Ellis Horwood: New York, 1991.
- Marle, I.; Joensson, S.; Isaksson, R.; Pettersson, C.; Pettersson, G.; *J. Chromatogr.* **1993**, *648*, 333.
- Haginaka, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *875*, 12.
- Francotte, E. R.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 379.
- Domenici, E.; Bertucci, C.; Salvadori, P.; Wainer, I. W.; *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 164.
- Kim, H. S.; Hage, D. S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *816*, 57.
- Chen, J.; Hage, D. S.; *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1445.
- Matsunaga, H.; Haginaka, J.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1106*, 124.
- Stalcup, A. M. Em ref. 1, cap. 5.
- Ali, I.; Kumerer, K.; Aboul-Enein, H. Y.; *Chromatographia* **2006**, *63*, 295.
- Han, S. M.; Han, Y. I.; Armstrong, D. W.; *J. Chromatogr.* **1988**, *441*, 376.
- Berthod, A.; Chang, S. C.; Armstrong, D. W.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 395.
- Armstrong, D. W.; Hilton, M.; Coffin, L.; *LCGC* **1991**, *9*, 646.
- Chang, S. C.; Reid, G. L., III; Chen, S.; Chang, C. D.; Armstrong, D. W.; *Trends Anal. Chem.* **1993**, *12*, 144.
- Wang, C.; Jiang, C.; Armstrong, D. W.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1980.
- Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5357.
- Hesse, G.; Hagel, R.; *Chromatographia* **1973**, *6*, 277.
- Blaschke, G.; *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, *9*, 341.
- Francotte, E.; *J. Chromatogr., A* **1994**, *666*, 565.
- Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Yamamoto, K.; Hatada, K.; *Chem. Lett.* **1984**, 739.
- Ichida, A.; Shibata, T.; Okamoto, I.; Yuki, Y.; Namikoshi, H.; Toga, Y.; *Chromatographia* **1984**, *19*, 280.
- Yashima, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 105.
- Kaida, Y.; Okamoto, Y.; *J. Chromatogr.* **1993**, *641*, 267.
- Okamoto, Y.; Ikai, T.; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2593.
- Okamoto, Y.; Kaida, Y.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 708.
- Okamoto, Y.; Kaida, Y.; *J. Chromatogr., A* **1994**, *666*, 403.
- Okamoto, Y.; Kaida, Y.; Hayashida, H.; Hatada, K.; *Chem. Lett.* **1990**, 909.
- Yashima, E.; Okamoto, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 3289.
- Cass, Q. B.; Tiritan, M. E.; Bassi, A. L.; Calafatti, S. A.; Degani, A. L. G.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 49.
- Wainer, I. W.; Stiffin, R. M.; Shibata, T.; *J. Chromatogr.* **1987**, *411*, 139.
- Wainer, I. W.; Alembik, M. C.; *J. Chromatogr.* **1986**, *358*, 85.
- Cass, Q. B.; Bassi, A. L.; Calafatti, S. A.; Matlin, S. A.; Tiritan, M. E.; Moreira de Campos, L. M.; *Chirality* **1996**, *8*, 143.
- Matlin, S. A.; Tiritan, E. M.; Crawford, A. J.; Cass, Q. B.; Boyd, D.; *Chirality* **1994**, *6*, 135.
- Aboul-Enein, H. Y.; Ali, I.; *Chirality* **2002**, *14*, 47.
- Tiritan, M. E.; Cass, Q. B.; Del Alamo, A.; Matlin, S. A.; Grieb, S. J.; *Chirality* **1998**, *10*, 573.
- Cass, Q. B.; Batigaglia, F.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *987*, 445.
- Kaida, Y.; Okamoto, Y.; *Chirality* **1992**, *4*, 122.
- Chankvetadze, B.; Kartoza, I.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 467.
- Tachibana, K.; Ohnishi, A.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 127.
- Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; Cassiano, N. M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 2083.
- Cass, Q. B.; Luiza, A.; Degani, G.; Cassiano, N.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, *23*, 1029.
- Cassiano, N. M.; Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; Wainer, I. W.; *Chirality* **2002**, *14*, 731.
- Gomes, R. F.; Cassiano, N. M.; Pedrazzoli, J., Jr.; Cass, Q. B.; *Chirality* **2010**, *22*, 35.
- Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; Cassiano, N. M.; Pedrazzoli, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *766*, 153.
- Zhang, T.; Franco, P. Em *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*; Subramanian, G., ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2007, cap. 3.
- Okamoto, Y.; Aburatani, R.; Miura, S.; Hatada, K.; *J. Liq. Chromatogr.* **1987**, *10*, 1613.
- Yashima, E.; Fukaya, H.; Okamoto, Y.; *J. Chromatogr., A* **1994**, *677*, 11.
- Ikai, T.; Okamoto, Y.; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6077.
- Franco, P.; Senso, A.; Oliveros, L.; Minguillon, C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 155.
- Ikai, T.; Yamamoto, C.; Kamigaito, M.; Okamoto, Y.; *Polym. J.* **2006**, *38*, 91.
- Ikai, T.; Yamamoto, C.; Kamigaito, M.; Okamoto, Y.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *875*, 2.
- Chen, X.; Zou, H.; Zhang, Q.; Ni, J.; Zhang, Z.; *J. Sep. Sci.* **2002**, *40*, 315.
- Francotte, E.; *WO 9627615*, **1996**.
- Francotte, E.; *WO 9749733*, **1997**.
- Francotte, E.; Huynh, D.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 421.
- Francotte, E.; Zhang, T.; *WO 9704011*, **1997**.
- Chen, X.; Qin, F.; Liu, Y.; Huang, X.; Zou, H.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1034*, 109.
- Kubota, T.; Kusano, T.; Yamamoto, C.; Yashima, E.; Okamoto, Y.; *Chem. Lett.* **2001**, 724.
- Kubota, T.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y.; *Chirality* **2003**, *15*, 77.
- Franco, P.; Minguillon, C.; Oliveros, L.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *791*, 37.



77. Ikai, T.; Yamamoto, C.; Kamigaito, M.; Okamoto, Y.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 151.
78. Franco, P.; Zhang, T.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *875*, 48.
79. Thunberg, L.; Hashemi, J.; Andersson, S.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *875*, 72.
80. Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 214.
81. Belaz, K. R. A.; Cass, Q. B.; Oliveira, R. V.; *Talanta* **2008**, *76*, 146.
82. Hefnawy, M.; Al-Majed, A.; Al-Suwailem, A.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2009**, *32*, 1934.
83. Liu, K.; Zhong, D.; Chen, X.; *Bioanalysis* **2009**, *1*, 561.
84. Zhang, Y.; Caporuscio, C.; Dai, J.; Witkus, M.; Rose, A.; Santella, J.; D'Arienzo, C.; Wang-Iverson, D. B.; Tymiak, A. A.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *875*, 154.
85. Belaz, K. R. A.; Coimbra, M.; Barreiro, J. C.; Montanari, C. A.; Cass, Q. B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 81.
86. Ferretti, R.; Gallinella, B.; La Torre, F.; Zanitti, L.; Turchetto, L.; Mosca, A.; Cirilli, R.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5385.
87. Sousa, M. E.; Tiritan, M. E.; Belaz, K. R. A.; Pedro, M.; Nascimento, M. S. J.; Cass, Q. B.; Pinto, M. M. M.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120*, 75.
88. Zhang, T.; Schaeffer, M.; Franco, P.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1083*, 96.
89. Armstrong, D. W.; Tang, Y.; Chen, S.; Zhou, Y.; Bagwill, C.; Chen, J.-R.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1473.
90. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Peter, A.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1305.
91. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Peter, A.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 1845.
92. Berthod, A.; *Chirality* **2009**, *21*, 167.
93. Ward, T. J.; Farris, A. B., III; *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 73.
94. Armstrong, D. W.; Liu, Y.; Ekborgott, K. H.; *Chirality* **1995**, *7*, 474.
95. Berthod, A.; Chen, X.; Kullman, J. P.; Armstrong, D. W.; Gasparrini, F.; D'Acquarica, I.; Villani, C.; Carotti, A.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1767.
96. Berthod, A.; Liu, Y.; Bagwill, C.; Armstrong, D. W.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *731*, 123.
97. Peter, A.; Arki, A.; Tourwe, D.; Forro, E.; Fueleop, F.; Armstrong, D. W.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1031*, 159.
98. Schlauch, M.; Frahm, A. W.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *868*, 197.
99. Peter, A.; Vekes, E.; Gera, L.; Stewart, J. M.; Armstrong, D. W.; *Chromatographia* **2002**, *56*, S79.
100. Berthod, A.; Xiao, T. L.; Liu, Y.; Jenks, W. S.; Armstrong, D. W.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *955*, 53.
101. Tesarova, E.; Zaruba, K.; Flieger, M.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *844*, 137.
102. Andersson, M. E.; Aslan, D.; Clarke, A.; Roeraade, J.; Hagman, G.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1005*, 83.
103. Dijkstra, G. D. H.; Kellogg, R. M.; Wynberg, H.; Svendsen, J. S.; Marko, I.; Sharpless, K. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8069.
104. Laemmerhofer, M.; Lindner, W.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *741*, 33.
105. Mandl, A.; Nicoletti, L.; Lammerhofer, M.; Lindner, W.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *858*, 1.
106. Sardella, R.; Lammerhofer, M.; Natalini, B.; Lindner, W.; *Chirality* **2008**, *20*, 571.
107. Maier, N. M.; Nicoletti, L.; Lammerhofer, M.; Lindner, W.; *Chirality* **1999**, *11*, 522.
108. Maier, N. M.; Schefzick, S.; Lombardo, G. M.; Feliz, M.; Rissanen, K.; Lindner, W.; Lipkowitz, K. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8611.
109. Pirkle, W. H.; House, D. W.; *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1957.
110. Welch, C. J.; *Adv. Chromatogr.* **1995**, *35*, 171.
111. Bargmann-Leyder, N.; Truffert, J. C.; Tambute, A.; Caude, M.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 27.
112. Felix, G.; Berthod, A.; *Sep. Purif. Rev.* **2007**, *36*, 285.
113. Pirkle, W. H.; Welch, C. J.; *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 138.
114. Pirkle, W. H.; Welch, C. J.; *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, *15*, 1947.
115. Cleveland, T.; *J. Liq. Chromatogr.* **1995**, *18*, 649.
116. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>nd</sup> ed.; John Wiley and Sons, Inc., 1997.
117. Gargaro, G.; Gasparrini, F.; Misiti, D.; Palmieri, G.; Pierini, M.; Villani, D.; *Chromatographia* **1987**, *24*, 505.
118. Davankov, V. A.; Rogozhin, S. V.; *J. Chromatogr.* **1971**, *60*, 280.
119. Davankov, V. A.; *Enantiomer* **2000**, *5*, 209.
120. Davankov, V. A.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 891.
121. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Whangbo, S. H.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *992*, 47.
122. Chen, Z.; Uchiyama, K.; Hobo, T.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *942*, 83.
123. Gubitz, G. S. M. G. Em ref. 61, cap. 5.
124. Ilisz, I.; Tourwe, D.; Armstrong, D. W.; Peter, A.; *Chirality* **2006**, *18*, 539.
125. Kurganov, A.; Davankov, V.; Unger, K.; Eisenbeiss, F.; Kinkel, J.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 99.
126. Miyazawa, T.; Minowa, H.; Imagawa, K.; Yamada, T.; *Chromatographia* **2004**, *60*, 45.
127. Natalini, B.; Sardella, R.; Macchiarulo, A.; Pellicciari, R.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *875*, 108.
128. Zaher, M.; Baussanne, I.; Ravelet, C.; Halder, S.; Haroun, M.; Fize, J.; Decout, J.-L.; Peyrin, E.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1185*, 291.
129. Sogah, G. D. Y.; Cram, D. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3035.
130. Sousa, L. R.; Sogah, G. D. Y.; Hoffman, D. H.; Cram, D. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4569.
131. Shinbo, T.; Yamaguchi, T.; Nishimura, K.; Sugiura, M.; *J. Chromatogr.* **1987**, *405*, 145.
132. Shinbo, T.; Yamaguchi, T.; Yanagishita, H.; Kitamoto, D.; Sakaki, K.; Sugiura, M.; *J. Chromatogr.* **1992**, *625*, 101.
133. Lee, W.; Yong Hong, C.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *879*, 113.
134. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Lipshutz, B. H.; Shin, Y. J.; Welch, C. J.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *910*, 359.
135. Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K.; Nakai, H.; Sato, T.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *805*, 85.
136. Berkecz, R.; Ilisz, I.; Fueleop, F.; Pataj, Z.; Hyun, M. H.; Peter, A.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1189*, 285.
137. Hyun, M. H.; Koo, H. J.; Jin, J. S.; Lee, W.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, *23*, 2669.
138. Hyun, M. H.; Song, Y.; Cho, Y. J.; Kim, D. H.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1108*, 208.
139. Hirose, K.; Nakamura, T.; Nishioka, R.; Ueshige, T.; Tobe, Y.; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1549.
140. Hirose, K.; Yongzhu, J.; Nakamura, T.; Nishioka, R.; Ueshige, T.; Tobe, Y.; *Chirality* **2005**, *17*, 142.
141. Hirose, K.; Yongzhu, J.; Nakamura, T.; Nishioka, R.; Ueshige, T.; Tobe, Y.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1078*, 35.
142. Hyun, M.H.; Jin, J.S.; Lee, W.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *822*, 155.
143. Hilton, M.; Armstrong, D. W.; *J. Liq. Chromatogr.* **1991**, *14*, 9.
144. Hyun, M. H.; Tan, G.; Cho, Y. J.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, *27*, 1671.
145. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Lipshutz, B. H.; Shin, Y.-J.; Welch, C. J.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *959*, 75.
146. Hyun, M. H.; Min, H. J.; Cho, Y. J.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *996*, 233.
147. Hyun, M. H. Em ref. 61, cap. 8.
148. Okamoto, Y.; Honda, S.; Okamoto, I.; Yuki, H.; Murata, S.; Noyori, R.; Takaya, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6971.
149. Nakano, T.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 205.
150. Peluso, P.; Cossu, S.; Moretto, F.; Marchetti, M.; *Chirality* **2009**, *21*, 507.
151. Blaschke, G.; Fraenkel, W.; Broeker, W.; Kinkel, J.; *DE 3619303*, **1987**.
152. Cannazza, G.; Braghiroli, D.; Iuliani, P.; Parenti, C.; *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, *17*, 3158.
153. Cirilli, R.; Costi, R.; Di Santo, R.; Artico, M.; Roux, A.; Gallinella, B.; Zanitti, L.; La Torre, F.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *993*, 17.
154. Schulte, M.; Devant, R.; Grosser, R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 627.
155. Allenmark, S. G.; Andersson, S.; Moeller, P.; Sancher, D.; *Chirality* **1995**, *7*, 248.

156. Zhong, Q.; Han, X.; He, L.; Beesley, T. E.; Trahanovsky, W. S.; Armstrong, D. W.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1066*, 55.
157. Han, X.; He, L.; Zhong, Q.; Beesley, T. E.; Armstrong, D. W.; *Chromatographia* **2006**, *63*, 13.
158. Han, X.; Wang, C.; He, L.; Beesley, T. E.; Armstrong, D. W.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2681.
159. Lourenço, T. C.; Armstrong, D. W.; Cass Q. B.; *Chromatographia* **2010**, *71*, 361.
160. Lourenço, T. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2010.
161. Sellergren, B. Em ref. 61, cap. 12.
162. Sellergren, B.; Lepistoe, M.; Mosbach, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5853.
163. Sellergren, B.; Shea, K. J.; *J. Chromatogr.* **1993**, *635*, 31.
164. Maier, N. M.; Lindner, W.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 377.
165. Spivak, D. A.; Campbell, J.; *Analyst* **2001**, *126*, 793.
166. Turiel, E.; Martin-Esteban, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1876.
167. Haginaka, J.; *Trends Chromatogr.* **2005**, *1*, 111.
168. Ansell, R. J.; Kuah, K. L.; *Analyst* **2005**, *130*, 179.
169. Ansell, R. J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 1809.
170. Kempe, M.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1948.
171. Kempe, M.; Fischer, L.; Mosbach, K.; *J. Mol. Recognit.* **1993**, *6*, 25.
172. Ramstroem, O.; Nicholls, I. A.; Mosbach, K.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 649,