

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS NATURAIS

Matheus Cecilio Fonseca

POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS E ANÁLISE
ENANTIOSSELETIVA DE TRAMADOL POR ELETROFORESE
CAPILAR – UMA ABORDAGEM COMPUTACIONAL E
EXPERIMENTAL

São João del-Rei/MG
Março de 2016

Matheus Cecilio Fonseca

POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS E ANÁLISE
ENANTIOSSELETIVA DE TRAMADOL POR ELETROFORESE
CAPILAR – UMA ABORDAGEM COMPUTACIONAL E
EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Química, na Universidade Federal de São
João del-Rei, como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Keyller Bastos Borges

Co-Orientador: Prof. Dr. Clebio Soares Nascimento Jr.

São João del-Rei – MG
Departamento de Ciências Naturais - UFSJ
Março de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio que me deu nesses anos de mestrado. À minha mãe Andréa e ao meu pai Nelson, os melhores pais do mundo, que não mediram esforços para me apoiar nesta trajetória. Também às minhas irmãs, Raquel e Sarah.

Dedico também à minha querida Carolina, pelo amor, compreensão, companheirismo e paciência, ao longo desses dois anos.

Por último dedico este trabalho ao meu orientador Keyller Bastos Borges pelo apoio, pelas ideias, pelo entusiasmo contagiante, confiança e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que me deu forças, saúde, sabedoria e tranquilidade para conseguir completar mais uma etapa da minha vida.

À Universidade Federal de São João del-Rei, pela concessão da bolsa.

Às agências de fomento (CNPq e FAPEMIG) pelo financiamento de equipamentos e insumos para o laboratório.

Aos professores Keyller Bastos Borges e Clebio Soares Nascimento Jr, pela orientação e co-orientação, respectivamente.

Aos professores da Universidade Federal de São João del-Rei, que contribuíram com o meu crescimento e minha formação, em especial à professora Stella Maris Resende, que acreditou em mim e em meu trabalho desde o início da graduação, sempre me oferecendo oportunidades de progredir.

Aos colegas de laboratório, que estiveram presentes no dia-a-dia, sempre ajudando nos diversos problemas que apareciam, em especial ao Ricky Cássio Santos, pela ajuda nos experimentos com HPLC.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x

Capítulo 1: Investigação estrutural e energética do processo de formação de um polímero molecularmente impresso para tramadol.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Preparo de amostras.....	2
1.2. Polímeros Molecularmente Impressos.....	4
1.3. Abordagem teórica de MIP's.....	6
1.4. Tramadol.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. METODOLOGIA	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. Seleção do monômero funcional e estequiometria	13
4.2. Seleção do solvente	17
4.3. Análise vibracional teórica do melhor MIP: TRM-(AA) ₃	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

Capítulo 2: Análise enantiosseletiva de tramadol por eletroforese capilar – uma abordagem teórica e experimental	27
1. INTRODUÇÃO	28
1.1. Eletroforese: conceitos básicos.....	28
1.2. Instrumentação.....	29
1.3. Detecção	31
1.4. Fundamentos Teóricos.....	32
1.4.1. Fluxo Eletroosmótico	32
1.4.2. Mobilidade eletroforética e velocidade eletroforética.....	36
1.5. Análise dos resultados obtidos	37
1.6. Análises enantiosseletivas por CE.....	38
1.7. Como se desenvolve uma separação quiral utilizando a CE	40
1.8. Química computacional aplicada na determinação da ordem de migração de enantiômeros separados por CE	42
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Reagentes.....	45
3.2. Instrumentação.....	46
3.3. Procedimentos Experimentais	46
3.4. Metodologia Computacional	47
3.5. Confirmação da ordem de migração dos enantiômeros.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Análises eletroforéticas.....	53
4.1.1. Estudo do tipo e da concentração do BGE	53
4.1.2. Estudo do tipo e da concentração de CD.....	56
4.2. Modelagem molecular	61

4.2.1. TRM e <i>cm</i> - β -CD	61
4.2.2. TRM e <i>S</i> - β -CD	65
4.3. Confirmação da ordem de migração dos enantiômeros.....	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
Capítulo 3:	75
Conclusões Gerais	756

RESUMO

Na primeira etapa deste trabalho, o objetivo foi determinar, através de métodos computacionais, o melhor método de síntese de um polímero molecularmente impresso (MIP) para o tramadol (TRM). Utilizando-se a análise energética dos processos de formação dos complexos de pré-polimerização, foi possível determinar qual seria o melhor monômero funcional (MF), a melhor estequiometria entre MF e a molécula molde (TRM). Além disso, um importante parâmetro para a síntese de um MIP, o solvente, também teve sua influência estudada. Os resultados obtidos mostraram que o melhor MF para a síntese de um MIP para o TRM é o ácido acrílico, em estequiometria 1:3 (TRM:MF). Já em relação ao solvente, o clorofórmio se mostrou o mais adequado para esta síntese. De acordo com os resultados obtidos, foi possível perceber que as ligações de hidrogênio são de extrema importância na formação dos complexos e também na estabilidade destes.

Já a segunda parte deste trabalho consistiu no desenvolvimento e otimização de um método para a separação dos enantiômeros do TRM por eletroforese capilar. Desse modo, foram estudadas a natureza do *background electrolyte* (BGE) e sua concentração, o tipo de ciclodextrina, que atua como seletor quiral, e a sua concentração. Os resultados obtidos mostraram que a natureza e concentração do BGE possuem influência significativa no eletroferograma obtido, e os melhores resultados foram obtidos com o BGE fosfato 125 mol L⁻¹. Em relação às ciclodextrinas e sua concentração, das cinco ciclodextrinas avaliadas, apenas duas se mostraram eficazes na separação dos enantiômeros de TRM. A carboximetil-β-ciclodextrina foi eficaz na separação dos enantiômeros, e quando utilizada na concentração 2,925 mM apresentou curtos tempos de análise (entre 13 e 14 min) assim como boa resolução ($R_s = 2,17$). Apesar disso, a β-ciclodextrina sulfatada se mostrou muito mais eficaz na separação, quando utilizada também em baixa concentração (5,850 mM). As análises apresentaram tempos curtos de análise (entre 11 e 12 min) e ótima resolução ($R_s = 7,09$). Assim, a β-ciclodextrina sulfatada foi determinada como sendo a ciclodextrina ideal para este trabalho. Em relação ao estudo computacional desta segunda parte, foram estudados os possíveis complexos entre as duas ciclodextrinas eficazes na separação (carboximetil-β-CD e β-CD sulfatada) e os enantiômeros do TRM. Foi realizada a análise energética e estrutural dos processos de formação dos complexos com o objetivo de se determinar qual a ordem de migração de cada enantiômero e como aconteceria o reconhecimento quiral, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que, com a carboximetil-β-CD, a diferença de energia entre os complexos varia entre 3 e 9 kcal, o que

possibilita a discriminação quiral, mas não de forma tão eficaz. Já quando utilizada a β -ciclodextrina sulfatada, a diferença de energia entre os complexos varia entre 8 e 29 kcal, o que possibilita uma separação mais efetiva dos enantiômeros, resultando em picos mais resolvidos nos eletroferogramas obtidos. Além disso, através do estudo computacional foi possível determinar que empregando a carboximetil- β -CD o enantiômero RR-TRM apresenta menor tempo de migração. Já quando se utiliza a β ciclodextrina sulfatada, o enantiômero com menor tempo de migração é o SS-TRM.

Finalmente, os resultados obtidos comprovam que a separação e a ordem de migração dos enantiômeros é algo que está diretamente relacionado com a concentração e o tipo de seletor utilizado, respectivamente. Além disso, o estudo computacional dos sistemas, possibilitou uma ideia do mecanismo responsável pela distinção quiral, explicando melhor os resultados obtidos experimentalmente.

ABSTRACT

In the first stage of this work, the aim was to determine, by computational methods, the best synthesis conditions of a molecularly imprinted polymer (MIP) for tramadol (TRM). Through energetic analysis of the formation process of the pre-polymerization complexes, it was possible to determine which was the best functional monomer (FM) and the adequate stoichiometry between FM and the target molecule (TRM). Besides that, an important parameter of a MIP synthesis, the solvent, also had its influence studied. The obtained results showed that the best FM for this synthesis is acrylic acid, in stoichiometry 1:3 (TRM:FM). Regarding the solvent, chloroform was determined as the best solvent for this synthesis. According to the obtained results, it was possible to understand that hydrogen bonds are extremely important in the complexes formation and stability.

The second part of this work consisted in the development and optimization of a method for the separation of the enantiomers of TRM, by capillary electrophoresis. Thereby, it was studied the nature of the background electrolyte (BGE) and its concentration, the kind and concentration of cyclodextrin, which acts as a chiral selector. The results show that the nature and concentration of the BGE have great influence in the obtained electropherogram, and the best results were obtained with the BGE phosphate 125 mM. In relation to cyclodextrins and its concentration, of the five tested cyclodextrins, only two were effective in the separation of TRM enantiomers. The carboxymethyl- β -CD showed higher effectiveness when used in a low concentration (2.925 mM), presenting short analysis time (between 13 and 14 min) and a good resolution ($R_s = 2.17$). Nevertheless, the sulfated β -cyclodextrin was more appropriate in this study. When used in low concentration (5.850 mM), it presented a short time of analysis (between 11 and 12 min) and a great resolution ($R_s = 7.09$). Therefore, the sulfated β -cyclodextrin was determined as the ideal chiral selector in this work. In relation to the computational study of this second part, the possible complexes between the TRM enantiomers and the two cyclodextrins cited above. An energetic and structural analysis of the formation process of the complexes was made, aiming to determine which TRM enantiomer was responsible for each peak in the electropherogram and how the chiral discrimination happened, respectively. The obtained results show that with the carboxymethyl- β -cyclodextrin the energy difference between the complexes vary between 3 and 9 kcal, what enables the chiral discrimination, but not in a very effective way.

When the sulfated β -cyclodextrin was used, the energy difference between the complexes vary between 8 and 29 kcal, what enables a more effective separation of the enantiomers, resulting in more resolved peaks in the electropherogram. Furthermore, by the computational study, it was possible to determine that with the carboxymethyl- β -cyclodextrin the enantiomer with shorter migration time is the RR-TRM. In the case of sulfated β -cyclodextrin, the enantiomer with shorter migration time is the SS-TRM.

These results show that the separation and the enantiomer migration order are directly related to the concentration and type of the chosen chiral selector, respectively. Besides that, the computational study of the system provided an idea of the responsible mechanism for the chiral distinction, providing a better explanation for the obtained experimental results.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SPE – extração em fase sólida

LLE – extração líquido-líquido

SFE – extração por fluido supercrítico

FE – fase extratora

MIP – polímeros molecularmente impressos

MF – monômero funcional

NIP – polímero não impresso

DFT – teoria do funcional de densidade

PCM – polarizable continuum model

MAA – ácido meta-acrílico

SPME – microextração em fase sólida

TRM – tramadol

AA – ácido acrílico

TFMAA – ácido 2-trifluorometil acrílico

PES – superfície de energia potencial

ϵ - constante dielétrica

DMSO – dimetilsulfóxido

QM/MM – quantum mechanics / molecular mechanics

MISPE – extração em fase sólida com impressão molecular

CE – eletroforese capilar

IV – infravermelho

UV – ultravioleta

LIF – fluorescência induzida por laser

MS – espectrometria de massas

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

CD – ciclodextrina

BGE – background electrolyte

EOF – fluxo eletrosmótico

S- β -CD – ciclodextrina sulfatada

m- β -CD – metil- β -CD

OH-et- β -CD – hidroxietil- β -CD

OH-prop- β -CD – hidroxipropil- β -CD

cm- β -CD – carboximetil- β -CD

BSSE – basis set superposition error

CP – counterpoise correction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Tempo gasto em cada passo necessário em procedimentos analíticos. Adaptado da ref. [4].	3
Figura 1.2. Esquema simplificado de uma coluna para SPE. Adaptado da ref. [3].	3
Figura 1.3. Esquema representativo das etapas na síntese do MIP. Adaptado da ref. [5].	5
Figura 1.4. Estrutura química do TRM.	9
Figura 1.5. Estrutura química dos MF's: (a) TFMAA; (b) MAA; (c) AA.	11
Figura 1.6. Representação esquemática das interações entre os MF's e o TRM na razão molar 1:1. Linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio.	14
Figura 1.7. Estruturas otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d,p) dos complexos na razão molar 1:1. (a) TRM-(AA) ₁ ; (b) TRM-(MAA) ₁ ; TRM-(TFMAA) ₁ -[OH]; (d) TRM-(TFMAA) ₁ -[F]. As ligações de hidrogênio são mostradas em linhas pontilhadas.	15
Figura 1.8. Estruturas otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d,p) dos complexos na razão molar 1:2. (a) TRM-(AA) ₂ ; (b) TRM-(MAA) ₂ ; (c) TRM-(TFMAA) ₂ -[OH+OH]. As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas.	16
Figura 1.9. Estruturas otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d,p) dos complexos na razão molar 1:3. (a) TRM-(AA) ₃ ; (b) TRM-(MAA) ₃ ; (c) TRM-(TFMAA) ₃ -[OH+OH+OH]. As interações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas.	17
Figura 1.10. Representação do melhor MIP encontrado: TRM-(AA) ₃ , solvente implícito: clorofórmio.	19
Figura 1.11. Espectros teóricos de infravermelho do (a) AA; (b) TRM; (c) TRM-(AA) ₃ .	21
Figura 2.1. Esquema genérico de eletroforese [4].	28
Figura 2.2. Seção transversal de um típico capilar utilizado em CE. Adaptado de ref. [10].	30
Figura 2.3. Esquema genérico de um instrumento de CE. Adaptado de ref. [9].	30
Figura 2.4. (a) capilar na forma Z; (b) capilar “bubble cell”; (c) capilar revestido com material refletor. Adaptado de ref. [10].	32

Figura 2.5. Representação esquemática da superfície interna do capilar, mostrando grupos silanóis, silanatos e siloxanos [1].	33
Figura 2.6. Modelo representando as camadas em contato com o capilar até o centro da solução [1].	34
Figura 2.7. Cargas positivas adsorvidas à superfície interna do capilar começando a se movimentar em direção ao eletrodo negativo, dando origem ao EOF [3].	34
Figura 2.8. Dependência do EOF em relação ao pH [3].	35
Figura 2.9. Diferença entre o EOF e o fluxo induzido por pressão. A diferença entre os picos obtidos também é representada [1].	35
Figura 2.10. (a) Velocidade do EOF; (b) velocidade eletroforética; (c) velocidade efetiva de cada molécula, dada pela soma da velocidade do EOF e a velocidade eletroforética. [9].	37
Figura 2.11. Exemplo genérico de um eletroferograma representando que cátions, moléculas neutras e ânions tendem a migrar nesta ordem, em uma análise eletroforética [3].	37
Figura 2.12. Estruturas da (a) α -CD, (b) β -CD e (c) γ -CD [24].	41
Figura 2.13. Tentativa de interação entre TRM e cm- β -CD. Complexos 1 (RR-TRM) e 2 (SS-TRM).	48
Figura 2.14. Tentativa de interação entre TRM e cm- β -CD. Complexos 3 (RR-TRM) e 4 (SS-TRM).	49
Figura 2.15. Tentativa de interação entre TRM e cm- β -CD. Complexos 5 (RR-TRM) e 6 (SS-TRM).	49
Figura 2.16. Tentativa de interação OH do TRM com O ⁻ da S- β -CD. Complexos A (SS-TRM) e B (RR-TRM).	50
Figura 2.17. Tentativa de interação OH do TRM com =O da S- β -CD. Complexos C (SS-TRM) e D (RR-TRM).	51
Figura 2.18. Tentativa de interação OH do TRM com átomo S da S- β -CD. Complexos E (SS-TRM) e F (RR-TRM).	51
Figura 2.19. Eletroferograma referente à tentativa inicial de separação dos enantiômeros de TRM. $R_s = 1,31$; $I = 25 \mu A$, $T_{mig1} = 10,66 \text{ min}$, $T_{mig2} = 10,86 \text{ min}$.	53

Figura 2.20. Eletroferograma relativo aos testes feitos com os três BGE's. [BGE]= 50 mM; pH= 10; CD= CM-β-CD, 3 mg/mL; λ= 195 nm; injeção hidrodinâmica P = 30 mbar, 4 segundos; V = 20 kV.....	54
Figura 2.21. Eletroferograma relativo aos testes feitos com BGE citrato nas concentrações 25 mM, 50 mM, 75 mM e 100 mM; pH= 10; CD= CM-β-CD, 3 mg/mL; λ= 195 nm; injeção hidrodinâmica.....	55
Figura 2.22. Eletroferograma relativo aos testes feitos com BGE fosfato nas concentrações 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM e 150 mM; pH= 10; CD= cm-β-CD, 3 mg/mL; λ= 195 nm; injeção hidrodinâmica P= 30 mbar, 4 segundos; V= 20 kV.	56
Figura 2.23. Eletroferograma referente às análises com a OH-e-β-CD, m-β-CD e OH-prop-β-CD com concentração 2,925 mM. BGE fosfato 125 mM; pH = 10; λ = 195 nm; injeção hidrodinâmica P = 30 mbar, 4 segundos; V = 20 kV.....	57
Figura 2.24. Eletroferogramas relativos aos testes feitos com diferentes concentrações de cm-β-CD. Concentrações avaliadas: 0,975 mM; 1,95 mM; 2,925 mM; 3,9 mM; 4,875 mM e 5,850 mM. BGE fosfato 125 mM; pH = 10; CD = CM-β-CD; λ = 195 nm; injeção hidrodinâmica P=30 mbar, 4 segundos; V = 20 kV.....	58
Figura 2.25. Eletroferogramas relativos aos testes feitos com diferentes concentrações de S-β-CD. Concentrações avaliadas: 0,975 mM; 1,950 mM; 2,925 mM; 3,900 mM; 4,875 mM e 5,850 mM. BGE fosfato 125 mM; pH= 10; λ= 195 nm; injeção hidrodinâmica P= 30 mbar, 4 segundos; V= 20 kV.....	60
Figura 2.26. Estrutura otimizada do Complexo 1.	62
Figura 2.27. Estrutura otimizada do Complexo 3.	62
Figura 2.28. Estrutura otimizada do Complexo 5.	63
Figura 2.29. Estrutura otimizada do Complexo A.....	66
Figura 2.30. Estrutura otimizada do Complexo C.....	66
Figura 2.31. Eletroferogramas referentes à (a) análise da alíquota de SS-TRM sob as condições do HPLC [52]; (b) análise da alíquota de RR-TRM sob as condições do HPLC [52]; (c) análise da mistura racêmica de TRM. Condições fixas em (a), (b) e (c): CD = S-β-CD 5,850 mM; BGE fosfato 125 mM, pH=10, λ _{det} = 195 nm, injeção hidrodinâmica (30 mbar, 4 seconds), 20 kV and T=10°C.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Variação da energia de interação (ΔE) e da energia livre de Gibbs (ΔG) para os complexos [MF-TRM] nas estequiometrias 1:1, 1:2, 1:3. Valores em kcal/mol, além do número de ligações intermoleculares estabelecidas.	14
Tabela 1.2. Variação da energia de interação (ΔE) e da energia livre de Gibbs (ΔG) para os complexos [MF-TRF] na estequiometrias 1:3, em distintos solventes. Valores em kcal/mol.....	18
Tabela 2.1. Tipos de CD's e seus substituintes.....	45
Tabela 2.2. Dados referentes às análises variando o BGE	54
Tabela 2.3. Dados referentes às análises variando a concentração do BGE citrato.	55
Tabela 2.4. Dados referentes às análises variando a concentração do BGE fosfato	56
Tabela 2.5. Dados referentes às análises variando a concentração de CM- β -CD.	58
Tabela 2.6. Dados referentes às análises variando-se a concentração de S- β -CD	59
Tabela 2.7. Variação de energia envolvida na formação dos complexos entre enantiômeros do TRM e CM- β -CD. Dados obtidos em nível B3LYP/6-31G(d,p), utilizando o método PCM e água como solvente.....	61
Tabela 2.8. Diferença entre as variações de energia para a formação de complexos entre enantiômeros do TRM e cm- β -CD.....	64
Tabela 2.9. Variação de energia envolvida na formação dos complexos entre enantiômeros do TRM e S- β -CD. Dados obtidos em nível B3LYP/6-31+G(d,p), utilizando o método PCM e água como solvente.....	65
Tabela 2.10. Diferença entre as variações de energia para a formação de complexos entre enantiômeros do TRM e S- β -CD	67

Capítulo 1:

Investigação estrutural e energética do processo de formação de um
polímero molecularmente impresso para tramadol

1. INTRODUÇÃO

A determinação de fármacos e drogas de abuso em material biológico tem se mostrado cada vez mais importante em diversos contextos, como monitoramento de *doping* em atletas, toxicologia forense e clínica, entre outras [1]. As amostras biológicas mais analisadas são urina, cabelo, soro e sangue, pois a coleta é relativamente simples e há grandes quantidades disponíveis de amostra. Alguns outros tipos de amostra biológica como saliva, lágrimas, bile, mecônio, também aparecem na literatura, porém, em menor quantidade, devido à dificuldade de coleta. Para realizar estas análises, faz-se necessário o uso de técnicas como a eletroforese capilar (CE), a qual resulta em ensaios rápidos, seletivos e sensíveis [1].

Sabe-se que matrizes biológicas são altamente complexas e apresentam proteínas, carboidratos e lipídeos, além de uma enorme quantidade de moléculas menores e de diversas polaridades e volatilidades. Devido a essa variedade de constituintes, é extremamente necessário o desenvolvimento de uma metodologia de preparo da amostra, a qual permita a extração, o isolamento e a concentração dos analitos encontrados em matrizes complexas, uma vez que não é recomendável a injeção da amostra no sistema de análise sem o preparo, seja ele cromatográfico ou eletroforético [2].

1.1. Preparo de amostras

O preparo da amostra é uma parte crítica do processo analítico e não deve ser desprezado. A **Figura 1.1** apresenta uma proposta da divisão de tempo gasto nas etapas básicas de uma análise química e também de possíveis fontes de erro. Todas essas etapas, cada uma com sua relevância, devem ser consideradas na obtenção de resultados confiáveis. É possível notar na **Figura 1.1** que o preparo da amostra é a etapa que demanda maior tempo para ser realizado e uma das técnicas mais conhecidas e aplicadas para esta finalidade é a extração em fase sólida (SPE). Além da SPE, há outras técnicas empregadas no preparo de amostra, como a extração líquido-líquido (LLE), a extração por fluido supercrítico (SFE) (utilizada na descafeinação do café), filtração, entre outras [2].

Proposta inicialmente na década de 70, a SPE é uma técnica de preparo de amostra de extrema importância em análise toxicológicas, especialmente para analitos presentes em baixas concentrações [3]. A SPE consiste basicamente na passagem de um líquido em fluxo por uma fase extratora (FE), normalmente um sólido, imobilizado em um cartucho ou coluna, e que

através de diferentes mecanismos (adsorção, troca iônica, exclusão, partição) de interação com o analito, permite a purificação da amostra.

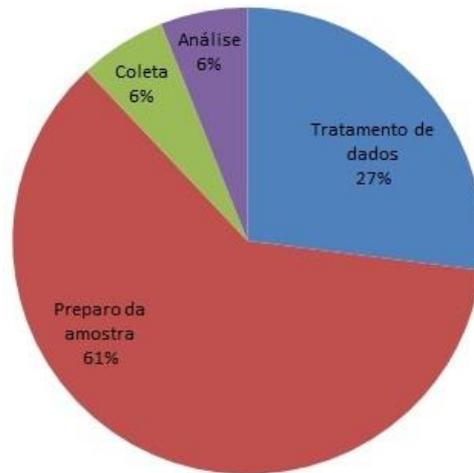


Figura 1.1. Tempo gasto em cada passo necessário em procedimentos analíticos. Adaptado da ref. [4].

Os materiais constituintes da FE não podem ser considerados filtros, apesar de serem normalmente porosos, pois as moléculas do analito não são filtradas, e sim retidas por adsorção ou outros mecanismos à FE. Um esquema simplificado da SPE é mostrado na **Figura 1.2** [5].

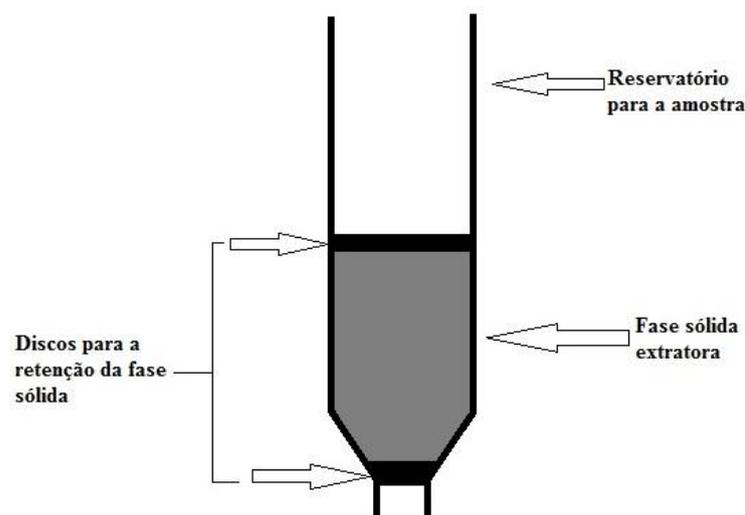


Figura 1.2. Esquema simplificado de uma coluna para SPE. Adaptado da ref. [3].

A grande vantagem da SPE, em relação às outras técnicas de preparo de amostras, se deve ao fato de que ela permite a realização simultânea de duas tarefas: a purificação da amostra e a pré-concentração ou enriquecimento do analito, através da passagem de grandes volumes de amostra pela FE, a qual retém os analitos de acordo com sua polaridade, permitindo a passagem de compostos endógenos presentes na amostra, encaminhados posteriormente ao descarte [3].

Uma das áreas que mais tem atraído a atenção de pesquisadores é o estudo da composição da FE na SPE. Alguns autores afirmam que para que este material sorvente seja adequado, ele deve permitir a rápida adsorção e reprodutibilidade de quantidades definidas dos componentes de interesse presentes na matriz [6]. Por outro lado, Fritz [7] estabelece que o material sorvente deve obedecer essencialmente a três condições: *(i)* uma quantidade alta e reprodutível deve ser extraída pelo sólido constituinte da FE; *(ii)* os analitos, uma vez adsorvidos à FE, devem ser facilmente eluídos por um solvente ou solução de composição determinada, ou seja, o processo de adsorção deve ser reversível; *(iii)* o material deve ser poroso com grande área superficial, livre de impurezas, apresentar estabilidade perante a matriz e os solventes de eluição utilizados, além de uma boa superfície de contato com a amostra analisada [7,8]. Nesse contexto, uma proposta alternativa para a composição da FE na SPE são os polímeros molecularmente impressos (MIP's).

1.2. Polímeros Molecularmente Impressos

A impressão molecular é uma técnica capaz de produzir polímeros dotados de sítios específicos de reconhecimento, estericamente moldados a partir de uma molécula molde ou molécula alvo – por exemplo, um fármaco de interesse [9]. Tais polímeros são chamados de polímeros de impressão molecular ou polímeros molecularmente impressos (*molecularly imprinted polymers* - MIP).

A ideia básica de formação dos MIP's é a tentativa de se reproduzir FE's altamente seletivas, comparáveis a alta seletividade de moléculas biológicas, tais como as enzimas. A alta seletividade dos MIP's é observada devido à presença da molécula alvo na síntese do polímero, que, ao final, deve ser retirada, deixando livre a cavidade seletiva formada durante a polimerização [5]. O processo de síntese dos MIP's pode ser dividido nas seguintes etapas:

- *Iniciação*: Nesta etapa, primeiramente é formado o chamado complexo de pré-polimerização entre a molécula molde e as moléculas de monômero funcional (MF). Posteriormente, ocorre a formação de um radical livre, o que resulta no início da reação. Com a

formação do primeiro radical livre, esses complexos pré-formados são unidos, formando a cadeia polimérica.

- *Propagação*: esta etapa é caracterizada pela contínua adição de monômeros funcionais à cadeia polimérica, levando a formação de complexos em diferentes razões molares.
- *Terminação*: etapa final da síntese ocorre quando há a formação de uma ligação covalente inativa [2];
- *Remoção da molécula molde*: por meio de sucessivas lavagens com solventes ou soluções apropriadas, a molécula molde deve ser retirada da cadeia polimérica. A não remoção ou remoção incompleta dessa molécula pode ser uma fonte de erro, causando lixiviação do analito em análises subsequentes, gerando resultados incorretos [3].

A **Figura 1.3**, mostrada abaixo, representa um esquema geral da preparação de um MIP.

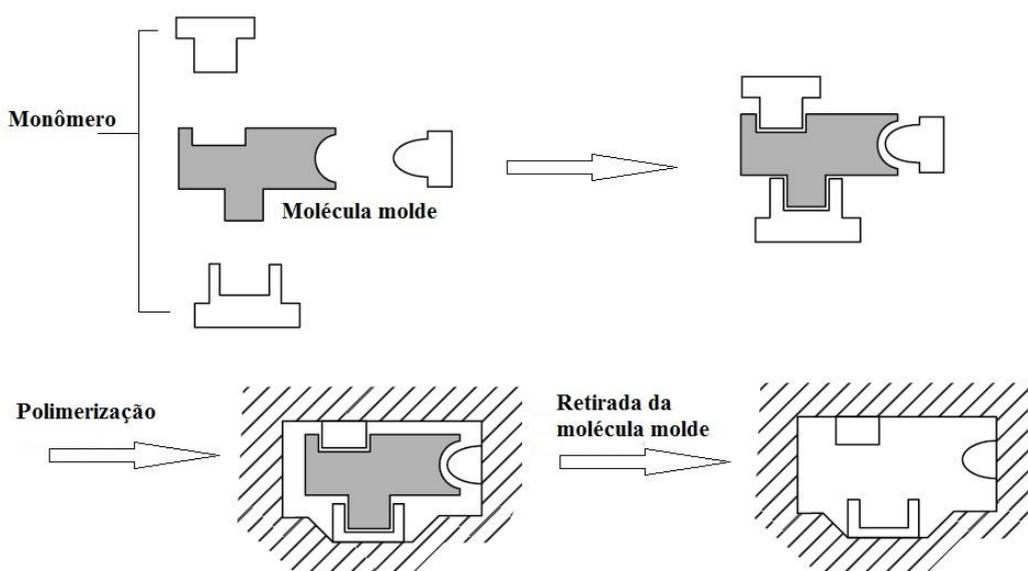


Figura 1.3. Esquema representativo das etapas na síntese do MIP. Adaptado da ref. [5].

Algumas variações podem ser encontradas na síntese dos MIP's, que podem ser classificadas quanto à sua natureza, sendo não covalente, covalente e de sacrifício espacial [10].

Os MIP's não covalentes usam o mesmo tipo de interações que os sistemas de reconhecimento molecular biológicos (por exemplo, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações π - π *stacking*). A interação entre o MF e a molécula molde possui

natureza não covalente durante a síntese e durante a religação. Os MF's utilizados podem ter características ácidas, básicas ou neutras [11].

A impressão molecular covalente distingue-se pelo uso de moléculas molde que se ligam covalentemente a um ou mais MF [12]. A ligação entre a molécula molde e o MF é formada antes da polimerização, por isso é chamado de complexo de pré-polimerização. Como apenas estão presentes ligações covalentes, a heterogeneidade é baixa e embora este tipo de impressão apresente um maior grau de especificidade, esta é limitada pela capacidade da molécula molde conseguir estabelecer ligações covalentes com o MF e pela facilidade com que esta ligação é rompida.

A síntese semi-covalente combina a impressão covalente com a não-covalente. Quando a molécula molde é clivada do polímero, é deixado para trás, no local de clivagem, um grupo funcional capaz de se ligar de forma não-covalente à molécula alvo [2,13,14]. Os diferentes métodos de síntese dos MIP's apresentam distintas vantagens e desvantagens, que devem ser levadas em consideração, e dependendo da aplicação do material, o método de síntese mais apropriado deve ser escolhido. Como relatado na literatura [15], o método de síntese covalente não é o mais indicado, pois possui aplicação restrita a poucos analitos e podem ser necessárias condições extremas para a quebra da ligação entre o MF e a molécula molde. Desse modo, a síntese não-covalente se destaca, pois, as interações entre MF e molécula molde são rompidas facilmente e os polímeros obtidos podem ser aplicados a todos os tipos de analitos. Apesar disso, esta metodologia também apresenta desvantagens, como a distribuição não homogênea dos sítios de ligação pela rede polimérica. Juntamente com o MIP, deve ser sintetizado também o NIP (polímero não-impresso, *non imprinted polymer*) o qual, possui síntese idêntica ao MIP, exceto pelo fato de não ser utilizada a molécula molde, resultando em um polímero comum, sem sítios seletivos, o que é testado posteriormente através da comparação dos resultados obtidos em análises com o MIP e NIP [15-16].

1.3. Abordagem teórica de MIP's

Como abordado na seção anterior, o primeiro passo para a formação de um MIP é a formação de um complexo entre a molécula molde e o MF, que pode ocorrer por ligações covalentes ou não-covalentes. Nesse sentido, a análise termodinâmica dessas reações de complexação, sob a influência de um solvente, pode fornecer informações valiosas e essenciais,

como ΔE e ΔG , que ajudam na compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular do polímero.

Apesar do procedimento de síntese de MIP's ser relativamente simples e de haver na literatura uma grande variedade de informações sobre os diversos tipos de monômeros funcionais, a otimização deste processo de síntese requer estudos envolvendo a estequiometria adequada entre o MF e a molécula molde, além da determinação do melhor solvente de síntese, um componente fundamental para a formação de um MIP com eficácia otimizada.

Nesse contexto, estudos experimentais com o intuito de se obter a estequiometria e o solvente adequado para a síntese dos MIP's são tediosos e laboriosos, além de consumir recursos do laboratório e demandar um tempo muito grande. Dessa forma, desenvolver este procedimento com o auxílio da química computacional tem sido uma boa estratégia, frequentemente relatada na literatura. O entendimento, no nível molecular, dos mecanismos de formação dos MIP's e o processo de reconhecimento molecular, com a elucidação das interações existentes entre as espécies interagentes no meio reacional, proporciona um planejamento racional na escolha dos reagentes de síntese.

Nos últimos cinco anos, alguns trabalhos têm mostrado a viabilidade de se usar métodos computacionais via Teoria do Funcional de Densidade (DFT), com o objetivo de se otimizar a síntese de MIP's [17-26].

Em 2014, Ahmadi e colaboradores [23] propuseram a otimização teórica da síntese de um MIP enantiosseletivo para a S-varfarina. Utilizando a DFT em nível B3LYP/6-31G+(d,p), os autores determinaram as energias de interação (ΔE) para diferentes monômeros em diferentes estequiometrias. O efeito do solvente foi considerado por meio do método implícito de solvatação PCM (*Polarizable Continuum Model*). Os resultados mostraram que a melhor condição de síntese para este polímero foi utilizando-se o ácido metacrílico (MAA) como MF, em estequiometria 1:3 (S-varfarina: ácido metacrílico) e acetonitrila como solvente de síntese. Com o planejamento teórico da síntese concluído, o MIP foi sintetizado e aplicado como material adsorvente em micro extração em fase sólida (SPME). A sua enantiosseletividade foi avaliada por aplicação de um método enantiosseletivo em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um polarímetro. Nesta etapa, os autores concluíram que o MIP, quando utilizado em SPME em uma mistura racêmica de varfarina, foi capaz de adsorver ambos enantiômeros, porém a quantidade do enantiômero (R) consistia em cerca de 20% da quantidade do enantiômero (S).

Também em 2014, De Barros e colaboradores [22] desenvolveram uma metodologia teórica para a otimização da síntese de um MIP para fenitrotona, o qual foi sintetizado e aplicado em SPE. Neste estudo, os autores utilizaram a DFT em nível B3LYP/6-31G(d) para otimização e cálculo de frequência das estruturas e o método PCM para o estudo da influência do solvente. Os resultados teóricos mostraram que, entre os monômeros e solventes testados, a melhor condição foi com o MAA como monômero funcional, em estequiometria 1:2 (fenitrotona: ácido metacrílico) e tolueno como solvente de síntese. Com estes resultados, o MIP foi sintetizado pelo método de síntese não-covalente. Os resultados mostram que a síntese do MIP com ácido metacrílico fornece polímeros com maior área superficial, maior volume de poro e maior diâmetro médio de poro do que o polímero com monômero ácido p-vinilbenzóico.

Em 2016, Kung e colaboradores [27] realizaram a otimização teórica de um MIP para norfloxacino como molécula molde, utilizando dinâmica molecular. Neste caso, foram avaliados o MF, o agente de ligação cruzada e a estequiometria entre estes três reagentes. Um fator importante que não foi estudado pelos autores foi o solvente, sendo sempre utilizada a acetonitrila. Os resultados mostraram que a o melhor MF foi o ácido foi o MAA, o melhor agente de ligação cruzada foi o etileno glicol dimetacrilato e a estequiometria ideal entre molécula molde, MF e agente de ligações cruzada foi 1:8:40. Os polímeros obtidos teoricamente foram sintetizados, e caracterizados com FT-IR e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

1.4. Tramadol

Os opióides são considerados um dos fármacos mais eficientes no tratamento da dor. No entanto, receios sobre a possível tolerância, dependência e abuso por eles criados podem ser problemáticos nos tratamentos desenvolvidos para controlar a dor crônica [28]. Um analgésico ideal deveria possuir as capacidades analgésicas dos opióides, sem os seus efeitos colaterais e sem a toxicidade gastrointestinal dos anti-inflamatórios não esteroides. Com este objetivo, foi desenvolvida a molécula de tramadol (TRM). [28]

O TRM (2-[dimetilamino) metil]-1-(metoxifenil) ciclohexanol) é, portanto, um opióide que possui em sua estrutura dois centros quirais (**Figura 1.4**), o que leva a formação de 4 estereoisômeros. É encontrado comercialmente na forma de uma mistura racêmica de dois enantiômeros, o 1R,2R-tramadol [(+)-*trans*-T] e o 1S,2S-tramadol [(-)-*trans*-T]. Ambos os enantiômeros *trans* possuem atividade analgésica e podem ser utilizados no tratamento de dores

relacionadas às cólicas renais e biliares, além de possuir atividade no tratamento de dores crônicas de origem maligna ou não-maligna, especialmente dores neuropáticas.

Como se sabe, a atividade biológica da maioria dos fármacos se deve à interação no organismo com enzimas e receptores biológicos estereoespecíficos. Devido a esta resposta enantiosseletiva, estereoisômeros podem resultar em diferentes reações no nosso organismo. No caso do TRM, ambos estereoisômeros *trans*, (+)-*trans*-T e (-)-*trans*-T, contribuem para a atividade analgésica do fármaco [29].

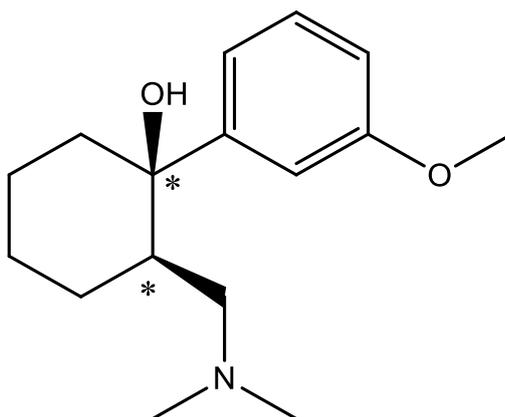


Figura 1.4. Estrutura química do TRM.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta etapa do trabalho foi investigar teoricamente o processo de formação de um MIP para o TRM. Buscou-se, portanto, via cálculos de estrutura eletrônica no nível DFT, a elucidação quanto ao tipo de monômero funcional na estequiometria mais adequada, além do melhor solvente para a síntese. É importante ressaltar que, até o presente momento, não foram encontrados na literatura, relatos de estudos teóricos envolvendo MIP para o TRM como molécula molde.

3. METODOLOGIA

Os cálculos foram realizados via DFT com o funcional B3LYP [30] e conjunto de bases 6-31G(d,p) [31]. Todas as espécies envolvidas no processo de formação do MIP, ou seja, a molécula molde, o TRM, os monômeros funcionais (MF's) (**Figura 1.5**) avaliados, ácido metacrílico (MAA), ácido acrílico (AA) e ácido 2-trifluorometil arílico (TFMAA), além dos respectivos complexos formados entre o TRM e os MF's em diversas estequiometrias, foram completamente otimizadas e caracterizadas como mínimos verdadeiros na Superfície de Energia Potencial (PES) através da análise das frequências harmônicas, sendo todas as frequências calculadas reais. As frequências B3LYP foram então usadas para se estimar as propriedades termodinâmicas referentes ao processo de complexação. Nenhuma restrição de geometria foi imposta durante o processo de otimização.

Como é possível perceber, os MF's avaliados foram ácidos. Uma vez que a molécula estudada é uma base de pKa 9,4, o MF deve ter caráter ácido-base contrário ao da molécula molde.

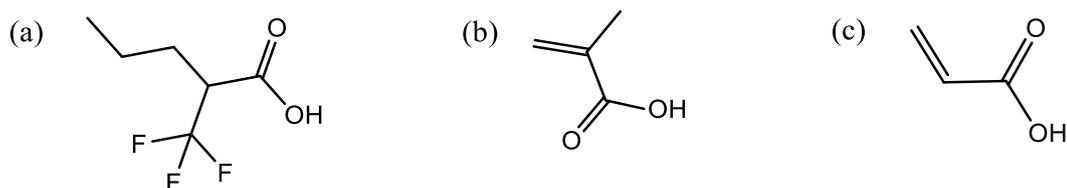


Figura 1.5. Estrutura química dos MF's: (a) TFMAA; (b) MAA; (c) AA.

Na primeira etapa buscou-se determinar o melhor MF na estequiometria mais adequada para a complexação, ou seja, a razão molar molécula molde/MF que gera os complexos mais estáveis. As energias de interação e energia livre de Gibbs para as reações de complexação foram determinadas utilizando as equações (1.1) e (1.2), mostradas a seguir:

$$\Delta E = E_{\text{complexo}} - [E_{\text{TRM}} + nE_{\text{MF}}] \quad (1.1)$$

$$\Delta G = G_{\text{complexo}} - [G_{\text{TRM}} + nG_{\text{MF}}] \quad (1.2)$$

com n variando de 1 a 3, gerando complexos nas estequiometrias 1:1, 1:2 e 1:3.

A segunda etapa consistiu no estudo da influência do solvente na estabilidade dos complexos formados. Para este estudo, utilizou-se o IEFPCM (*Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model*) [32]. Neste modelo, o solvente não existe como moléculas explícitas, e sim como um contínuo dielétrico, que possui uma cavidade, na qual o soluto está inserido. Os solventes escolhidos para avaliação foram a água ($\epsilon=78,35$), clorofórmio ($\epsilon=4,71$), metanol ($\epsilon=32,61$), acetonitrila ($\epsilon=35,68$), acetona ($\epsilon=20,49$) e dimetilsulfóxido (DMSO, $\epsilon=46,82$).

Este método foi escolhido para o estudo do solvente, pois os métodos que tratam o solvente explicitamente são métodos híbridos de mecânica quântica e mecânica molecular, conhecidos como QM/MM (*quantum mechanics / molecular mechanics*). Estes métodos apresentam vantagens, como a alta eficiência, mas as desvantagens se destacam. Alguns cálculos são realizados utilizando-se a mecânica molecular, tratando átomos como esferas rígidas e ligações como molas. Desse modo, o sistema não é descrito de forma adequada.

Como etapa final, foi realizada uma análise dos espectros de infravermelho obtidos teoricamente para o TRM e para o monômero funcional determinado como ideal nas etapas anteriores, o ácido acrílico, e do complexo termodinamicamente mais estável encontrado, o TRM-(AA)₃. A comparação dos três espectros fornece informações importantes para o entendimento e confirmação da formação das ligações de hidrogênio, responsáveis pela estabilidade do complexo. Todos os cálculos foram realizados por meio do pacote computacional GAUSSIAN 09 [33].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção do monômero funcional e estequiometria

A busca pelo melhor monômero funcional na estequiometria mais adequada consiste em uma análise meticulosa da estrutura química da molécula molde e tentativas de se adicionar os monômeros, usando o senso químico, nos sítios passíveis de interação da molécula molde. Observando a estrutura do TRM (**Figura 1.4**), é possível notar que ela apresenta três sítios de interação capazes de formar ligações de hidrogênio com os monômeros funcionais escolhidos no estudo. Desse modo, os grupos do TRM passíveis de interação são a hidroxila, o oxigênio de éter e o grupo amina.

A primeira tentativa de interação dos MF's com a molécula molde foi via hidroxila da molécula de TRM, levando à formação de complexos com razão molar 1:1, como pode ser visto, esquematicamente, na **Figura 1.6**. Esta escolha foi baseada em uma análise estérica da estrutura tridimensional do TRM. No caso do monômero TFMAA, o composto é um ácido formado por três átomos de flúor, desse modo, a interação entre o TRM e o monômero TFMAA que leva à formação de ligação hidrogênio, pode ocorrer de duas maneiras. A primeira delas ocorre quando a interação entre as espécies envolve a hidroxila de ambas, levando a formação do complexo TRM-(TFMAA)₁-[OH], como representado no esquema da **Figura 1.6(a)**. A segunda maneira é a interação entre um átomo de flúor do TFMAA e a hidroxila do TRM, gerando o complexo TRM-(TFMAA)₁-[F], cuja estrutura é mostrada na **Figura 1.6(b)**. No caso dos outros dois MF's, MAA e AA, a interação ocorre entre as hidroxilas do monômero funcional e a hidroxila do TRM, como ilustrado na **Figura 1.6(c)** e **Figura 1.6(d)**, respectivamente.

As energias de estabilização dos complexos TRM-MF, ΔE e ΔG , calculadas no nível B3LYP/6-31G(d,p), na fase gasosa, nas razões molar 1:1, 1:2 e 1:3, são apresentadas na **Tabela 1.1**.

Considerando a estequiometria 1:1, é possível notar que os melhores resultados, ou seja, os complexos mais estáveis são obtidos quando a interação entre as espécies envolve as hidroxilas dos respectivos monômeros funcionais: MAA, AA e TFMAA-[OH]. A interação do átomo de flúor do TFMAA com o TRM é menos favorecida por cerca de 5,0 kcal.mol⁻¹ em relação às outras formas de complexação, tanto para valores de ΔE , quanto de ΔG , como pode ser confirmado na **Tabela 1.1**.

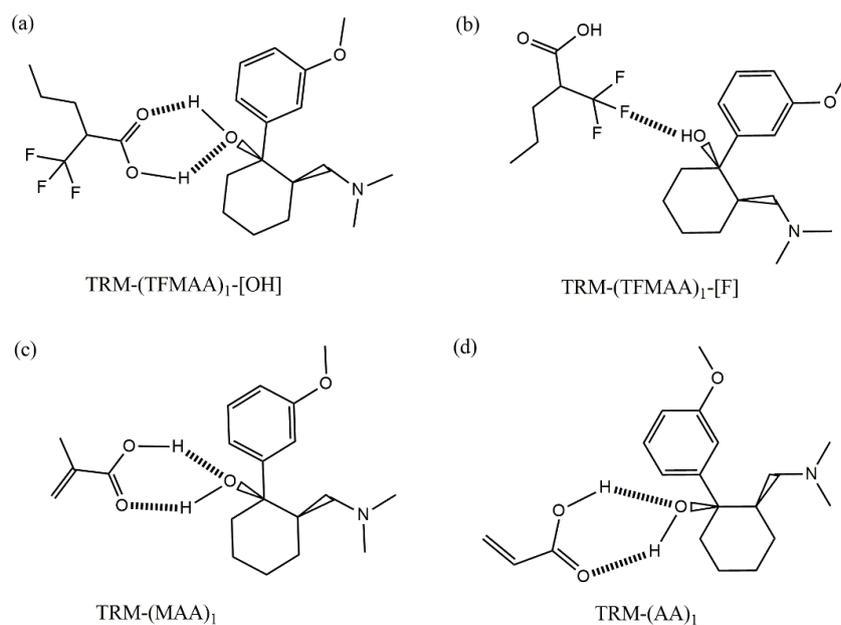


Figura 1.6. Representação esquemática das interações entre os MF's e o TRM na razão molar 1:1. Linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio.

Tabela 1.1. Variação da energia de interação (ΔE) e da energia livre de Gibbs (ΔG) para os complexos [MF-TRM] nas estequiometrias 1:1, 1:2, 1:3. Valores em kcal/mol, além do número de ligações intermoleculares estabelecidas.

Complexos	ΔE	ΔG	Ligações de hidrogênio
TRM-(AA) ₁	-14,12	-0,50	2
TRM-(MAA) ₁	-14,39	-1,31	2
TRM-(TFMAA) ₁ -[F]	-3,97	5,46	1
TRM-(TFMAA) ₁ -[OH]	-15,86	-0,91	2
TRM-(AA) ₂	-23,34	1,07	3
TRM-(MAA) ₂	-23,54	0,11	3
TRM-(TFMAA) ₂ -[OH+OH]	-24,33	0,80	3
TRM-(AA) ₃	-39,28	-2,11	4
TRM-(MAA) ₃	-38,67	-1,15	4
TRM-(TFMAA) ₃ -[OH+OH+OH]	-38,50	-1,77	4

De acordo com as **Figuras 1.7a, 1.7b e 1.7c**, é possível notar que a interação das hidroxilas dos monômeros com a hidroxila do TRM leva à formação de duas ligações de hidrogênio, resultando em um anel de seis membros e em uma maior estabilidade para estes complexos. Por outro lado, para o complexo TRM-(TFMAA)₁-[F], apenas uma ligação de H é estabelecida, como mostra a **Figura 1.7d**, ou seja, o complexo formado é menos estável. Como os resultados das análises energéticas e estruturais para os complexos na estequiometria 1:1 mostraram que a interação no átomo de flúor levou à formação de um complexo menos estável, o TRM-(TFMAA)₁-[F] foi excluído das etapas posteriores do trabalho.

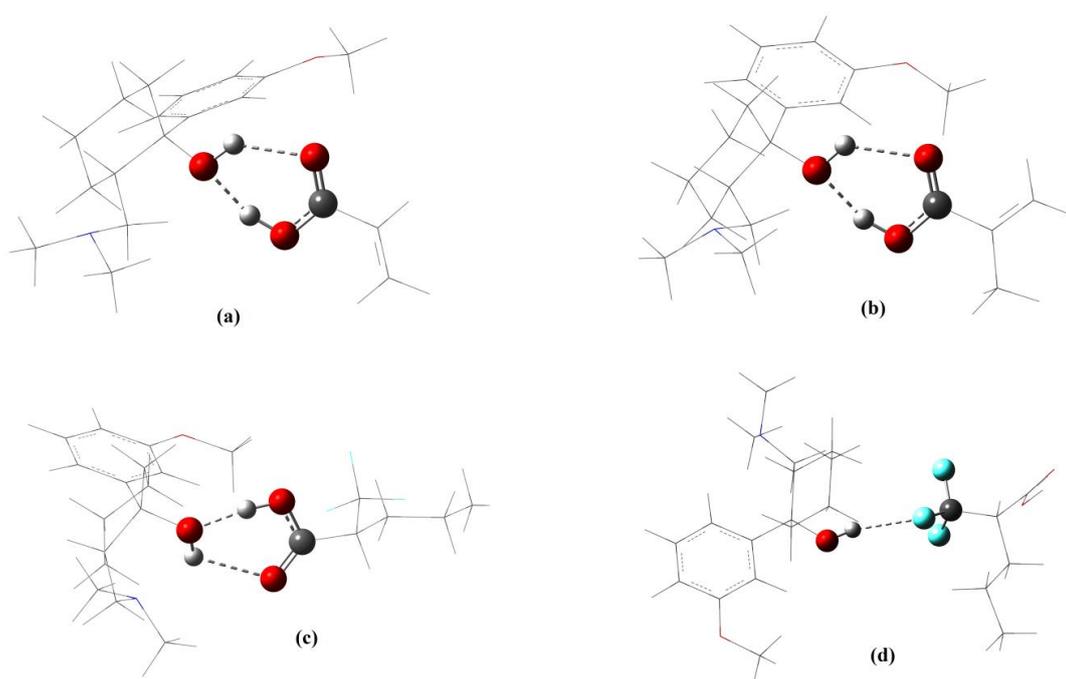


Figura 1.7. Estruturas otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d,p) dos complexos na razão molar 1:1. (a) TRM-(AA)₁; (b) TRM-(MAA)₁; TRM-(TFMAA)₁-[OH]; (d) TRM-(TFMAA)₁-[F]. As ligações de hidrogênio são mostradas em linhas pontilhadas.

Posteriormente, uma segunda molécula do MF foi adicionada aos complexos 1:1, previamente otimizados, levando a formação de sistemas na estequiometria 1:2. O sítio de interação considerado foi o átomo de oxigênio de éter presente na estrutura do TRM.

Observando a **Tabela 1.1**, é possível notar que os três complexos na razão molar 1:2 apresentaram energias muito próximas entre si, em torno de 1,0 kcal.mol⁻¹, em termos de ΔE e ΔG . Como mostrado na **Figura 1.8**, para todos os complexos 1:2, três ligações de hidrogênio foram estabelecidas entre as moléculas do monômero e o TRM, gerando complexos praticamente degenerados, o que impossibilita alguma conclusão.

Além disso, percebe-se também que os complexos de estequiometria 1:2 possuem $\Delta G > 0$, o que caracteriza um processo não-espontâneo. Apesar de maiores que zero, estes valores estão bem próximos de zero. Isto pode ser explicado devido a um possível erro de cálculo, causado pelas bases utilizadas. Também se sabe que a DFT é um nível intermediário de cálculo e que possui um erro intrínseco. Estes fatores podem ser uma justificativa para os valores positivos de ΔG .

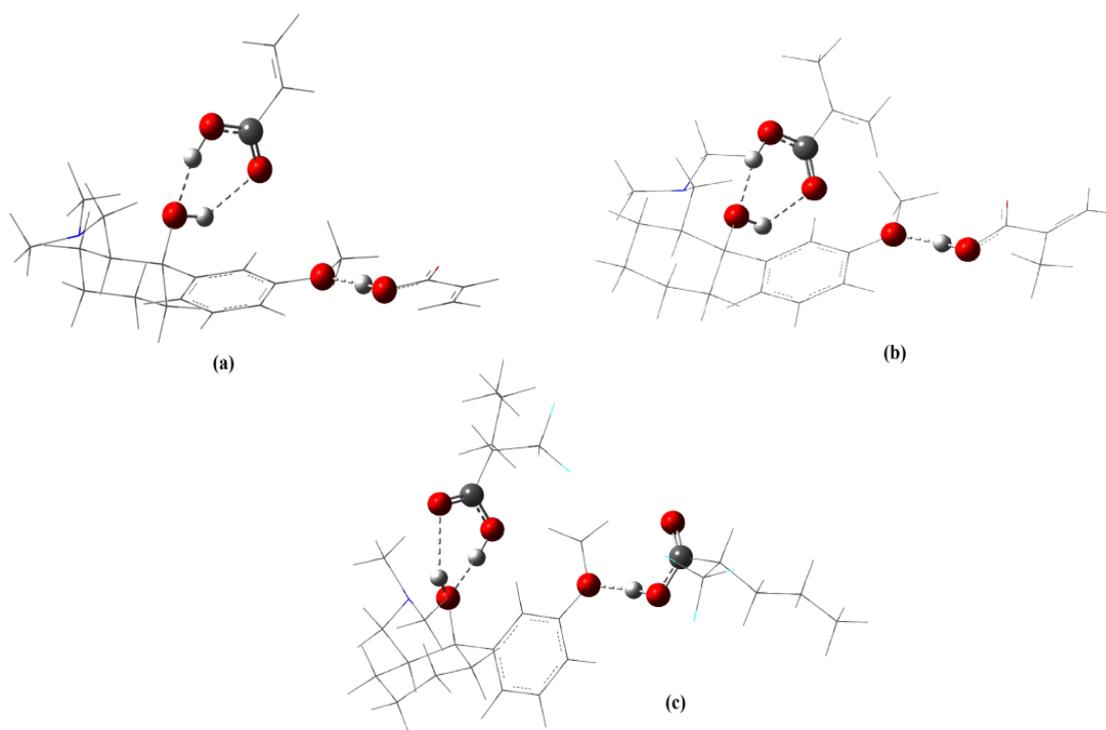


Figura 1.8. Estruturas otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d,p) dos complexos na razão molar 1:2. (a) TRM-(AA)₂; (b) TRM-(MAA)₂; (c) TRM-(TFMAA)₂-[OH+OH]. As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas.

Por fim, uma terceira molécula do MF foi adicionada aos complexos 1:2, previamente otimizadas, desta vez, no grupo amina do TRM, levando à formação de complexos na estequiometria 1:3. Na **Tabela 1.1** é possível notar claramente que os complexos mais estáveis são formados na estequiometria 1:3, em comparação às outras estequiometrias 1:1 e 1:2. O número de ligações de hidrogênio entre os MF e o TRM exerce um papel fundamental para a maior estabilidade dos complexos 1:3. Neste caso, como mostrado na **Figura 1.9**, são observadas quatro ligações de hidrogênio entre as espécies.

Analisando os resultados de ΔE e ΔG , é possível notar que os três complexos 1:3 formados também são praticamente degenerados. A diferença de energia entre eles é da ordem

de $1,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Todas as interações entre as três moléculas de MF e o TRM são da mesma natureza, ou seja, grupos hidroxila dos MF interagindo com grupos eletronegativos do TRM. Além disso, como mencionado anteriormente, o mesmo número de interações (4 ligações de H), com comprimento de ligação variando entre 1,68 e 2,09 Å, é determinado.

Nesta etapa do trabalho foi possível, portanto, selecionar a estequiometria mais adequada, sendo a de razão molar 1:3 que leva a formação de complexos mais estáveis. Além disso, percebe-se que o monômero funcional AA apresenta, na estequiometria 1:3, valores tanto de ΔE , quanto de ΔG , ligeiramente mais estáveis, em comparação aos outros dois complexos.

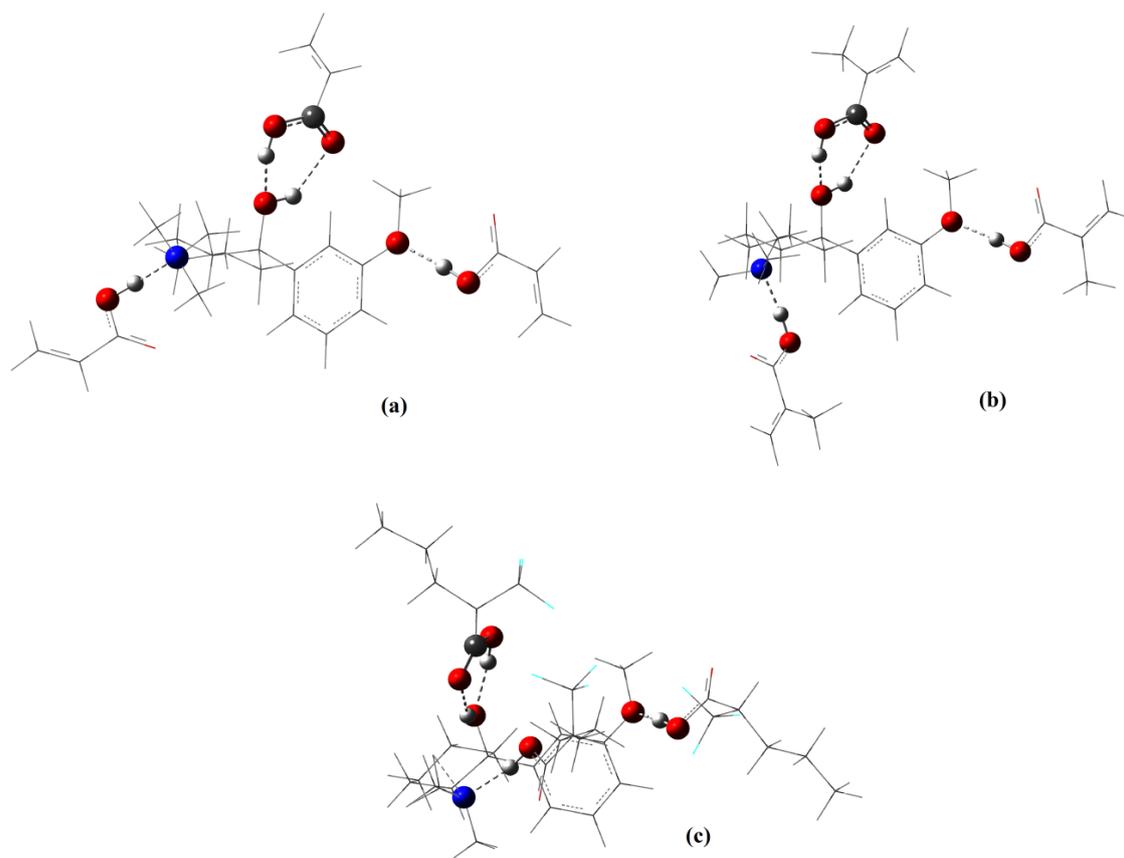


Figura 1.9. Estruturas otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d,p) dos complexos na razão molar 1:3. (a) TRM-(AA)₃; (b) TRM-(MAA)₃; (c) TRM-(TFMAA)₃-[OH+OH+OH]. As interações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas.

4.2. Seleção do solvente

Nesta etapa, foi feito um estudo para se avaliar o solvente mais adequado para formação dos complexos MF-TRM. Os solventes foram escolhidos de acordo com sua maior utilização na síntese de MIP's. Este procedimento é um passo extremamente importante, pois o solvente deve

solubilizar todos os componentes da síntese e interferir o mínimo possível nas interações entre os reagentes. Com este objetivo, as reações de complexação foram avaliadas na presença de solventes distintos selecionados para estudo. As energias de interação, ΔE e ΔG , são mostradas na **Tabela 1.2**, para todos os solventes avaliados.

De acordo com a **Tabela 1.2**, é possível perceber que o TFMAA não é o monômero funcional mais adequado para a síntese deste polímero, em nenhum solvente, isto, porque todos os valores energéticos encontrados para os complexos formados com esse MF, nos diferentes solventes, apresentaram energias menos favoráveis quando comparados aos MF's AA e MAA. Os menores valores de ΔE e ΔG , e, portanto, considerado, no presente trabalho, o complexo mais estável, é o TRM-(AA)₃ em clorofórmio.

Novamente, os valores de ΔG encontrados são maiores que zero. Alguns valores bem maiores (para os complexos com o monômero TFMAA) e alguns pouco maiores que zero. A justificativa para estes valores, novamente, pode ser um erro proveniente da metodologia utilizada para o cálculo.

É possível perceber que os valores de ΔE e ΔG seguem uma tendência de crescimento similar ao da constante dielétrica. Este fato é explicado abaixo.

ϵ – Clorofórmio < acetona < metanol < acetonitrila < DMSO < água

ΔG – Clorofórmio < acetona < metanol < DMSO < água < acetonitrila

ΔE – Clorofórmio < acetona < metanol < acetonitrila < DMSO < água

Tabela 1.2. Variação da energia de interação (ΔE) e da energia livre de Gibbs (ΔG) para os complexos [MF-TRF] na estequiometria 1:3, em distintos solventes. Valores em kcal/mol.

Complexo	Água		Acetona		DMSO		Clorofórmio		Acetonitrila		Metanol	
	ΔE	ΔG	ΔE	ΔG	ΔE	ΔG	ΔE	ΔG	ΔE	ΔG	ΔE	ΔG
TRM-(AA) ₃	-30.81	6.02	-31.33	3.73	-30.93	3.85	-33.26	1.87	-31.03	6.85	-31.07	3.78
TRM-(MAA) ₃	-29.51	4.88	-29.99	6.21	-29.63	6.41	-31.78	4.26	-29.74	5.15	-29.77	6.49
TRM-(TFMAA) ₃ -[OH+OH+OH]	-29.47	12.71	-29.90	12.35	-29.56	12.82	-31.64	10.98	-29.63	12.79	-29.66	12.62

Em 2005, Tarley e colaboradores [15] argumentaram que, quando a interação entre o MF e a molécula molde ocorre por ligações de hidrogênio, solventes com baixa polaridade e pequena constante dielétrica, como é o caso do clorofórmio, fornecem um meio mais adequado

para a formação de complexos mais estáveis. Ainda assim, solventes com maior constante dielétrica, como acetonitrila, podem ser usados, mas o polímero obtido apresentará menor capacidade de reconhecimento da molécula molde. No caso de solventes próticos, como água e metanol, eles irão fornecer átomos de hidrogênio para o meio, átomos estes que podem competir entre os reagentes para a formação de ligações de hidrogênio, resultando em um polímero com eficácia comprometida. Por essas razões, conclui-se que o melhor MIP obtido teoricamente no presente trabalho, via cálculos DFT, é aquele que tem o AA como monômero funcional, na razão molar 1:3 e o clorofórmio como solvente, conforme mostrado na **Figura 1.10**.

Importante ressaltar que, em 2010, Javanbakht e colaboradores [33] relataram, em um trabalho experimental, uma extração em fase-sólida com impressão molecular (MISPE – *molecular imprinted solid phase extraction*) de tramadol em amostras de urina e plasma. O MIP foi sintetizado em três diferentes solventes – clorofórmio, acetonitrila e dimetilformamida. A capacidade de recuperação foi avaliada em soluções com concentração conhecida de TRM. Os melhores resultados foram obtidos com o MIP sintetizado em clorofórmio (recuperação em torno de 95%), seguido do MIP sintetizado em acetonitrila (recuperação em torno de 50%) e por último, o MIP em dimetilformamida (recuperação em torno de 30%). Esse resultado corrobora perfeitamente com os resultados teóricos obtidos no presente trabalho para um MIP para o TRM, que aponta também o solvente mais adequado para síntese como sendo o clorofórmio.

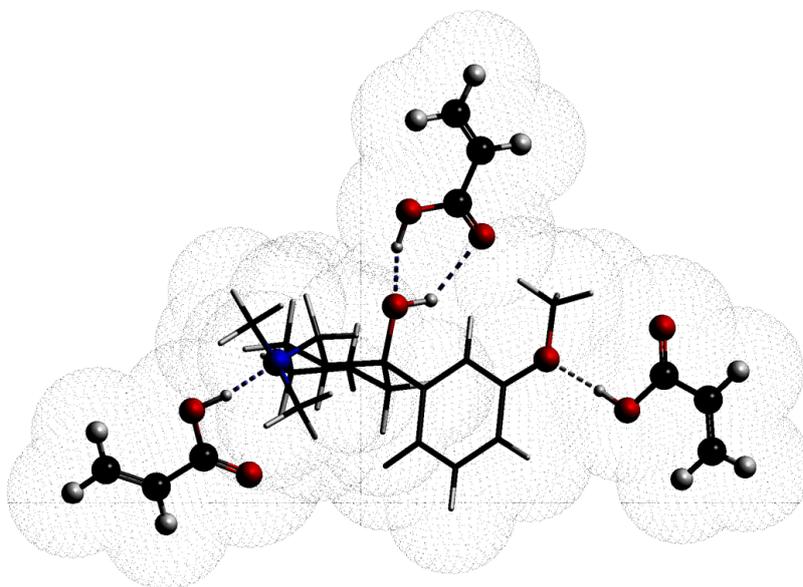


Figura 1.10. Representação do melhor MIP encontrado: TRM-(AA)₃, solvente implícito: clorofórmio.

4.3. Análise vibracional teórica do melhor MIP:TRM-(AA)₃

Outra análise que pode ser realizada para ajudar na compreensão de como o MIP é formado em nível molecular, é o seu espectro de infravermelho (IV) teórico. As ligações de hidrogênio, interação intermolecular mais relevante na formação de um MIP, causam mudanças significativas nos modos vibracionais do complexo, em relação aos espectros do MF e da molécula molde isoladas, além do surgimento de novos picos.

A **Figura 1.11** mostra os espectros do AA, do TRM e do complexo TRM-(AA)₃ obtidos por meio do cálculo de frequências harmônicas no nível B3LYP/6-31G(d,p). Observando o espectro do AA, é possível notar os picos mais característicos: em 1205 cm⁻¹, relativo a deformação angular do átomo de H da hidroxila, em 1801 cm⁻¹, relativo ao estiramento da carbonila e em 3760 cm⁻¹ relativo ao estiramento da ligação entre oxigênio e hidrogênio do grupo OH. Entre 1801 e 3172 cm⁻¹ não foram determinados picos. Para o TRM, o modo vibracional mais característico está em 1651 cm⁻¹, relativo à deformação assimétrica do anel aromático. Os picos entre 2906 e 3260 cm⁻¹ são característicos de estiramentos de ligações com átomos de hidrogênio presentes na molécula de TRM. O pico em 3830 cm⁻¹ representa o estiramento da ligação com o átomo de hidrogênio no grupo OH. Entre 1651 e 2906 cm⁻¹, não foram determinados picos. Por último, encontra-se o espectro de IV do complexo TRM-(AA)₃. Sua interpretação é de extrema importância para detecção, por exemplo, da formação de ligações de hidrogênio.

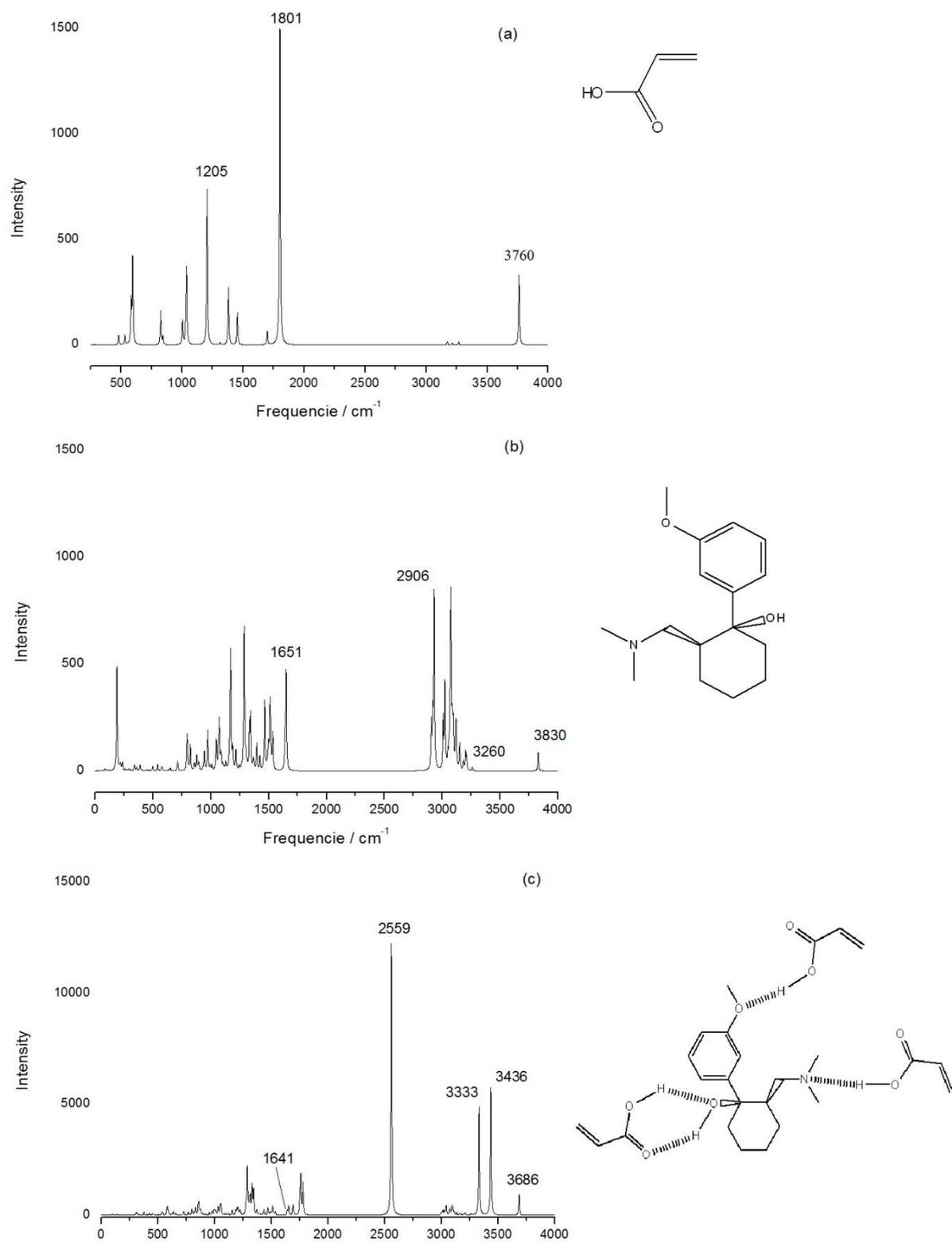


Figura 1.11. Espectros teóricos de infravermelho do (a) AA; (b) TRM; (c) TRM-(AA)₃.

Na **Figura 1.11(a)** pode ser visto que as três moléculas de AA fornecem ao complexo TRM-(AA)₃ três grupos carbonila, os quais podem ser determinados no espectro da **Figura 1.11(c)** em três diferentes picos (1753, 1760 e 1779 cm⁻¹), todos estes em frequências menores que o grupo carbonila do AA (1801 cm⁻¹). A interação entre o AA e o grupo hidroxila do TRM, leva à formação de duas ligações de hidrogênio, o que causa uma diminuição da frequência de vibração desta hidroxila do TRM. As outras duas carbonilas (das moléculas de AA) também se deslocam para frequências menores, devido às restrições estéricas. Além disso, pode ser observado que as três moléculas do MF também fornecem ao meio três hidroxilas, o que levará a deslocamentos para frequências menores nos complexos. Como se sabe, o que permite a formação dos complexos é o estabelecimento das ligações de hidrogênio, as quais são responsáveis pelo deslocamento da frequência das hidroxilas do AA para frequências menores (de 3760 cm⁻¹ para 3333 e 3436 cm⁻¹). A frequência da hidroxila do TRM também sofre um deslocamento para valor menor (3830 para 3686 cm⁻¹). A diferença mais clara entre o espectro do complexo e os espectros de seus constituintes é o pico de alta intensidade em 2559 cm⁻¹. A ausência deste pico nos espectros de AA e TRM permite afirmar que este é característico da formação da ligação de hidrogênio do AA com o átomo de nitrogênio do TRM.

A partir dessa análise, é possível perceber que todos os grupos responsáveis pela formação das interações de hidrogênio sofrem deslocamentos para frequências menores. Se relacionarmos essa diminuição da frequência com a Lei de Hooke (1.3) podemos afirmar que ocorre uma diminuição da constante de força (K) das ligações intramoleculares quando as moléculas formam as ligações de hidrogênio entre si.

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (1.3)$$

Desse modo, podemos afirmar que existe, de fato, aproximação dos fragmentos, no nível molecular e conseqüente consolidação das interações entre moléculas de monômero com os grupos hidroxila e éter da molécula de TRM. No caso da interação com o grupo amina do TRM, um pico de grande intensidade também nos permite afirmar que existe a formação da interação, pois comparando com os espectros de AA e TRM, esta estava ausente em ambos. Dessa forma, com o aparecimento deste pico, é possível afirmar que ligação de hidrogênio é estabelecida.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho relatou, pela primeira vez, uma análise teórica, via Teoria do Funcional de Densidade, do processo de interação entre monômeros funcionais e o TRM, com o objetivo de se obter as melhores condições de síntese de um polímero impresso molecularmente para o TRM. Dentre os resultados obtidos pode-se destacar: (i) a estequiometria ideal encontrada para os complexos foi determinada como sendo 1:3, tendo como base resultados energéticos e estruturais; (ii) o monômero funcional adequado o ácido acrílico (AA), pois com ele, os complexos formados são mais estáveis; (iii) o melhor solvente, dentre os testados, foi o clorofórmio, que é um solvente de baixa constante dielétrica; (iv) as interações intermoleculares do tipo de ligação de hidrogênio formadas entre a molécula molde e os MF's desempenham um papel fundamental na estabilidade do complexo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BOONE, M., WATERVAL, J.C.M., LINGEMAN, H., ENSING, K., UNDERBERG, W.J.M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs - a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 20 (1999) 831
- [2] BORGES, K. B., FIGUEIREDO, E. C., QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1ª ed., LTC Editora, Rio de Janeiro, 2015.
- [3] MOREAU, R.L. DE M., DE SIQUEIRA, M.E.P.B. Toxicologia Analítica. Editora Guanabara Koogan S.A., 2008.
- [4] Sample preparation Fundamentals for Chromatography. Agilent Technologies, Inc. 2013. Disponível em http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf
- [5] MITRA, S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Inc., 2003.
- [6] SIMPSON, N.J.K. Solid-Phase extraction: principles, techniques, and applications. Taylor & Francis Group LLC, 2000.
- [7] FRITZ, J.S. Analytical solid-phase extraction. Wiley – VCH, 1999
- [8] FRITZ, J.S., MACKA, M. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. *Journal of Chromatography A* 902 (2000) 137
- [9] MAGALHÃES, C.S., GARCIA, J.S.; LOPES, A.S.; FIGUEIREDO, E.C.; ARRUDA, M.A.Z. Strategies for sample preparation focusing on biomolecules determination/characterization In: ARRUDA, M.A.Z. (Eds.). Trends in sample preparation. New York: Nova Science Publishers, 2007.
- [10] WHITCOMBE, M.J., VULFSON, E.N. Imprinted Polymers. *Advanced Materials* 13 (2001) 467
- [11] CUMMINS, W.; DUGGAN, P.; MCLOUGHLIN, P. A comparative study of the potential of acrylic and sol-gel polymers for molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta* 542 (2005) 52
- [12] ALEXANDER, C.; ANDERSSON, H. S.; ANDERSSON, L. I.; ANSELL, R. J.; KIRSCH, N.; NICHOLLS, I. A.; O'MAHONY, J.; WHITCOMBE, M. J. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition* 19 (2006) 106
- [13] JUDIT TULLA-PUCHE, F. A. Ed. The power of functional resins in organic synthesis, Weinheim, (2008)
- [14] WHITCOMBE M.I., RODRIGUEZ, M.E., VULFSON, E.N. Separation for biotechnology 3, Royal Society of Chemistry: Cambridge, (1994).
- [15] TARLEY, C.R.T, SOTOMAYOR, M.D.P.T., KUBOTA, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. *Química Nova* 28 (2005) 1076

- [16] SELLERGRÉN, B. Molecularly imprinted polymers Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry. Techniques and instrumentation in analytical chemistry, Vol. 23, Elsevier, 2001.
- [17] KODADADIAN, M.M., AHMADI, F. Computer-assisted design and synthesis of molecularly imprinted polymers for selective extraction of acetazolamide from human plasma prior to its voltammetric determination. *Talanta* 81 (2010) 1446
- [18] AHMADI, F., AHMADI, J., RAHIMI-NASRABADI, M. Computational approaches to design a molecular imprinted polymer for high selective extraction of 3,4-methylenedioxymethamphetamine from plasma. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 7739
- [19] SALONI, J., LIPKOWSKI, P., DASARY, S.S.R., ANJANEYULU, Y., YU, H., HILL JR. G. Theoretical study of molecular interactions of TNT, acrylic acid, and ethylene glycol dimethacrylate – Elements of molecularly imprinted polymer modeling process. *Polymer* 52 (2011) 1206
- [20] PUZIO, K., DELÉPÉE, R., VIDAL, R., AGROFOGLIO, L.A. Combination of computational methods, adsorption isotherms and selectivity tests for the conception of a mixed non-covalent–semi-covalent molecularly imprinted polymer of vanillin. *Analytica Chimica Acta* 790 (2013) 47
- [21] SALONI, J., WALKER, K., HILL JR., G. Theoretical investigation on monomer and solvent selection for molecular imprinting of nitrocompounds. *The Journal of Physical Chemistry A* 117 (2013) 1531
- [22] DE BARROS, L.A., PEREIRA, L.A., CUSTÓDIO, R., RATH, S. A Novel computational approach for development of highly selective fenitrothion imprinted polymer: theoretical predictions and experimental validations. *Journal of Brazilian Chemical Society* 25 (2014) 619
- [23] AHMADI, F., YAWARI, E., NIKBAKHT, M. Computational design of an enantioselective molecular imprinted polymer for the solid phase extraction of S-warfarin from plasma. *Journal of Chromatography A* 1338 (2014) 9
- [24] TORKASHVAND, M., GHOLIVAND, M.B., TAHERKHANI, F. Fabrication of an electrochemical sensor based on computationally designed molecularly imprinted polymer for the determination of mesalamine in real samples. *Materials Science and Engineering: C* 55 (2015) 209
- [25] KARIMIAN, N., GHOLIVAND, M.B., TAHERKHANI, F. Computational design and development of a novel voltammetric sensor for minoxidil detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 740 (2015) 45
- [26] FERNANDES, L.S., HOMEM-DE-MELLO, P., LIMA, E.C., HONORIO, K.M. Rational design of molecularly imprinted polymers for recognition of cannabinoids: A structure–property relationship study. *European Polymer Journal* 71 (2015) 364
- [27] KUNG, Y., WANG, N., NI, X., YU, Q., LIU, H., HUANG, W., XU, W. Molecular dynamics simulations of molecularly imprinted polymer approaches to the preparation of selective materials to remove norfloxacin. *Journal of Applied Polymer Science* 132 (2016) 42817

- [28] STRUMPF, M., ZENZ, M., WILLWEBER-STRUMPF, A. Analysis of the therapy of chronic pain. A comparison of previous therapy and specialized pain therapy. *Anaesthesist* 42 (1993) 169
- [29] GODOY, A. L. P. C., DE MORAES, N. V., MARTINEZ, E. Z., CARVALHO, T. M. J. P., MARQUES, M. P., LANCHOTE, V. L. Simultaneous analysis of tramadol, O-Desmethyltramadol, and N-Desmethyltramadol enantiomers in rat plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetics. *Chirality* 23 (2011) 287
- [30] HEHRE, W. J., DITCHFIELD, R., POPLE, J. A. Self – Consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian – type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules. *The Journal of Chemical Physics* 56 (1972) 2257
- [31] LEE, C., YANG, W., PARR, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* 37 (1988) 785
- [32] BARONE, V., COSSI, M., TOMASI, J. A. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *The Journal of Chemical Physics* 107 (1997) 3210
- [33] FRISCH, M. J. et al., Gaussian 09, Revision D.01 (Gaussian, Inc., Wallingford CT 2009).
- [34] JAVANBAKHT, M., ATTARAN, A.M., NAMJUMANESH, M.H., ESFANDYARI-MANESH, M., AKBARI-ADERGANI, B. Solid Phase Extraction Of Tramadol From Plasma And Urine Samples Using A Novel Water-Compatible Molecularly Imprinted Polymer. *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 1700

Capítulo 2:

Análise enantiosseletiva de tramadol por eletroforese capilar –
uma abordagem teórica e experimental

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eletroforese: conceitos básicos

A eletroforese é uma técnica de separação baseada nas diferentes taxas de migração de diferentes espécies químicas em um meio eletrolítico, sob a influência de um campo elétrico. Diversos mecanismos de separação são conhecidos, entre eles, podemos citar a eletroforese capilar de zona (CZE), eletroforese capilar em gel (CGE), eletroforese capilar por focalização isoelétrica (CIEF), isotacoforese capilar (CITP). Cada mecanismo tem a suas singularidades e aplicações mais indicadas dependendo do objetivo da análise [1,2].

A eletroforese foi desenvolvida inicialmente por um químico sueco, Arne Tiselius, em sua tese intitulada “*The Moving Boundary Method to Study the Electrophoresis of Proteins*”, publicada em 1930. Pode ser empregada na separação de diversas classes de moléculas: ânions e cátions inorgânicos, aminoácidos, fármacos, vitaminas, carboidratos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo que para esta última classe apresenta um desempenho ímpar. Nesta época, as separações realizadas por eletroforese foram realizadas em um meio plano estabilizado, como papel ou um gel poroso semi-sólido (**Figura 2.1**). Bons resultados foram obtidos, mas muitas desvantagens podem ser citadas, tais como análises muito lentas, instrumentação de alta complexidade e problemas com a reprodutibilidades dos experimentos [3].

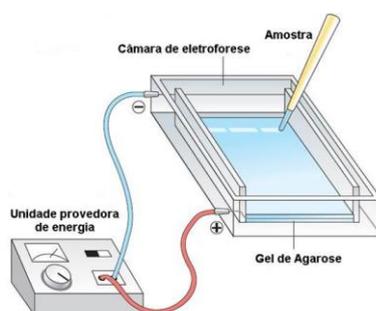


Figura 2.1. Esquema genérico de eletroforese [4].

No início dos anos 1980, foram introduzidas por Jorgenson e Lukacs [5] as separações realizadas em capilares de sílica fundida, dando origem a eletroforese capilar (CE). Nesta modalidade da eletroforese, os resultados mostraram-se promissores, apresentando curtos tempos de migração para as análises, possibilidade de automação e

altas resoluções. Assim, a CE tornou-se uma ferramenta de extrema importância na resolução de problemas analíticos envolvendo separações. Além disso, pode ser acoplada a diversos meios de detecção: UV-Vis, fluorescência, métodos eletroquímicos, espectrometria de massas etc. [3]

O desenvolvimento do Projeto Genoma Humano, que tinha como objetivo obter a sequência completa do DNA humano, diferenciando polinucleotídeos que poderiam diferir entre si em poucos Daltons, foi possível graças à ótima resolução e altas velocidades de análise da CE. O DNA humano contém cerca de três bilhões de nucleotídeos, que podem ser muito semelhantes. Desse modo, a alta resolução e as análises rápidas da CE permitiram o sequenciamento de até milhares de nucleotídeos em apenas um único dia [3,6-9].

1.2. Instrumentação

Uma das vantagens da CE é a grande simplicidade dos instrumentos, comercializados desde 1989. O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares de sílica fundida, eletrodos inertes (geralmente de Pt) e um detector apropriado. Os capilares são constituídos por sílica fundida, pois esta apresenta algumas vantagens quando aplicadas para este objetivo, tais como baixa condutividade elétrica, alta resistência ao ataque químico e alta transmitância ótica em uma ampla faixa do espectro (190 a 900 nm). Além disso, os capilares são revestidos com poliimida, um polímero que fornece flexibilidade ao capilar de sílica, o qual se rompe facilmente sem o revestimento. Estes capilares (**Figura 2.2**) possuem diâmetro interno entre 10 e 100 μm e um comprimento entre 40 e 100 cm. As duas extremidades do capilar são colocadas nos reservatórios “*inlet*” (o qual fornece a solução eletrolítica para a análise) e “*outlet*” (o qual recebe a solução eletrolítica) (**Figura 2.3**). Quando se aplica o campo elétrico (entre 5 e 30 kV), a solução com cargas flui do *inlet* para o *outlet*. A introdução da amostra, que também pode ocorrer de diferentes formas, é realizada em uma extremidade no capilar e a detecção na outra extremidade [1,10].

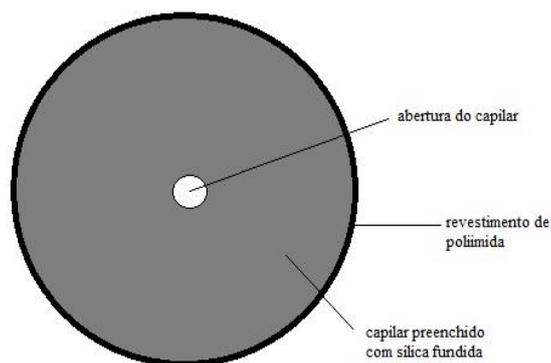


Figura 2.2. Seção transversal de um típico capilar utilizado em CE. Adaptado de ref. [10].

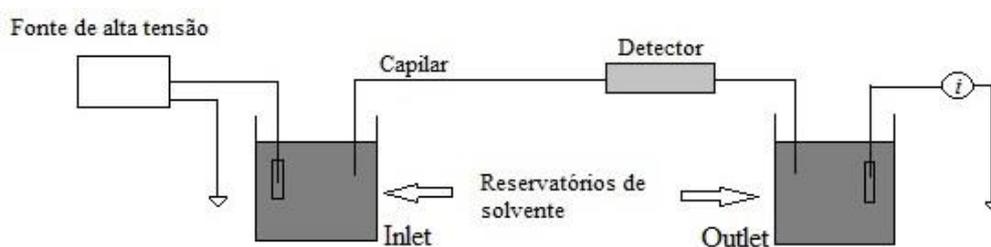


Figura 2.3. Esquema genérico de um instrumento de CE. Adaptado de ref. [9].

A forma de introduzir a amostra é de extrema importância no desenvolvimento de análises quantitativas. Esta introdução pode ser: (i) injeção eletrocinética, onde a amostra é introduzida no capilar por um gradiente de potencial ao longo do capilar; (ii) injeção hidrodinâmica, onde se utiliza o gradiente de pressão para injetar a amostra. Esta pressão pode ser aplicada por pressurização, vácuo ou gravidade (gerando o fenômeno conhecido como sifonagem) [1,2]. Estes dois tipos de injeção apresentam vantagens e desvantagens, mas o método mais utilizado é o hidrodinâmico, pois neste caso a injeção se baseia apenas na transferência de volume, não apresentando diferenças para soluções com diferentes viscosidades, concentrações, etc. O volume de injeção é da ordem de nL [1].

Como citado acima, as voltagens utilizadas nas análises em CE são muito altas e isso pode gerar um grande problema, o chamado Efeito Joule, causado pela passagem de correntes muito intensas através de um meio condutor, gerando calor, que é dissipado apenas nas extremidades do capilar, o que resulta em gradientes de temperatura ao longo do capilar. Esses gradientes de temperatura, por sua vez, geram gradientes de

densidade e de viscosidade, causando convecção da solução no interior do capilar e dificultando as separações. Além disso, se a temperatura for muito elevada, o soluto pode se decompor [1].

Para solucionar estes problemas causados pelo Efeito Joule, a separação é realizada em tubos com dimensões capilares, pois a geometria capilar (grande área superficial interna em relação ao volume) favorece a dissipação do calor, o que praticamente elimina a convecção, sendo possível a aplicação de campos elétricos de grande intensidade. Apesar disso, o equipamento deve contar com um controle de temperatura eficiente [1,3].

1.3. Detecção

Como a CE é uma técnica utilizada na separação dos componentes de uma mistura, é necessário o acoplamento a algum método de detecção. Entre os métodos mais relatados na literatura podemos citar a absorção de radiação ultravioleta visível (UV-vis), fluorescência induzida por laser (LIF) e espectrometria de massa (MS). Estes métodos também são os mais utilizados nas identificações para as separações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Apesar disso, métodos como condutividade, amperometria e radiometria também podem ser utilizados [10].

Mesmo com a grande variedade de métodos de detecção, o que tem seu uso mais relatado na literatura é o UV-Vis. Apesar de resultar em maiores limites de detecção, é um método mais barato e altamente funcional. Como a absorbância do material está diretamente ligada ao caminho óptico da radiação e o capilar tem diâmetro da ordem de micrômetros, algumas modificações têm sido propostas. Entre elas podemos citar: capilar na forma Z, o capilar revestido internamente com material refletivo ou o capilar “*bubble cell*”. Em todos estes modos, o trajeto percorrido pela radiação é aumentado [10]. Todos são mostrados na **Figura 2.4 (a), (b) e (c)**, respectivamente.

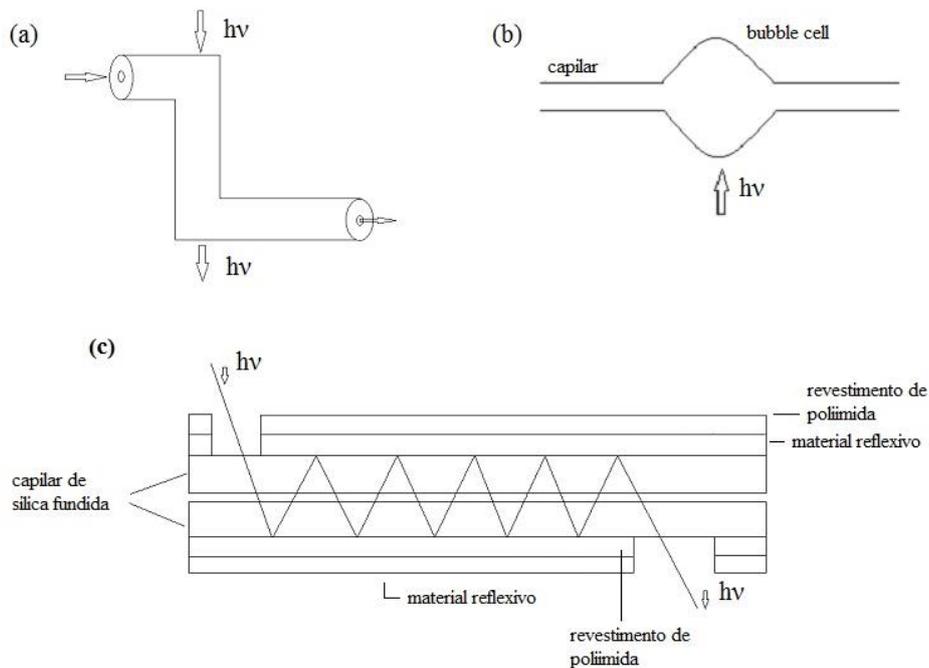


Figura 2.4. (a) capilar na forma Z; (b) capilar “bubble cell”; (c) capilar revestido com material refletor. Adaptado de ref. [10].

1.4. Fundamentos Teóricos

1.4.1. Fluxo Eletroosmótico

Uma das características mais marcantes da CE é o fluxo eletroosmótico (EOF), fenômeno de extrema importância, originado pelo uso dos capilares de sílica. A sílica fundida, na forma pura de SiO_2 amorfo, fornece propriedades interessantes aos capilares como dimensões precisas, além das já citadas no item 1.3, como alta resistência ao ataque químico e alta transmitância ótica em uma ampla faixa do espectro. O preparo do capilar e a formação do EOF são explicados a seguir [1].

Inicialmente o capilar é silanizado, ou seja, os grupos siloxanos ($\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$) e silanóis ($\text{Si} - \text{OH}$) são ativados, deixando de ser neutros e transformando-se em grupos silanatos ($\text{Si} - \text{O}^-$), os quais possuem cargas negativas (**Figura 2.5**). A silanização ocorre através da passagem de uma solução concentrada de NaOH (1 mol L^{-1}). Os grupos OH^- provenientes do hidróxido de sódio retiram os íon H^+ dos grupos silanóis e rompem as ligações $\text{O} - \text{Si}$ dos grupos siloxanos, deixando a sua parede interna toda na forma de grupos silanatos. Com a alta concentração de cátions Na^+ e a superfície do capilar cada vez mais negativa, os cátions Na^+ são atraídos para a parede interna. Para a

retirada do excesso de cátions na parede do capilar, é realizado um fluxo de água deionizada pelo capilar, a qual carrega os cátions e deixando a superfície efetivamente negativa. Por último, deve-se passar a solução eletrolítica em que será feita a análise. Dessa forma, o capilar estará pronto para a análise [11].

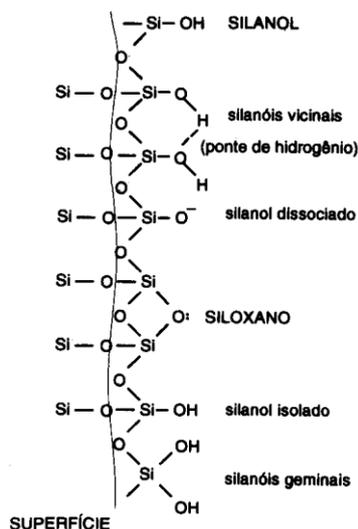


Figura 2.5. Representação esquemática da superfície interna do capilar, mostrando grupos silanóis, silanatos e siloxanos [1].

Quando o capilar é preenchido pela solução eletrolítica, alguns fenômenos são observados. Primeiramente, podemos citar novamente a aproximação de cátions desidratados da solução à parede interna do capilar, carregada negativamente. Isto leva a formação do chamado plano interno de Helmholtz (IHP, *inner Helmholtz plane*) ou camada fixa. Como a quantidade de cátions que forma o IHP não é suficiente para neutralizar totalmente a carga negativa da parede interna, uma camada adjacente a esta é formada por cátions hidratados, formando o chamado plano externo de Helmholtz (OHP, *outer Helmholtz plane*) ou camada difusa (**Figura 2.6**). Desse modo, a concentração de cátions diminui de acordo em que nos distanciamos das paredes internas do capilar, até uma região em que a influência da carga negativa da parede do capilar não é exercida [1,11].

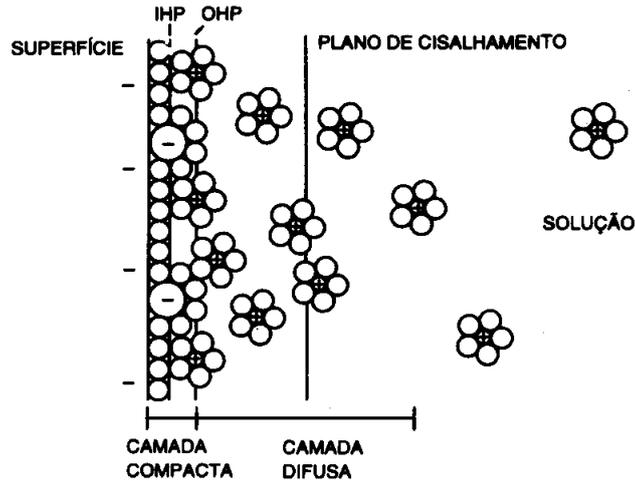


Figura 2.6. Modelo representando as camadas em contato com o capilar até o centro da solução [1].

Quando é aplicado o campo elétrico, as cargas positivas da solução, próximas às paredes internas, tendem a se movimentar em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons acabam transportando também moléculas de água e induzindo o movimento da solução como um todo. Este fluxo, originado pelas cargas positivas adsorvidas na parede interna do capilar é o chamado EOF [1,11].

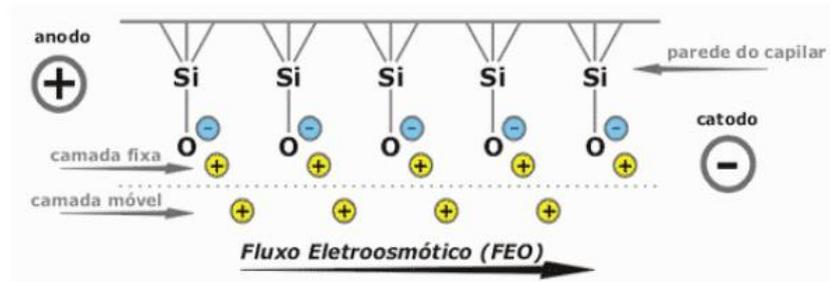


Figura 2.7. Cargas positivas adsorvidas à superfície interna do capilar começando a se movimentar em direção ao eletrodo negativo, dando origem ao EOF [3].

A presença deste fenômeno está diretamente relacionada com o pH da solução. Em baixos pH's (< 4), grupos silanóis estão neutros, o que diminui a aproximação de cátions e a intensidade do EOF. Em valores de pH maiores (> 8), os grupos silanóis estão em grande parte ionizados, o que aumenta a concentração de cátions na camada

difusa, resultando também no aumento do EOF. A **Figura 2.8** mostra a dependência do EOF em relação ao pH. [1,11]

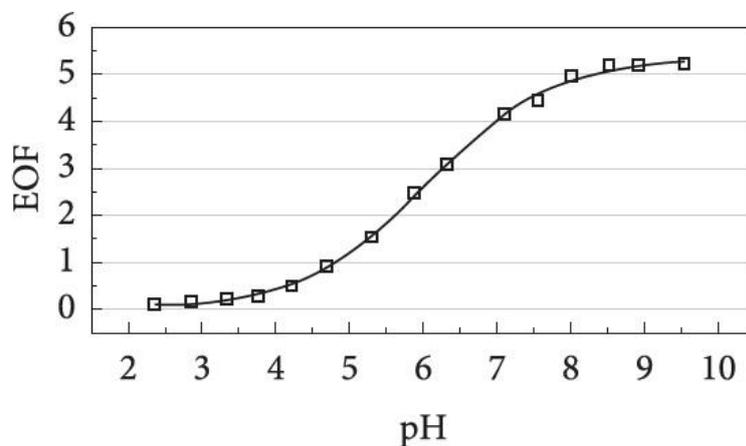


Figura 2.8. Dependência do EOF em relação ao pH [3].

Como já mencionado, a origem do EOF é nas paredes do capilar, desse modo o escoamento da solução eletrolítica se dá de maneira uniforme por todo o diâmetro do capilar. Ao contrário do que acontece em HPLC, em que o fluxo é induzido por pressão, o EOF apresenta um perfil laminar, e o fluxo em HPLC apresenta um perfil parabólico. Esta diferença no formato do fluxo, também tem influência no formato dos picos obtidos, como mostrado na **Figura 2.9**. Os picos obtidos por CE tendem a ser mais estreitos que os obtidos por HPLC [1].

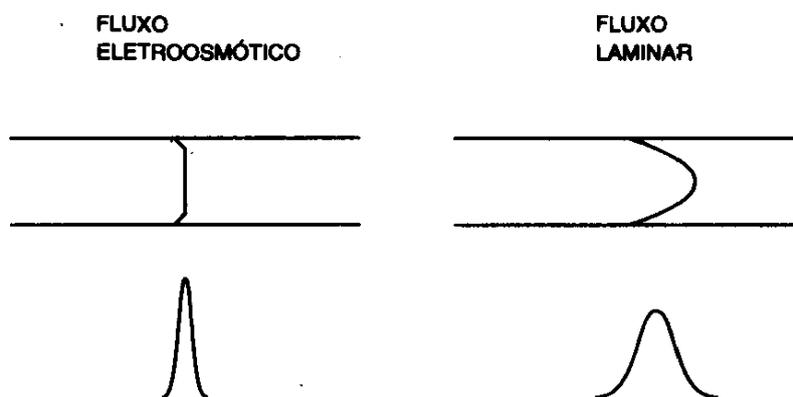


Figura 2.9. Diferença entre o EOF e o fluxo induzido por pressão. A diferença entre os picos obtidos também é representada [1].

1.4.2. Mobilidade eletroforética e velocidade eletroforética

Os solutos em solução podem se tornar ânions, cátions ou permanecerem neutros. Quando se inicia uma análise e é aplicado um campo elétrico, as espécies carregadas tendem a migrar para o eletrodo de carga oposta. Geralmente, em CE convencional, o fluxo é no sentido positivo \rightarrow negativo dos eletrodos. Desse modo, espécies carregadas positivamente se deslocam em direção ao eletrodo negativo (direção do detector) e espécies negativas em direção ao polo positivo (contrário ao detector). Esse movimento dos solutos sob a influência do campo elétrico é chamado de mobilidade eletroforética (μ), uma propriedade intrínseca de cada molécula. Matematicamente, μ é dada por:

$$\mu = \frac{z.e}{6\pi\eta r} \quad (2.1)$$

em que η é a viscosidade do meio, r é o raio iônico efetivo, z é a magnitude da carga e e representa a carga elementar [1]. Já a velocidade que a molécula apresenta, é chamada de velocidade eletroforética e é dada por:

$$v = \mu \cdot E \quad (2.2)$$

em que E é a intensidade do campo elétrico [1].

Desse modo, pode-se pensar que espécies neutras e negativas não podem ser analisadas por CE, mas isso não é verdade. O movimento apresentado pelos solutos é resultando da soma de sua mobilidade eletroforética e do EOF. Assim sendo, moléculas positivas se movimentam em direção ao eletrodo negativo e também devido ao EOF, ambos no mesmo sentido. Moléculas neutras são carregadas pelo EOF, pois não apresentam mobilidade eletroforética. Já os ânions, possuem mobilidade eletroforética no sentido contrário ao EOF. Como a intensidade do EOF é bem maior que as mobilidades eletroforéticas, os ânions são carregados para o eletrodo de carga negativa, no sentido do detector, mas com velocidade menor [11].

O esquema na **Figura 2.10** é uma representação genérica em que (a) representa a velocidade do EOF, (b) as velocidades eletroforéticas de solutos positivos, neutros e negativos e (c) a velocidade total dos solutos.

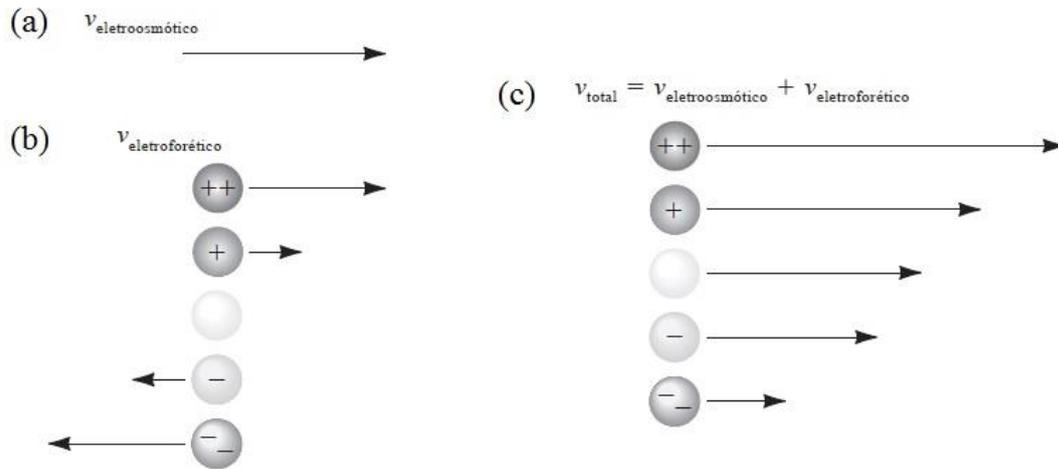


Figura 2.10. (a) Velocidade do EOF; (b) velocidade eletroforética; (c) velocidade efetiva de cada molécula, dada pela soma da velocidade do EOF e a velocidade eletroforética. [9]

De acordo com a discussão apresentada, eletroferogramas apresentam um comportamento típico, representado abaixo, com cátions em menor tempo de análise, moléculas neutras em tempo intermediário e ânions com tempo maior de análise.

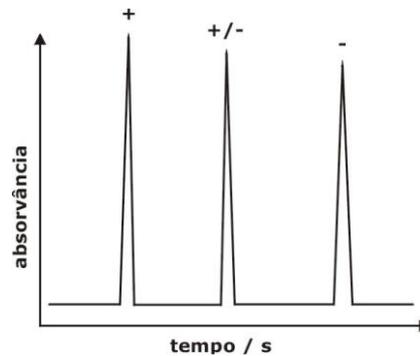


Figura 2.11. Exemplo genérico de um eletroferograma representando que cátions, moléculas neutras e ânions tendem a migrar nesta ordem, em uma análise eletroforética [3].

1.5. Análise dos resultados obtidos

Dois parâmetros podem ser utilizados para se avaliar os eletroferogramas obtidos. São eles: eficiência e resolução. A eficiência é representada pelo número de pratos teóricos (N), a qual é proporcional ao campo elétrico e inversamente

proporcional à temperatura, devido à presença de gradientes de viscosidade e densidade em altas temperaturas. N representa uma média do alargamento da banda de um determinado soluto que ocorre durante a separação. N é dado matematicamente por:

$$N = \frac{L_{det}(\mu_{ef} + \mu_{osm})V}{2DL_{tot}} \quad (2.3)$$

em que L_{det} é a distância entre o ponto da injeção e o ponto em que é realizada a detecção, também chamado de comprimento efetivo do capilar, μ_{ef} é a mobilidade eletroforética, μ_{osm} é a mobilidade do EOF, D é o coeficiente de difusão do soluto e L_{tot} é o comprimento total do capilar. Os valores de N são da ordem de 10^5 . [1,3]

A resolução, por sua vez, mede a efetividade da separação realizada. Picos bem resolvidos correspondem a solutos bem separados. Valores ideais para este parâmetro são acima de dois. Matematicamente, a resolução é representada por:

$$R_S = \frac{2(t_{i+1} - t_i)}{w_{bi} + w_{bi+1}} \quad (2.4)$$

em que t_{i+1} é o tempo de migração de um soluto, t_i é o tempo de migração do soluto anterior a este e w_b é a largura da base de cada banda [1,3].

Diversos fatores são importantes para se atingir uma boa resolução. Entre eles, podemos citar a ausência de aquecimento Joule, interações entre o capilar e os solutos, funcionamento não ideal do instrumento, irregularidades na aplicação do campo elétrico, decomposição do eletrólito devido à aplicação de altos potenciais, irregularidades nas extremidades do capilar, etc. Identificar e minimizar estes erros é fundamental para se obter uma condição ideal de análise [1].

1.6. Análises enantiosseletivas por CE

A presença de centros assimétricos nas estruturas de fármacos é de extrema relevância no desempenho de seu papel biológico. A presença de um grupo em uma determinada posição é decisiva no tipo e intensidade da função desempenhada em nosso organismo. Muitos fármacos são comercializados na forma de mistura racêmica, porém, isso pode ocasionar alguns problemas. Há cerca de vinte anos, estudos começaram a mostrar a importância e benefícios de se administrar apenas uma forma dos fármacos quirais [12-14].

Fármacos quirais podem se comportar de diversas maneiras distintas no organismo [12, 15-16], sendo elas:

- atividade desejada é causada por um dos enantiômeros, o outro é inativo. É uma situação desejada, mas incomum;
- atividade desempenhada igualmente por ambos enantiômeros. É uma situação bem rara, devido à alta estereosseletividade dos receptores biológicos. Apesar disso, alguns exemplos são conhecidos, como a prometazina, um anti-histamínico. Neste caso, não faz sentido se administrar apenas um enantiômero, já que o processo de purificação demanda tempo e possui alto custo;
- a atividade desempenhada pelos enantiômeros é a mesma, mas em potências diferentes. É um caso bem comum. Como exemplo podemos citar o β -bloqueador propranolol;
- um enantiômero antagoniza o efeito secundário do outro. Um exemplo que pode ser citado é o fármaco indacrinona. Neste caso, o racemato é administrado e apenas um enantiômero possui o efeito desejado (ação diurética), porém este apresenta como ação secundária a retenção do ácido úrico. Este efeito secundário é minimizado pelo outro enantiômero;
- um enantiômero é responsável pela ação desejada e o outro por efeitos secundários;
- dois enantiômeros desempenham a atividade desejada, mas um deles causa efeitos indesejados. Como exemplo, podemos citar a talidomida, fármaco que começou a ser comercializado no final dos anos 1950 em diversos países. Os testes mostraram que a talidomida era uma droga com poucos efeitos colaterais, que podia ser utilizada para diversos fins e comercializada sem receita. Desse modo, o seu uso se popularizou e mulheres grávidas começaram a utilizá-la contra as náuseas causadas pela gravidez. Infelizmente, a talidomida é constituída por uma mistura racêmica, sendo que ambos enantiômeros possuem essa atividade, mas o enantiômero S possui efeito teratogênico, levando à má formação dos fetos. Em 1961, a droga foi retirada de circulação em todo o mundo, exceto no Brasil, o qual, apenas em 1994, proibiu o uso da talidomida por mulheres em idade fértil. Atualmente, a talidomida pode ser utilizada no tratamento de diversas doenças, mas com inúmeras restrições;

- Diferentes enantiômeros possuem atividades distintas;
- Mistura de diastereoisômeros leva a efeitos benéficos. Como exemplo, pode-se citar o fármaco labetalol, constituído por uma mistura de 4 diastereoisômeros, na qual a forma SS possui uma atividade, a forma RR outra atividade e as formas SR e RS são inativas, portanto, são administradas sem danos ao paciente.

Desse modo, fica clara a necessidade de se desenvolver métodos para a separação de enantiômeros, os quais podem ser identificados após a separação utilizando técnicas como rotação ótica, RMN, dicroísmo circular e até mesmo a química computacional.

1.7. Como se desenvolve uma separação quiral utilizando a CE

A separação de enantiômeros por CE é um procedimento muito bem descrito na literatura. Esta separação acontece, normalmente, pela adição de seletores quirais na solução eletrolítica, também chamada *background electrolyte* (BGE), o que resulta na formação de complexos estérica e termodinamicamente distintos, possibilitando assim, a separação dos enantiômeros. A diferença de mobilidade é resultado das distintas estabilidades dos complexos formados entre cada enantiômero e os seletores quirais [17-23].

Para se realizar estas análises, o capilar é previamente preenchido com a mistura BGE + seletor quiral, a amostra é injetada e posteriormente BGE + seletor quiral continua a ser injetado. Assim, a formação dos complexos entre fármaco + seletor quiral ocorre dentro do próprio capilar.

Existem relatos da utilização de vários seletores quirais, mas os mais utilizados e mais compreendidos até o presente momento são as ciclodextrinas, que constituem cerca de 80% das separações de enantiômeros por CE [12].

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$. As CDs mais conhecidas são a α , β e γ -ciclodextrinas constituídas, respectivamente, de 6, 7 e 8 unidades de glicose (**Figura. 2.12**) que adotam a conformação de cadeira [24]. Topologicamente, as CDs são frequentemente descritas na forma de toróides, porém, a sua conformação mais

correta é sob a forma de cones truncados, com o lado mais largo formado por hidroxilas secundárias e a face mais estreita constituída por hidroxilas primárias [24]. Evidentemente, a dimensão da cavidade dessa classe de compostos é determinada pelo número de unidades de glicose constituintes da CD, como ilustrado na **Figura 2.12**.

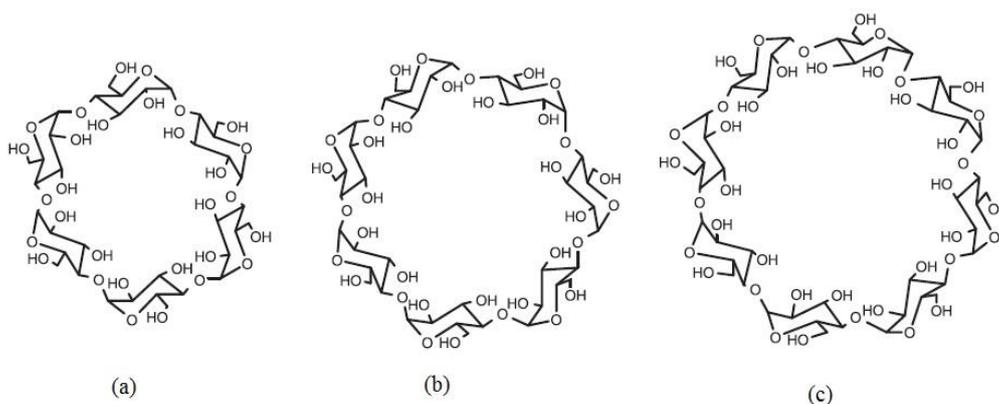


Figura 2.12. Estruturas da (a) α -CD, (b) β -CD e (c) γ -CD [24].

O arranjo estrutural das moléculas de glicose presentes nas CDs confere a estes compostos algumas propriedades muito interessantes. Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas e os átomos de hidrogênio que apontam para o centro das CDs determinam o caráter hidrofóbico no interior de sua cavidade. Além disso, a presença das hidroxilas primárias e secundárias livres na parte externa das CDs ligadas lhes confere um caráter hidrofílico, fazendo com que esses compostos sejam solúveis em água[24].

As CDs podem ser modificadas quimicamente através de diversas rotas sintéticas, gerando produtos específicos. As sínteses são realizadas a partir da α , β , e γ -ciclodextrinas, através principalmente da substituição dos hidrogênios das hidroxilas OH por grupos tais como hidroxipropila, metila e sulfobutila [25]. O objetivo de se realizar essa derivatização é alterar algumas propriedades da CD como solubilidade e até mesmo o reconhecimento quiral. Outro fator que influencia efetivamente na separação é a concentração de CD no BGE [24,25].

A separação de enantiômeros empregando CD está em contínuo desenvolvimento e o surgimento de novos derivados com novas aplicações é frequente.

Alguns relatos mostram a utilização de sistemas com dois tipos de CD, levando também à obtenção de resultados interessantes e eficazes com objetivos de separação [24,25].

Um problema que pode surgir após se separar os enantiômeros é a determinação da sua ordem de eluição. As técnicas citadas acima, como rotação ótica e RMN nem sempre estão disponíveis em todos os laboratórios. Desse modo, uma alternativa barata e confiável é a aplicação de estudos de modelagem molecular com este objetivo.

1.8. Química computacional aplicada na determinação da ordem de migração de enantiômeros separados por CE

A elucidação dos mecanismos envolvidos na discriminação quiral têm se tornado um tópico muito estudado no campo da química analítica. Sabe-se que os agentes quirais separam os enantiômeros, e nesse sentido, a compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo, no nível molecular, é de extrema importância para a evolução e aperfeiçoamento dos modelos estudados. Além do entendimento destes mecanismos de reconhecimento quiral, a identificação da ordem de migração também é algo que vem sendo estudado e relatado na literatura.

Em relação à compreensão dos mecanismos envolvidos na discriminação quiral, diversos trabalhos, envolvendo a aplicação de metodologias teóricas, podem ser encontrados [26-31]. As interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals são as grandes responsáveis por esta discriminação. As ligações de hidrogênio geralmente envolvem hidroxilas ou outras partes polares dos fármacos e as partes polares da CD, já as forças de van der Waals estão relacionadas com a parte hidrofóbica da CD's e com grupos de baixa polaridade do fármaco, como anéis aromáticos e alifáticos.

Uma vez formados, os complexos podem ser avaliados através de uma análise sistemática estrutural e energética, o que possibilita afirmar quais partes das moléculas hospede e hospedeira estarão envolvidas na formação do complexo.

Com relação à identificação da ordem de migração dos enantiômeros, a quantidade de trabalhos disponível na literatura é menor do que a quantidade de trabalhos envolvendo mecanismos de separação [32].

A ordem de migração em enantiômeros em CE é bem diferente da ordem de eluição em cromatografia e, como já citado, esta discussão nem sempre aparece nos trabalhos que tratam deste tema. Nas técnicas cromatográficas, o seletor quirál é sempre uma fase estacionária, o que faz com que o enantiômero responsável pelo complexo mais estável, migrar em tempos maiores. Além disso, o fluxo na cromatografia é formado por aplicação de pressão, o que faz com que todos os componentes da solução migrem na mesma velocidade e direção. Estes são os principais fatores que influenciam na ordem de eluição de enantiômeros em cromatografia. Por outro lado, outros fatores devem ser considerados em CE. A primeira diferença é que em CE, o seletor quirál não é constituído por uma fase estacionária, como em cromatografia. Outra importante diferença é que o fluxo em CE é causado pela aplicação de diferença de potencial, o que permite que solutos em uma mesma fase migrem com diferentes velocidades e também em diferentes sentidos. Desse modo, o seletor quirál em CE pode adquirir carga e migrar no sentido oposto ou mesmo sentido que o EOF, fazendo com que a chegada no detector seja mais demorada ou mais rápida, respectivamente. Assim sendo, é importante saber como o seletor quirál se comportará no pH de análise. Dependendo de sua carga, ele pode migrar na direção contrária ao detector, contra o EOF, o que significa que o enantiômero responsável pelo complexo mais estável irá migrar em tempos maiores. Se este não for o caso, o seletor migra na mesma direção que o EOF, o que faz com que o enantiômero responsável pelo complexo mais estável apresente menores tempos de migração. [32]

No caso deste trabalho, ambos os seletores quiráls capazes de separar os enantiômeros de TRM, se comportam como ânions em toda a faixa de pH. Desse modo, com a polaridade normal (detector no eletrodo negativo), estes migram contra o EOF e o enantiômero ligado mais fortemente ao seletor atinge o detector em tempos maiores.

Este tipo de estudo já foi realizado por nosso grupo e os resultados obtidos computacionalmente estavam de acordo com os resultados experimentais [33].

2. OBJETIVOS

O objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um método por CE para a separação dos enantiômeros de TRM, avaliando diversos seletos quirais em diversas concentrações, além de se estudar a influência do BGE.

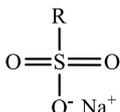
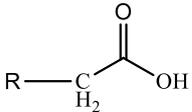
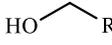
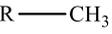
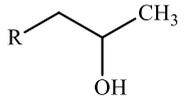
Depois do método de separação dos enantiômeros do TRM desenvolvido e otimizado, utilizou-se a química computacional para determinar a ordem de eluição de seus enantiômeros.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Para os procedimentos experimentais os reagentes utilizados foram o fosfato de sódio monobásico anidro 98% P.A. (Neon Comercial LTDA, São Paulo, SP, Brasil), citrato de sódio tribásico diidratado 98% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), acetato de potássio 99% P.A., (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), hidróxido de sódio P.A. 99% (Synth, Diadema, SP, Brasil), padrão secundário de TRM (referência USP 99,52% p/p), metanol grau HPLC (J.T. Baker, Cidade do México, México). As ciclodextrinas utilizadas foram β -CD-sulfatada sal sódico (S- β -CD), metil- β -CD (m- β -CD), 2-hidróxi-*et*- β -CD (OH-*et*- β -CD), 2-hidróxi-*prop*- β -CD (OH-*prop*- β -CD), carboximetil- β -CD (cm- β -CD) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Todas as ciclodextrinas utilizadas neste trabalho, não são ciclodextrinas nativas, ou seja, não são formadas apenas pelos anéis de glicose. Elas passaram por modificações em suas hidroxilas, substituindo os átomos de H dessas hidroxilas das extremidades por outros grupos, os quais são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 2.1. Tipos de CD's e seus substituintes.

CD	Substituinte
S-B-CD	
cm-B-CD	
OH- <i>et</i> -B-CD	
m-B-CD	
OH- <i>prop</i> -B-CD	

3.2. Instrumentação

Para o ajuste do pH utilizou-se um pHmetro modelo mCA150 (Tecnopom Equipamentos Especiais, Piracicaba, SP, Brasil). Todas as análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese modelo CE 7100 acoplado a um DAD (Agilent Technologies, Alemanha), em um capilar de sílica fundida (Agilent Technologies, Alemanha) revestido com poliimida, de 50 µm de diâmetro interno, 60 cm de comprimento e 52 cm de comprimento efetivo. A detecção foi realizada em um comprimento de onda de 195 nm. A injeção da amostra foi realizada pelo modo hidrodinâmico, aplicando-se uma pressão de 30 mbar por 4 segundos. Durante a análise, a voltagem utilizada foi de 20 kV e $T = 10^{\circ}\text{C}$.

3.3. Procedimentos Experimentais

O padrão da mistura racêmica dos enantiômeros *trans* do TRM foi dissolvido em metanol, obtendo-se concentração 1 mg/mL. Essas soluções foram preparadas toda semana e armazenadas a -20°C . No momento da análise, essa solução foi diluída 10 vezes, passando a ter concentração 0,1 mg/mL. As soluções de BGE foram preparadas todos os dias, filtradas em um filtro de 0,45µm de tamanho de poro, colocadas em ultrassom por 10 min e tinham pH ajustado para 10 com uma solução de NaOH 0,1 mol/L. A solução de BGE + seletor quiral era preparada no próprio vial de análise, tendo seu volume variado entre 500 e 1000 µL.

Os capilares novos foram submetidos a um *flush* de solução de NaOH 1 mol/L por 1 h, seguido de outro *flush* de água deionizada por 30 min. No início do dia de trabalho, os capilares foram condicionados com NaOH 1 mol/L por 10 min., lavados com água deionizada por 5 min, seguido de um flush de BGE + seletor quiral por 5 min. Entre as análises, o capilar era lavado com NaOH 1 mol/L por 3 min., lavado com água deionizada por mais 3 min e condicionado com BGE + seletor quiral também por 3 min. No final de cada dia de trabalho, o capilar foi lavado com água deionizada por 15 min e armazenado com as extremidades imersas em água. A cada 5 análises, as soluções de BGE + seletor quiral eram trocadas, afim de evitar a decomposição da solução e manter a reprodutibilidade das análises.

3.4. Metodologia Computacional

A parte computacional foi realizada após os experimentos. Deste modo, as ciclodextrinas estudadas nesta etapa foram apenas as que foram capazes de separar os enantiômeros, ou seja, CM- β -CD e S- β -CD.

Inicialmente, as estruturas do (+)-*trans*-tramadol (RR-TRM), (-)-*trans*-tramadol (SS-TRM), CM- β -CD e S- β -CD tiveram suas estruturas geradas, geometrias otimizadas e frequências vibracionais calculadas utilizando-se a metodologia semi-empírica PM3 [34].

Todas as espécies foram caracterizadas como mínimos verdadeiros na Superfície de Energia Potencial (SEP) por meio da análise das frequências harmônicas.

Uma vez obtidas as geometrias otimizadas das espécies isoladas, estruturas iniciais foram geradas considerando-se a interação dos enantiômeros do TRM com as ciclodextrinas, utilizando-se os programas HyperChem 8.0 e GaussView 5.0. Para isso, deu-se preferência a associação das espécies interagentes via ligação de hidrogênio, uma vez que estas interações são consideradas importantes na estabilização de sistemas supramoleculares complexos. Da mesma forma, todos os complexos obtidos foram completamente otimizados no nível semi-empírico PM3 e as estruturas caracterizadas via cálculos de frequências harmônicas, como mínimos verdadeiros na SEP. Nenhuma restrição de geometria foi imposta durante o processo de otimização, tanto para as espécies isoladas, quanto para os complexos.

Com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos valores de energia de complexação, foram realizados cálculos no ponto utilizando a Teoria do Funcional de Densidade com o funcional B3LYP [35] e o conjunto de funções de base 6-31G(d,p) [36]. Além disso, a avaliação do efeito do solvente (água) nas propriedades moleculares dos sistemas foi realizada utilizando-se o modelo contínuo de solvatação (PCM) [37].

Todos os cálculos foram realizados no pacote computacional Gaussian 2009 [38].

Analisando-se a estrutura tridimensional, é possível observar que esta molécula é bem ramificada, possuindo grupos que se espalham em todas as direções. Devido a este fato, não foi possível obter complexos típicos de inclusão onde o TRM ficasse total ou parcialmente incluso na cavidade da CD, pois o ele não se “acomoda” espacialmente no interior das CD's, devido a restrições estéricas.

Assim sendo, os complexos montados foram todos complexos de associação, ou seja, o TRM interagindo com os grupos substituintes da CD funcionalizadas pelo lado de fora.

Para os complexos TRM+CM- β -CD, foram propostas três possibilidades para cada enantiômero, resultando, então, em seis complexos.

- Complexos 1 e 2: tentativa de interação do OH do RR-TRM e SS-TRM com a hidroxila e carbonila do grupo carbóxi da CM- β -CD (**Figura 2.13**)
- Complexos 3 e 4: tentativa de interação entre o átomo de nitrogênio do TRM com o átomo H do grupo carbóxi da CM- β -CD (**Figura 2.14**)
- Complexos 5 e 6: tentativa de interação entre o grupo éter do RR-TRM e SS-TRM com o átomo de H do grupo carbóxi da CM- β -CD (**Figura 2.15**)

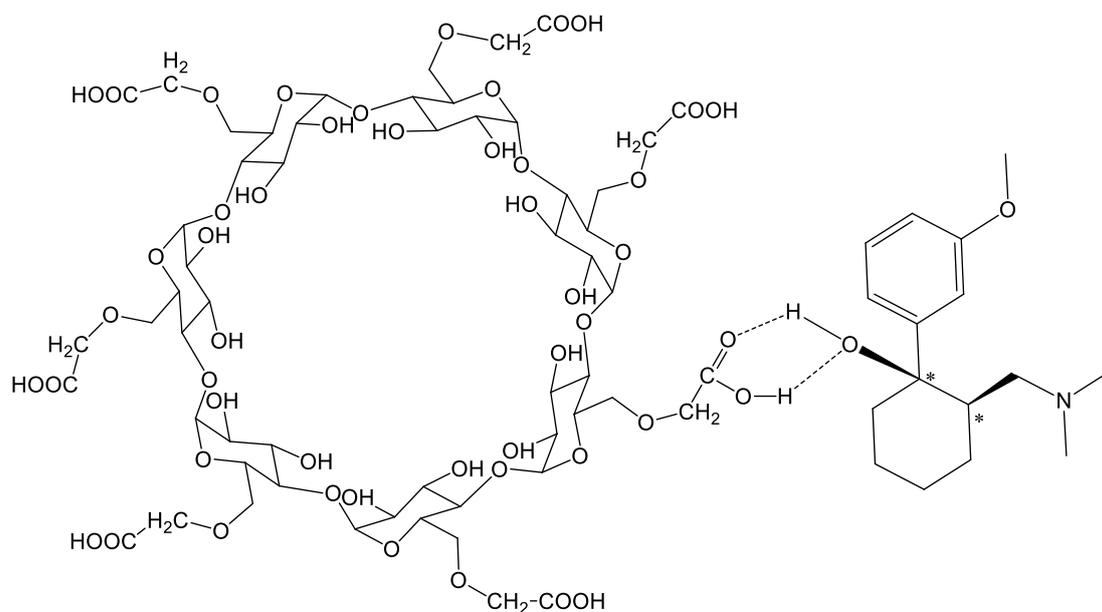


Figura 2.13. Tentativa de interação entre TRM e cm- β -CD. Complexos 1 (RR-TRM) e 2 (SS-TRM).

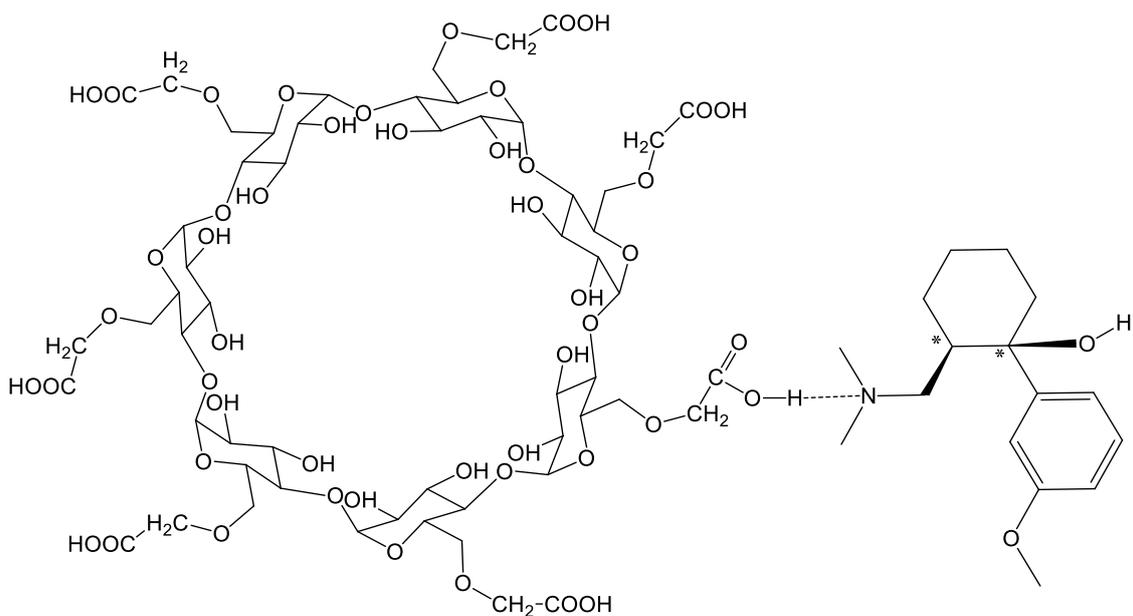


Figura 2.14. Tentativa de interação entre TRM e α - β -CD. Complexos 3 (RR-TRM) e 4 (SS-TRM).

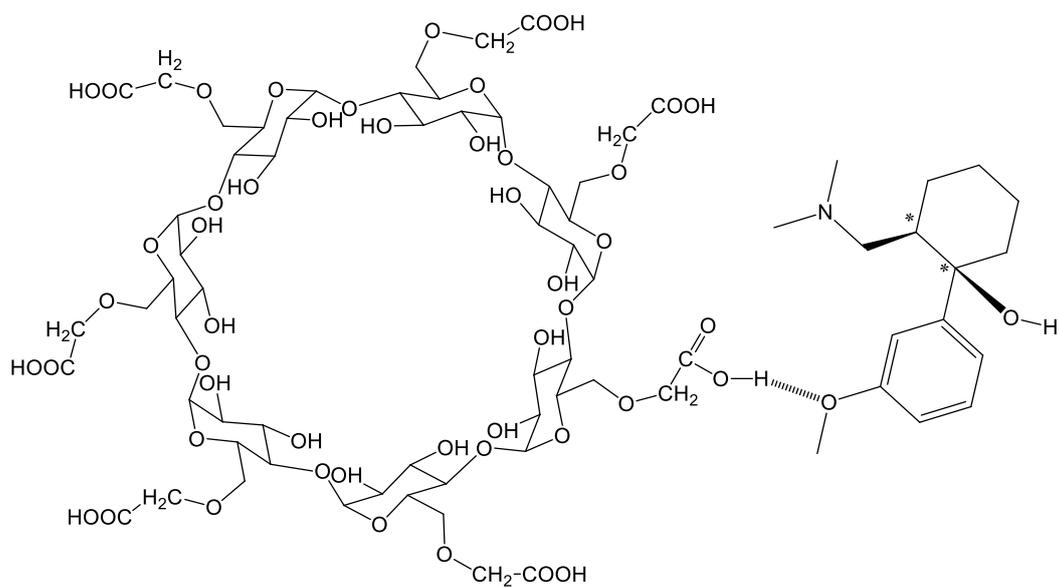


Figura 2.15. Tentativa de interação entre TRM e α - β -CD. Complexos 5 (RR-TRM) e 6 (SS-TRM).

As **Figuras 2.13, 2.14 e 2.15** apresentam apenas a interação com um dos enantiômeros, com o objetivo de ilustrar a tentativa inicial.

No caso da S- β -CD, também foram propostas três possibilidades de modos de interação para a formação do complexo de associação, resultando na formação de seis complexos. Todas as possibilidades envolvem a interação da hidroxila do TRM com o grupo sulfóxido da CD. As possibilidades são:

- Complexos A e B: tentativa de interação da hidroxila do SS-TRM e RR-TRM com o grupo O⁻ da S- β -CD. (**Figura 2.16**)
- Complexos C e D: tentativa de interação da hidroxila do SS-TRM e RR-TRM com o grupo =O da S- β -CD. (**Figura 2.17**)
- Complexos E e F: tentativa de interação da hidroxila do SS-TRM e RR-TRM com o átomo S da S- β -CD. (**Figura 2.18**)

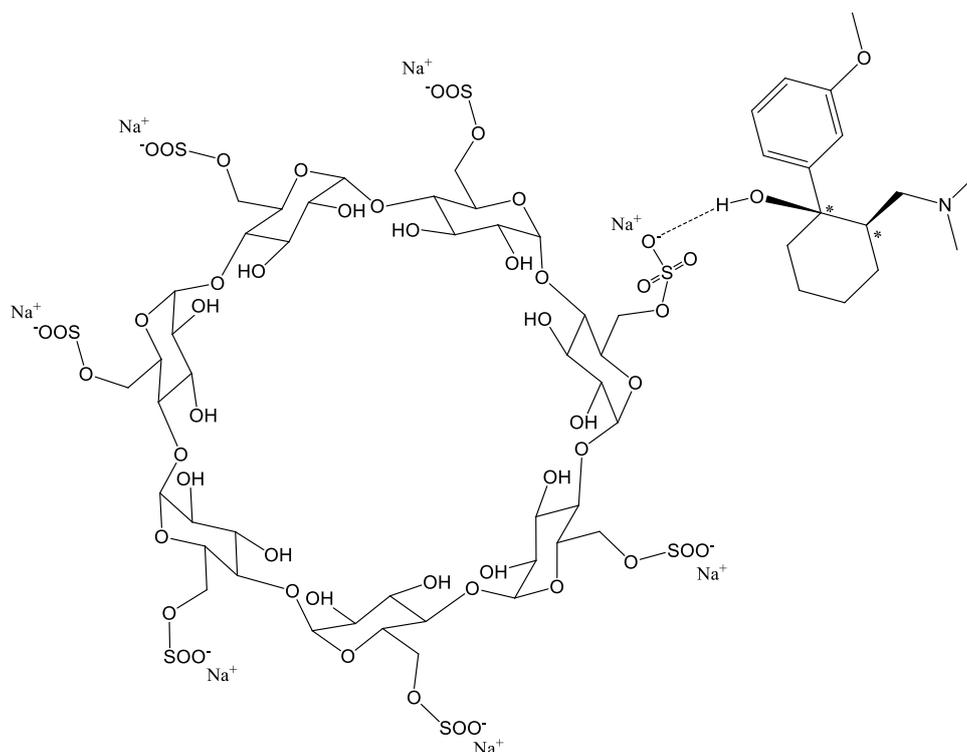


Figura 2.16. Tentativa de interação OH do TRM com O⁻ da S- β -CD. Complexos A (SS-TRM) e B (RR-TRM).

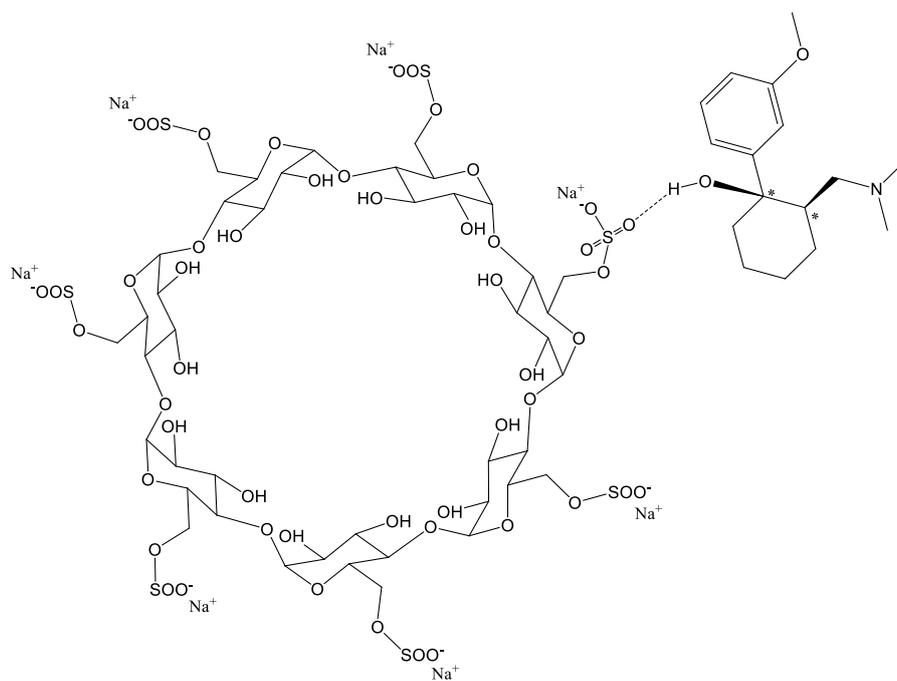


Figura 2.17. Tentativa de interação OH do TRM com =O da S- β -CD. Complexos C (SS-TRM) e D (RR-TRM)

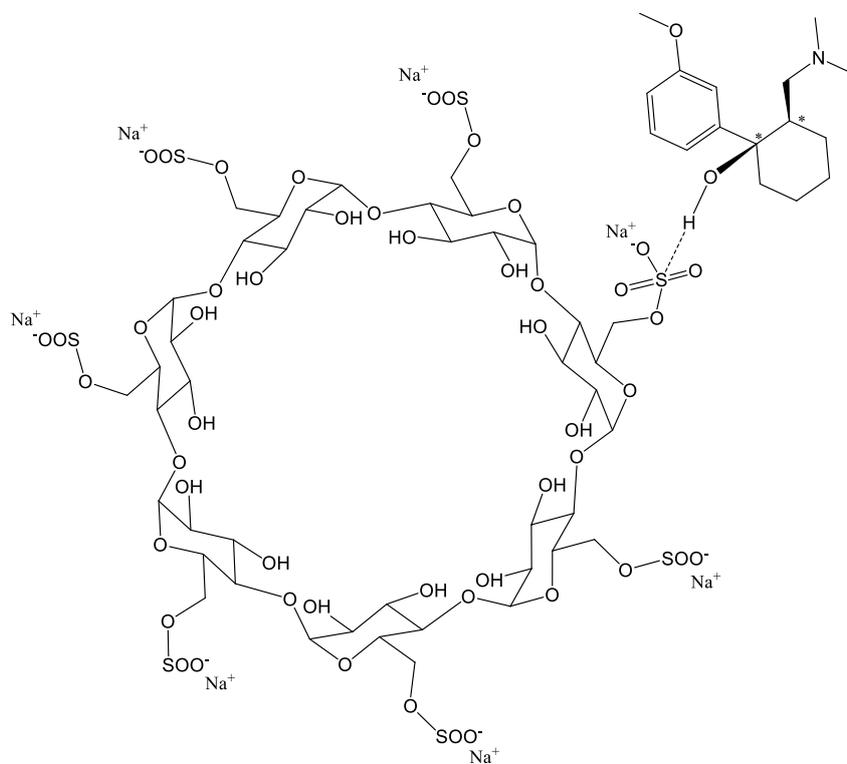


Figura 2.18. Tentativa de interação OH do TRM com átomo S da S- β -CD. Complexos E (SS-TRM) e F (RR-TRM).

3.5. Confirmação da ordem de migração dos enantiômeros

Para a determinação da ordem de migração dos enantiômeros nas condições obtidas neste trabalho e confirmação dos resultados computacionais, um método já publicado para a separação e identificação quiral de TRM foi reproduzido [Referência 52]. Utilizando como fase móvel a mistura hexano:etanol (96:4, v/v) com adição de 0,3% de dietilamina, vazão de 1 mL min⁻¹, temperatura fixa em 27 °C, volume de injeção 100 µL e uma coluna ChiralPak[®] IA, foi possível separar os enantiômeros do TRM. Portanto, 20 injeções da solução padrão em metanol de TRM foram realizadas e a alíquota de cada enantiômero coletada no final da coluna. A fase móvel foi evaporada sob fluxo de N₂ e os resíduos do recipiente foram redissolvidos no mesmo solvente utilizado nos experimentos em CE, metanol.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises eletroforéticas

4.1.1. Estudo do tipo e da concentração do BGE

Para o início das análises, foi fixada uma condição inicial, determinada de acordo com uma revisão na literatura. Nesta condição inicial, utilizou-se o BGE NaH_2PO_4 , em concentração 50 mM, $\text{pH} = 10$, $\text{CD} = \text{cm-}\beta\text{-CD}$ em concentração 3 mg/mL, $\lambda = 195$ nm, injeção hidrodinâmica com pressão em 30 mbar por 4 segundos e $V = 20$ kV. Com estas condições, é possível observar na **Figura 2.19** que houve um princípio de separação, com a resolução ainda baixa, que poderia ser melhorada. Além disso, um parâmetro de extrema importância que deve ser monitorado durante a análise é a corrente. Correntes (I) muito altas ($> 100 \mu\text{A}$) podem resultar, eventualmente, em análises satisfatórias, mas fenômenos como convecção e aquecimento Joule estarão presentes em maior intensidade, dificultando a reprodutibilidade dos experimentos.

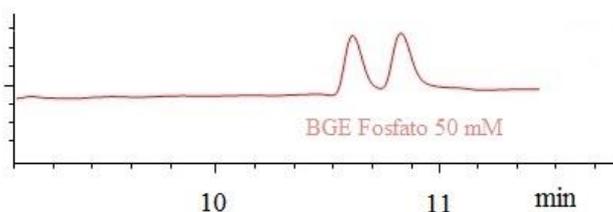


Figura 2.19. Eletroferograma referente à tentativa inicial de separação dos enantiômeros de TRM. $R_s = 1,31$; $I = 25 \mu\text{A}$, $T_{\text{mig}1} = 10,66$ min, $T_{\text{mig}2} = 10,86$ min.

De acordo com o resultado apresentado na **Figura 2.19**, optou-se por estudar a natureza do BGE, o qual é de extrema importância no desenvolvimento de um método. Alterar o BGE altera a sua condutividade, pois esta está relacionada diretamente com o raio hidratado e carga de seus componentes. Desse modo, fatores importantes como corrente e intensidade do EOF serão alterados.

Neste caso, todas as variáveis da análise anterior foram mantidas e alterou-se apenas a identidade do BGE, comparando os resultados obtidos com fosfato de sódio, citrato de sódio e acetato de potássio. Os resultados são mostrados na **Figura 2.20** e alguns parâmetros importantes relativos à análise, na **Tabela 2.2**.

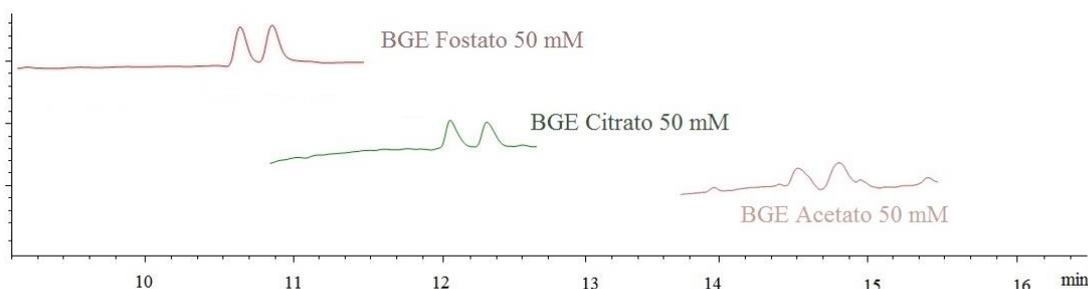


Figura 2.20. Eletroferograma relativo aos testes feitos com os três BGE's. [BGE]= 50 mM; pH= 10; CD= CM- β -CD, 3 mg/mL; λ = 195 nm; injeção hidrodinâmica P = 30 mbar, 4 segundos; V = 20 kV.

Tabela 2.2. Dados referentes às análises variando o BGE

	Resolução	Corrente	T_{mig1} / min	T_{mig2} / min
Fosfato	1,31	25 μ A	10,66	10,86
Citrato	1,58	50 μ A	12,08	12,20
Acetato	1,3	25 μ A	14,71	15,18

Observando a **Figura 2.20** e a **Tabela 2.2** é possível perceber que o BGE acetato não foi adequado, pois a linha de base apresentou muito ruído, os picos obtidos estavam muito largos e o tempo de migração foi o maior entre os três BGE's testados. Por esses motivos, o BGE acetato foi considerado como o pior nesta primeira análise. É possível perceber que a melhor resolução foi obtida com o BGE citrato. A corrente estava em um valor aceitável, a linha de base não apresentava muitos distúrbios e o tempo de migração de ambos enantiômeros não era muito alto. Desse modo, o BGE citrato foi escolhido para dar prosseguimento aos experimentos, variando-se, a partir de agora, a sua concentração.

O objetivo de se variar a concentração do BGE é que esta concentração está diretamente relacionada com a intensidade do EOF, fazendo com que a resolução entre os picos se alterem. Nesta etapa, todas as variáveis da análise foram mantidas constantes e variou-se apenas a concentração do BGE citrato de 25 mM a 100 mM. A **Figura 2.21** e a **Tabela 2.3** apresentam os resultados obtidos.

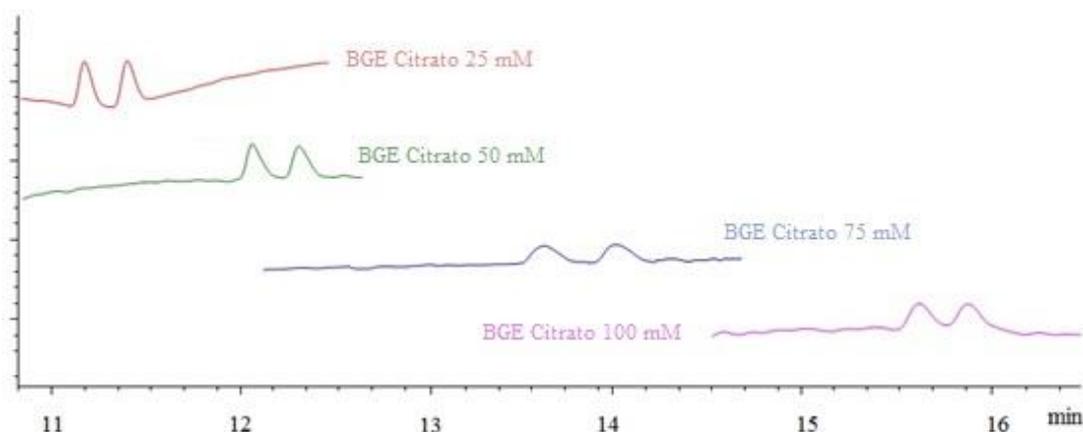


Figura 2.21. Eletroferograma relativo aos testes feitos com BGE citrato nas concentrações 25 mM, 50 mM, 75 mM e 100 mM; pH= 10; CD= CM- β -CD, 3 mg/mL; λ = 195 nm; injeção hidrodinâmica.

Tabela 2.3. Dados referentes às análises variando a concentração do BGE citrato.

Concentração BGE	Resolução	Corrente	T _{mig1} / min	T _{mig2} / min
25 mM	1,72	30 μ A	11,5	11,38
50 mM	1,60	50 μ A	12,03	12,30
75 mM	1,24	75 μ A	13,57	13,95
100 mM	1,90	100 μ A	15,62	15,88

Observando os dados da **Figura 2.21** e da **Tabela 2.3**, é possível perceber que a variação da concentração do BGE altera o sistema significativamente. A resolução, apesar de não ser satisfatória, foi maior na maior concentração de BGE avaliada (100 mM, $R_s = 1,9$). Algo que também merece atenção é a corrente das análises. Correntes muito baixas ($< 30 \mu\text{A}$) tendem a fazer com que a análise seja mais longa e correntes muito altas ($> 100 \mu\text{A}$) causam problemas, como o aquecimento Joule. Desse modo, concentrações de BGE maiores que 100 μA não puderam ser avaliadas, já que o máximo aceitável na corrente já tinha sido atingido. Além disso, com o aumento da concentração, os picos se comportaram de maneira inversa ao esperado, ficando com a sua base cada vez mais larga. Desse modo, a opção foi retornar ao BGE fosfato e avaliar como o sistema se comportava variando a sua concentração.

A **Figura 2.22** apresenta os eletroferogramas obtidos variando-se apenas a concentração do BGE fosfato de 50 mM a 150 mM e a **Tabela 2.4**, os dados referentes a essas análises.

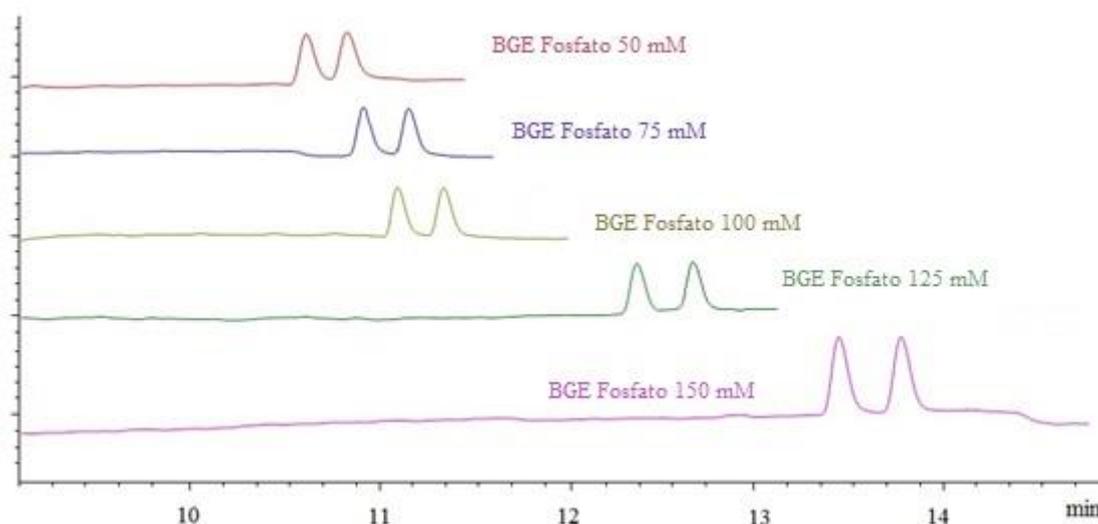


Figura 2.22. Eletroferograma relativo aos testes feitos com BGE fosfato nas concentrações 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM e 150 mM; pH= 10; CD= cm- β -CD, 3 mg/mL; λ = 195 nm; injeção hidrodinâmica P= 30 mbar, 4 segundos; V= 20 kV.

Tabela 2.4. Dados referentes às análises variando a concentração do BGE fosfato

Concentração de BGE	Resolução	Corrente	T _{mig1} / min	T _{mig2} / min
50 mM	1,31	25 μ A	10,66	10,86
75 mM	1,76	30 μ A	10,96	11,20
100 mM	1,80	36 μ A	11,19	11,41
125 mM	2,18	40 μ A	12,60	12,90
150 mM	2,00	45 μ A	13,40	13,70

Observando a **Figura 2.22** e a **Tabela 2.4** é possível notar que todas as análises apresentaram linha de base estável, picos com a base mais estreita do que os picos obtidos com BGE citrato (**Figura 2.21**), corrente em níveis aceitáveis, curtos tempos de migração para ambos enantiômeros e em duas concentrações de BGE (125 e 150 mM) resolução satisfatória, atingindo o seu máximo com a concentração de BGE em 125 mM. Desse modo, o tipo de BGE foi escolhido como sendo o BGE fosfato na concentração 125 mM.

4.1.2. Estudo do tipo e da concentração de CD

Com o tipo e concentração de BGE definidos, o objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar diferentes tipos de CD em diferentes concentrações. O estudo da

variação da concentração de CD é de extrema importância, pois o reconhecimento quiral acontecerá em um meio dinâmico, através da formação de equilíbrios. Se a concentração de CD não for adequada, o equilíbrio será deslocado para o sentido oposto da reação de complexação, ou seja, os complexos CD + fármaco estarão pouco presentes no meio. Além disso, a adição de CD ao BGE influencia a viscosidade da solução, reduz o EOF e afeta a resolução entre os enantiômeros. Um estudo minucioso é necessário para se determinar qual é a melhor concentração e tipo de CD para o sistema em estudo. A concentração típica destes seletores no BGE pode variar entre 1 e 50 mM.

Iniciando o estudo do tipo e concentração de ciclodextrinas, foram testadas a OH-et- β -CD, OH-prop- β -CD e m- β -CD. Todas essas três CD's foram avaliadas nas mesmas concentrações que a CM- β -CD, 0,975 mM; 1,95 mM; 2,925 mM; 3,9 mM; 4,875 mM e 5,850 mM. Não foi observada a separação quiral, com nenhuma das três CD's, em nenhuma concentração. Nos eletroferogramas obtidos, observou-se apenas um pico, em todas as concentrações das três CD's. A **Figura 2.23** mostra os eletroferogramas obtidos, com as três CD's, na concentração 2,925mM. Não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes concentrações de CD. A concentração mostrada na figura foi escolhida aleatoriamente, apenas para mostrar, de forma geral, como se comportou o sistema.

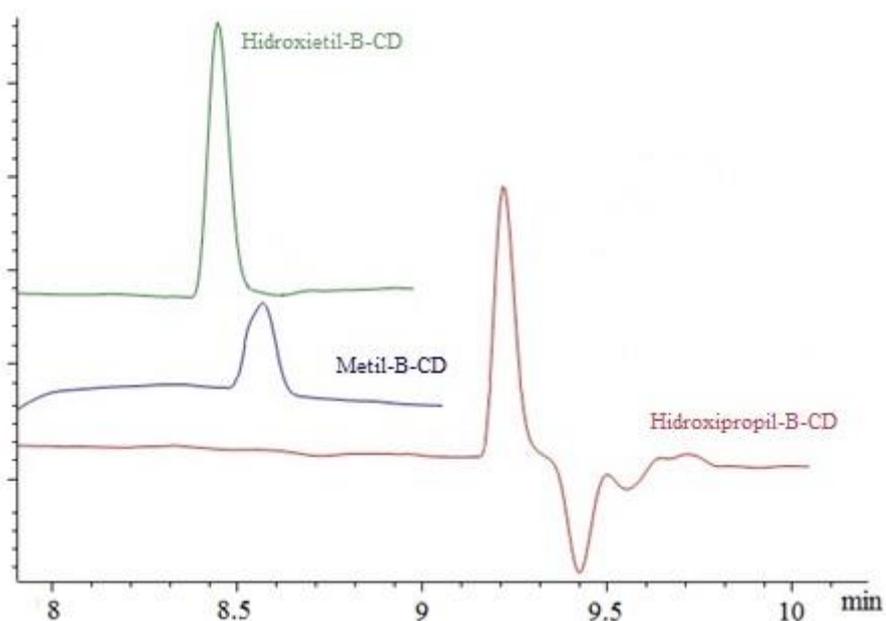


Figura 2.23. Eletroferograma referente às análises com a OH-e- β -CD, m- β -CD e OH-prop- β -CD com concentração 2,925 mM. BGE fosfato 125 mM; pH = 10; λ = 195 nm; injeção hidrodinâmica P = 30 mbar, 4 segundos; V = 20 kV.

Outra CD testada foi a CM- β -CD, nas quantidades de 1,5 mg/mL (0,975 mM), 3 mg/mL (1,95 mM), 4,5 mg/mL (2,925 mM), 6 mg/mL (3,9 mM), 7,5 mg/mL (4,875 mM) e 9 mg/mL (5,850 mM). Todas as condições foram mantidas constantes e variou-se apenas a concentração da CM- β -CD. A **Figura 2.24** apresenta os eletroferogramas obtidos com as diferentes concentrações de cm- β -CD.

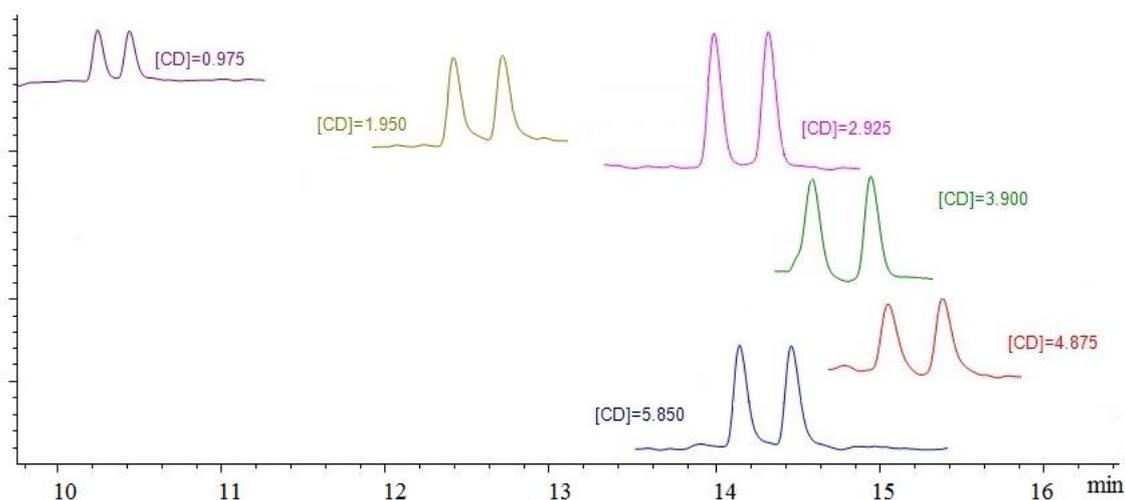


Figura 2.24. Eletroferogramas relativos aos testes feitos com diferentes concentrações de cm- β -CD. Concentrações avaliadas: 0,975 mM; 1,95 mM; 2,925 mM; 3,9 mM; 4,875 mM e 5,850 mM. BGE fosfato 125 mM; pH = 10; CD = CM- β -CD; λ = 195 nm; injeção hidrodinâmica P=30 mbar, 4 segundos; V = 20 kV

Observando a **Figura 2.24** é possível notar que com o aumento da concentração da CM- β -CD, o tempo de migração dos enantiômeros aumentou, resultado da diminuição do EOF e do aumento de viscosidade da solução. Apesar disso, quando a concentração de CD chega a seu máximo, o sistema se comporta de maneira inesperada e o tempo de migração dos enantiômeros diminuiu. A resolução e corrente das análises apresentadas na **Figura 2.24**, são mostradas na **Tabela 2.5**.

Tabela 2.5. Dados referentes às análises variando a concentração de CM- β -CD.

Concentração de cm- β -CD / mM	Resolução	Corrente	T _{mig1} / min	T _{mig2} / min
0,975	1,63	40 μ A	10,24	10,44
1,95	2,02	40 μ A	12,40	12,71
2,925	2,17	40 μ A	13,98	14,31
3,900	2,13	40 μ A	14,63	14,99
4,875	1,85	40 μ A	14,94	15,27
5,850	2,05	40 μ A	14,22	14,53

Observando a **Tabela 2.5**, conclui-se que a concentração de CM- β -CD exerce influência na resolução entre os picos e também no tempo de migração, como já comentado acima. A resolução começa baixa ($R_s = 1,63$), atinge o seu máximo ($R_s = 2,17$) e depois volta a cair. Já em relação à corrente, esta não foi alterada pela concentração de CD e permaneceu em um valor aceitável ($40 \mu\text{A}$). Desse modo, para a CM- β -CD concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos na concentração de $2,925 \text{ mM}$, o que foi satisfatório, já que CD's, em geral, são reagentes caros.

A última CD testada foi a S- β -CD. Como todas as outras testadas anteriormente, as concentrações avaliadas foram $0,975 \text{ mM}$; $1,95 \text{ mM}$; $2,925 \text{ mM}$; $3,9 \text{ mM}$; $4,875 \text{ mM}$ e $5,850 \text{ mM}$. Observando a **Figura 2.25**, é possível observar que na primeira concentração avaliada, os picos ainda estão bem próximos ($R_s = 1,59$), antes do EOF (distúrbio da linha de base). Já nas concentrações $1,95 \text{ mM}$, $2,925 \text{ mM}$ e $3,9 \text{ mM}$ os picos aparecem com um maior tempo de migração, mas coincidem com o EOF, comum em todas as análises, o que dificulta a compreensão do eletroferogramas e a determinação do início e final dos picos. Na concentração $4,875 \text{ mM}$, os picos aparecem posteriormente ao EOF, mas o primeiro deles aparece deformado. Na última concentração avaliada ($5,850 \text{ mM}$), a análise apresenta ótima resolução, $R_s = 7,09$, uma boa corrente ($50 \mu\text{A}$), e tempos curtos de migração para ambos enantiômeros.

Tabela 2.6. Dados referentes às análises variando-se a concentração de S- β -CD

Concentração de CD / mM	Resolução	Corrente	T _{mig1} / min	T _{mig2} / min
0,975	1,59	$40 \mu\text{A}$	8,57	8,75
1,95	-	$45 \mu\text{A}$	-	-
2,925	-	$46 \mu\text{A}$	-	-
3,900	-	$46 \mu\text{A}$	-	-
4,875	5,38	$47 \mu\text{A}$	10,36	11,21
5,850	7,09	$50 \mu\text{A}$	11,40	12,63

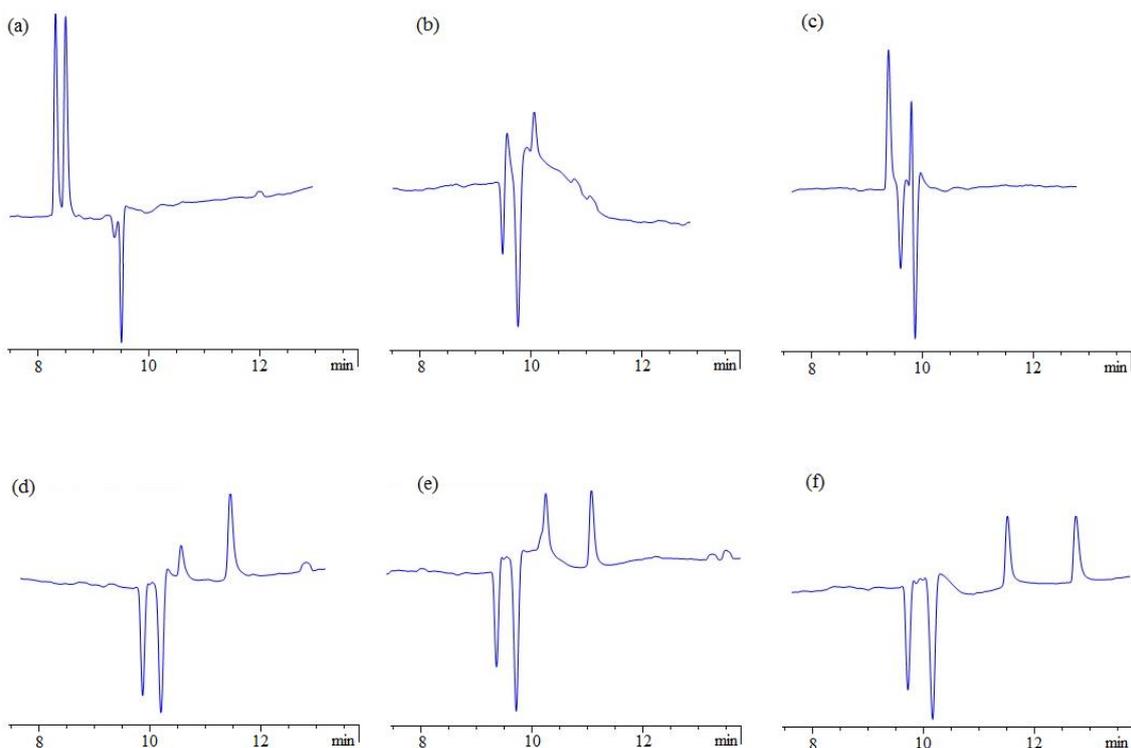


Figura 2.25. Eletroferogramas relativos aos testes feitos com diferentes concentrações de S- β -CD. Concentrações avaliadas: 0,975 mM; 1,950 mM; 2,925 mM; 3,900 mM; 4,875 mM e 5,850 mM. BGE fosfato 125 mM; pH= 10; λ = 195 nm; injeção hidrodinâmica P= 30 mbar, 4 segundos; V= 20 kV.

De acordo com os resultados discutidos nessa sessão, fica clara a influência que a substituição da CD exerce na capacidade de reconhecimento quiral. No caso do TRM, as ciclodextrinas menos polares (OH-et- β -CD, OH-prop- β -CD e m- β -CD), não foram capazes de formar complexos distintos com cada enantiômero. No caso das CD's mais polares (CM- β -CD e S- β -CD), em baixas concentrações houve um início de discriminação quiral, de modo que quando a concentração de CD foi aumentada, essa discriminação ocorreu de forma mais clara. No caso da CM- β -CD, a resolução atingida com concentração 5,850 mM ($R_s = 2,05$) foi boa, mas fica nítida a maior capacidade da S- β -CD em discriminar os enantiômeros de TRM, sendo que a melhor condição com esta CD resultou em resolução 7,09.

Pela preferência do TRM por CD's mais polares, é possível elaborar algumas hipóteses de que a discriminação quiral ocorrerá por interações como ligações de hidrogênio, entre grupos polares do TRM e da substituição da CD. Desse modo, o procedimento descrito na seção 3.4, de não se montar complexos de inclusão e sim

complexos de associação, se justifica, pois a parte interna da CD tem caráter mais apolar e normalmente as interações nesta cavidade são interações entre grupos menos polares, como forças de van der Waals. Através do estudo computacional é possível compreender o mecanismo e justificar porque a S- β -CD discrimina melhor os enantiômeros do TRM.

Já que as CD consideradas menos polares não resultaram em separação efetiva dos enantiômeros do TRM, o estudo computacional levou em consideração apenas a cm- β -CD e a S- β -CD.

4.2. Modelagem molecular

4.2.1. TRM e cm- β -CD

4.2.1.2. Mecanismo de reconhecimento quiral

As geometrias otimizadas no nível semi-empírico PM3 para os complexos formados entre os enantiômeros do TRM e a CM- β -CD são mostradas nas **Figuras 2.26, 2.27 e 2.28**, considerando-se os três modos de complexação propostos.

Os resultados energéticos referentes ao processo de formação dos complexos encontram-se sumarizados na **Tabela 2.7**, a qual mostra os valores de energia de interação (ΔE) em solução aquosa.

Tabela 2.7. Variação de energia envolvida na formação dos complexos entre enantiômeros do TRM e CM- β -CD. Dados obtidos em nível B3LYP/6-31G(d,p), utilizando o método PCM e água como solvente.

Complexo	$\Delta E / \text{kcal.mol}^{-1}$
Complexo 1 (RR-TRM+ CM- β -CD)	-2,885
Complexo 2 (SS-TRM+ CM- β -CD)	-3,094
Complexo 3 (RR-TRM+ CM- β -CD)	-6,516
Complexo 4 (SS-TRM+ CM- β -CD)	-10,149
Complexo 5 (RR-TRM+ CM- β -CD)	-3,844
Complexo 6 (SS-TRM+ CM- β -CD)	-0,787

Observando a **Tabela 2.7**, é possível perceber que os três tipos de complexo são passíveis de formação, porém os Complexos 3 e 4, que correspondem a interação entre o átomo de nitrogênio do TRM com o átomo H do grupo carbóxi da CM- β -CD

(Figura 2.26), possuem ΔE mais negativo, o que nos leva a concluir que esta forma de interação é a mais estável.

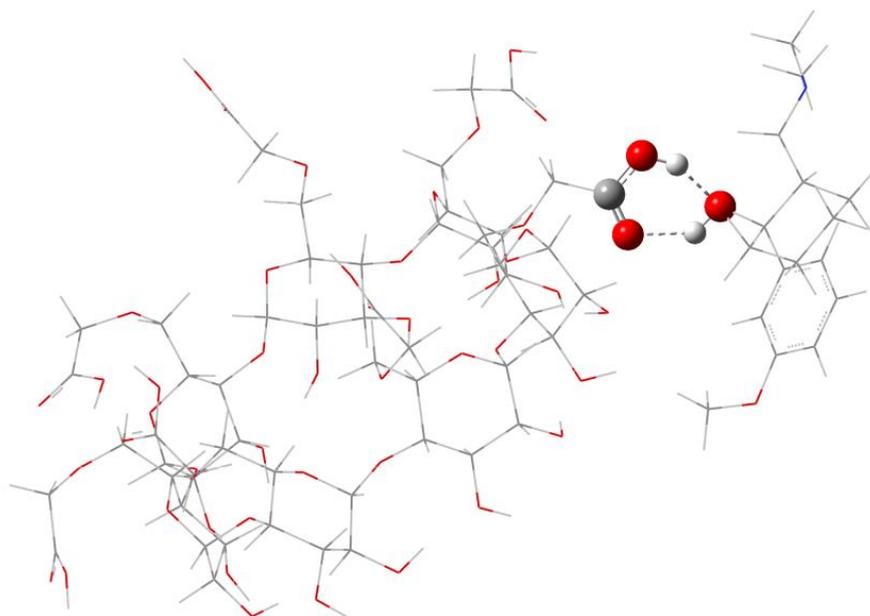


Figura 2.26. Estrutura otimizada do Complexo 1.

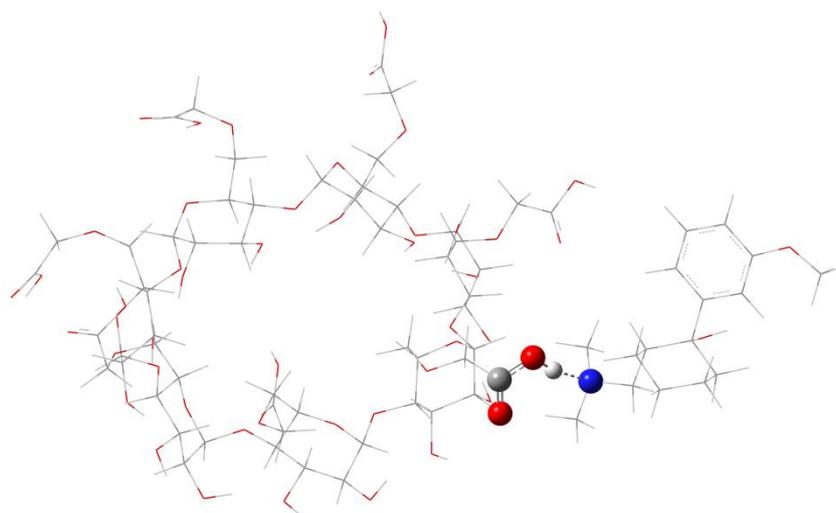


Figura 2.27. Estrutura otimizada do Complexo 3.

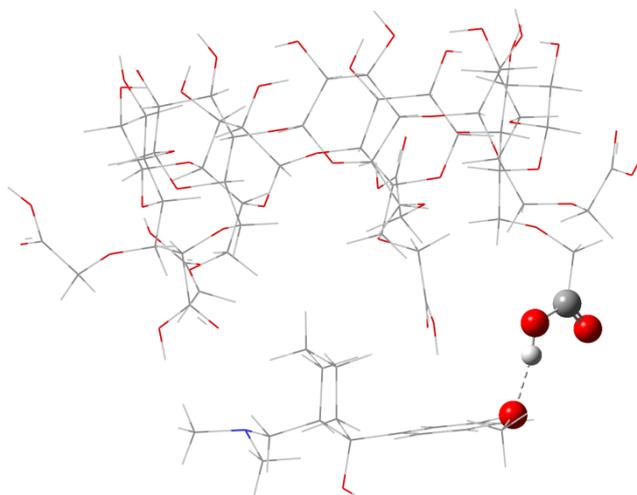


Figura 2.28. Estrutura otimizada do Complexo 5.

Observando a estrutura dos complexos otimizados, é possível perceber no Complexo 1, a formação de duas ligações de hidrogênio fortes (1,79 e 1,83 Å) e de um anel de 6 membros. Já nas estruturas dos Complexos 3 e 5, ocorre a formação de apenas uma ligação de hidrogênio. Desse modo, esperava-se que os Complexos 1 e 2, tivessem menor ΔE , pois além de apresentarem a formação de duas ligações de hidrogênio envolvem um elemento mais eletronegativo (oxigênio) que os Complexos 3 e 4 (nitrogênio). Apesar disso, os resultados da **Tabela 2.7** mostram que os Complexos 3 e 4 são os mais estáveis.

De acordo com esses resultados, o mecanismo de interação e discriminação quiral entre os enantiômeros do TRM e a CM- β -CD é determinado. Apesar disso, os resultados energéticos obtidos, não estão de acordo com os resultados esperados baseados em efeitos estéricos, como explicado acima. Acredita-se que a metodologia, apesar de ter seu uso relatado na literatura [30,31,33] e mostrar resultados de acordo com os experimentais, ela parece não descrever este sistema de forma correta. Desse modo, tem-se como perspectiva a realização de um estudo com outras metodologias, tentando compreender melhor o sistema e buscar a metodologia mais adequada para este sistema.

4.2.1.2. Ordem de migração dos enantiômeros

A determinação do módulo da diferença relativa das energias de interação para a formação dos complexos ($|\Delta\Delta E|$) pode ser realizada e utilizada para inferir quanto à ordem de migração de enantiômeros, de modo que uma pequena diferença energética possibilita, a princípio, separação quirais. Quanto maior for $|\Delta\Delta E|$ entre os complexos analisados, melhor, teoricamente, será a separação e a resolução entre os picos no sistema eletroforético.

Nesta etapa, buscou-se determinar o $|\Delta\Delta E|$ entre os complexos. O complexo de menor ΔE é tomado como referência (zero) e os outros têm o $|\Delta\Delta E|$ calculado a partir da referência. Dessa forma, se a metodologia utilizada está sendo fonte de erros, estes erros estarão presentes da mesma forma em todos os cálculos. A **Tabela 2.8** apresenta os resultados de $\Delta\Delta E$ para os complexos estudados.

Tabela 2.8. Diferença entre as variações de energia para a formação de complexos entre enantiômeros do TRM e $\text{cm-}\beta\text{-CD}$.

Complexos	$ \Delta\Delta E / \text{kcal.mol}^{-1}$
Complexo 1	7,265
Complexo 2	7,056
Complexo 3	3,633
Complexo 4	0,000
Complexo 5	6,305
Complexo 6	9,363

É possível notar na **Tabela 2.8** que os valores de $|\Delta\Delta E|$ para todas as possibilidades de interação entre os enantiômeros do TRM e $\text{CM-}\beta\text{-CD}$, apresentam uma diferença de no mínimo $3,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$, o que, do ponto de vista teórico, já é suficiente para o reconhecimento quiral. Como mostrado na **Figura 2.24**, ocorreu a discriminação quiral quando utilizada a $\text{CM-}\beta\text{-CD}$ e a melhor resolução entre os picos foi de 2,17 (**Tabela 2.5**). Dessa forma, de acordo com os resultados teóricos obtidos, o enantiômero SS-TRM, responsável pela formação do Complexo 4, apresentará maior tempo de migração.

4.2.2. TRM e S- β -CD

4.2.2.1. Mecanismo de discriminação quiral

As geometrias otimizadas no nível semiempírico PM3 para os Complexos A, B, C e D, formados entre os enantiômeros do TRM e a S- β -CD são mostradas nas **Figuras 2.29** e **2.30**. No caso dos complexos E e F, a tentativa de interação entre a hidroxila dos enantiômeros de TRM e o átomo de enxofre dos grupos sulfóxido não foi bem sucedida, não sendo observada a interação entre as espécies. Além do átomo de enxofre sofrer um impedimento estérico, a hidroxila do TRM tem uma maior tendência a interagir com os átomos de oxigênio do grupo sulfóxido, o que faz com que a interação com o átomo de enxofre não seja formada. No prosseguimento deste estudo, apenas os Complexos A, B, C e D são considerados.

Os resultados energéticos referentes ao processo de formação dos complexos são apresentados na **Tabela 2.9**, a qual mostra os valores de energia de interação (ΔE) em solução aquosa.

Tabela 2.9. Variação de energia envolvida na formação dos complexos entre enantiômeros do TRM e S- β -CD. Dados obtidos em nível B3LYP/6-31+G(d,p), utilizando o método PCM e água como solvente.

Complexo	ΔE / kcal.mol ⁻¹
Complexo A (RR-TRM + S- β -CD)	-10,508
Complexo B (SS-TRM + S- β -CD)	-12,715
Complexo C (RR-TRM + S- β -CD)	-21,625
Complexo D (SS-TRM + S- β -CD)	8,318

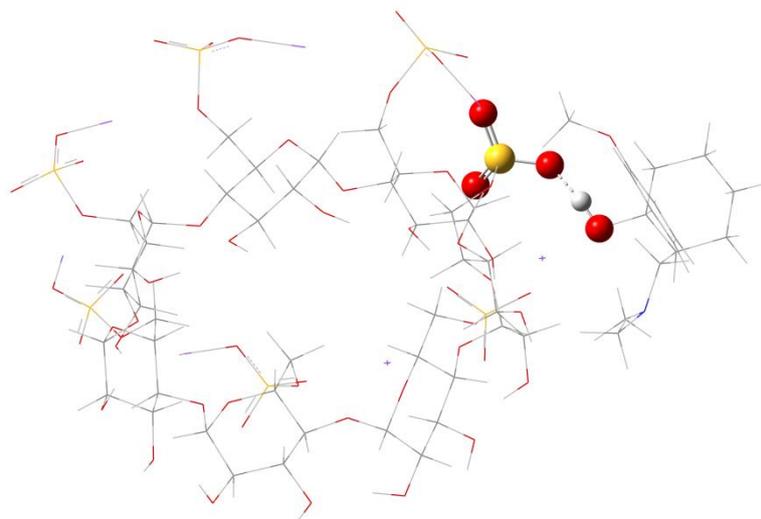


Figura 2.29. Estrutura otimizada do Complexo A

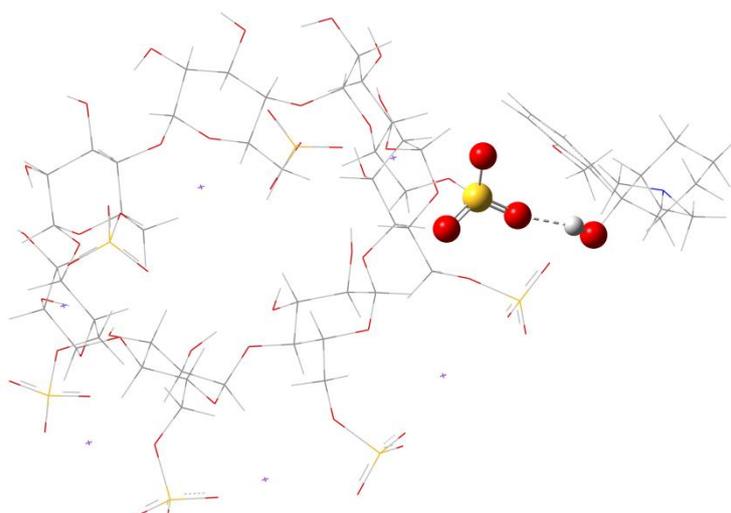


Figura 2.30. Estrutura otimizada do Complexo C

Observando a **Tabela 2.9**, percebe-se que o complexo mais estável é o Complexo C, formado pela interação entre a hidroxila do TRM e o grupo =O do grupo sulfóxido. Novamente, os resultados obtidos para ΔE não estão de acordo com o esperado. Esperava-se que os Complexos A e B, fossem os mais estáveis, pois envolvem interações do tipo íon-dipolo, entre o grupo OH do TRM e o grupo O^- da substituição da CD. Uma interação íon-dipolo é uma interação muito mais forte que uma interação do tipo ligação de hidrogênio (interação que se observa nos complexos C e D) e tende a estabilizar o sistema de forma mais acentuada.

Novamente, o mecanismo de interação e discriminação quiral entre os enantiômeros do TRM e a S- β -CD foi determinado, mas os resultados observados não estão de acordo com o esperado. Assim, como proposto para a CM- β -CD, um estudo metodológico deve ser realizado, para a melhor descrição dos valores relativos às variações de energia.

4.2.2.2. Ordem de migração dos enantiômeros

Como descrito na seção 4.2.1.2, o objeto de estudo na determinação da ordem de migração dos enantiômeros é diferença entre a variação de energia ($|\Delta\Delta E|$) entre os complexos. A **Tabela 2.10**, mostrada abaixo, apresenta esses dados para os complexos entre enantiômeros do TRM e S- β -CD.

Tabela 2.10. Diferença entre as variações de energia para a formação de complexos entre enantiômeros do TRM e S- β -CD

Complexo	$ \Delta\Delta E $ /kcal.mol ⁻¹
Complexo A (RR-TRM + S-β-CD)	11,117
Complexo B (SS-TRM + S-β-CD)	8,910
Complexo C (RR-TRM + S-β-CD)	0,000
Complexo D (SS-TRM + S-β-CD)	29,943

É possível observar na **Tabela 2.10**, que os valores de $|\Delta\Delta E|$ obtidos para os complexos formados com a S- β -CD, são muito maiores que aqueles obtidos para os complexos formados com a CM- β -CD (valores variando entre 3,6 e 9,3 kcal.mol⁻¹). Este dado deixa muito claro a maior capacidade da S- β -CD em discriminar os enantiômeros do TRM. Nos eletroferogramas, isso deve resultar em picos mais resolvidos, muito bem separados. Observando a **Figura 2.25**, percebe-se que é exatamente isso que acontece. Quando a S- β -CD é utilizada na concentração 5,850 mM, gera picos com resolução ímpar ($R_s = 7,09$), não relatada na literatura até o momento.

De acordo com este estudo, pode-se inferir que o enantiômero RR-TRM terá um maior tempo de migração, quando a S- β -CD for utilizada como agente quiral. Além disso, os valores maiores de $|\Delta\Delta E|$ para complexos com a S- β -CD mostram que esta CD é ideal na separação dos enantiômeros de TRM.

É importante observar que a ordem de migração dos enantiômeros depende diretamente do seletor quiral utilizado. No caso do TRM, os resultados mostram que se for utilizada a CM- β -CD, o enantiômero com maior tempo de migração será o SS-TRM. Já quando for utilizada a S- β -CD, o enantiômero RR-TRM, apresenta um maior tempo de migração.

4.3. Confirmação da ordem de migração dos enantiômeros

Com o objetivo de se confirmar os resultados computacionais obtidos em relação à ordem de migração dos enantiômeros, a alíquota de cada enantiômero foi analisada sob as melhores condições em CE determinadas neste estudo. A **Figura 2.31** apresenta os resultados obtidos. Na **Figura 2.31(a)** a alíquota de SS-TRM foi analisada sob as condições de CE. Um pequeno sinal relativo ao enantiômero RR-TRM pode ser encontrado no cromatograma, o que foi útil para se verificar melhor a separação dos picos. A **Figura 2.31(b)**, mostra a injeção da alíquota de SS-TRM, também nas condições otimizadas em CE. Ao final, a **Figura 2.31(c)**, mostra a injeção do padrão da mistura racêmica de TRM. Com a injeção dos enantiômeros puros, apresentadas na **Figura 2.31(a)** e **Figura 2.31(b)**, é possível afirmar que na **Figura 2.31(c)**, o SS-TRM migra em tempos menores que o RR-TRM. Este resultado está de acordo com a discussão apresentada anteriormente neste trabalho. Como a S- β -CD possui caráter aniônico, ela migra em sentido contrário ao detector e o enantiômero ligado mais fortemente a esta, RR-TRM (**Tabela 2.9**), é carregado pelas ciclodextrinas, retardando a sua chegada ao detector. Portanto, sob as condições apresentadas, o RR-TRM apresenta maior tempo de migração.

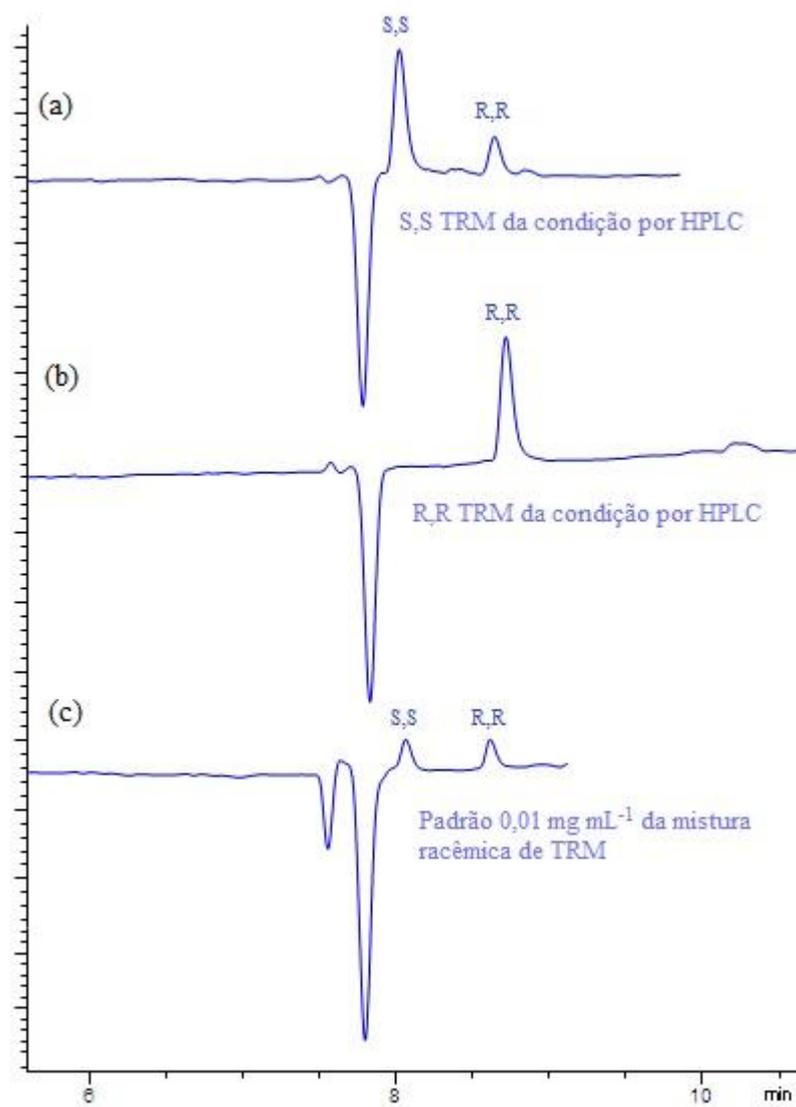


Figura 2.31. Eletroferogramas referentes à (a) análise da alíquota de SS-TRM sob as condições do HPLC [52]; (b) análise da alíquota de RR-TRM sob as condições do HPLC [52]; (c) análise da mistura racêmica de TRM. Condições fixas em (a), (b) e (c): CD = S- β -CD 5,850 mM; BGE fosfato 125 mM, pH=10, $\lambda_{\text{det}} = 195$ nm, injeção hidrodinâmica (30 mbar, 4 segundos), 20 kV e T=10°C.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Novamente, os métodos computacionais mostraram ser uma ferramenta muito útil, a qual pode ser utilizada na química analítica. Através de cálculos computacionais foi possível fazer um estudo do mecanismo de discriminação quiral de enantiômeros do TRM com duas ciclodextrinas distintas e também determinar a ordem de migração dos enantiômeros. Apesar dos resultados relativos ao mecanismo de interação entre as CD's e TRM não serem totalmente compreendidos, o estudo da ordem de migração apresentou resultados bem interessantes, que estão de acordo com os eletroferogramas obtidos.

Como perspectiva para o estudo teórico pretende-se realizar uma investigação de uma metodologia adequada para a descrição deste tipo de sistema, testando diferentes funcionais e funções de base, além do estudo do *basis set superposition error* (BSSE) e da *counterpoise correction* (CP).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] TAVARES, M.F.M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. *Química Nova* 19(2) (1996) 173
- [2] TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova* 20(5) (1997) 493
- [3] QUEIROZ, S.C.N., JARDIM, I.C.S.F. *Eletroforese Capilar* (2001) 1
- [4] Powerpoint image bank. Disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>
- [5] JORGENSON, J. W.; LUKACS K. D. Zone Electrophoresis in Open-tubular Glass Capillaries, *Analytical Chemistry* 53(8) (1981) 1298
- [6] DOVICH, N. J., ZHANG J. How Capillary Electrophoresis Sequenced the Human Genome. *Angewandte Chemie* 39(24) (2000) 4463
- [7] KARGER, B.L., GUTTMAN, A. DNA sequencing by CE. *Electrophoresis* 30 (2009) S196
- [8] SKOOG, D.A., HOOLER, F.J., CROUCH, S.R. *Principles of instrumental analysis*, Thomson Higher Education, 2007
- [9] SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. *Fundamentos de Química Analítica*. Editora Thomson, 2006
- [10] HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Higher Education, 2000
- [11] VAZ, F. A. S., OLIVEIRA, C. L. M., OLIVEIRA, M. A. L. Fundamentos de eletroforese capilar: uma abordagem por animações. *Química Nova* 38(5) (2015) 732
- [12] LIMA, V.L.E. Os fármacos e a quiralidade: Uma breve abordagem. *Química Nova* 20(6) (1997) 657
- [13] COELHO, F.A.S. Fármacos e quiralidade. *Cadernos Temáticos Química Nova na escola* 3 (2001) 23

- [14] BONATO, P.S., JABOR, V.A.P. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Química Nova* 28(4) 2005 683
- [15] THOMAS, G. *Química Medicinal: uma introdução*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003
- [16] Associação Brasileira de Portadores da Síndrome da Talidomida. <http://www.talidomida.org.br/>
- [17] VAN EECKHAUT, A. MICHOTTE, Y. *Chiral separations by capillary electrophoresis*, Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010
- [18] FANALI, S. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A* 875 (2000) 89
- [19] PETERSEN, J. MAHAMMAD, A.A. *Clinical and Forensic applications of capillary electrophoresis*, Humana Press, Springer, 2001
- [20] DIXIT, S. PARK, J.H. Application of antibiotics as chiral selectors for capillary electrophoretic enantioseparation of pharmaceuticals: a review. *Biomedical Chromatography* 28 (2014) 10
- [21] DOMINGUEZ-VEGA, E., PÉREZ-FERNÁNDEZ, V., GREGO, A.L., GARCÍA, M.A., MARINA, M.L. Recent advances in CE analysis of antibiotics and its use as chiral selectors. *Electrophoresis* 35 (2014) 28
- [22] STAVROU, I.J., MAVROUDI, M.C., KAPNISSI-CHRISTODOULOU, C. Chiral selectors in CE: Recent developments and applications (2012-mid 2014). *Electrophoresis* 36 (2015) 101
- [23] TSIUUPI, D.A., STADEN, R.-I. S.-V., KAPNISSI-CHRISTODOULOU, C. P. Chiral selectors in CE: Recent developments and applications. *Electrophoresis* 34 (2013) 178
- [24] DODZIUK, H. *Cyclodextrins and their complexes. Chemistry, Analytical methods, Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2006.
- [25] TANG, W., NG, S.-C., SUN, D. *Modified cyclodextrins for chiral separations*. Springer, 2013.

- [26] LI, L., LI, X., LUO, Q., YOU, T. A comprehensive study of the enantioseparation of chiral drugs by cyclodextrin using capillary electrophoresis combined with theoretical approaches. *Talanta* 142 (2015) 28
- [27] SZABÓ, Z.-I., TÓTH, G., VOLGYI, G., KOMJÁTI, B., HANCU, G., SZENTE, L., SOHAJDA, T., BÉNI, S., MUNTEAN, D.-L., NOSZÁL, B. Chiral separation of asenapine enantiomers by capillary electrophoresis and characterization of cyclodextrin complexes by NMR spectroscopy, mass spectrometry and molecular modeling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 117 (2016) 398
- [28] MELANI, F., PASQUINI, B., CAPRINI, C., GOTTI, R., ORLANDINI, S., FURLANETTO, S. Combination of capillary electrophoresis, molecular modeling and NMR to study the enantioselective complexation of sulpiride with double cyclodextrin systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 114 (2015) 265
- [29] SULIMAN, F.O., ELBASHIR, A.A., SCHMITZ, O.J. Study on the separation of ofloxacin enantiomers by hydroxyl-propyl- β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis: A computational approach. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 83 (2015) 119
- [30] ARSAD, S.R., MAAROF, H., IBRAHIM, W.A.W., ABOUL-ENEIN, H. Theoretical and Molecular Docking study of ketoconazole on heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -cyclodextrin as chiral selector. *Chirality* 28 (2016) 209
- [31] HUANG, M.-J., QUAN, Z., LIU, Y.-M. Computational modeling of inclusion complexes of β -cyclodextrin with enantiomers of salsolinol, *N*-methyl-salsolinol, and 1-benzyl-tetrahydroisoquinoline. *International Journal of Quantum Chemistry* 109 (2009) 81
- [32] CHANKVETADZE, B. Enantiomer migration order in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23 (2002) 4022
- [33] NASCIMENTO JR., C.S., LOPES, J.F., GUIMARÃES, L., BORGES, K. B. Molecular modeling study of the recognition mechanism and enantioseparation of 4-hydroxypropranolol by capillary electrophoresis using carboxymethyl- β -cyclodextrin as the chiral selector. *Analyst* 139 (2014) 3901
- [34] STEWART, J. J. *Journal of Computational Chemistry* 10 (1989) 209

- [35] HEHRE, W.J., DITCHFIELD, R., POPLÉ, J.A. The Journal of Chemical Physics 56 (1972) 2257
- [36] LEE, C., YANG, W., PARR, R.G., Physical Review B 37 (1988) 785
- [37] BARONE, V., COSSI, M., TOMASI, J.A. The Journal of Chemical Physics 107 (1997) 3210
- [38] FRISCH, M.J., *et al.*, Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009

Capítulo 3:

Conclusões Gerais

Conclusões

Neste trabalho, utilizamos a química teórica como ferramenta em estudos na área de química analítica. Na primeira parte, a modelagem computacional permitiu o estudo de diversas condições para a otimização da síntese de um MIP. Com a química computacional, foi possível determinar qual seria o melhor monômero funcional, a melhor estequiometria e o solvente mais adequado para a síntese de um MIP para o TRM. Percebemos que as ligações de hidrogênio são fundamentais na estabilização do complexo e através de um senso químico é possível se ter uma ideia de como e onde irão acontecer as interações entre os monômeros funcionais e a molécula molde.

Na segunda parte deste trabalho, um método por CE para a separação dos enantiômeros de TRM foi desenvolvido. O estudo do tipo e concentração de BGE, assim como o tipo e concentração de CD, permitiram uma compreensão dos parâmetros envolvidos nas análises e como o sistema se comporta quando esses parâmetros são variados. O desenvolvimento de um método para a separação de enantiômeros é um processo extremamente detalhado e o entendimento dos fundamentos da técnica e domínio do equipamento (hardware e software) são fundamentais para se atingir os resultados com sucesso. O estudo computacional dos complexos CD + TRM permitiu termos uma ideia sobre como ocorrem os mecanismos de discriminação quiral e também forneceram argumentos contundentes para a explicação da resolução obtida nas análises assim como a ordem de migração dos enantiômeros.

Métodos computacionais são uma ferramenta extremamente útil no desenvolvimento e compreensão de estudos envolvendo MIP's, eletroforese capilar, separações quirais e outros tipos de estudo, em que os resultados são obtidos, mas a nível molecular, não se tem certeza do que está acontecendo. Apesar disso, os relatos na literatura de trabalhos que utilizam a química computacional junto com a experimental ainda são poucos. A comunhão entre essas duas metodologias é de extrema importância e deveria ser muito mais explorada.