

Resolução de misturas por CCD-RMN

Gelves, L. G. V.;* Rezende, C. M.; Kaiser, C. R.

Rev. Virtual Quim., 2010, 2 (3), 178-191. Data de publicação na Web: 6 de dezembro de 2010

<http://www.uff.br/rvq>

Resolution of mixtures by TLC-NMR

Abstract: TLC-NMR (*Tin Layer Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance*) allows the resolution and structural elucidation of analytes present in natural and synthetic mixtures directly, without prior purification processes. This is done through a NMR technique named DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*), which is based at the diffusion coefficient of analytes in solution, thus providing a versatile alternative technique for the study and understanding of molecular interactions of biological and chemical systems. Here the various types of interactions between the additive (micelles, ions, polymers, polysaccharide gel, proteins or chiral auxiliary) and the analyte in separation and identification sequence are discussed.

Keywords: NMR; TLC; DOSY; mixtures; resolution.

Resumo

CCD-RMN (Cromatografia em Camada Delgada-Ressonância Magnética Nuclear) permite a resolução e elucidação estrutural de analitos presentes em misturas naturais e sintéticas, de forma direta, sem processos de purificação prévios. Isto é realizado através do experimento de RMN denominado de DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*), que se baseia no coeficiente de difusão do analito em solução, uma técnica alternativa versátil para o estudo e entendimento de interações moleculares em sistemas biológicos e químicos. Serão aqui definidos e discutidos os diversos tipos de interações entre o aditivo (micelas, íons, polímeros, gel polissacarídeo, proteínas ou auxiliar quiral) e o analito na seqüência de separação e identificação.

palavras-chave: RMN; CCD; DOSY; misturas; resolução.

* Pós-Graduação em Química - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos 149, Bloco A - 6º andar, sala 605, 21949-900 Rio de Janeiro-RJ.

✉ luisga011@hotmail.com

DOI: [10.5935/1984-6835.20100017](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100017)

Resolução de misturas por CCD-RMN

Luis G. V. Gelves,* Claudia M. Rezende, Carlos R. Kaiser

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Bloco A, Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro-RJ.

*luisga011@hotmail.com

Recebido em 30 de setembro de 2009. Aceito para publicação em 5 de dezembro de 2010

1. Introdução
2. Fundamentos da Difusão Molecular em RMN
3. Experimentos DOSY
4. Aplicações da CCD-RMN
 - 4.1. Interações com micelas
 - 4.2. Interações ácido-base
 - 4.3. Interações com filmes
 - 4.4. Interações com macromoléculas hospedeiras
 - 4.5. Interações com fases quirais
 - 4.6. Interações com íons
 - 4.7. Formação de complexos com cátions
5. Conclusões

1. Introdução

O uso de técnicas de separação de misturas como a cromatografia, hifenadas às técnicas de identificação estrutural, como a ressonância magnética nuclear e/ou a espectrometria de massas tem permitido, nos últimos anos, a análise de misturas complexas.¹⁻⁴

Estas técnicas são extremamente úteis para a análise estrutural de substâncias em misturas, com economia de tempo quando comparadas aos processos de purificação tradicionais, em que numa primeira etapa as substâncias são separadas e purificadas para, posteriormente, serem identificadas.

O acoplamento destas técnicas proporcionou um enorme avanço para o entendimento de mecanismos de reação, análise estrutural e interações moleculares, em diferentes processos biológicos e químicos.⁵⁻⁶

No entanto, o alto custo dos equipamentos necessários a estas análises “acopladas” limita seu uso a vários grupos de pesquisa. Por tal motivo, a criação de metodologias mais econômicas, que permitam a análise rápida de misturas, motivou alguns grupos de pesquisa na criação do que está sendo denominada de CCD-RMN, Cromatografia em Camada Delgada-Ressonância Magnética Nuclear (Figura 1).⁷

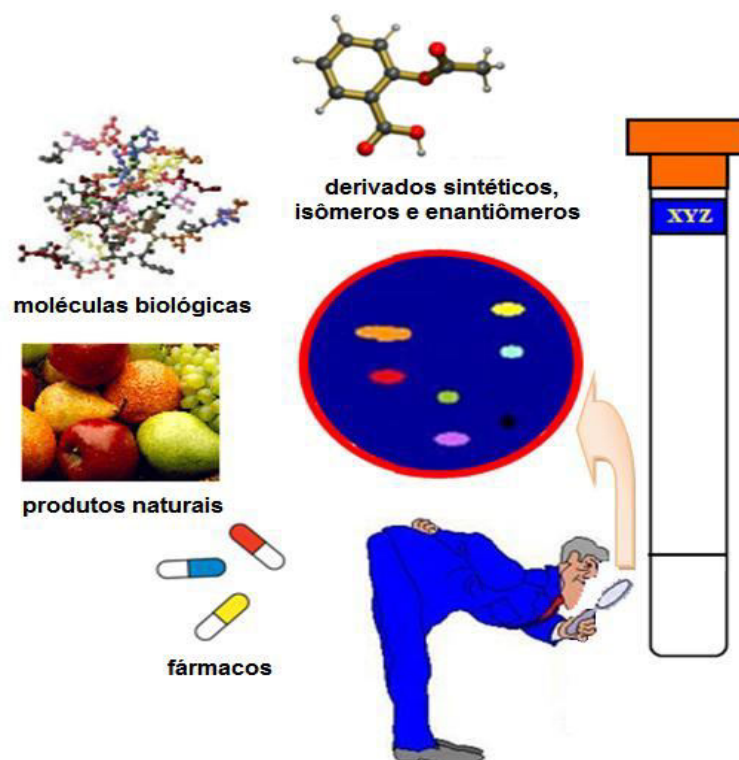


Figura 1. Análise de misturas por CCD-RMN

2. Fundamentos da Difusão Molecular em RMN

A difusão molecular é um fenômeno resultante dos movimentos aleatórios das moléculas, conhecidos como movimentos brownianos, fruto da energia térmica do sistema, entre regiões de diferentes concentrações. O deslocamento molecular resultante da difusão é definido por coeficientes de difusão, os quais dependem da temperatura, pressão e composição da solução.⁸⁻¹⁰

Os valores típicos de coeficientes de difusão (D) em líquidos, a temperaturas moderadas (25 – 30 °C), variam desde $10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ($10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$) (polímeros de alta massa molar, em solução) até $10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ($10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$) (moléculas pequenas, em solução pouco viscosa).¹⁰ Estes fornecem informações sobre a organização molecular e estrutura de fases, e podem ser medidos por várias técnicas, tais como o espalhamento de luz, a análise por injeção em fluxo (FIA) e a ressonância magnética nuclear (RMN).^{8,10}

A hidrofobicidade e hidrofiliabilidade dos solutos são usadas como meios para determinar a velocidade de difusão efetiva, o que pode ser determinado pela adição de tensoativos às misturas de interesse. A partição dos solutos no interior das micelas está

relacionada a sua solubilidade relativa, estando sujeitos à troca rápida entre a solução e o interior das micelas formadas, envolvendo ligações de hidrogênio, van der Waals e interações hidrofóbicas como as principais forças de ligação no processo de difusão. Sobre tais condições, os experimentos PFG-RMN (RMN com Gradiente de Campo Pulsado, do inglês *Pulsed Field Gradient NMR*) reportam somente uma média ponderada dos coeficientes de difusão da espécie livre e incorporada (no interior da micela). Portanto, para o soluto j , o coeficiente de difusão observado é D_j e este é descrito pela seguinte equação:

$$D_j = p_j D_j^{\text{incorporado}} + (1 - p_j) D_j^{\text{livre}}$$

Onde p_j é o grau de solubilização, $D_j^{\text{incorporado}}$ e D_j^{livre} são os coeficientes de difusão das moléculas solubilizadas e livres, respectivamente.^{10,11} É importante ter em mente que, se o raio da micela for muito menor do que a difusão do analito no experimento de PFG-RMN, a difusão dentro das micelas não será detectada. O valor de $D_j^{\text{incorporado}}$ é igual ao coeficiente de difusão do surfactante e é igual ao coeficiente de difusão da micela, desde que a concentração do surfactante seja muito maior do que a concentração crítica da micela (CMC). De acordo

com a equação anterior, o coeficiente de difusão aparente de um soluto pode ser modificado, alterando a concentração e o tipo de surfactante e, portanto, o grau de solubilização.^{9,10}

3. Experimentos DOSY

Em 1992, Morris e cols. desenvolveram a primeira técnica bidimensional de RMN capaz de avaliar a difusão molecular, através de um método analítico não invasivo que pode identificar os componentes de uma mistura e simultaneamente caracterizar o tamanho dos agregados, sendo relativamente de fácil implementação num espectrômetro de RMN com gradiente de campo.¹¹

No experimento de DOSY (Espectroscopia Ordenada por Difusão, do inglês: *Diffusion Ordered Spectroscopy*),¹⁰ são medidas as intensidades do sinal de RMN, enquanto são aplicados gradientes de campo magnético pulsado ao longo de um ou vários eixos, com intensidade crescente.¹²⁻¹⁴ Quando a molécula do analito se difunde na presença desse gradiente de campo magnético, o sinal de RMN é atenuado de acordo com a extensão da translação.

Dessa forma, executa-se uma variação progressiva da intensidade do gradiente, da duração, ou do espaçamento entre os gradientes e, através da aplicação de um processamento matemático específico, é obtido um mapa de correlação bidimensional do coeficiente de difusão (F1, m^2s^{-1} ou cm^2s^{-1}) versus frequência do sinal de RMN (F2, ppm).⁹⁻¹⁰

4. Aplicações da CCD-RMN

A análise de misturas complexas é um grande desafio enfrentado por cientistas que trabalham na área de química sintética, farmacêutica e de produtos naturais. Porém, metodologias alternativas como a CCD-RMN permitem a determinação estrutural dos analitos nas misturas sem separação prévia, a exemplo do experimento DOSY, e oferecem enormes benefícios ao nível de simplicidade e velocidade. A aplicabilidade desta metodologia para análise de misturas tem sido demonstrada em um número de sistemas complexos, incluindo misturas de moléculas pequenas e fluídos biológicos.

4.1. Interações com micelas

Morrison e cols. desenvolveram o primeiro trabalho relacionado à separação de misturas usando surfactantes e vesículas,¹⁵ através de um experimento DOSY, na resolução de uma mistura de tetrametilamônio (TMA) e octaetilenoglicol dodecil éter ($C_{12}E_8$) em micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS- d^{25}) (Figura 2).¹¹ Os resultados mostraram que o conjunto dos sinais entre 0,69-1,40 e 3,25-3,78 ppm no espectro da Figura 3, referentes ao tensoativo, ocorrem no mesmo valor de difusão do $C_{12}E_8$, indicando que a micela e o $C_{12}E_8$ se encontram associados, com um coeficiente de difusão de $5,54 \times 10^{-7} cm^2s^{-1}$.

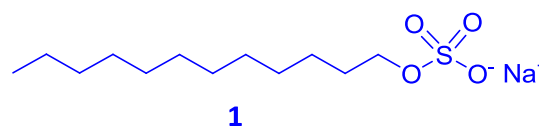


Figura 2. Dodecil sulfato de sódio (SDS- d^{25} ou NaDS- d^{25}) ou lauril sulfato de sódio (SLS- d^{25})

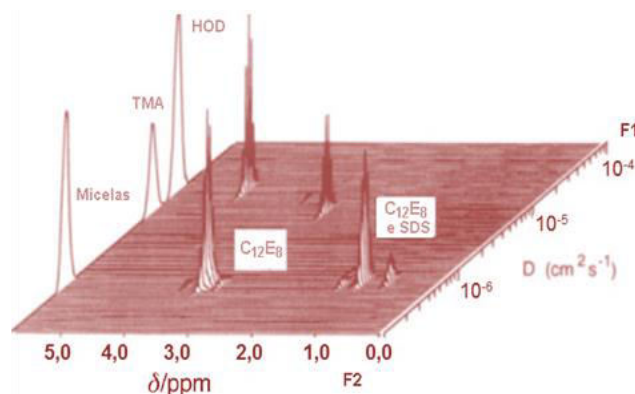


Figura 3. Espectro 1H DOSY (250 MHz, D_2O , 259 K), da mistura de tetrametilamônio (TMA) e octaetilenoglicol dodecil éter ($C_{12}E_8$). A análise foi feita utilizando dodecilsulfato de sódio (SDS). Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 1992 American Chemical Society (ACS).¹¹

A resolução de uma mistura de sacarose e NaCl, na presença de vesículas fosfolipídicas (1-palmitoil-2-oleoilfosfatidil-colina) foi obtida facilmente, já que as camadas duplas de fosfolipídios são altamente permeáveis na água, mas não a sacarose, permitindo identificar com nitidez o valor de difusão da sacarose livre ($3,00 \times 10^{-6} cm^2s^{-1}$), sacarose complexada com as vesículas ($1,86 \times 10^{-8} cm^2s^{-1}$) e o sinal intenso da HOD ($1,24 \times 10^{-5} cm^2s^{-1}$) com maior coeficiente, no espectro da Figura 4.

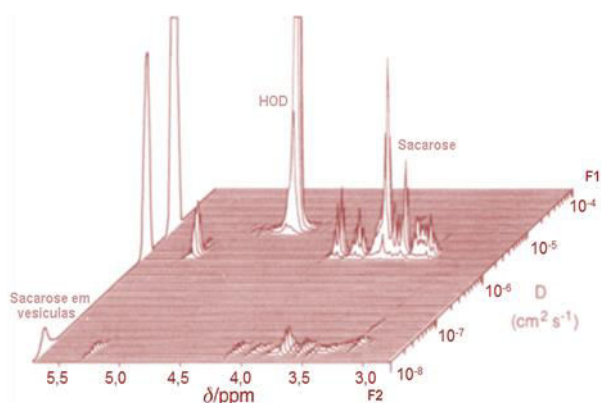


Figura 4. Espectro ^1H DOSY (250 MHz, D_2O , 259 K), da mistura de sacarose e NaCl. A análise foi feita utilizando vesículas fosfolipídicas (1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina). Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 1992 American Chemical Society (ACS).¹¹

Seguindo o mesmo objetivo, Zielinski e cols. mostraram os efeitos das micelas formadas pelo dodecil sulfato de sódio deuterado (SDS-d_{25}), quando usado como “fase estacionária”, em D_2O , na resolução de misturas de peptídeos tais como: triptofilglicina (Try-Gly), leucilmetionina (Leu-Met), acetato de arginilvalina (Arg-Val) e glicilglicilfenilalanina (Gly-Gly-Fenil-Ala).¹⁶

O trabalho mostrou uma boa separação dos analitos na mistura, em especial para Try-Gly e Leu-Met, que apresentaram coeficientes de difusão muito próximos em solução aquosa (Figura 5.1), sendo obtidos valores de difusão de $2,92 \times 10^{-10}$ e $3,91 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ para Try-Gly e Leu-Met, respectivamente, na presença do surfactante (Figura 5.2).

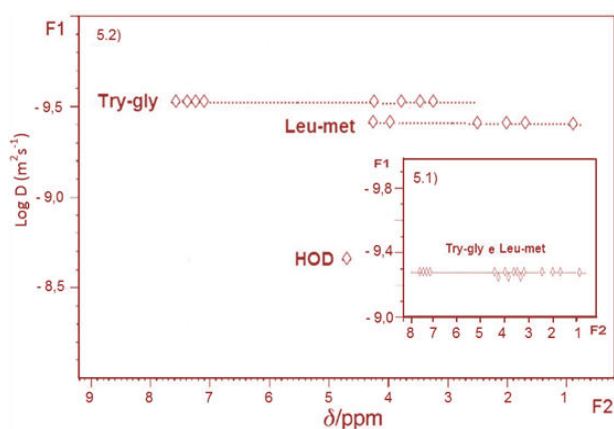


Figura 5. Representação do espectro ^1H DOSY (300 MHz, D_2O , 25 °C), da mistura de Try-Gly e Leu-Met. 5.1) sem SDS-d_{25} , 5.2) com SDS-d_{25} . Adaptado da referência 16

Em solução, o coeficiente de difusão é determinado pelas diferenças no raio hidrodinâmico efetivo. Este tipo de relação pode ser muito útil quando as espécies apresentam diferentes tamanhos moleculares, mas esta conexão não pode ser aplicada a misturas de isômeros, cujas espécies possuem tamanho e estrutura semelhante.

O trabalho de Evans e cols. ilustra bem uma aplicação neste campo, com uma série de isômeros de diidroxibenzenos, mostrados na Figura 6, nos quais é esperada semelhança nos raios hidrodinâmicos, mas que apresentem interações diferentes na presença de micelas.¹⁷ As propriedades de difusão foram investigadas na presença de micelas de SDS/ D_2O e micelas invertidas de bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sódio em clorofórmio deuterado (AOT/CDCl_3), em concentrações diferentes de solvente e surfactante.

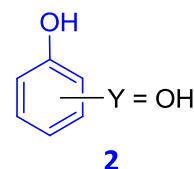


Figura 6. Representação das estruturas do catecol, resorcinol e hidroquinona, onde Y encontra-se em *o*, *m* e *p* respectivamente

O sistema $\text{SDS/D}_2\text{O}$ levou a uma resolução significativa para os três isômeros, sendo a hidroquinona quem apresentou menor coeficiente de difusão em relação ao catecol, como pode ser observado comparando os espectros da Figura 7.

O sistema AOT/CDCl_3 mostrou o comportamento esperado, na presença de micelas invertidas, onde os solutos mais hidrofílicos revelaram um menor coeficiente de difusão (Figura 8).

Contudo, a ordenação no resorcinol e catecol é realmente invertida em comparação com o sistema $\text{SDS/D}_2\text{O}$ (Figuras 7.2 e Figura 8.2), sendo novamente a hidroquinona o soluto com a menor força de complexação em AOT/CDCl_3 (Figura 8.2).

O comportamento em AOT/CDCl_3 é razoavelmente mais complexo do que em $\text{SDS/D}_2\text{O}$, uma vez que a primeira é, na realidade, um sistema ternário em que a formação de micelas invertidas envolve outros fatores além do eletrostático e a consideração hidrofóbica. Este processo exige a presença de água, e na verdade, a ordem da difusão dos três solutos estudados independe da concentração de D_2O , como observado nas Figuras 7.1 e 8.1.

A baixa solubilidade dos diidroxibenzenos em CDCl_3 limitou a relação sinal/ruído no espectro de ^1H RMN (F2), e conseqüentemente levou à menor resolução do espectro DOSY (Figura 8), porém houve uma mudança dramática na difusão dos solutos sobre a adição do surfactante.

Os resultados mostram que a força da ligação

entre a micela e o analito é evidenciada pela diminuição no coeficiente de difusão na ordem hidroquinona < resorcinol < catecol, raciocínio coerente com a associação entre o analito e a micela formada. Esta é, na melhor das hipóteses, uma explicação parcial, pois outros fatores devem estar envolvidos.

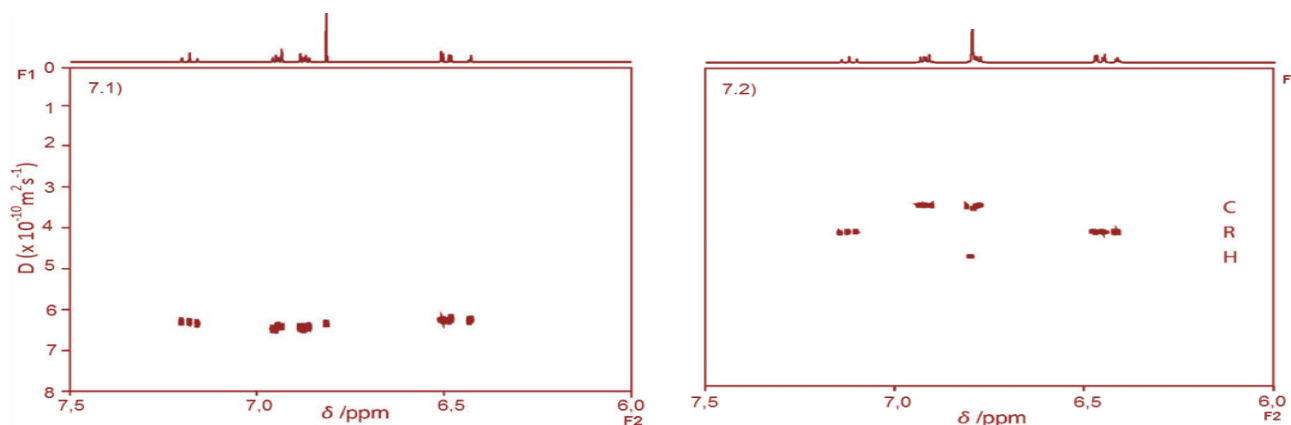


Figura 7. Espectro ^1H DOSY (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP-d}_4$ (trimetilsililpropionato), $21 \pm 1^\circ\text{C}$), da mistura de catecol, resorcinol e hidroquinona. 7.1) sem SDS, 7.2) com SDS. Os sinais de catecol, resorcinol, hidroquinona são identificados por C, R, e H. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2009 American Chemical Society (ACS)¹⁷

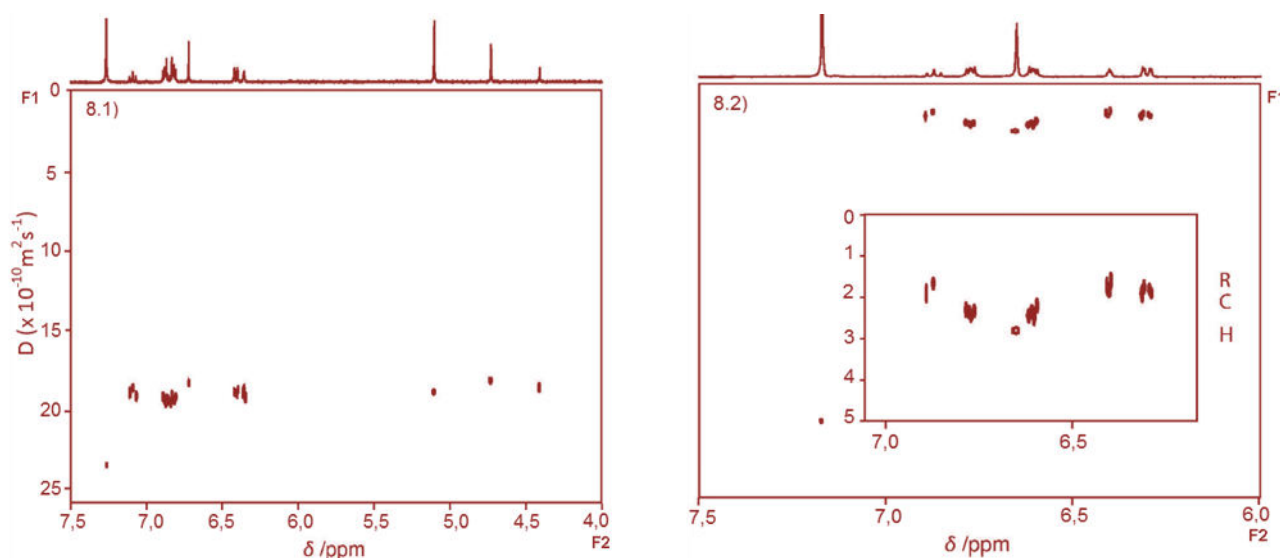


Figura 8. Espectro ^1H DOSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{TSP-d}_4$ (trimetilsililpropionato), $21 \pm 1^\circ\text{C}$), da mistura de catecol, resorcinol e hidroquinona. 8.1) sem AOT, 8.2) com AOT. O quadro inserido no espectro 8.2 mostra os sinais numa escala de 250%. Os sinais de catecol, resorcinol, hidroquinona são identificados por C, R, e H. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2009 American Chemical Society (ACS).¹⁷

Analogamente, no trabalho de Wu e cols. foi resolvida uma mistura de sacarose e glicose na presença de

SDS.¹⁸ Os resultados indicaram que a presença do surfactante não muda significativamente os valores

dos coeficientes de difusão, devido a baixa solubilidade dos açúcares no interior hidrofóbico das micelas de SDS (Figura 9).

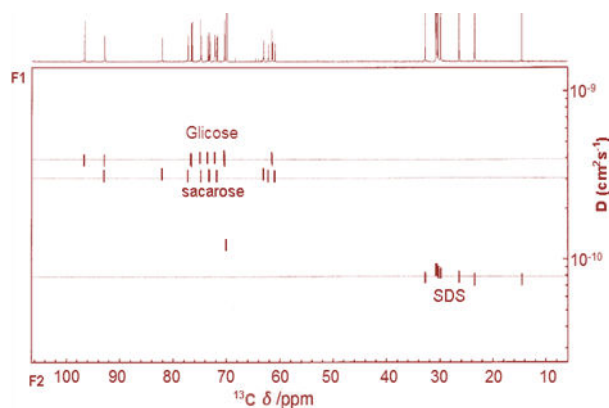


Figura 9. Espectro ^{13}C INEPT DOSY (250 MHz, D_2O , 300 ± 1 k), da mistura de glicose e sacarose, na presença de SDS

Porém, os sinais estão resolvidos e podem ser facilmente identificados para os dois analitos a partir do espectro bidimensional envolvendo, neste caso, o núcleo de ^{13}C .

Além disso, foi evidenciado pelo número e deslocamento químico dos sinais no espectro de RMN ^{13}C , que a amostra da glicose apresenta uma mistura de anômeros (formas α e β), que tem carbonos com

diferentes deslocamentos químicos no espectro, mas essencialmente os mesmos raios hidrodinâmicos e coeficientes de difusão.

Naturalmente, todos os hidrogênios não ligados diretamente aos ^{13}C são eliminados no experimento INEPT-DOSY, devido à seqüência INEPT (*Insensitive Nuclear Enhancement by Polarization Transfer*, baseado em $^1J_{\text{CH}}$).

Seguindo o mesmo objetivo, Morris e cols. analisaram a resolução de misturas em relação ao tamanho molecular e a hidrofobicidade dos analitos na presença de SDS/ D_2O em uma mistura de álcool benzílico, tolueno e tetraetilenoglicol (Figura 10) e uma mistura de metanol, *iso*-propanol, *terc*-butanol e *neo*-pentanol com DTAB/ D_2O (Figura 11).¹⁹

Na presença de SDS, foi obtida uma boa resolução da mistura. Contudo, após adição, foi observada uma reversibilidade na difusão dos analitos (Figuras 10.1 e 10.2), como consequência das mudanças no grau de solubilização dos solutos, do tamanho molecular e do processo de troca rápida entre a solução e o interior da micela.

Os resultados mostraram uma completa resolução das espécies, na presença do DTAB (brometo de dodeciltrimetilamônio), tendo destaque o *neo*-pentanol e o *terc*-butanol, os quais apresentaram igual coeficiente de difusão na ausência de DTAB (Figuras 11.1 e 11.2).

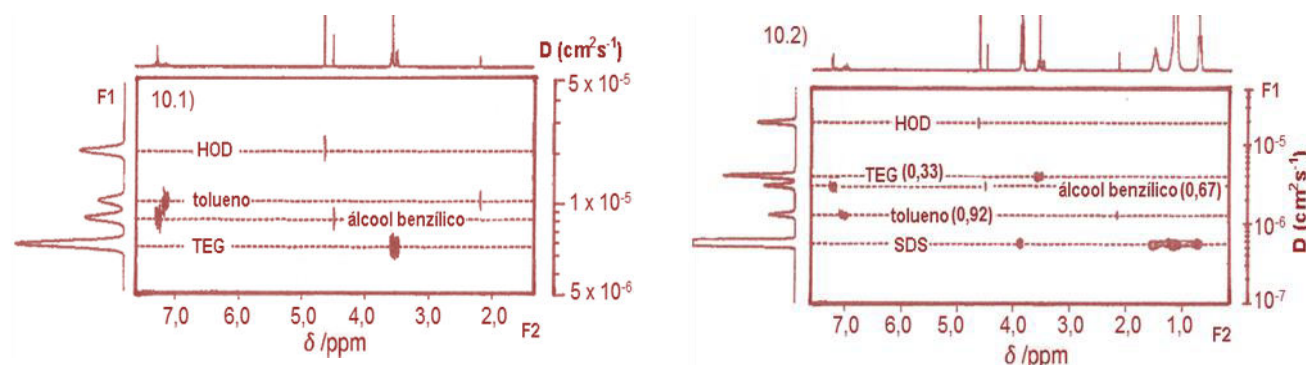


Figura 10. Espectro ^1H DOSY (250 MHz, D_2O , 25 ± 1 °C) de uma mistura de tolueno, álcool benzílico e tetraetilenoglicol (TEG). A análise foi feita com 10 mM de cada analito. 10.1) sem SDS, 10.2) com 0,150 mM de SDS. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 1994 American Chemical Society (ACS)¹⁹

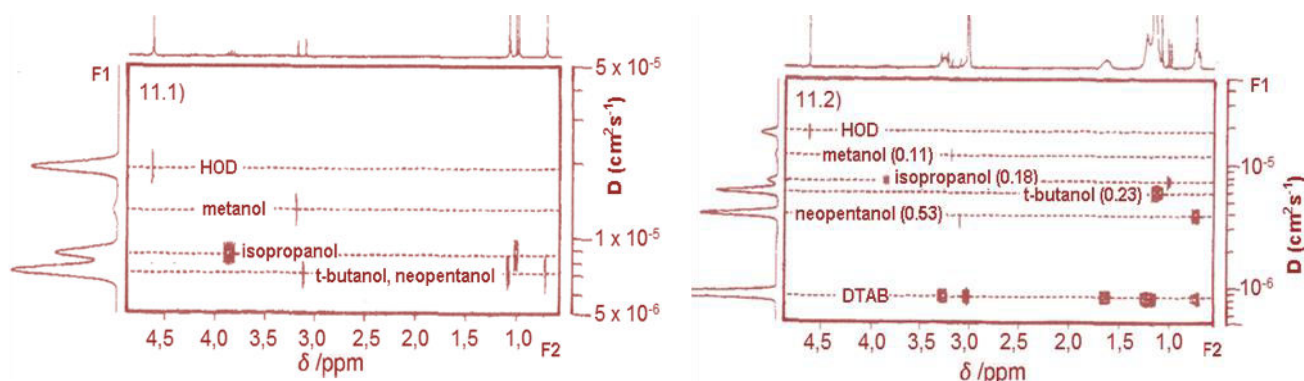


Figura 11. Espectro ^1H DOSY (250 MHz, D_2O , $25 \pm 1^\circ\text{C}$), de uma mistura de 5,0 mM de metanol, 10,0 mM de *iso*-propanol, 10,0 mM *terc*-butanol e 10,0 mM *neo*-pentanol. 11.1) sem DTAB, 11.2) com 0,150 mM de DTAB. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 1994 American Chemical Society (ACS)¹⁹

4.2. Interações ácido-base

O trabalho publicado por Hodge e cols. descreve a resolução de misturas de vários componentes com o foco de interações ácido-base, na presença dos polímeros **(3)** e **(4)** (Figura 12), em CD_3OD , utilizando HR-DOSY (Espectroscopia Ordenada por Difusão de Alta Resolução, do inglês *High Resolution Diffusion-Ordered Spectroscopy*).²⁰ Os autores observaram pouca mudança nos coeficientes de difusão dos analitos na mistura quando foi usado o polímero **(3)**. A hidroquinina apresentou uma maior interação com este polímero, o que levou a uma mudança no valor do coeficiente de difusão de $6,3 \times 10^{-10}$ para $4,0 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ com o polímero (Figuras 13.1 e 13.2).

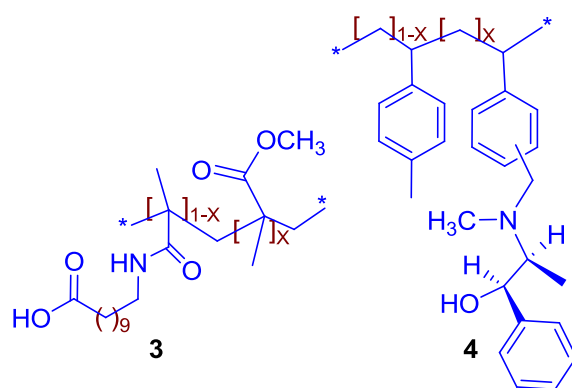


Figura 12. Estrutura dos Polímeros **(3)** e **(4)**, usados no trabalho de Hodge e cols. para a resolução de misturas usando interações ácido-base²⁰

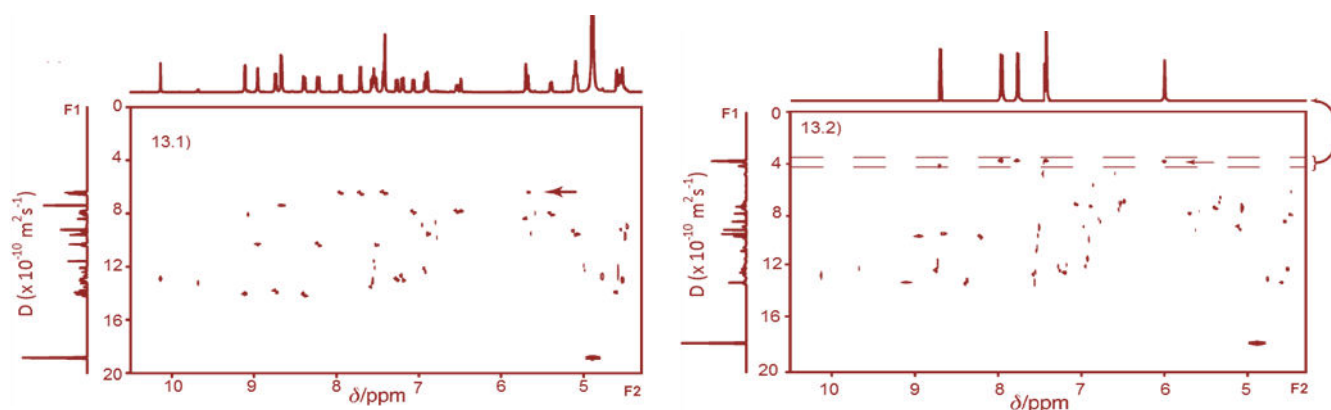
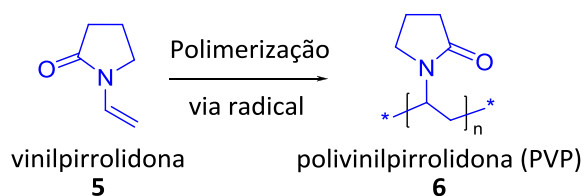


Figura 13. Espectro ^1H HR-DOSY (400 MHz, CD_3OD) da mistura de estrona, *o*-vanilina, (*R*)-(+)-citronelal, (*S*)-(-)-citronelol, hidroquinina, metilnicotinato, *N*-metilnicotinamida, (1*S*)-(-)- β -pineno, 1,6-di-hidropregnenolona e progesterona. 13.1) sem polímero **(3)**, a seta no espectro indica os sinais da hidroquinina, 13.2) com polímero **(3)**, as linhas no espectro ressaltam os sinais da hidroquinina em correlação com o seu sub-espectro de ^1H RMN. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2001 Royal Society of Chemistry (RSC)²⁰

4.3. Interações com filmes

O trabalho publicado por Kavakka e cols. descreve um interessante exemplo de aplicação geral da CCD-RMN utilizando a polivinilpirrolidona (PVP) como “fase estacionária” (Esquema 1).⁷



Esquema 1. Representação estrutural da molécula de polivinilpirrolidona (adaptada da referência 22)

No polímero PVP, a presença da ligação C=O favorece a solubilidade em solventes polares. Segundo estudos de Palermo e cols., a molécula de PVP tem a capacidade de interagir com outras moléculas mesmo em solução aquosa diluída, a diferentes temperaturas.²¹ As propriedades de umidificação do PVP favorecem a formação de películas ou filmes,²² que neste caso é comparável com a cromatografia de fase estacionária líquida.

O espectro mostrado na Figura 14.1 revela uma diferença pequena nos valores dos coeficientes de difusão dos analitos sem PVP, favorecendo a sobreposição dos sinais. No entanto, na presença de PVP, mostrado na Figura 14.2, a separação é evidente. De igual forma na Figura 15, pode ser observado o efeito deste aditivo no coeficiente de difusão de uma variedade de moléculas.

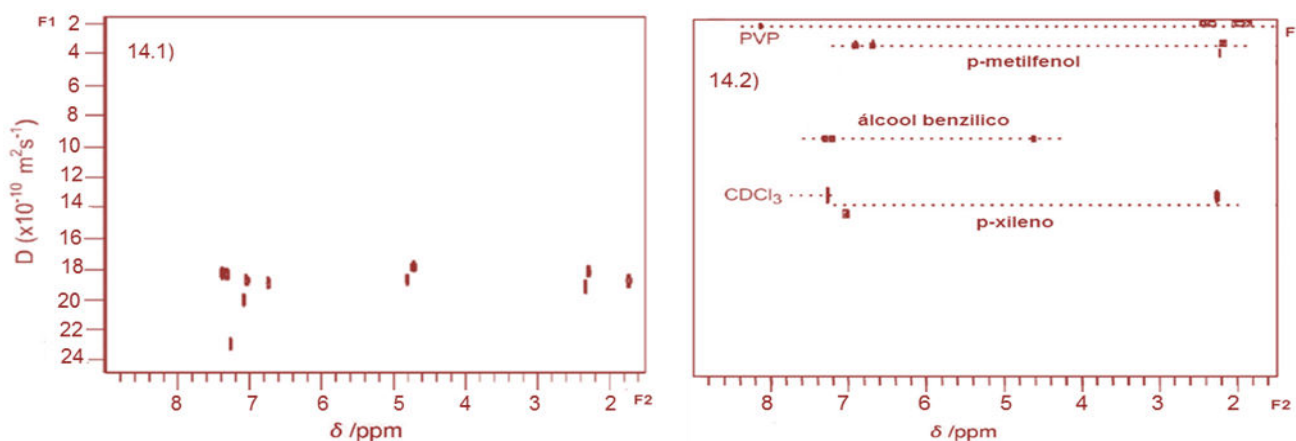


Figura 14. Espectro ¹H DOSY (500 MHz, CDCl₃/TMS), para o álcool benzílico, *p*-metilfenol e *p*-xileno. Foi preparada uma solução de 3 mg (de cada analito), misturados e dissolvidos em 0,6 ml de CDCl₃. 14.1) sem PVP, 14.2) com PVP. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2009 American Chemical Society (ACS)⁷

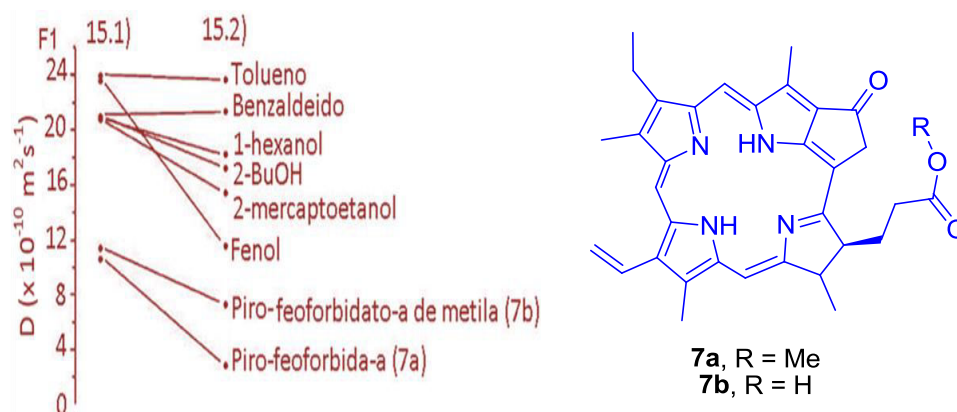


Figura 15. Resultados do espectro ¹H DOSY (500 MHz, CDCl₃/TMS). Foi preparada uma solução de 3 mg (de cada analito), misturados e dissolvidos em 0,6 ml de CDCl₃. 15.1) sem PVP, 15.2) com PVP. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2009 American Chemical Society (ACS)⁷

4.4. Interações com compostos hospedeiros macromoleculares

O estudo realizado por Xu e cols. ilustra a separação de uma mistura de quatro catequinas ((+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina e (-)-epigalocatequina-3-galato), presentes no chá verde (Figura 16), por interações com β -ciclodextrinas (β -CD) e albumina sérica bovina (BSA), como agentes de complexação, em diferentes misturas de solventes deuterados, tais como, água, metanol, dimetilsulfóxido, acetona e acetonitrila usando HR DOSY.²³

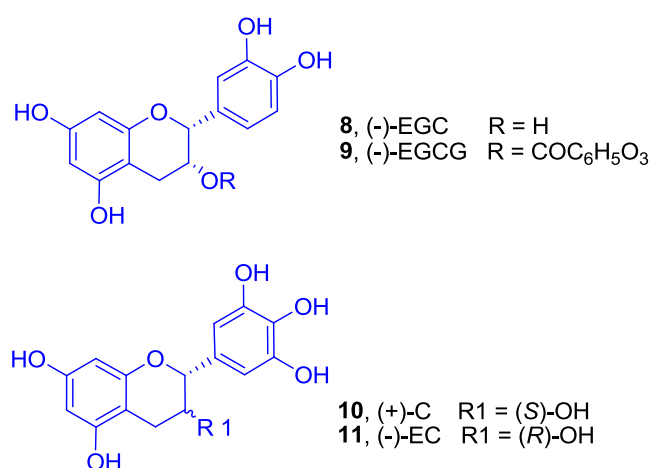


Figura 16. Estruturas de (+)-catequina ((+)-C), (-)-epicatequina ((-)-EC), (-)-epigalocatequina ((-)-EGC) e (-)-epigalocatequina-3-galato ((-)-EGCG).

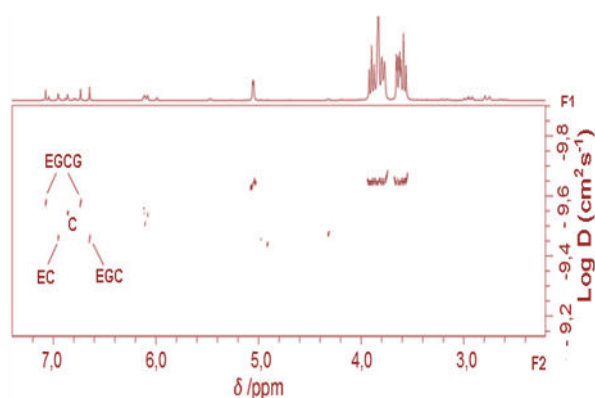


Figura 17. Espectro HR DOSY (400 MHz, 15% CD₃CN–85% D₂O), das catequinas representadas na Figura 16. Foi preparada uma solução de 2 mM de cada analito, misturados com 8 mM de β -CD. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2009 Royal Society of Chemistry (RSC)²³

Foi observada uma variação na difusão dos analitos nos dois casos. A análise com BSA nas diferentes misturas de solventes deuterados mostraram baixa resolução espectral; entretanto na presença de β -CD e acetonitrila como co-solvente (15 % CD₃CN - 85 % D₂O (v/v)), foi obtida uma melhor resolução das catequinas, como mostrado no espectro da **Figura 17**. Foi determinado que a força da ligação entre β -CD e as catequinas obedece ao seguinte ordem: C > EGCG > EC > EGC.

4.5. Interações com fases quirais

A análise de misturas racêmicas pelo uso de auxiliares quirais²⁴⁻²⁵ foi realizada por Uccello-Barreta e cols., por detecção do grau de imobilização direta na mistura, devido a interações com auxiliares.²⁶ Foi estudada uma mistura contendo quantidades equimoleculares de enantiômeros dos compostos mostrados na Figura 18, com e sem agente de solvatação quiral (CSA-1), homólogo do seletor quiral CSP-1 usado para produzir fases estacionárias quirais em CLAE e CG (Figura 19).

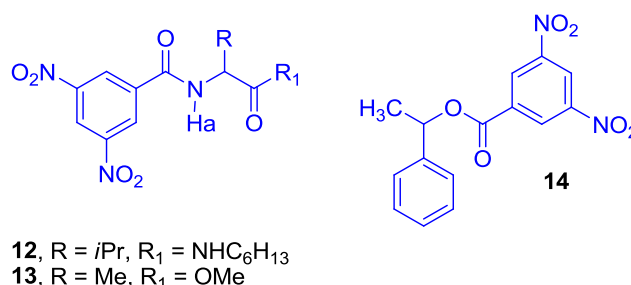


Figura 18. Mistura racêmica de compostos analisada por Uccello-Barret e cols.²⁶

Os enantiômeros do composto (**14**) na **Figura 18** apresentaram o menor coeficiente de difusão, sem discriminação enantiômérica. Porém, com os enantiômeros dos analitos (**12**) e (**13**), foi obtido uma boa resolução como pode ser observado no fragmento do espectro DOSY correspondente aos hidrogênios na posição orto do 3,5-dinitrofenil na Figura 20.

O estudo mostrou que o uso de seletos enantioseletivos, empregados em CLAE ou CG, podem constituir a base de um bom agente complexante em RMN, oferecendo alternativas eficazes para enantioseparação cromatográfica de compostos. Isto

pode ser notavelmente atraente, tendo em conta a velocidade e os custos envolvidos: alguns miligramas dos compostos quirais, dissolvidos em menos de 1 ml de solvente deuterado, que podem ser analisados em poucos minutos num espectro de ^1H RMN de rotina.

Os auxiliares CSP-1 (**15**) e CSA-1 (**16**) têm

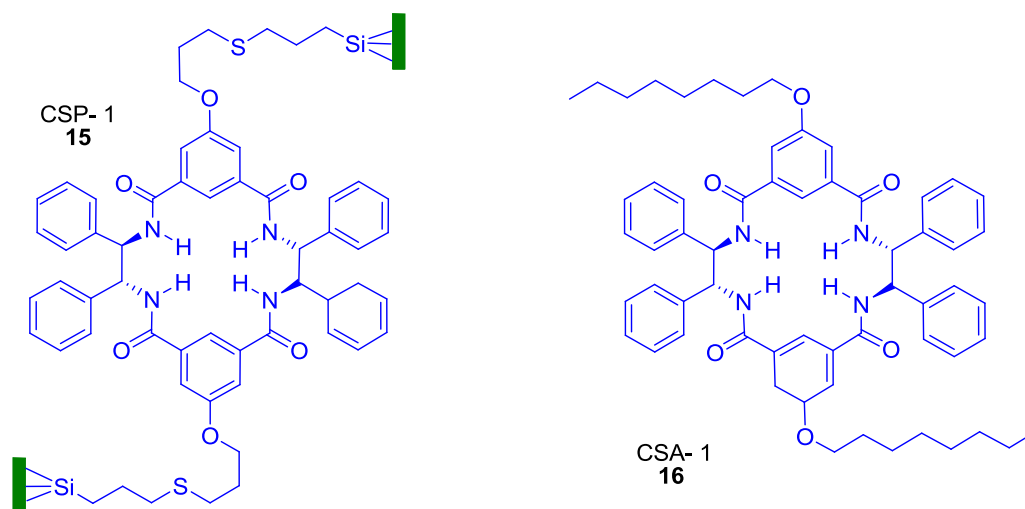


Figura 19. Estruturas dos auxiliares quirais CSP-1, CSA-1

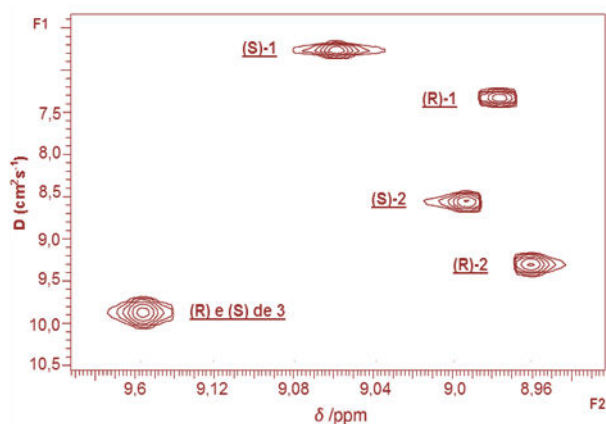


Figura 20. Expansão do espectro ^1H DOSY (600 MHz, CDCl_3 , 25 °C) dos enantiômeros dos compostos **12**, **13** e **14** da Figura 18. Foi preparada uma solução de 3,6 mg (de cada analito), misturados e dissolvidos em 0,6 ml de CDCl_3 , com o auxiliar quiral CSA 1. Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2005 Elsevier²⁶

linalol (LIN) (Figura 21), através de um gel polissacarídeo como a carragenina.²⁷

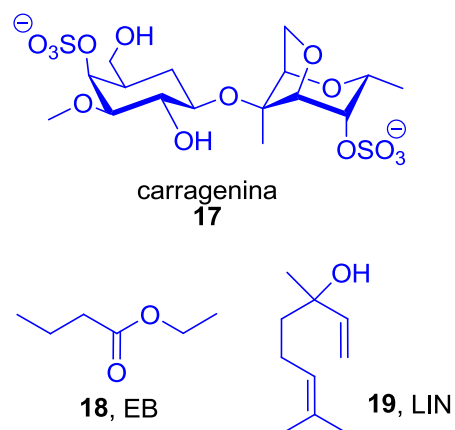


Figura 21. Estruturas dos compostos estudados por Gostan e cols.: butanoato de etila (EB), linalol (LIN) e carragenina²⁷

4.6. Interações com ânions

O trabalho desenvolvido por Gostan e cols. mostrou a importância dos coeficientes de difusão na percepção de aroma dos alimentos. Os autores analisaram a difusão do benzoato de etila (EB) e

Mediante o uso desta técnica, foi evidenciado que o coeficiente de difusão do EB é maior do que o LIN no gel carragenina (Figura 22 e Figura 23). A pesquisa determinou o coeficiente de difusão de dois compostos responsáveis pelo aroma, butanoato de etila ($\cong 940 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) e linalol ($\cong 670 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$), em matrizes de carragenina em baixas concentrações

(1%) e em alguns diferentes estados de gelificação, demonstrando que a presença de polissacarídeos, como a carragenina, nos produtos alimentares podem modificar a libertação do aroma e por isso a percepção do sabor. A análise chama atenção para a

importância do estudo de modelos de difusão nos alimentos, a fim de elucidar se esta mudança se deve à alteração nas propriedades de difusão e/ou um efeito cognitivo.

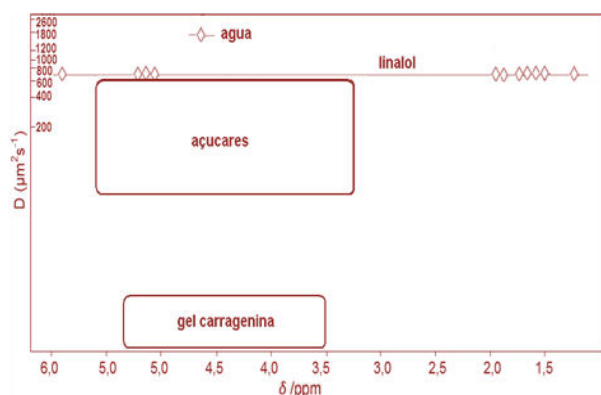


Figura 22. Representação do espectro ^1H DOSY (600 MHz, D_2O , 303 K) de uma mistura de linalol e carragenina. Foi preparada uma solução de 50 $\mu\text{l/l}$ do analito com 1% p/p de carragenina e 0,3 % p/p de NaCl em 0,6 ml de D_2O . Adaptado da referência²⁷

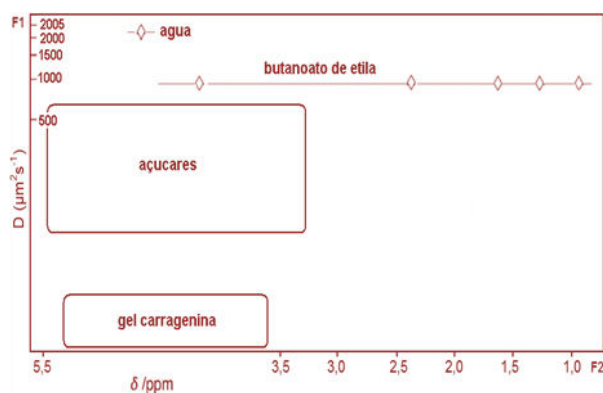


Figura 23. Representação do espectro ^1H DOSY (600 MHz, D_2O , 303 K) de uma mistura de butanoato de etila e carragenina. Foi preparada uma solução de 50 $\mu\text{l/l}$ do analito com 1 % p/p de carragenina e 0,3 % p/p de NaCl em 0,6 ml de D_2O . Adaptado da referência²⁷

4.7. Formação de complexos com cátions

A formação de complexos na presença de cátions lantanídeos com açúcares redutores em meio aquoso foi explorada por Diaz e cols., como uma ferramenta para distinguir entre as estruturas em equilíbrio de piranoses, furanoses e compostos acíclicos coexistentes num açúcar redutor como a D-ribose (Figura 24).²⁸ Pelo experimento DOSY foi possível distinguir entre as formas tautoméricas complexadas e não complexadas da D-ribose, devido às diferenças nos seus respectivos coeficientes de difusão (Figura 25).

A menor difusão foi atribuída às espécies complexadas por causa do aumento em tamanho e peso molecular, quando comparado com a forma não complexada.

Portanto, misturas de açúcares do mesmo peso molecular e também os isômeros de um único monossacarídeo podem ser "separados" com base nas suas diferentes tendências para formar complexos com diferentes valores do coeficiente de difusão. A resolução do DOSY está relacionada com o tamanho molecular uma vez que, segundo a equação Stokes-Einstein, o coeficiente de difusão de uma molécula é inversamente proporcional ao raio molecular.^{29,30}

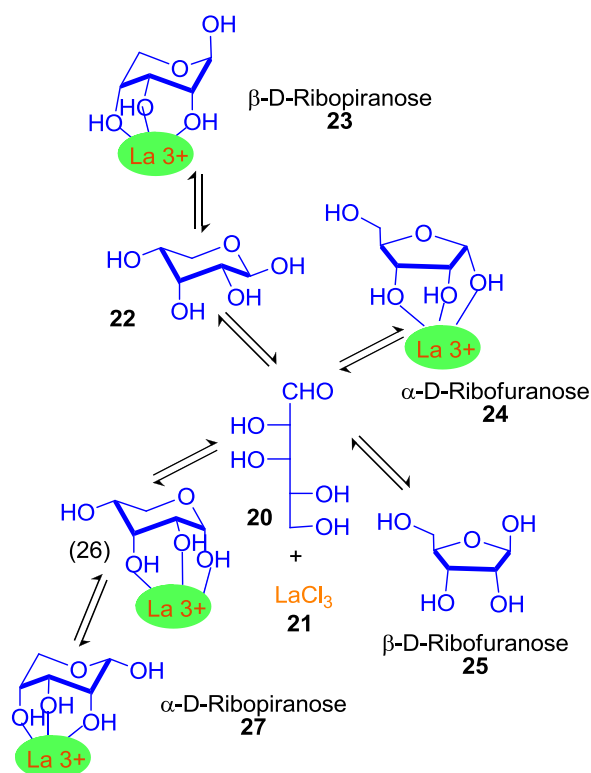


Figura 24. Complexos lantanídeos dos monômeros da D-Ribose

No trabalho foi mostrado qualitativamente que, embora a formação de complexos seja um processo dinâmico, dependendo da posição axial e equatorial das hidroxilas nos tautômeros (Figura 24), o

experimento DOSY pode ser bem sucedido, já que a difusão observada é a média dos coeficientes das populações em equilíbrio complexadas e não complexadas. A diferença relativa entre as formas tautoméricas é comparável aos resultados obtidos por CCD, na presença de cátions lantanídeos, mas de uma forma simples e com maior informação ao nível estrutural. As diferenças no coeficiente de difusão após a adição de LaCl_3 tornam as espécies na mistura distinguíveis, embora o método não forneça uma separação física (Figuras 25 e 26).

No entanto, no espectro DOSY não foi possível a separação da furanose e piranose complexadas. Além

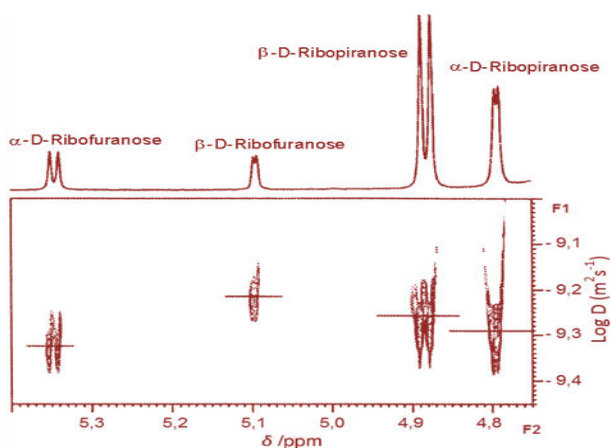


Figura 25. Região anomérica do espectro ^1H DOSY (400 MHz, D_2O), de uma mistura de complexos lantanídeos de monômeros de D-Ribose, em solução aquosa com LaCl_3 (relação molar de ribose: LaCl_3 de 1:0.5). Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2000 Elsevier²⁸

disso, houve pouca diferença na difusão dos componentes individuais. Contudo, a adição de LaCl_3 mudou os coeficientes de difusão porque só alguns dos isômeros são complexados (D-ribose e D-alose), enquanto os seus respectivos homólogos na mistura binária não o são (D-arabinose e D-glicose).

Os monossacarídeos redutores foram divididos entre espécies que favorecem a formação do complexo, por exemplo, D-ribose ou D-alose e as que não favorecem, como por exemplo, D-arabinose, D-glicose ou D-galactose, dependendo da geometria do tautômero.

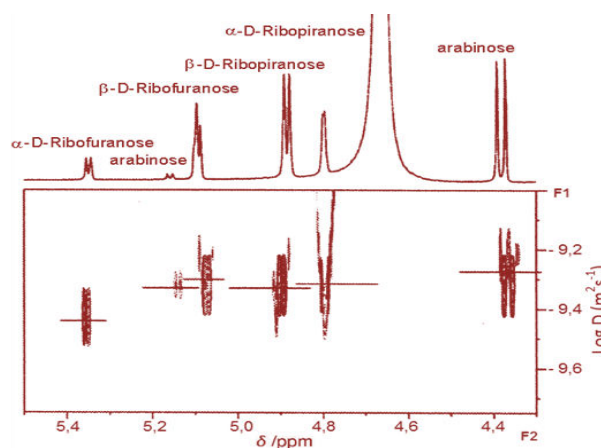


Figura 26. Região anomérica do espectro ^1H DOSY (400 MHz, D_2O), de uma mistura de complexos lantanídeos de monômeros de D-Arabinose e D-Ribose, em solução aquosa com LaCl_3 (relação molar de arabinose:ribose: LaCl_3 de 1:1:2). Reproduzidos com permissão da referência citada. Copyright© 2000 Elsevier²⁸

5. Conclusões

A técnica de CCD-RMN proporciona uma excelente alternativa analítica na área de alimentos, química sintética e farmacêutica, para a resolução, identificação e caracterização de misturas com o uso de aditivos. É uma análise rápida e versátil, restrita às diferenças significativas do coeficiente de difusão, já que não há separação física efetiva das misturas, como foi demonstrado no presente artigo.

O reduzido número de trabalhos publicados neste campo abre as portas para futuras pesquisas inovadoras, em um grande número de combinações entre os diversos surfactantes, polímeros, aditivos quirais e solventes, comercialmente disponíveis.

Agradecimentos

Ao apoio das agências de fomento CNPq (bolsa L.G.V.G.), CAPES e FAPERJ.

Referências Bibliográficas

- Peré-Trepat, E.; Lacorte, S.; Tauler, R. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *595*, 228. [[CrossRef](#)]
- Sommer, U.; Herscovitz, H.; Welty, F. K.; Costello, C. E. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 804. [[CrossRef](#)]
- Huo, R.; Wehrens, R.; Duynhoven, J. V.; Buydens, L. M. C. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *490*, 231. [[CrossRef](#)]
- Carapito, C.; Klemm, C.; Aebersold, R.; Domon, B. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 2608. [[CrossRef](#)]

- ⁵ Carrara, C.; Viel, S.; Delaurent, C.; Ziarelli, F.; Excoffier, G.; Caldarelli, S. *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 303. [CrossRef]
- ⁶ Price, K. E.; Lucas, L. H.; Larive, C. K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1405. [CrossRef]
- ⁷ Kavakka, J. S.; Kilpeläinen, I.; Heikkinen, S. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1349. [CrossRef]
- ⁸ Loh, W. *Quím. Nova* **1997**, *20*, 541. [CrossRef]
- ⁹ de Souza, A. A.; JR, A. L. *Quím. Nova* **2002**, *25*, 1022. [CrossRef]
- ¹⁰ de Souza, A. A.; Marsaioli, A. J.; Ferreira, A. G.; Jr, A. L.; Fujiwara, F. Y.; Figueiredo, I. M.; Vizzotto, L.; Fernandez, S. A; *Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear: Difusão por RMN*, AUREMN: Rio de Janeiro, 2009.
- ¹¹ Morris, K. F., Johnson, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139. [CrossRef]
- ¹² Price, W. S. *Concepts in Magn. Reson.* **1997**, *9*, 299. [CrossRef]
- ¹³ Price, W. S. *An. Rep. NMR Spectrosc.* **1996**, *32*, 51. [CrossRef]
- ¹⁴ Kaiser, C. R. *Quím. Nova* **2000**, *23*, 231. [CrossRef]
- ¹⁵ Maniasso, N. *Quím. Nova* **2001**, *24*, 87. [CrossRef]
- ¹⁶ Zielinski, M. E.; Morris, K. F. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 53. [CrossRef]
- ¹⁷ Evans, R.; Haiber, S.; Nilsson, M.; Morris, G. A. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4548. [CrossRef]
- ¹⁸ Wu, D.; Chen, A.; Jr., C. S. *J. Magn. Reson.* **1996**, *123*, 215. [CrossRef]
- ¹⁹ Morris, K. F.; Stilbs, P.; Johnson Jr., C. S. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 211. [CrossRef]
- ²⁰ Hodge, P.; Monvisade, P.; Morris, G. A.; Preece, I. *Chem. Commun.* **2001**, *2001*, 239. [CrossRef]
- ²¹ Palermo, L. T.; Sanchez, E. M. S.; Felisberti, M. I.; *Anais do 14^a Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, São Pedro, 2000. [link]
- ²² Bühler, V., Polyvinylpyrrolidone Excipients for pharmaceuticals Povidone, Crospovidone and Copovidone Page. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/Content/h77741/#section=556683&page=1&locus=85>>. Acessado em: 25 Outubro 2010.
- ²³ Xu, J.; Tan, T.; Kenne, L.; Sandstro, C. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1057. [CrossRef]
- ²⁴ Bonato, P. S.; Jabor, V. A. P.; De Gaitani, C. M. *Quím. Nova* **2005**, *28*, 683. [CrossRef]
- ²⁵ Singh, A. K.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; Santoro, M. I. R. M. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2006**, *42*, 553. [link]
- ²⁶ Uccello-Barretta, G.; Balzano, F.; Martinelli, J.; Berni, Margherita-Giulia; Villani, C.; Gasparrini, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3746. [CrossRef]
- ²⁷ Gostan, T.; Moreau, C.; Juteau, A.; Guichard, E.; Delsuc, Marc-André. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 496. [CrossRef]
- ²⁸ Díaz, M. D.; Berger, S. *Carboh. Res.* **2000**, *329*, 1. [CrossRef]
- ²⁹ Cappelezzo, M.; Capellari, C. A.; Pezzin, S. H.; Coelho, L. A. F. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 224516. [CrossRef]
- ³⁰ Sharma, M.; Yashonath, S. *Diff. Fund.* **2007**, *7*, 11.1. [Link]