

## PRÁCTICA I.2

### DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES HIDROFÓBICAS DE SUBSTITUINTES DE SULFONAMIDAS POR MEIO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA EM FASE REVERSA

### DETERMINATION OF HYDROPHOBIC CONSTANTS OF SULFONAMIDE SUBSTITUENTS BY REVERSED-PHASE THIN- LAYER CHROMATOGRAPHY

Maria Auxiliadora Fontes Prado

*Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Produtos*

*Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de*

*Minas Gerais, Av. Olegário Maciel, 2360-31180-112, Belo Horizonte,*

*Brasil*

*E-mail: doraprad@dedalus.lcc.ufmg.br*

#### INTRODUÇÃO

A relação entre a estrutura química e atividade biológica (REA, “SAR”) das substâncias pode ser determinada de maneira qualitativa. O estudo da relação entre estrutura e atividade pode ser feito também de maneira quantitativa (REAQ, “QSAR”), sendo que neste caso, os efeitos eletrônicos ( $\sigma$ , estereoquímicos ( $E_s$ ) e de solubilidade ( $\pi$ ) dos grupos funcionais (substituintes) presentes na estrutura do fármaco são medidos e relacionados à atividade por meio de modelos matemáticos. Estudos de “QSAR” possibilitam explicar de forma quantitativa a relação entre a estrutura química e atividade biológica e planejar modificações moleculares de forma a se obter fármacos com vantagens sobre o protótipo.

De todos os parâmetros físico-químicos, o coeficiente de partição ( $P$ ) tem sido o mais utilizado nos estudos de QSAR, uma vez que este parâmetro influencia, efetivamente, nas propriedades farmacocinéticas e permite avaliar a possibilidade de formação de ligações hidrofóbicas com os receptores. A contribuição dos diversos substituintes na

relação lipo/hidrossolubilidade das moléculas é medida e denominada constante hidrofóbica, ou constante lipofílica ou constante de Hansch ( $\pi$ ).

Hansch e colaboradores [1] determinaram que  $\pi$  de um substituinte X corresponde à diferença dos logaritmos dos coeficientes de partição óleo/água ( $P$ ) de uma substância de estrutura RX e de uma substância de estrutura RH.

$$\pi_x = \log \frac{P_{RX}}{P_{RH}} = \log P_{RX} - \log P_{RH}$$

Significa que para se calcular o valor de  $\pi$ , ou seja, avaliar a influência do substituinte X no coeficiente de partição é preciso determinar experimentalmente os coeficientes de partição de RX e RH. Do ponto de vista experimental a determinação do coeficiente de partição é, na maioria dos casos, trabalhosa e exige o uso de métodos sofisticados.

Em 1965, Boyce and Milborrow [2] observaram uma correlação entre o coeficiente de partição das substâncias e os respectivos valores do parâmetro cromatográfico  $Rm$ . Estes autores encontraram que a diferença dos valores de  $Rm$  da substância RX e RH corresponde à constante hidrofóbica do substituinte X ( $\pi$ ).

$$\pi_x = Rm_{RX} - Rm_{RH}$$

O valor de  $Rm$  é calculado com base no valor de  $Rf$  em cromatografia em camada delgada em fase reversa (fase estacionária hidrofóbica, fase móvel polar; as substâncias menos polares interagem mais efetivamente com a fase estacionária, portanto, as substâncias menos polares permanecem mais retidas, apresentando  $Rf$  menor que as mais polares), utilizando a seguinte expressão:

$$Rm = \log \left( \frac{1}{Rf} - 1 \right)$$

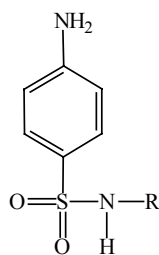
Segundo Biagi e colaboradores [3], para substâncias ácidas e básicas o valor de  $Rm$  deve ser corrigido, acrescentando-se o valor da expressão  $\log \left\{ \frac{Ka + [H^+]}{[H^+]} \right\}$ , onde  $Ka$  é a constante de acidez e  $[H^+]$  é a concentração em mol/L de íons  $H^+$  na fase móvel. Portanto, para ácidos e bases:

$$Rm = \log \left( \frac{1}{Rf} - 1 \right) + \log \left( \frac{Ka + [H^+]}{[H^+]} \right)$$

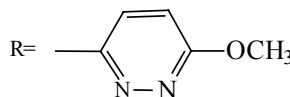
Assim, utilizando um método simples, rápido e barato, cromatografia em camada delgada em fase reversa, é possível determinar a constante hidrofóbica de uma série de substituintes.

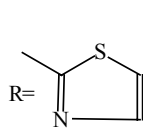
## OBJETIVO

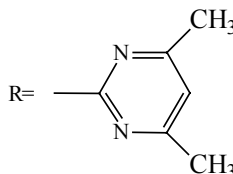
Determinar as constantes hidrofóbicas dos substituintes de três sulfonamidas, por meio de cromatografia em camada delgada em fase reversa, e com base nos valores encontrados e no valor do coeficiente de partição da sulfanilamida calcular os coeficientes de partição das três sulfonamidas.



R= H sulfânilamida 1  
pKa= 10,45

R=  sulfameto xipiridazina 3  
pKa= 7,05

R=  sulfâtiazol 2  
pKa= 7,10

R=  sulfametazina 4  
pKa= 7,70

## TÉCNICA

Referências bibliográficas básicas: G. L. Biagi, A. M. Barbaro, M. C. Guerra, G. C. Forti, M. E. Fraccasso. *J. Med. Chem.* **17**, 28 (1974); M. A. F. Prado. *J. Chem. Educ.* **78**, 533 (2001).

- Fase estacionária: sobre 12 placas de vidro de  $9 \times 4,5$  cm colocar suspensão preparada pela agitação vigorosa de 6 g de sílica gel G para cromatografia em camada fina e 15 mL de água destilada, de forma que se tenha espessura de 0,25 mm; secar à temperatura ambiente; secar em estufa a  $120\text{ }^\circ\text{C}$  durante, no mínimo, 30 minutos; resfriar à temperatura ambiente; imergir as placas, cuidadosamente, em uma solução a 5 % v/v de n-octanol em éter etílico; secar à temperatura ambiente.
- Fase móvel: solução tampão de pH 7,4 (preparada pela mistura de 50 mL de solução de fosfato biácido de potássio 0,1 mol/L e 39,5 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L).
- A aproximadamente 1 cm da base da placa, aplicar, com auxílio de um capilar, as soluções das sulfonamidas 1, 2, 3, e 4 (4 mg/mL em acetona). Secar e eluir até que a fase móvel atinja altura de cerca de 0.5 cm do topo da sílica. Marcar a linha da fase móvel, secar as placas com auxílio de secador de cabelo e borrifar solução 100/1 de p-dimetilaminobenzaldeído (0,1 % em etanol) e ácido clorídrico concentrado.

## CÁLCULOS

- Calcular os  $R_f$  de cada uma das substância ( $R_f = \text{distância do ponto de aplicação até o centro da mancha} / \text{distância do ponto de aplicação até a linha da fase móvel}$ ).
- Calcular os valores de  $R_m$  para as quatro sulfonamidas.
- Calcular as constantes hidrofóbicas dos substituintes ( $\pi$ ) presentes nas sulfonamidas 2, 3, e 4.
- Considerando que o coeficiente de partição ( $P$ ) da sulfanilamida é 0,15, calcular os coeficientes de partição das sulfonamidas 2, 3, e 4.

**REFERÊNCIAS**

1. P. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita. *Nature* **194**, 178 (1962).
2. C. B. C. Boyce, B. V. Milborrow. *Nature* **208**, 537 (1965).
3. G. L. Biagi, A. M. Barbaro, M. C. Guerra, G. C. Forti, M. E. Fraccasso. *J. Med. Chem.* **17**, 28 (1974).

**Maria Auxiliadôra Fontes Prado**

*doraprad@dedalus.lcc.ufmg.br*

O trabalho em laboratórios de Química Medicinal requer cuidado e uso de boas práticas de laboratório. O manuseio de instrumentos eletrônicos, a utilização de calor, o uso de vidrarias e de solventes não representam problemas especiais, desde que sejam seguidas, de forma cuidadosa, as instruções do supervisor.

Este documento foi supervisionado pelo Prof. Maria Auxiliadôra Fontes Prado (doraprad@dedalus.lcc.ufmg.br) que informou sobre a inexistência de riscos específicos na realização deste exercício (e.g., toxicidade, inflamabilidade, riscos de explosão, etc.), fora aqueles comuns a execução de toda e qualquer prática em laboratórios de Química Medicinal.

Se seu exercício ou prática envolver qualquer risco específico, favor informar ao Editor.

## EXERCISE I.2

### DETERMINATION OF LIPOPHILICITY SUBSTITUENT CONSTANTS OF SULFONAMIDES BY MEANS OF REVERSED- PHASE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Maria Auxiliadôra Fontes Prado

*Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Produtos*

*Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de*

*Minas Gerais, Av. Olegário Maciel, 2360-31180-112, Belo Horizonte,*

*Brasil*

*E-mail: doraprad@dedalus.lcc.ufmg.br*

#### INTRODUCTION

The partition coefficient ( $P$ ) is one of the most important factors in controlling drug action in biological systems. Hansch and coworkers [1] derived substituent constants for the contribution of individual atoms or groups to the partition coefficient, the lipophilicity (or hydrophobicity, or Hansch) constant ( $\pi$ ). This is defined as the  $\log P_{RX} - \log P_{RH}$  (eq. 1), where  $P_{RX}$  and  $P_{RH}$  are the partition coefficients, determined in system 1-octanol-water, of substituted and unsubstituted compounds, respectively. Thus, the constant  $\pi$  indicates the change in the logarithm of the partition coefficient resulting from the introduction of a substituent  $X$ .

$$\pi_x = \log \frac{P_{RX}}{P_{RH}} = \log P_{RX} - \log P_{RH}$$

where  $P_{RX}$  = partition coefficient of  $RX$ ,  $P_{RH}$  = partition coefficient of  $RH$ .

The  $\pi$  values for many substituent groups were directly measured for a variety of drugs and used in order to calculate the partition coefficient of other compounds. However, the direct determination of partition coefficient is tedious and often presents practical difficulties, particularly when the compound is highly insoluble in either of the solvent phases. In order to avoid these practical difficulties, Boyce and Milborrow [2] had proposed the chromatographic  $Rm$  value as an expression of lipophilic character of molecules. The  $Rm$  is calculated using the  $Rf$  value determined by means of reversed-phase thin-layer chromatography. Equation 2 is used to calculate the  $Rm$  value for neutral substances and eq. 3 for acids and bases [3]. The change in the value of  $Rm$  ( $Rm_{RX} - Rm_{RH}$ ) for a substituent is a free-energy-based constant identical with  $\pi$  used by

Hansch (eq. 4).

$$Rm = \log\left(\frac{1}{Rf} - 1\right) \quad (2)$$

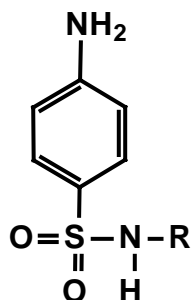
$$Rm = \log\left(\frac{1}{Rf} - 1\right) + \log\left(\frac{Ka + [H^+]}{[H^+]}\right) \quad (3)$$

where  $Ka$  = dissociation constant,  $[H^+]$  = hydronium ion concentration of the mobile phase

$$\pi_x = Rm_{RX} - Rm_{RH} \quad (4)$$

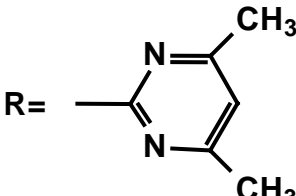
The simple laboratory activity described here (reverse-phase thin-layer chromatography of antibacterial drugs, the sulfonamides) offers an opportunity to show the differences between the normal and reverse-phase thin-layer chromatography and introduces a new chromatographic parameter, the  $Rm$ . By means of this experiment, it is possible to determine  $\pi$  values of three substituent groups present in the structures of sulfonamides and calculate the partition coefficient of the compounds.

**R= H sulfanilamide pKa= 10,45**



**R=  sulfamethoxypyridazine pKa= 7,05**

**R=  sulfathiazole pKa= 7,10**

**R=  sulfamethazine pKa= 7,70**

## EXPERIMENTAL

Basic references: G. L. Biagi, A. M. Barbaro, M. C. Guerra, G. C. Forti, M. E. Fraccasso. *J. Med. Chem.* **17**, 28 (1974); M. A. F. Prado. *J. Chem. Educ.* **78**, 533 (2001).

- Stationary phase: Mix 6 g of silica gel with 15 mL of water, shake, coat the plates (12 glass plates measuring 9 × 4.5 cm; 0.25 mm), dry at room temperature, heat in oven at 120 °C for 4 h, and cool at room temperature. A stationary nonpolar phase is obtained by impregnation of the silica gel layer with a 5 % 1-octanol in ethyl ether. The impregnation is carried out by immersion of the plates in the solution. The silica

- gel layer is removed at 3 mm from each lateral edge and 1 cm from the high edge.
- Mobile phase: An aqueous buffer at pH 7.4 (mixture of 50 mL of 0.1 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution and 19.5 mL of 0.1 mol/L sodium hydroxide solution).
  - Samples: The sulfonamides (sulfanilamide, sulfathiazole, sulfamethazine, and sulfamethoxypyridazine) are dissolved in acetone (10 mg in 25 mL).
  - Chromatography: The solutions of sulfonamides are spotted on a line 1 cm from the lower edge of the plate using a glass capillary. The plate is left in the chromatographic chamber until the mobile phase reaches the end of the stationary layer.
  - Revelation: The developed plate is dried with hot air, and the spots appear by spraying the plate with a solution prepared by adding 1 mL of concentrated hydrochloridric acid to 100 mL of 0.1 % *p*-dimethylaminebenzaldehyde solution in ethanol.

### CALCULATIONS

- Calculate the *R<sub>f</sub>* value of each sulfonamide.
- Calculate the *R<sub>m</sub>* value of each sulfonamide.
- Calculate the lipophilicity substituent constant ( $\pi$ ) of substituent groups of sulfathiazole, sulfamethazine, and sulfamethoxypyridazine.
- The partition coefficient of sulfanilamide is 0.15. Calculate the partition coefficient of sulfathiazole, sulfamethazine, and sulfamethoxypyridazine.

### REFERENCES

1. P. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita. *Nature* **194**, 178 (1962).
2. C. B. C. Boyce, B. V. Milborrow. *Nature* **208**, 537 (1965).
3. G. L. Biagi, A. M. Barbaro, M. C. Guerra, G. C. Forti, M. E. Fraccasso. *J. Med. Chem.* **17**, 28 (1974).

**Maria Auxiliadôra Fontes Prado**

doraprad@dedalus.lcc.ufmg.br

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories. The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. Maria Auxiliadôra Fontes Prado) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions),

outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.