



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Físico-Química

Dissertação de Mestrado

**ENCAPSULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
ESTUDO TEÓRICO DO FÁRMACO TIABENDAZOL EM
 β -CICLODEXTRINA**

GUILHERME LIONELLO ALEXANDRINO

Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

Campinas – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

AL27e Alexandrino, Guilherme Lionello.
Encapsulação, caracterização físico-química e estudo
teórico do fármaco tiabendazol em beta-ciclodextrina /
Guilherme Lionello Alexandrino. -- Campinas, SP: [s.n],
2011.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira
Pessine.

Mestrado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Tiabendazol. 2. Beta-ciclodextrina. 3. Complexos
de inclusão. I. Pessine, Francisco Benedito Teixeira.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Encapsulation, physico chemical characterization and theoretical
study of drug thiabendazole in beta-cyclodextrin

Palavras-chaves em inglês: Thiabendazole, Beta-cyclodextrin, Inclusion complexes

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (orientador), Prof.
Dr. Leonardo Fernandes Fraceto (DEA-UNESP), Prof. Dr. Edvaldo Sabadini (IQ-
UNICAMP)

Data de defesa: 21/07/2011

*“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para
atravessar o rio da vida - ninguém, exceto tu, só tu.
Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semideuses que se
oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu
te hipotecarias e te perderias.
Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar.
Onde leva? Não perguntes, segue-o!”*

F. Nietzsche

A todas as pessoas que me ajudaram, apoiaram e acreditaram no êxito deste trabalho.

Agradecimentos

O autor é muito grato a todas as pessoas que contribuíram das mais diversas maneiras para a realização desta dissertação, tenha sido ela no âmbito científico, através de críticas e opiniões, quanto no pessoal, em que as grandes amizades tornam nossas vidas muito mais satisfatórias.

Aos meus pais e familiares, pelo incentivo e constante apoio nas minhas escolhas e decisões.

Ao prof. Francisco Pessine, pela constante orientação, receptividade e, principalmente, por acreditar no compromisso e determinação dos alunos no laboratório.

Ao pessoal do laboratório: Milene, Adriana, Débora, Marcelo, Andreza, Ana Claudia e Simone, com as quais cultivei grandes amizades e me proporcionaram ótimos momentos e alegrias.

Ao prof. Nelson H. Morgon, pela orientação e disposição em me ensinar a trabalhar com cálculos teóricos.

Um agradecimento especial para a mais nova doutora Adriana Calderini, pelo valor inestimável de nossa amizade, esta que começou graças a sua grande disposição em me auxiliar nos experimentos de RMN, estes por mim considerados um dos mais importantes deste trabalho.

Ao CENAPAD-SP, por ceder sua infra-estrutura computacional para a realização dos cálculos teóricos.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

Ao IQ-UNICAMP, pelo apoio institucional, o qual considero uma das peças fundamentais para meu desenvolvimento como pesquisador.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nome: Guilherme Lionello Alexandrino

RG: 43689550-X

Data de nascimento: 07/02/1986

Naturalidade: Itápolis-SP

Estado civil: Solteiro

Email: alexandrinogl@gmail.com

Formação Acadêmica

Bacharelado em Química Tecnológica (Março/2004 – Julho/2009)

Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP Campinas (SP)

Experiência Profissional

Estágio em Pesquisa e Desenvolvimento (Fevereiro/2008 – Dezembro/2008)

Empresa: Elekeiroz S.A

Projeto: Desenvolvimento de metodologia experimental e de análise química para recuperação *in-situ* de catalisador de hidroformilação de olefinas em escala bancada

Atividades Acadêmicas

- ***Iniciação Científica (Julho/2005 – Dezembro/2007)***

Projeto: Reatividade do catalisador Rh:BINAP na hidrogenação assimétrica da olefina 2-metil-2-pentenal

Orientadora: Prof. Dr^a Regina Buffon (Departamento de Química Inorgânica)

Instituição Financiadora: PIBIC/CNPq

- **Trabalhos científicos apresentados em congressos**

1. ALEXANDRINO, G. L.; BUFFON, R.

Reatividade do catalisador Rh:BINAP na hidrogenação assimétrica da olefina α - β -insaturada (apresentação de pôster)

31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008 – Águas de Lindóia (SP)

2. ALEXANDRINO, G.L.; PESSINE, F. B. T.

Encapsulação do fármaco Tiabendazol em β -Ciclodextrina: caracterização por espectroscopia de fluorescência (apresentação de pôster)

33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010 – Águas de Lindóia (SP)

3. ALEXANDRINO, G.L.; PESSINE, F.B.T.

Encapsulação de Tiabendazol em β -Ciclodextrina: caracterização espectroscópica e estudo teórico (apresentação de pôster)

2º Encontro sobre Estruturas Auto-Organizadas em Solução e Interfaces, 2010 – São Pedro (SP)

4. ALEXANDRINO, G.L.; PESSINE, F.B.T.

Encapsulation of Thiabendazole in β -Cyclodextrin: Spectroscopic Characterization and Theoretical Study (apresentação oral)

Segunda Escuela de Nanomedicinas, 2010 – La Plata (ARG)

5. ALEXANDRINO, G.L.; PESSINE, F.B.T.

Estudo sobre interações entre o fármaco Thiabendazol e β -Ciclodextrina por espectroscopias de fluorescência, RMN-¹H e cálculos teóricos (apresentação de pôster)

34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011 – Florianópolis (SC)

RESUMO

ENCAPSULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO TEÓRICO DO FÁRMACO TIABENDAZOL EM β -CICLODEXTRINA

Tiabendazol (TBZ) é um fármaco pouco solúvel em água (66 $\mu\text{g/mL}$), derivado do benzimidazol, com ampla aplicação farmacológica, devido a suas propriedades anti-helmíntica, fungicida e bactericida. O aumento em sua solubilidade pode ser atingido preparando complexos de inclusão com Ciclodextrinas (βCD), que são polissacarídeos cíclicos de D-(+)-glicopirranose unidas por meio de ligações glicosídicas α -1,4, cuja estrutura resulta em um ambiente interno hidrofóbico e uma superfície e extremidades hidrofílicas. Neste trabalho, a preparação de complexos de inclusão entre TBZ e βCD foi realizada pelo método de co-precipitação, em duas metodologias que diferiram na etapa de solubilização do TBZ: empregando etanol ou meio ácido com HCl em pH 2.2. Os complexos preparados foram caracterizados no estado sólido, através das técnicas de espectroscopia de absorção no i.v., difratometria de raios-X e análise termogravimétrica. Em solução, a estabilidade termodinâmica do complexo de inclusão TBZ: βCD foi investigada em meios que simulam os fluidos gástrico e intestinal humano, sem enzimas, determinando as constantes de equilíbrio K nas temperaturas 25 (150 ± 31), 37 (85 ± 32) e 45°C (83 ± 23), e as funções termodinâmicas de formação ΔH° (-24 kJ/mol), ΔS° (-39 J/mol.K) e ΔG° (-12,5 kJ/mol), através de dados de espectroscopia de fluorescência. Além disso, a estrutura supramolecular deste complexo em água foi investigada por RMN, a partir de espectros de dados de deslocamento químico em espectros de ^1H e do experimento ROESY-1D, em que o último sugere encapsulação do fármaco através de seu grupo benzimidazol, além da determinação dos coeficientes de difusão e K (49 à 25°C) por DOSY, em D_2O . Os dados experimentais sobre estabilidade termodinâmica e informações estruturais foram confrontados com resultados obtidos de cálculos teóricos de otimização molecular e determinação de energias de conformações e interações, realizados com os métodos quânticos PM3 e DFT (vácuo) e PM6 (meio aquoso)

ABSTRACT

ENCAPSULATION, PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND THEORETICAL STUDY OF DRUG THIABENDAZOLE IN β -CICLODEXTRIN

Thiabendazole (TBZ) is a poorly water soluble drug derived from benzimidazole with wide pharmacological, fungicide and bactericide applicability. The enhancement of its water solubility can be achieved through formation of inclusion complexes with beta-Cyclodextrin (β CD), a cyclic polysaccharide from D-(+)-glucopyranose units linked by α -1,4 chemical bonds, whose structure has a hydrophobic cavity and a hydrophilic surface and extremities. This work involves the preparation of inclusion complexes with TBZ and β CD by the co-precipitation method, using two methodologies for the TBZ solubilization step: with ethanol or HCl medium (pH 2.2). The inclusion complexes were characterized on solid state by infrared spectroscopy, X-ray diffractometry and thermogravimetric analysis. The thermodynamic stability of TBZ: β CD inclusion complex was investigated in human simulated gastric and intestinal fluids but without the respective enzymes. Equilibrium constants K at the temperatures of 25 (150 ± 31), 37 (85 ± 32) and 45°C (83 ± 23), and the thermodynamic functions $\Delta_f H^\circ$ (-24 kJ/mol), ΔS° (-39 J/mol.K) and ΔG° (-12,5 kJ/mol) were evaluated through fluorescence spectroscopy. The supramolecular structure of this complex in aqueous solution was extensively investigated by NMR spectroscopy, based on ^1H chemical shift and ROESY-1D experiments, with the latter one suggesting the drug interacts with the CD through its benzimidazole group. NMR-based experiment DOSY was also employed to get the diffusion coefficients and K (49 at 25°C), in D_2O . Experimental results on thermodynamic stability and structural information were compared with theoretical calculations of TBZ: β CD molecular optimization and determination of conformation and interaction energies of related structures. The calculations of the isolated species, in vacuum, were performed by PM3 and DFT methods, while PM6 method was employed for calculation simulating the aqueous media.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	xxi
Lista de Tabelas	xxv
Lista de Figuras	xxvii

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1) Tiabendazol	1
1.2) Ciclodextrinas	3
1.2.1) Propriedades estruturais e físico-químicas	3
1.2.2) Toxicologia e Metabolismo das CDs	7
1.3) Complexos de inclusão de CDs	8
1.3.1) Influência nas propriedades físico-químicas do ativo e os fenômenos acerca de sua formação	8
1.3.2) Métodos de preparação e caracterização estrutural e físico química	12
1.4) Caracterização dos complexos de inclusão em solução	14
1.4.1) Espectroscopia molecular de fluorescência	14
1.4.2) Aplicação da espectroscopia de fluorescência em solução para estudo de propriedades termodinâmicas de complexos de CDs	17
1.4.3) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	21
1.4.3.1) Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear	21
1.4.3.2) O deslocamento químico (δ)	24
1.4.3.3) Relaxações Longitudinal (T_1) e Transversal (T_2)	25
1.4.3.4) Relaxação dipolar e o efeito Overhauser nuclear (NOE)	26
1.4.3.5) O Experimento ROESY (<u>R</u> otating frame <u>O</u> verhauser <u>E</u> nhancement <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>)	29
1.4.3.6) O Experimento DOSY (<u>D</u> iffusion <u>O</u> rdere <u>d</u> <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>)	30
1.5) Caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido	36
1.5.1) Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)	36

1.5.2) Difração de raios-X (DRX)	38
1.5.3) Análise termogravimétrica (TGA)	40
1.6) Cálculos teóricos	40
1.6.1) Fundamentos da química quântica, aplicações a sistemas multieletrônicos e os orbitais moleculares	40
1.6.2) Cálculos teóricos em nível semiempírico e o método PM3	44
1.6.3) Métodos quânticos <i>ab-initio</i> e a Teoria do Funcional de Densidade (DFT)	48
1.6.4) Aplicações de química quântica a complexos de CDs	51

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

2.1) Objetivos gerais	55
2.2) Objetivos específicos	55

CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL

3.1) Materiais utilizados	57
3.2) Preparação das soluções utilizadas nos experimentos de fluorescência	57
3.2.1) Preparação do meio que simula o fluido intestinal humano	57
3.2.2) Preparação do meio que simula o fluido gástrico	58
3.3) Preparação dos complexos de inclusão	58
3.3.1) Preparação em meio ácido (pH 2,2)	59
3.3.2) Preparação em meio neutro utilizando etanol	59
3.4) Caracterização do complexo de inclusão TBZ:βCD em fase aquosa por espectroscopia de fluorescência	60
3.4.1) Determinação da constante de equilíbrio do complexo de inclusão	60
3.4.2) Determinação da estequiometria do complexo de inclusão	60

3.4.3) Diagrama de solubilidade do complexo de inclusão TBZ:βCD e determinação da constante de equilíbrio segundo modelo de Higushi - Connors	61
3.5) Caracterização do complexo de inclusão TBZ:βCD em fase aquosa e orgânica por espectroscopia de RMN-1H	62
3.5.1) Espectros de 1H das espécies TBZ, βCD e do complexo TBZ:βCD	62
3.5.2) Caracterização estrutural do complexo TBZ:βCD por ROESY-1D	62
3.5.3) Determinação dos coeficientes de difusão das espécies por DOSY	63
3.6) Caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido	63
3.6.1) Análise Termogravimétrica (TGA)	63
3.6.2) Difração de Raios X (DRX)	64
3.6.3) Espectroscopia no IV	64

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Determinação das propriedades termodinâmicas do complexo de inclusão TBZ:βCD por espectroscopia de emissão de fluorescência	65
4.2) Determinação da estequiometria do complexo de inclusão TBZ:βCD em solução: O método de Job	71
4.3) Diagrama de solubilidade do complexos de inclusão TBZ:βCD	73
4.4) Caracterização do complexo de inclusão TBZ:βCD por espectroscopia de ressonância magnética nuclear	78
4.4.1) Espectros de ¹ H do TBZ, βCD e TBZ:βCD por RMN- ¹ H em DMSO-d ₆	78
4.4.2) Caracterização da formação do complexo de inclusão TBZ:βCD pela variação de deslocamento químico (Δδ) em D ₂ O	80
4.4.3) A estrutura de TBZ:βCD em D ₂ O por ROESY-1D (<u>R</u> otating frame <u>O</u> verhauser <u>E</u> nhancement <u>S</u> pectroscopy)	82
4.4.4) Os coeficientes de difusão por DOSY (<u>D</u> iffusion <u>O</u> rdere	

<u>Spectroscop<u>Y</u></u>	85
4.5) Caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido	89
4.5.1) Influência do meio na preparação do complexo de inclusão entre TBZ e β CD	89
4.5.2) Caracterização dos complexos de inclusão por análise termogravimétrica (TGA)	90
4.5.2.1) A curva de TGA e a fusão do TBZ	90
4.5.2.2) A curva de TGA e as transições térmicas da β CD	91
4.5.2.3) A curva de TGA dos complexos de inclusão	93
4.5.3) Caracterização dos complexos de inclusão por espectroscopia no i.v	96
4.5.4) Caracterização dos complexos de inclusão por Difração de raios-X	99
4.6) Estudo teórico por métodos quânticos do complexo TBZ: β CD	102
4.6.1) Otimização estrutural do complexo TBZ/ β CD, no vácuo, pelo método PM3	104
4.6.2) Otimização estrutural do complexo TBZ/ β CD, simulando meio aquoso, pelo método PM6 e o algoritmo COSMO	109
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	115
CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

Lista de Abreviaturas

Sigla	Nome
α CD	alfa-Ciclodextrina
β CD	beta-Ciclodextrina
γ CD	gama-Ciclodextrina
Δ (PM3 – Cris.)	Variação dos valores obtidos pelo método PM3 e experimentalmente por cristalografia
ΔF	Variação da intensidade de fluorescência
$\Delta\delta$	Variação de deslocamento químico
$\Delta E_{\text{def}}X$	Variação de energia de deformação da espécie X
ΔE_f	Variação de energia de formação
ΔE_{int}	Variação de energia de interações
ΔH_{def}	Variação de entalpia de deformação
ΔH_f	Variação de entalpia de formação
ΔH_{int}	Variação de entalpia de interação
Φ_{ativo}	Rendimento quântico de fluorescência do ativo isolado
$\Phi_{\text{ativo:CD}}$	Rendimento quântico de fluorescência do ativo no complexo de inclusão com a CD
[ativo:CD]	Concentração molar do complexo de inclusão do ativo com a CD
[ativo]	Concentração molar do ativo isolado
[CD]	Concentração molar de CD
[TBZ.HCl]	Concentração molar de TBZ.HCl
AM1	Austin Model 1
$B_1(xy)$	Campo magnético B_1 aplicado no plano xy

C2	Carbono número 2 das CDs
C3	Carbono número 3 das CDs
CDs	Ciclodextrinas
CGT	Enzima Glucosiltransferase
CNDO	Completa negligência de orbitais diferenciais
D	Coeficiente de difusão molecular
$D_{CD-observ.}$	Coeficiente de difusão da CD isolada em solução
D_{compl}	Coeficiente de difusão do ativo na forma de complexo de inclusão com CD em solução
DFT	Teoria do funcional de densidade
DIMEB	β CD dimetilada
D_{livre}	Coeficiente de difusão do ativo isolado em solução
DMSO-d6	Dimetilsulfóximo com 6 átomos de deutério
DOSY	“Diffused Ordered Spectroscopy”
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
F_{ativo}	Intensidade de fluorescência emitida pelo ativo isolado
$F_{ativo:CD}$	Intensidade de fluorescência emitida pelo ativo no complexo de inclusão com CD
FE MO	Orbital Molecular do Elétron Livre
FID	“free induction decay”
G	Gradiente de campo magnético estático
GTFs	Funções do tipo Gaussiana
HF	Hartree – Fock
HMO	Orbitais Moleculares de Hückel
HP β CD	Hidroxipropil- β CD

$H\psi(r, t)$	Operador Hamiltoniano aplicado à função de onda $\psi(r, t)$
i.v.	Infra-vermelho
INDO	Orbitais diferenciados negligenciados intermediário
$K_{1:1}$	Constante de equilíbrio ativo:CD 1:1 em mol
$K_{1:1}(\text{DOSY})$	Constante $K_{1:1}$ obtida do experimento DOSY
K-S	Kohn e Shan
LDA	Aproximação de densidade local
LSDA	Aproximação de densidade local de spin
MINDO/1	Orbitais diferenciados negligenciados intermediário modificado – versão 1
MNDO	Orbitais diatômicos negligenciados modificado
M_x	Componente de M do eixo x
M_{xy}	Componentes de M no plano xy
M_y	Componente de M do eixo y
NDDO	Orbitais diatômicos diferenciais negligenciados
NOE	Efeito nuclear Overhauser
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OMs	Orbitais moleculares
P	Porcentagem de encapsulação
PFG	Gradiente de campo magnético pulsado
PFGSE	Echo de spin por gradiente de campo magnético pulsado
PFGSTE	Echo de spin estimulado por gradiente de campo magnético pulsado
PM3	Método parametrizado número 3
PM6	Método parametrizado número 6
RAMEB	β CD metilada aleatoriamente

RF	rádio – frequência
RMN- ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rOe	Efeito overhauser no frame rotacional
ROESY	Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
STE	Echo de spin estimulado
STOs	Orbitais do tipo Slater
TBZ	Tiabendazol
TBZ.HCl:βCD	Complexo de inclusão entre TBZ.HCl e βCD
TBZH+	Tiabendazol protonado
TGA	Análise Termogravimétrica
ZDO	Overlap diferencial nulo

Lista de Tabelas

Tabela 1.5.1. Faixa de frequência de absorção no i.v. de alguns grupos funcionais orgânicos.	37
Tabela 4.1.1. Valores experimentais das funções termodinâmicas padrão de formação do complexo de inclusão TBZ:βCD.	70
Tabela 4.1.2. Valores de propriedades termodinâmicas do complexo TBZ:βCD reportados na literatura e obtidas neste trabalho.	71
Tabela 4.4.2.1. Variação de deslocamento químico δ entre espécies puras (δ_{livre}) e no complexo (δ_{compl}), em D ₂ O.	81
Tabela 4.4.4.1. Coeficientes de Difusão (D) das espécies TBZ e βCD livres e no complexo de inclusão.	87
Tabela 4.6.1. Comprimento e ângulos de ligação da βCD otimizada pelo método PM3 e obtidos experimentalmente.	99
Tabela 4.6.1.1. Energias obtidas das estruturas A e B do complexo TBZ:βCD no vácuo, nos níveis semiempírico (PM3) e <i>ab-initio</i> (DFT).	107
Tabela 4.6.2.1. Energias obtidas para as estruturas A2 e B2 do complexo TBZ:βCD em água.	113

Lista de Figuras

Fig. 1.1.1. Estrutura química do Tiabendazol.	1
Fig. 1.2.1.1. Estruturas químicas das CDs naturais.	4
Fig. 1.2.1.2A. Formas cristalinas de organização das CDs no estado sólido: Canal(esquerda), Escama de peixe (<i>Herringbone</i>) (meio) e Tijolo (direita).	5
Fig. 1.2.1.2B. Disposições cabeça-cauda (esquerda) e cabeça-cabeça (direita) das CDs no estado sólido.	6
Fig. 1.3.1.1. Estruturas químicas de complexos ativo:CD 1:1 e 1:2.	10
Fig. 1.4.1.1. Diagrama de Jablonski.	15
Fig. 1.4.3.1. Analogia entre uma carga se movendo em círculo e o movimento nuclear.	22
Fig. 1.4.3.2. Níveis de energias α e β ocupados por μ na presença de B_0 para núcleos de spin $1/2$.	23
Fig. 1.4.3.3. Precessão de M em função do tempo de aplicação do campo B_1 .	24
Fig. 1.4.3.4. Diagrama de níveis de energia em um sistema de dois spins homonucleares. W são as probabilidades de ocorrência das respectivas transições. Estados de spins estão escritos com o de I primeiro e o de S em segundo.	27
Fig. 1.4.3.5. Mudança na população dos níveis de energias com as transições de probabilidades W_{2IS} e W_{OIS} , causadoras de NOE, após saturação da ressonância de H_S .	28
Fig. 1.4.3.6. Sequência de pulsos para o experimento ROESY-2D.	29
Fig. 1.4.3.7. Sequência de pulsos e comportamento das isocromatas nos experimentos PFGSE (A) e PFGSTE (B).	32
Fig. 1.4.3.8. Principais seqüências de pulsos utilizadas em DOSY.	35
Fig. 1.5.2.1. Reflexões de Bragg em planos espaçados por d_{hkl} .	38

Fig. 1.5.2.2. Diagrama de um difratômetro de raios-X.	39
Fig. 1.6.4.1. Ângulos, diedros e planos existentes entre monômeros de α -D-glicose nas CDs.	52
Fig. 4.1.1. Espectros normalizados de absorção e fluorescência (λ_{ex} 298 nm) do TBZ em tampão $KH_2PO_4/NaOH$, pH 6,8.	65
Fig. 4.1.2. Espectros de fluorescência do TBZ em soluções de β CD a 37 °C, nos fluidos intestinal (A) e gástrico(B).	66
Fig. 4.1.3. Ajustes não-lineares e determinação das constantes de equilíbrio do complexo TBZ: β CD a 25 (R^2 0,980), 37 (R^2 0,966) e 45 °C (R^2 0,981) Regressão não-linear realizada pelo algoritmo de Levenberg - Marquardt.	68
Fig. 4.2.1. Gráfico de Job para o complexo TBZ: β CD em meio que simula fluido intestinal humano, pH 6,8.	73
Fig. 4.3.1. Tipos de isotermas de solubilidade dos complexos de inclusão com CDs.	75
Fig. 4.3.2. Diagrama de solubilidade do complexo TBZ: β CD a 37 °C.	77
Fig. 4.4.1.1A. Espectro de 1H do complexo TBZ: β CD em DMSO-d6.	79
Fig. 4.4.1.1B. Espectro de 1H do TBZ em DMSO-d6.	79
Fig. 4.4.1.1C. Espectro de 1H da β CD em DMSO-d6.	80
Fig. 4.4.3.1. Espectro 1 de ROESY-1D do complexo TBZ: β CD em D_2O . Pulsos em δ 7,302 ppm (Ha do TBZ).	82
Fig. 4.4.3.2. Espectro 2 de ROESY-1D do complexo TBZ: β CD em D_2O . Pulsos em δ 7,637 ppm (Hb do TBZ).	83
Fig. 4.4.3.3. Espectro 3 de ROESY-1D do complexo TBZ: β CD em D_2O . Pulsos em δ 8,236 ppm (Hc do TBZ).	83
Fig. 4.4.3.4. Espectro 4 de ROESY-1D do complexo TBZ: β CD em D_2O . Pulsos em 9,076 ppm (Hd do TBZ).	84
Fig. 4.4.3.5. Estruturas propostas do complexo TBZ: β CD em água com base nos resultados do experimento ROESY-1D.	85
Fig. 4.4.4.1. Espectro DOSY do TBZ em D_2O .	86

Fig. 4.4.4.2. Espectro DOSY da β CD em D_2O .	86
Fig. 4.4.4.3. Espectro DOSY do complexo TBZ: β CD em D_2O .	87
Fig. 4.5.2.1. Curva de TGA do TBZ, mostrando fusão/decomposição do fármaco entre 200 e 300 °C.	91
Fig. 4.5.2.2. Curva de TGA da β CD, mostrando as transições de desidratação (primeira) e fusão/decomposição (segunda).	92
Fig. 4.5.2.3. Curvas de TGA e derivadas do TBZ, β CD, mistura física equimolar TBZ: β CD 1:1(MF) e do complexo de inclusão TBZ: β CD (LF).	93
Fig. 4.5.2.4. Curvas de TGA e derivadas do TBZ.HCl, β CD, mistura física equimolar TBZ.HCl: β CD 1:1(MF) e do complexo de inclusão TBZ.HCl: β CD (LF).	95
Fig. 4.5.3.1. Espectros no i.v. do TBZ, β CD, mistura física TBZ: β CD equimolar 1:1 (MF) e complexo de inclusão TBZ: β CD (LF).	97
Fig. 4.5.3.2. Espectros no i.v. de TBZ.HCl, β CD, mistura física TBZ.HCl: β CD equimolar 1:1 (MF) e complexo de inclusão TBZ.HCl: β CD (LF).	98
Fig. 4.4.3.1. Difractogramas de raios-X de TBZ, β CD, mistura física TBZ: β CD equimolar 1:1 (MF) e complexo de inclusão TBZ: β CD (LF).	100
Fig. 4.5.4.2. Difractogramas de raios-X de TBZ.HCl, β CD, mistura física TBZ.HCl: β CD equimolar 1:1 (MF) e complexo de inclusão TBZ.HCl: β CD (LF).	101
Fig. 4.6.1.1. Energias absolutas do complexo TBZ: β CD para todas as formas de encapsulação do fármaco e pontos de mínimo de energia (A e B): TBZ entrando pelo lado benzimidazol (primeiro) e pelo lado tiazolil (segundo).	104
Fig. 4.6.1.2. Vistas lateral e frontal das estruturas químicas A (primeira) e B (segunda) mais estáveis do complexo TBZ: β CD obtidas pelo método PM3.	106

Fig. 4.6.2.1. Calor de formação do complexo TBZ: β CD, em meio simulando ambiente aquoso, para todas as formas de encapsulação do fármaco. Pontos de mínimo de energia **A2** e **B2** para as duas formas de encapsulação do TBZ.

109

Fig. 4.6.2.2. Vistas frontais das estruturas químicas **A2** (primeira) e **B2** (segunda) mais estáveis do complexo TBZ: β CD em água, obtidas com o método PM6.

111

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1) Tiabendazol

Tiabendazol [2-(4-tiazolil)-1*H*-benzimidazol], TBZ, é um fármaco derivado do benzimidazol, com propriedades anti-helmíntica, anti-fúngica e bactericida. Este fármaco possui amplo espectro de aplicação, sendo empregado em medicamentos para humanos e animais, em alimentos, como conservante de vegetais frescos, junto com fungicidas na agricultura, entre outras (Tang et al, 2005). A fórmula estrutural do TBZ é apresentada na Fig. 1.1.1.

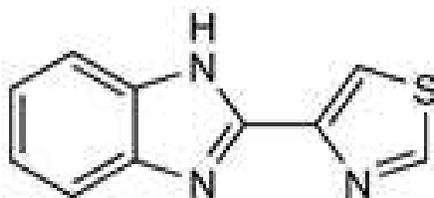


Fig. 1.1.1. Estrutura química do Tiabendazol

A principal aplicação do TBZ em medicamentos explora sua propriedade anti-helmíntica, que além de combater o parasita já na fase adulta, também combate o desenvolvimento de seus ovos e larvas, diminuindo a eliminação dos mesmos nas fezes dos organismos infectados. Os principais parasitas suscetíveis ao TBZ são (MINTEZOL, Merck & Co. Inc., 2003): *Ascaris lumbricóides*, *Strongyloides stercoralis*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma braziliense*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Enterobius vermicularis*.

Seu mecanismo de atuação é ainda completamente desconhecido; contudo, a principal hipótese está na inibição da enzima fumarato–redutase que se encontra na mitocôndria celular das células do parasita. A consequência desta

inibição é o bloqueio na formação de microtúbulos, prejudicando o metabolismo do mesmo e, portanto, seu desenvolvimento.

Quando ingerido na forma de suspensão, TBZ é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, apresentando um pico de concentração no plasma sanguíneo de 1 a 2 h após ingestão. No organismo, sua meia vida é de aproximadamente 70 min, apresentando transformação hepática a 5-hidroxi-tiabendazol. Após 48 h, aproximadamente 90% do fármaco é eliminado na urina, sob formas conjugadas a glucuronídeos e sulfatos, e 5% nas fezes. Entretanto, a maior parte do fármaco é eliminada já nas primeiras 24 h.

TBZ apresenta baixa incidência de efeitos adversos, que em geral são leves e transitórios. Os mais freqüentes são náusea, vômito, diarréia, sonolência, vertigem, cefaléia, anorexia e xerostomia. Em menor freqüência, podem ocorrer febre, exantema e eritema multiforme (incluindo síndrome de Stevens-Johnson). Raras vezes são encontrados casos de zumbido, distúrbios visuais, leucopenia, angioedema, cristalúria e colestase intra-hepática (MINTEZOL, Merck & Co. Inc., 2003).

TBZ é uma base fraca (pK_a $5,92 \pm 0,12$) e foi primeiramente sintetizado em 1961 por cientistas dos Laboratórios Merck, sendo à temperatura ambiente um sólido branco e inodoro (Kappor, 1986). Embora muitos trabalhos na literatura relatem que TBZ apresenta temperatura de fusão entre 296 e 303°C, estudos publicados sobre o comportamento térmico deste fármaco mostram que na verdade ocorre uma pseudo-fusão, ou seja, sua fusão é acompanhada de decomposição (Macedo e Nascimento, 2002). Sua forma cristalina apresenta configuração ortorrômbica, existindo 8 moléculas de TBZ por célula unitária (Trus e Marsh, 1973). Quanto à fotoestabilidade, TBZ é relatado como sendo uma substância relativamente estável, apresentando pouca sensibilidade à radiação ultra-violeta. Quando ocorre fotodegradação, os principais produtos formados são benzimidazol, benzimidazol-2-carboxiamida, triazol-4-carboxiamida, tiazol-4-ilamidina e metil tiazol-4-carboxilato (Kapoor, 1986).

Entretanto, um fator limitante para a eficiência deste fármaco é sua baixa solubilidade em água, reportada na literatura como 60,4 mg/L ($3,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em pH 7 (Lezcano et al, 2002), o que leva a comercialização deste fármaco em medicamentos por meio de formulações tópicas (pomadas) ou suspensão em meio aquoso. Embora pouco solúvel, quando em contato com o meio gástrico ácido, a formação de seu sal hidrocloreto, resultado da protonação do sítio básico da molécula, torna o fármaco muito mais solúvel, chegando a atingir solubilidade de 3,88% (0,193 mol/L) em pH 2,2 (Kapoor, 1986). Assim, esta propriedade química da molécula irá contribuir para sua rápida absorção no organismo quando administrado oralmente, o que contribui para a biodisponibilidade do fármaco no organismo.

Contudo, para aplicação tópica do TBZ ou mesmo quando se pretende estudar seu comportamento em fluidos neutro ou básicos, como os existentes no intestino humano (local onde os parasitas em geral se desenvolvem e/ou se reproduzem), o estudo de metodologias para complexar este fármaco em agentes encapsuladores mais solúveis constitui alternativa promissora para melhorar sua biodisponibilidade nesses ambientes. Assim, abrem-se novas possibilidades de se melhorar as formulações existentes ou até mesmo criar novas formulações que possam resultar em rotas terapêuticas mais eficientes e menos tóxicas aos seres vivos.

1.2) Ciclodextrinas

1.2.1) Propriedades estruturais e físico-químicas

Ciclodextrinas (CDs) constituem-se de polissacarídeos cíclicos formados a partir de unidades monoméricas de D-(+)-glicopiranosose, ligadas por meio de ligações glicosídicas α -1,4. Elas foram descobertas em 1891 por Villiers; entretanto, sua estrutura só foi elucidada em 1936 por Freudenberg e

colaboradores. CDs são produzidas a partir da degradação do amido, através de processo enzimático governado pela glucosiltransferase (CGT). Neste processo, a quebra da cadeia de moléculas de amido é seguida da reação de formação α -1,4 sem a participação de moléculas de água; assim, dextranas cíclicas serão obtidas como produto de reação. As CDs mais comuns contêm 5, 6 e 7 unidades monoméricas de glicopiranoose, denominadas α , β e γ ciclodextrinas, respectivamente (**Fig. 1.2.1**), entretanto, CDs contendo nove (δ CD) e até mais unidades de glicopiranoose também podem ser obtidas. Por razões estéricas, CDs contendo menos que seis unidades monoméricas não podem ser formadas (Szejtli, 1989).

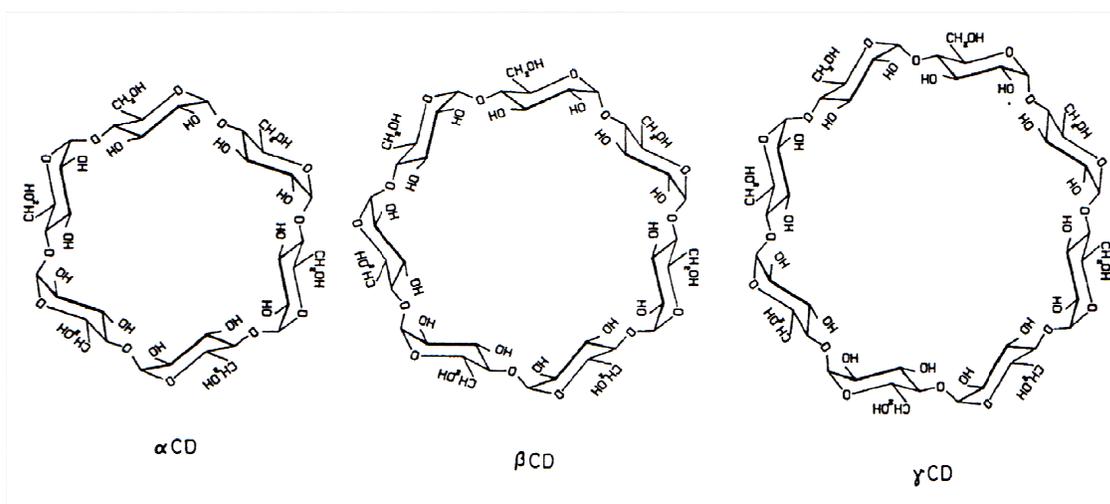


Fig. 1.2.1.1. Estruturas químicas das CDs naturais.

A funcionalização de grupos hidroxílicos das CDs leva à formação de derivados. Em geral, ela ocorre através de uma ligação α -1,6, resultando em derivados como hidroxipropil- β CD (HP β CD) ou derivados metilados, como RAMEB (“Random Methylated β -Ciclodextrin”) e DIMEB (“Dimethylated β -Ciclodextrin”).

A disposição espacial das unidades glicopiranoose confere às CDs geometria toroidal. As hidroxilas secundárias (C2-OH e C3-OH) e primárias (C6-

OH) das unidades glicopiranosídicas encontram-se em extremidades diametralmente opostas, existindo apenas as ligações α -1,4 no interior da cavidade. Esta conformação espacial resulta em ambientes com polaridades diferentes em uma mesma molécula. O interior da cavidade das CDs é dotado de alta densidade eletrônica e predominantemente apolar devido a existência de um baixo momento de dipolo elétrico resultante. No entanto, a presença dos grupos hidroxílicos nas cavidades conferirá a estas regiões das moléculas caráter polar. Além disso, na borda maior, em que se encontram as hidroxilas secundárias das unidades monoméricas, as ligações de hidrogênio presentes entre as hidroxilas em C2 e C3 conferem à esta região específica maior caráter ácido-base de Lewis (Szejtli e Frömming, 1994; Szejtli, 1998).

CDs são sólidos cristalinos à temperatura ambiente, apresentando as formas de pratos hexagonais (α CD), paralelogramas monoclônicos (β CD) ou prismas quadráticos (γ CD). Além disso, elas podem se alinhar através das configurações canal (cabeça-cauda ou cabeça-cabeça), escama de peixe (“herringbone”) e tijolo (Fig. 1.2.1.2).

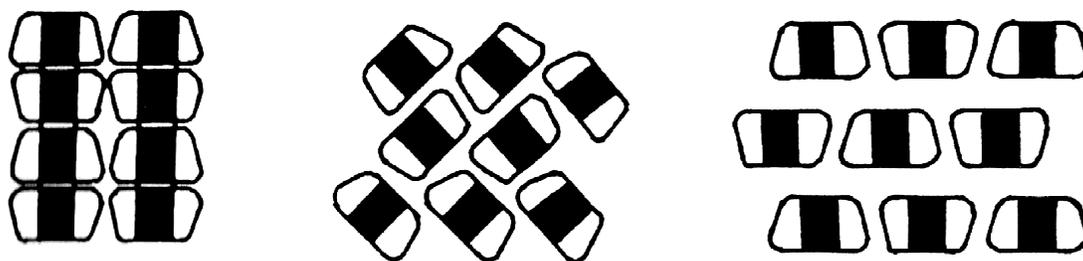


Fig. 1.2.1.2A. Formas cristalinas de organização das CDs no estado sólido: Canal (esquerda), Escama de peixe (*Herringbone*, meio) e Tijolo (direita).

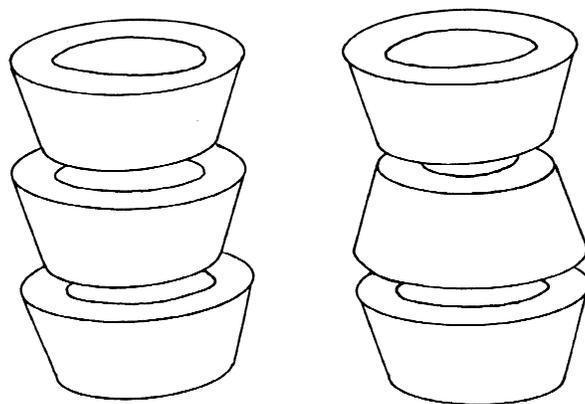


Fig. 1.2.1.2B. Disposições cabeça-cauda (esquerda) e cabeça-cabeça (direita) de CDs no estado sólido.

Embora não sejam sólidos bastante higroscópicos, CDs formam hidratos estáveis, que podem conferir a elas diferentes estruturas cristalinas. Assim, dependendo das condições de precipitação, α CD pode apresentar duas estruturas cristalinas para o hidrato $\alpha\text{CD}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e uma terceira para $\alpha\text{CD}\cdot 7\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, todas alinhadas sob a forma “herringbone”. β CD é precipitada na forma dos hidratos $\beta\text{CD}\cdot 11\text{H}_2\text{O}$ e $\beta\text{CD}\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, enquanto que γ CD é obtida como $\gamma\text{CD}\cdot 13,3\text{H}_2\text{O}$. Mesmo sendo predominantemente apolar, a cavidade das CDs também contém moléculas de água, em quantidade de acordo com suas respectivas dimensões (Szejtli, 1989).

Embora estruturalmente semelhantes, CDs apresentam diferentes solubilidades, principalmente em água: α CD (145 g/L), β CD(18,5 g/L), γ CD(232 g/L). Essa diferença é atribuída à rigidez de suas respectivas estruturas moleculares, ocasionada pelas ligações de hidrogênio existentes entre as hidroxilas em C2 e C3. Em β CD, as ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias são completas dificultando sua solvatação pela água. No entanto, impedimentos estéricos e maior mobilidade conformacional fazem com que o mesmo não ocorra em α CD e γ CD, respectivamente (ligações de hidrogênio entre as hidroxilas são incompletas nestas moléculas), o que as tornam mais solúveis.

CDs possuem maior resistência frente a reações químicas que os respectivos polissacarídeos lineares. Em reações de hidrólise ácida, CDs podem ser de 2 a 5 vezes mais estáveis que as correspondentes dextranas acíclicas. Quanto à hidrólise alcalina, a resistência das CDs é semelhante à da celulose (Szejtli, 1989).

1.2.3) Metabolismo e toxicologia das CDs

Ao contrário das dextranas acíclicas, CDs apresentam grande resistência à hidrólise enzimática pela α -amilase, assim como ao meio ácido do trato gástrico. Ao serem ingeridas por humanos, CDs serão muito pouco absorvidas sob a forma intacta. Como humanos não possuem a enzima CTG-ase, responsável pela hidrólise das CDs, seu metabolismo ocorrerá apenas no cólon, pelas bactérias da microflora que possuem esta enzima. Embora o metabolismo das CDs leve aos mesmos produtos obtidos do metabolismo do amido (maltodextrinas acíclicas, maltose e glicose), como o amido é metabolizado no intestino delgado, sua absorção será 1 – 2 h após ingestão, enquanto que para as CDs, a absorção dos produtos metabólicos ocorrerá após 6 – 8 h.

A toxicidade das CDs depende da via de administração ao organismo. CDs não são consideradas tóxicas para aplicação oral, o que as torna muito utilizadas em formulações farmacêuticas e alimentícias. Testes *in-vivo* com ratos e cachorros mostram que CDs são satisfatoriamente toleradas em até 3% (600 mg/kg/dia) da composição na dieta alimentícia, limite bem acima das quantidades contidas em formulações para humanos (\approx 25 mg/kg/dia).

Quando aplicadas via parenteral, em animais, CDs têm demonstrado majoritariamente propriedades nefrotóxicas (alterações no sistema vascular, desintegração celular e mineralização amorfa) e hemolíticas. Quando administradas intravenosamente a ratos, γ CD apresentou a menor toxicidade

(LD50 maior que 2400 mg/kg), seguida da β CD (788 mg/kg) e α CD (419 mg/kg) (Frank e Gray, 1976). Outras decorrências também foram encontradas separadamente de acordo com as vias de administração parenteral empregadas, mas que desapareceram após interrupção dos tratamentos: sonolência e problemas de respiração (após administração subcutânea), alterações fisiológicas no fígado (após administração intraperitoneal), ulceração das pernas e necrose glomerular (após administração intramuscular) (Szejtli e Frömring, 1994).

1.3) Complexos de inclusão com CDs

1.3.1) Influência nas propriedades físico-químicas do ativo e fenômenos sobre sua formação

As características estruturais, eletrônicas e físico-químicas tornam CDs moléculas com grande potencial de aplicação como nanocarregadores. O caráter predominantemente hidrofóbico de suas cavidades e suas superfícies hidrofílicas, permitem que as CDs possam interagir com moléculas hidrofóbicas formando estruturas supramoleculares (complexos de inclusão) que permitirão maior solubilidade, em água, do ativo hidrofóbico. Além disso, quando determinado ativo é complexado em CDs, algumas propriedades, além da solubilidade, serão modificadas, cujas principais são (Szejtli, 2004):

- Decréscimo de sua reatividade com outras substâncias presentes no meio, tornando-se mais estáveis (com exceção de ativos que apresentam reatividade com as CDs)
- Diminuição da difusão, sublimação e volatilização, decorrentes da formação do sistema macromolecular que é o complexo de inclusão

- Ativos líquidos ou gasosos tornam-se matrizes sólidas com formação do complexo de inclusão, trazendo benefícios de manipulação e demais aplicações.
- Ativos hidrofóbicos, na forma de complexos de inclusão, podem ser facilmente dispersados e dissolvidos em água.

Este conjunto de novas características que ativos adquirem quando na forma de complexos de inclusão com CDs, além das do próprio nanocarregador (baixa toxicidade, fácil produção, etc.) conferem grande aplicação das CDs nas indústrias farmacêutica e alimentícia, principalmente. Na primeira, fármacos hidrofóbicos são encapsulados com objetivos geralmente relacionados com o aumento de suas respectivas solubilidades em água e biodisponibilidade, enquanto que na indústria alimentícia, o uso de CDs concentra-se como encapsuladores de aromas e fragrâncias.

A formação de complexos de inclusão com CDs envolve uma série de fatores. O principal deles são as forças intermoleculares de van der Waals de atração entre o ativo e as CDs. Forças predominantemente apolares governam as interações entre ativos hidrofóbicos (ou a região correspondente da molécula) e a cavidade interna das CDs. Ativos dotados de grupos funcionais polares também podem interagir com CDs através de suas extremidades hidrofílicas, neste caso envolvendo forças de maior caráter polar.

Complexos de inclusão com CDs em geral organizam-se sob estequiometria molar ativo:CD 1:1. Os fatores principais limitantes para os arranjos supramoleculares são as dimensões moleculares do ativo e CD, esta que deve possuir cavidade compatível com as dimensões moleculares do ativo e a influência de forças de repulsão intermoleculares. Assim, complexos 2:1 e com outras estequiometrias, ex: 3/2, 2/3, 1/3, são menos freqüentes, enquanto que 1:2 são mais comuns para ativos de cadeia mais longa (Szejtli e Frömring, 1994). Alguns exemplos de complexos de inclusão com CDs podem ser visualizados na **Fig. 1.3.1.1**.



Fig. 1.3.1.1. Estruturas químicas de complexos ativo:CD 1:1 (El-Kemary et al, 1994) e 1:2 (Catena e Bright, 1989).

Embora interações intermoleculares governem a formação da grande maioria dos complexos de inclusão com CDs, a termodinâmica deste processo é mais complexa, pois podem atuar simultaneamente (Guo e Liu, 2002): interações eletrostáticas (ativos iônicos), efeito hidrofóbico, variação de tensão conformacional molecular, liberação de moléculas de água da cavidade hidrofóbica das CDs e interações envolvendo transferência de cargas.

Como CDs são moléculas neutras, interações eletrostáticas de natureza íon-íon não ocorrem, a menos que se trate de derivados com CDs adequados. Complexos com CDs formados puramente envolvendo interações eletrostáticas são pouco reportados na literatura, devido a sua fraca estabilidade. Embora essas interações possuam maior intensidade que as forças de van der Waals, íons apresentam forte solvatação pela água, que acaba atuando como forte competidor com as CDs. Assim, complexos com CDs envolvendo os íons ClO_4^- e NO_3^- foram caracterizados experimentalmente, mas o mesmo não ocorreu para os íons SO_4^{2-} e CO_3^{2-} (Suzuki et al, 1993).

O efeito hidrofóbico consiste de um fenômeno de natureza termodinâmica puramente entrópica. Em sistemas com CDs, eles são relacionados com as mudanças de graus de liberdade das moléculas do solvente, em geral água, durante o processo de formação do complexo de inclusão. Quando um determinado ativo entra na cavidade da CD, as moléculas de água que antes o solvavam têm aumento em seus graus de liberdade, aumentando a entropia do

sistema. Embora a este fenômeno não seja atribuído a possível força motriz de formação de complexos com CDs, sua ocorrência é relacionada com o complicado entendimento, do ponto de vista molecular, da influência do solvente na variação de entropia no processo de formação dos complexos de inclusão com CDs (Connors, 1997; Rekharsky e Inoue, 1998).

A participação do solvente na formação dos complexos com CDs também ocorre durante a entrada do ativo na cavidade da CD, que expulsa moléculas de solvente, em geral água, que antes ali se encontravam. Neste processo, quanto mais polar o solvente, mais negativa será a entalpia associada a essa expulsão, pois essas moléculas migrarão do meio apolar da cavidade das CDs (onde são menos estáveis) para o interior da solução, onde serão mais estáveis. Embora este processo seja entalpicamente favorável, esta variação de energia não é considerada força motriz para a formação de complexos de inclusão, pois a variação da energia livre não é necessariamente negativa (Bergeron et al, 1977; Connors, 1996).

A formação de complexos de inclusão é um processo que usualmente resulta em mudanças conformacionais nas estruturas moleculares do ativo e da CD. Embora este fenômeno não seja considerado como possível força motriz de reação, CDs geralmente têm suas estruturas alteradas, tanto em solução como no estado sólido, quando interagindo com um determinado ativo. Muitos autores (Hirayama et al, 1988; Gelb e Schwartz, 1989 ; Lee et al, 1996) o atribuem ao ajuste do sistema a uma nova situação de maior estabilidade termodinâmica, portanto, relevante para a compreensão do processo de formação desses sistemas.

Outro fenômeno menos freqüente que pode influenciar a formação dos complexos de inclusão são as interações envolvendo transferência de cargas. Essas interações ocorrem quando elétrons do HOMO de uma molécula são transferidos para orbitais LUMO da outra. Esse tipo de interação envolvendo complexos com CDs já foi reportado na literatura, englobando ativos e grupos substituintes em CDs (Rademacher e Czarnik, 1993; Hanaoka et al, 1989) e

também envolvendo o próprio esqueleto hidrofóbico dessas macromoléculas (Guo et al, 2001).

1.3.2) Métodos de preparação e caracterização estrutural e físico-química

Os métodos de preparação de complexos de inclusão com CDs são simples e basicamente compreendem a mistura do ativo e da CD, tanto por meio dos constituintes previamente dissolvidos (método de co-precipitação), como com os mesmos ainda no estado sólido (métodos “kneading” e pasta).

O método mais eficiente de preparação de complexos de inclusão com CDs é denominado co-precipitação. Neste método, o ativo e a CD são primeiramente dissolvidos separadamente, a CD geralmente em solução aquosa e o ativo com ou sem a presença de solvente orgânico, dependendo de sua solubilidade em água. Após dissolução dos constituintes na proporção molar desejada, as soluções são misturadas, sendo em seguida o solvente orgânico, se assim houver, eliminado por evaporação. Após esta etapa, geralmente é observada precipitação do complexo de inclusão correspondente, formando uma suspensão aquosa que em seguida pode ser filtrada ou liofilizada para obter o complexo sólido seco.

Além deste método, complexos de inclusão com CDs também podem ser preparados em fase heterogênea. Embora o rendimento de formação do produto seja inferior nesses métodos, em relação ao anterior, eles possuem a vantagem de não utilizarem solventes orgânicos e também requererem menor quantidade de água, características importantes para a aplicação industrial. Os principais métodos de fase heterogênea empregados na preparação de complexos de inclusão são: “kneading”, “slurry” e por fusão do ativo.

No método “kneading”, o ativo e a CD são macerados em um almofariz de ágata, com pequena quantidade de água, de forma a se obter uma pasta. Como a

estrutura cristalina dos hidratos com CDs são energeticamente menos favoráveis em relação a estrutura ativo:CD, as moléculas de água presentes na cavidade interna das CDs vão sendo substituídas pelas moléculas do ativo. Além disso, a estrutura amorfa dos complexos com CDs faz com que as moléculas de complexo de inclusão vão se separando do arranjo cristalino dos hidratos das CDs a medida que a formação do complexo vai ocorrendo. Assim, toda estrutura cristalina das CDs rapidamente torna-se desorganizada e transformada na estrutura amorfa do complexo de inclusão. Finalmente, o excesso de água é removido desta pasta por aquecimento ou arraste de ar, resultando no complexo seco.

O método “slurry” é semelhante ao “kneading”; entretanto, maior quantidade de água é adicionada, formando uma suspensão que é mantida sob agitação de algumas horas até dias, dependendo da natureza do substrato.

O método de preparação por fusão do ativo é menos comum dentre os demais e conforme a denominação, o complexo de inclusão é preparado empregando o ativo fundido e CDs. Neste método, além da necessidade de se empregar aquecimento para a fusão do ativo, o que não se torna interessante para ativos com altos pontos de fusão, o mesmo não deve sofrer decomposição com o aquecimento. Além disso, a temperatura de fusão do ativo não deve ultrapassar 180°C, temperatura inicial de degradação das CDs.

Complexos de inclusão com CDs podem ser caracterizados em solução ou no estado sólido, através de diversas técnicas analíticas. No estado sólido, as principais técnicas empregadas são: espectroscopias no i.v. reflectância e ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{13}C , análises térmicas (principalmente TGA e DSC) e difração de raios-X (DRX).

Técnicas baseadas em análises térmicas e DRX apenas comprovam a formação do complexo de inclusão e não fornecem detalhes sobre como o ativo e a CD estão molecularmente organizados. Este tipo de informação pode ser obtido com as demais técnicas espectroscópicas mencionadas, mas as dificuldades inerentes a cada uma delas tornam difíceis estas caracterizações para grande

parte dos complexos com CDs. Em ambas as técnicas, os complexos de inclusão são caracterizados com base nos deslocamentos das bandas (i.v. e reflectância) ou picos (RMN- ^{13}C) correspondentes aos átomos do ativo e da CD que estão interagindo no sistema supramolecular. Assim, a região da molécula do ativo cujos átomos apresentarem maior deslocamento espectral (juntamente com os átomos presentes na cavidade das CDs), permitirá que a estrutura mais estável do complexo de inclusão no estado sólido seja elucidada. Entretanto, tais alterações espectrais geralmente são imperceptíveis no i.v. e no espectro de reflectância, e a resolução da RMN no estado sólido ainda constitui a principal barreira para o êxito deste tipo de análise em complexos com CDs.

A caracterização de complexos de inclusão em solução geralmente compreende técnicas espectroscópicas ou potenciométricas. Em espectroscopia, as técnicas mais utilizadas são absorção no uv-vis e fluorescência, devido às mudanças no perfil das bandas de absorção e/ou emissão do ativo, quando o mesmo interage com a cavidade hidrofóbica da CD, e RMN- ^1H ou ^{13}C , que fornece informações estruturais sobre o sítio de interação do ativo na cavidade da CD. Como neste trabalho foram muito exploradas as técnicas de fluorescência e RMN- ^1H , seus fundamentos serão detalhados separadamente nos itens seguintes. Nas técnicas potenciométricas, a caracterização dos complexos de inclusão em solução é realizada com base na variação na constante de dissociação K_a (ou em função de K_b) do ativo quando o mesmo interage com a CD (Szejtli, 1989; Szejtli e Frömmling, 1994).

1.4) Caracterização dos complexos de inclusão em solução

1.4.1) Espectroscopia molecular de fluorescência

O fenômeno de luminescência molecular consiste na emissão de fótons resultantes de transições eletrônicas entre orbitais moleculares do estado excitado

(S_1 , T_1) e do estado fundamental (S_0). A luminescência ocorre em moléculas poliinsaturadas, sendo dividida em dois tipos: fluorescência e fosforescência. Na fluorescência, a emissão de fótons decorre majoritariamente da transição $S_1 \rightarrow S_0$, permitida por spin por envolver elétrons no estado singlete. Diferentemente, na fosforescência, elétrons de S_1 sofrem mudança de spin, passando para o estado triplete T_1 (“cruzamento intersistemas”). Como a transição $T_1 \rightarrow S_0$ é proibida por spin, esta transição é mais lenta e com emissão de fótons de menor energia (maior comprimento de onda) em relação a fluorescência. Além disso, o tempo de duração dos fenômenos será diferente: $\approx 10^{-8}$ s (fluorescência), segundos – min (fosforescência) (Skoog, 2001).

Os fenômenos de luminescência podem ser ilustrados no diagrama simplificado de Jablonski (**Fig. 1.4.1.1**).

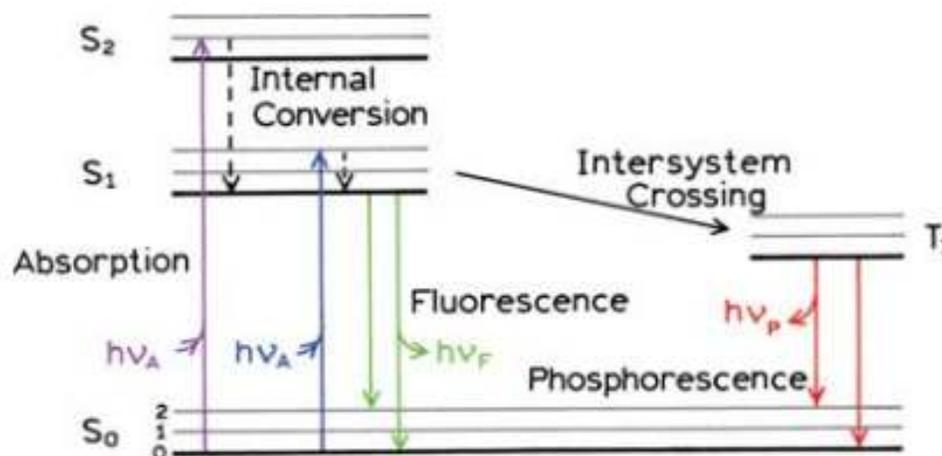


Fig. 1.4.1.1. Diagrama de Jablonski.

Os estados eletrônicos apresentam vários níveis vibracionais, denominados 0, 1, 2, etc., permitindo amplo espectro de energias de absorção. As moléculas em níveis excitados primeiramente sofrerão conversão interna (processo não radiativo), através de relaxação molecular entre níveis vibracionais, passando a ocupar S_1 em tempo da ordem de 10^{-12} s. Assim, a fluorescência ocorrerá na transição $S_1 \rightarrow S_0$, ocupando, inicialmente, os níveis vibracionais de maior energia

do estado fundamental, portanto, emitindo fótons de energias em geral menores que os fótons envolvidos na absorção (excitação molecular). Assim como em S_1 , a relaxação molecular também ocorre em S_0 , restaurando a condição inicial de energia da molécula.

Os estados excitados menos energéticos das moléculas dificilmente resultam em grandes mudanças em suas geometrias, assim, os níveis de energia vibracionais são igualmente espaçados em relação aos níveis do estado fundamental. Consequentemente, os espectros de fluorescência em geral apresentam-se como uma imagem especular dos respectivos espectros de absorção.

Na fosforescência, as transições menos energéticas $T_1 \rightarrow S_0$ resultarão em bandas de emissão em maiores comprimentos de onda. Moléculas dotadas de átomos pesados, como bromo e iodo, são mais susceptíveis à fosforescência, pois nesses átomos existe maior possibilidade de cruzamento intersistema (devido ao acoplamento spín-órbita).

A emissão de luminescência ocorre em um número muito menor de moléculas relativamente à absorção, pois a emissão de fótons depende de uma série de fatores, principalmente: natureza dos orbitais envolvidos, diferença de energia entre os níveis eletrônicos S_0 e S_1 e interações intermoleculares com solutos e/ou solventes. Fenômenos de luminescência decorrentes de excitação para orbitais σ^* (ex: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$) dificilmente ocorrem, pois as energias desses orbitais são suficientes para desestabilizar as ligações químicas, resultando em degradação molecular. Portanto, em cromóforos orgânicos, apenas é observada luminescência em moléculas insaturadas e, majoritariamente, poliinsaturadas, cuja excitação aos orbitais π^* ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$) não causam tal desestabilização. Em determinadas moléculas nas quais há superposição de níveis vibracionais entre os níveis eletrônicos S_0 e S_1 , a relaxação molecular para o estado energético fundamental poderá ocorrer pelo processo de conversão interna, cuja natureza não radiativa do mesmo tornam as moléculas não luminescentes.

A luminescência também pode ser suprimida através de interações ou colisões intermoleculares envolvendo o cromóforo no estado excitado. As colisões permitem maior transferência de energia cinética, enquanto que as interações intermoleculares com solvente e/ou solutos (este último, denominado supressor) levam a sistemas moleculares organizados que facilitam a transferência da energia na forma térmica. Assim, esses processos passam a concorrer cineticamente com os processos luminescentes, podendo resultar na total supressão da emissão do fluoróforo.

As intensidades de emissão de moléculas luminescentes são comparadas através de seus respectivos rendimentos quânticos ϕ , definido como a relação entre a energia absorvida na absorção molecular e a energia emitida por fluorescência ou fosforescência. Assim, quanto mais intenso for o processo de fluorescência/fosforescência frente aos demais processos de relaxação não radiativos de determinado cromóforo, mais próximo de 1 será ϕ (Lakowicz, 2006).

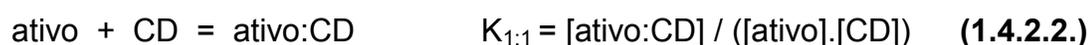
1.4.2) Aplicação da espectroscopia de fluorescência em solução para estudo de propriedades termodinâmicas de complexos com CDs

Ativos que apresentam pouca fluorescência em água podem ter a intensidade de emissão aumentada significativamente quando na presença de solventes orgânicos mais apolares. Esta mudança no ambiente químico do fluoróforo também ocorre quando o mesmo é inserido dentro da cavidade das CDs no processo de formação de complexos de inclusão, em que o ambiente desidratado e predominantemente apolar que caracterizará o interior desta cavidade resultará nas características espectrais do ativo.

Em geral, a adição com CDs a soluções aquosas contendo determinado ativo fluorescente resultarão em aumento na intensidade de emissão conforme a

quantidade com CD presente nesse meio, decorrente da mudança de ambiente químico. No entanto, esse fenômeno não pode ser generalizado a todos os fluoróforos. Quando determinado ativo apresenta estrutura molecular dotada de átomos muito eletronegativos, que leva a interações de natureza polar com as hidroxilas das extremidades das CDs, sua fluorescência pode, então, ser suprimida (Scypinski e Drake, 1985).

O incremento/diminuição na intensidade da banda espectral de absorção ou emissão de um cromóforo, que se obtêm em função da quantidade com CD no meio, pode ser utilizado como medida da caracterização termodinâmica do processo de formação do complexo de inclusão correspondente. A intensidade da variação espectral do cromóforo é resultado de sua população na solução como complexo de inclusão, formado de acordo com a equação do equilíbrio químico (Eq. 1.4.2.1). Portanto, quanto maior o incremento com CD em relação a quantidade de ativo, ou seja, fazendo $[CD] \gg [ativo]$, mais deslocada para o produto estará a reação de formação de ativo:CD. Na espectroscopia de fluorescência, considerando formação de complexo de inclusão com estequiometria 1:1, a intensidade de emissão do ativo relaciona-se com $K_{1:1}$ segundo as Eqs. 1.4.2.2.-1.4.2.4.



$$F_{ativo:CD} = k \cdot \phi_{ativo:CD} \cdot K_{1:1} \cdot [CD] \cdot [ativo] \quad (1.4.2.3.)$$

$$F_{ativo} = k \cdot \phi_{ativo} \cdot [ativo:CD] \cdot (K_{1:1} \cdot [CD])^{-1} \quad (1.4.2.4.)$$

Nas Eqs. 1.4.2.3 e 1.4.2.4, k é uma constante decorrente das configurações instrumentais e ϕ o rendimento quântico de cada espécie.

A intensidade de fluorescência (F) medida nas soluções de ativo:CD corresponderá às contribuições das emissões do ativo nas formas livre e complexada.

$$F = F_{\text{ativo}} + F_{\text{ativo:CD}} \quad (1.4.2.5.)$$

As concentrações do ativo e da CD nas formas livres e no complexo 1:1 são desconhecidas no equilíbrio; no entanto, elas se relacionam na equação do balanço de massa, em que as concentrações iniciais das espécies são conhecidas (Eqs. 1.4.2.6 e 1.4.2.7).

$$[\text{ativo}]_{\text{TOTAL}} = [\text{ativo}] + [\text{ativo:CD}] \quad (1.4.2.6.)$$

$$[\text{CD}]_{\text{TOTAL}} = [\text{CD}] + [\text{ativo:CD}] \quad (1.4.2.7.)$$

$$[\text{CD}]_{\text{TOTAL}} \approx [\text{CD}], \text{ pois } [\text{CD}] \gg [\text{ativo:CD}] \quad (1.4.2.8.)$$

Rearranjando as Eqs. 1.4.2.5. – 1.4.2.8. nas Eqs. 1.4.2.3. e 1.4.2.4., pode-se estabelecer uma relação linear entre a variação da fluorescência emitida pelo ativo em função da concentração com CD no meio e $K_{1:1}$ (Eq. 1.4.2.9.) (Castillo et al, 2003). Esta equação é conhecida como equação de Benesi – Hildebrand adaptada a sistemas de complexos com CDs, em relação aos pesquisadores que a desenvolveram em 1949 estudando o equilíbrio químico de interação entre iodo e hidrocarbonetos aromáticos a partir de medidas de absorção no uv-vis do primeiro.

$$(\Delta F)^{-1} = (K_{1:1} \cdot (F_{\text{ativo:CD}} - F_{\text{ativo}}) \cdot [\text{CD}])^{-1} + (F_{\text{ativo:CD}} - F_{\text{ativo}})^{-1} \quad (1.4.2.9)$$

Nesta equação, ΔF é o incremento na emissão de fluorescência do ativo nas soluções com CD correspondentes, em relação a emissão em solução sem CD (branco).

O modelo de Benesi-Hildebrand para complexos ativo:CD 1:2 é obtido de forma análoga, resultando na equação abaixo (**Eq. 1.4.2.10**):

$$(\Delta F)^{-1} = (K_{1:1} \cdot (F_{\text{ativo:CD}} - F_{\text{ativo}}) \cdot [\text{CD}]^2)^{-1} + (F_{\text{ativo:CD}} - F_{\text{ativo}})^{-1} \quad (1.4.2.10)$$

O modelo linear de Benesi – Hildebrand é muito empregado na literatura para determinar constantes de associação de complexos de inclusão, empregando tanto medidas espectroscópicas de absorção como emissão, pois os valores de K são facilmente obtidos por meio de regressão linear. No entanto, este modelo apresenta maior significância em $(\Delta F)^{-1}$ para soluções menos concentradas com CD, pois ΔF é menor (Catena e Bright, 1989).

Uma maneira de contornar essa limitação ao plotar $(\Delta F)^{-1}$, que é consequência da equação linear de Benesi – Hildebrand, é a utilização de equações não-lineares, obtidas das seguintes maneiras: rearranjando a respectiva equação linear, resultando na Eq. **1.4.2.11** (Aaron et al, 1998; Escandar, 1999), ou deduzindo-se novas equações a partir das equações básicas que descrevem esses sistemas, Eqs. **1.4.2.12** (Velasco et al, 1998; Aicart e Junquera, 1999) e **1.4.2.13** (Matei et al, 2007; Wiczek et al, 2001; Lezcano et al, 2002). Outra vantagem da utilização de modelos não-lineares em complexos com CD é a possibilidade de descrição termodinâmica de sistemas multi-componentes, ou

seja, em que mais de um equilíbrio de formação simultâneo esteja envolvido (Loukas, 1997; Velasco et al, 1998; Funasaki et al, 2000).

$$\Delta F = (F_{\text{ativo:CD}} - F_{\text{ativo}}) \cdot K_{1:1} \cdot [\text{CD}] / (1 + K_{1:1} \cdot [\text{CD}]) \quad (1.4.2.11)$$

$$F/F_{\text{ativo}} = (1 + (\phi_{\text{ativo:CD}}/\phi_{\text{ativo}}) \cdot K_{1:1} \cdot [\text{CD}]) / (1 + K_{1:1} \cdot [\text{CD}]) \quad (1.4.2.12)$$

$$F = (F_{\text{ativo}} + F_{\text{ativo:CD}} \cdot K_{1:1} \cdot [\text{CD}]) / (1 + K_{1:1} \cdot [\text{CD}]) \quad (1.4.2.13)$$

Nestas equações, F é a intensidade de fluorescência medida na [CD] correspondente, F_{ativo} e $F_{\text{ativo:CD}}$ são as intensidades de fluorescência do ativo sem CD e quando o ativo encontra-se todo na forma de complexo de inclusão, respectivamente. Os parâmetros inicialmente desconhecidos $F_{\text{ativo:CD}}$ (eqs. 1.4.2.11 e 1.4.2.13), $\phi_{\text{ativo:CD}}/\phi_{\text{ativo}}$ (Eq. 1.4.2.12) e $K_{1:1}$ são obtidos por métodos de iteração contidos em algoritmos computacionais.

1.4.3) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

1.4.3.1) Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear

Núcleos dotados de spin possuem, intrinsicamente, um campo magnético associado, resultando em um vetor momento de dipolo nuclear magnético μ . Este campo é gerado através da movimentação das cargas positivas que constituem o núcleo (Fig. 1.4.3.1), mas μ será diferente de zero apenas quando o número

atômico e a massa atômica deste núcleo forem ímpares (Lambert e Mazzola, 2003).

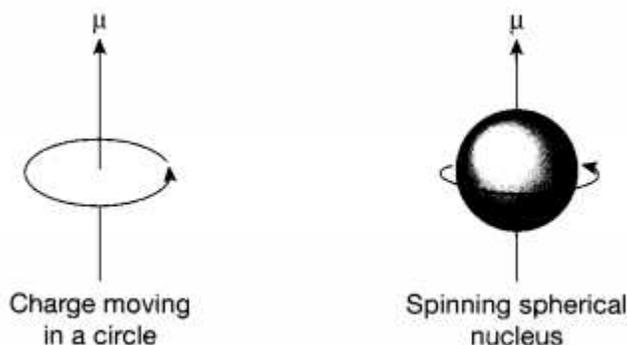


Fig. 1.4.3.1. Analogia entre uma carga se movendo em círculo e o movimento nuclear (Lambert e Mazzola, 2003).

Este vetor, que pode ser interpretado qualitativamente como uma “barra magnética microscópica”, é descrito através das leis da mecânica quântica, e sua magnitude é definida pela equação abaixo (**Eq. 1.4.3.1**):

$$\mu = \gamma \hbar \sqrt{I(I + 1)} \quad (1.4.3.1)$$

Nesta equação, $\hbar \sqrt{I(I + 1)}$ é o autovalor do momento angular do núcleo devido ao spin, em que: I é o número de spin nuclear, $\hbar = (h/2\pi)$, h é a constante de Planck. O momento angular depende apenas do spin do núcleo, conseqüentemente, é o mesmo para núcleos de mesmo spin. Entretanto, μ dependerá da energia do núcleo, que é uma propriedade característica de cada núcleo. Assim, a proporcionalidade entre essas grandezas é estabelecida pela constante magnetogírica γ (Eq. 1.4.3.1), relacionando a diferença entre os núcleos por meio da intensidade de seus respectivos dipolos magnéticos associados.

Quando um núcleo com $\mu \neq 0$ é submetido a um campo magnético externo B_0 , por exemplo em um espectrômetro de RMN, aplicado sobre um eixo arbitrário z, o vetor μ tomará orientação alinhada ao vetor B_0 . Ocorrerá desdobramento dos níveis de energia do núcleo, resultando em dois níveis (α e β) para núcleos de $I = \frac{1}{2}$. O vetor resultante $B_0 \times \mu$ orientar-se-á sob ângulo de $54,73^\circ$ em relação a B_0 em um movimento de precessão sobre o eixo z, sendo que a população de μ no nível α (menor energia) será maior que a de β (**Fig. 1.4.3.2**).

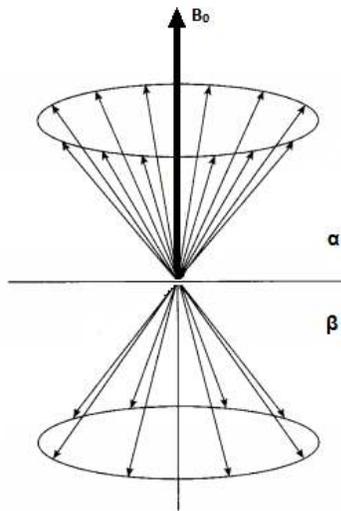


Fig. 1.4.3.2. Níveis de energias α e β ocupados por μ na presença de B_0 para núcleos com spin $1/2$.

Este fenômeno é conhecido como Efeito Zeeman e quanto maior a intensidade de B_0 , maior será a diferença entre os níveis de energia, aumentando a população em α . Com isso, quando se aplica a somatório de μ em α e β , o resultado é um vetor μ resultante em α , que apresentará freqüência de precessão em z denominada freqüência de Larmor (**Eq. 1.4.3.2.**)

$$\nu_0 = (\gamma/2\pi) \cdot |B_0| \quad (1.4.3.2)$$

Este vetor será igual para todos os núcleos equivalentes em uma amostra, resultando em um vetor macroscópico denominado Magnetização (M), que será a soma de todos os vetores μ resultantes microscópicos individuais. Como na Eq.1.4.3.2 se observa que ν_0 depende de γ , a frequência de Larmor será característica de cada núcleo (Neuhaus e Williamson, 1989).

Quando, além de $B_0(z)$, uma amostra é submetida a outro campo $B_1(xy)$ (gerado a partir de um pulso de RF no espectrômetro de RMN), de energia ressonante à frequência de Larmor deste núcleo, M deixará de precessar em z devido ao produto vetorial $M \times B_1$, passando a existir também as projeções transversais M_x e M_y , cujas intensidades serão dependentes do tempo, ou seja, da duração da aplicação do campo B_1 sobre M (**Fig. 1.4.3.3**).

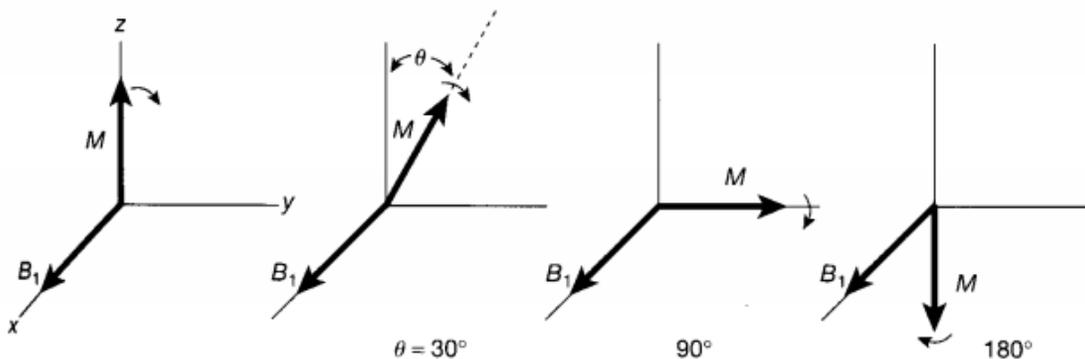


Fig. 1.4.3.3. Precessão de M em função do tempo de aplicação do campo B_1 .

Os espectrômetros de RMN medem a frequência de Larmor das componentes transversais de M através da aquisição do sinal elétrico induzido em um receptor com a presença de M_{xy} . O somatório dos sinais relativos às frequências de Larmor de cada núcleo consistirá o FID (*free induced decay*), que se transformará no espectro de RMN após aplicação da Transformada de Fourier.

1.4.3.2) O deslocamento químico (δ)

A frequência de Larmor de um núcleo em ressonância não dependerá apenas de B_0 e γ . A presença dos elétrons se movimentando na vizinhança também cria um pequeno campo local B_{loc} , cuja interação com B_0 torna ν_0 também dependente do ambiente em que este núcleo se encontra. Assim, um núcleo apresentará menor ν_0 quando rodeado de grupos doadores de elétrons em relação ao mesmo núcleo quando rodeado de grupos retiradores. A frequência de Larmor passa então a ser descrita pela Eq. 1.4.3.3.

$$\nu = (\gamma/2\pi).B_0(1-\sigma) \quad (1.4.3.3)$$

Nesta equação, $B_0(1-\sigma)$ consiste na perturbação de B_0 em função do deslocamento eletrônico, em que σ geralmente é positivo. Assim, o deslocamento químico pode ser definido como a variação em ν do núcleo em uma determinada posição na molécula em relação a este mesmo núcleo em uma molécula padrão. Para RMN em solução, o padrão adotado para o ^1H é o Tetrametilsilano, TMS (Lambert e Mazzola, 2003).

1.4.3.3) Relaxações Longitudinal (T_1) e Transversal (T_2)

Após a perturbação em M causada pelo pulso de RF, o restabelecimento do equilíbrio ocorre por dois processos: M retoma seu alinhamento com B_0 (relaxação Longitudinal) e M_{xy} decai para zero (relaxação Transversal). O primeiro processo é devido à mudança na diferença de população entre os níveis α e β que ocorre com a aplicação do pulso de RF, em que parte da população em β retorna ao nível fundamental α , liberando energia térmica para a rede. Fenômenos como emissões espontânea e estimulada de fótons são irrelevantes ou não se aplicam nesse

processo (Neuhaus e Williamson, 1989). Na relaxação transversal, ao contrário da anterior, não ocorre dissipação de energia térmica para rede. A diminuição de M_{XY} ocorre devido à perda de fase das contribuições individuais de M_{XY} , que é consequência das interações entre os momentos magnéticos individuais de spin (Lambert e Mazzola, 2003). À relaxação longitudinal, é atribuída a denominação relaxação spin-rede, cujo tempo em que este processo ocorre é denominado T_1 . Para a relaxação Transversal, é atribuída a denominação relaxação spin-spin e o tempo é denominado T_2 .

1.4.3.4) Relaxação dipolar e o efeito Overhauser nuclear (NOE)

Quando dois núcleos H_I e H_S estão especialmente próximos (aproximadamente 4 Å), seja em uma mesma molécula ou devido à atração intermolecular, o campo local B_{loc} existente em H_A irá perturbar a ressonância de H_B , e vice-versa, causando acoplamento dipolo-dipolo. O movimento Browniano dos núcleos causará alterações randômicas na intensidade e orientação de B_{loc} , resultando em um campo incoerente (em que as componentes possuem várias frequências) no meio líquido. Embora o acoplamento escalar seja nulo ($J_{IS} = 0$), o acoplamento dipolar altera a relaxação spin-rede (T_1) no ambiente de interação entre os núcleos, constituindo a base da relaxação dipolar.

O acoplamento dipolo-dipolo causará nova configuração dos níveis de energia de spins. Quando ela ocorre entre dois núcleos de mesma espécie (homonuclear), existirão quatro níveis de energia, organizados conforme a **Fig. 1.4.3.4** (Neuhaus e Williamson, 1989).

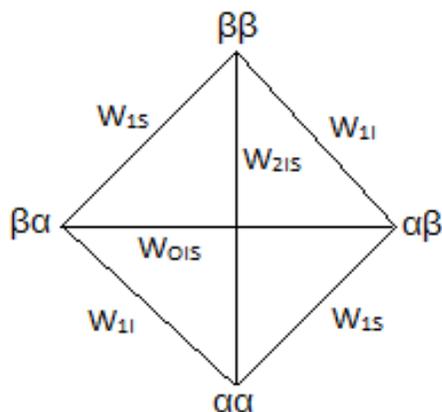


Fig. 1.4.3.4. Diagrama de níveis de energia em um sistema de dois spins homonucleares. W são as probabilidades de ocorrência das respectivas transições. Estados de spins estão escritos com o de I primeiro e o de S em segundo.

O efeito NOE pode ser definido como a mudança na fração da intensidade de ressonância de H_I quando se satura H_S . Devido à existência do acoplamento dipolar entre essas espécies, ele estará intimamente relacionado com as transições de populações entre os níveis de energia. Enquanto essas transições não podem ser induzidas através de um pulso externo de RF, elas podem ocorrer no processo de relaxação dipolar, estabelecendo a relação do NOE com esse tipo de relaxação.

A saturação da ressonância de H_S é obtida aplicando um pulso prolongado, pouco intenso, em $\nu(H_S)$. Quando H_S é saturado, ocorre equalização da população nos níveis de energia, aumentando a população nos níveis $\alpha\beta$ e $\beta\beta$ e diminuindo em $\alpha\alpha$ e $\beta\alpha$. Nesta processo, não há mudança na intensidade da transição, pois não houve mudança em suas respectivas populações em relação à situação de equilíbrio: $(N_{\alpha\alpha} - N_{\beta\alpha})$ e $(N_{\alpha\beta} - N_{\beta\beta})$ permanecem constantes (**Fig. 1.4.3.5 A e B**). Após aplicação do pulso seletivo em H_S , o restabelecimento do equilíbrio ocorrerá via relaxação dipolar, com as probabilidades de transição W_{215} e W_{015} ou a W_1 , que não causarão efeito NOE por serem isoladas de cada núcleo. Se ocorrer a

transição com probabilidade W_{2IS} , o retorno da população ao nível fundamental $\alpha\alpha$ ocasionará aumento nas diferenças de populações ($N_{\alpha\alpha} - N_{\beta\alpha}$) e ($N_{\alpha\beta} - N_{\beta\beta}$), **Fig. 1.4.3.5C**, aumentando a intensidade da ressonância em H_I (NOE positivo). Analogamente, se no processo de relaxação ocorrer a transição com probabilidade W_{OIS} , a mesma diferença das populações diminuirá a ressonância em H_I , originando NOE negativo (Neuhaus e Williamson, 1989) (**Fig. 1.4.3.5D**).

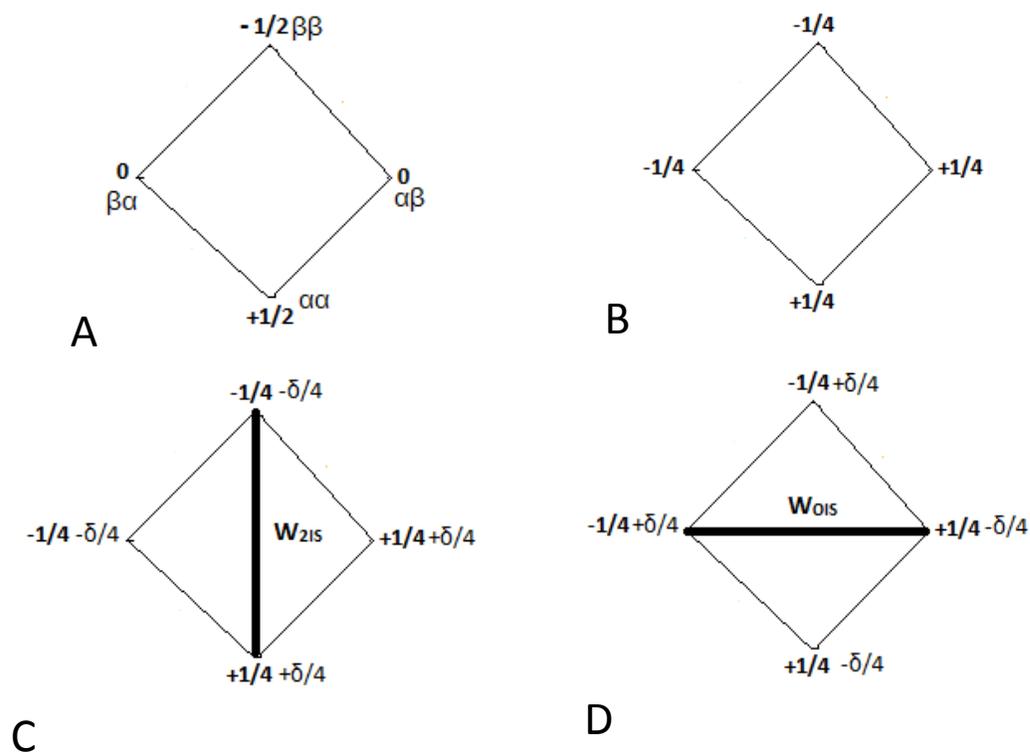


Fig. 1.4.3.5. Mudança na população dos níveis de energias com as transições de probabilidades W_{2IS} e W_{OIS} , causadoras de NOE, após saturação da ressonância de H_S .

1.4.3.5) Experimento ROESY (Rotating frame Overhauser Enhancement SpectroscopY)

Este experimento foi idealizado por Bothner-By e colaboradores em 1984, com objetivo de desenvolver uma nova metodologia para estudar o efeito NOE. Este experimento pode ser realizado em uma ou duas dimensões, sendo que em 1D ele foi primeiramente denominado CAMELSPIN (Cross-relaxation Appropriate for Mini-molecules EmuLated by SPIN-locking). A principal diferença deste experimento com o tradicional NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), é o emprego da condição de trava de spin (*spin-lock condition*) durante um tempo definido τ_m , denominado no espectrômetro *tempo de mistura*. Assim, o rOe (rotational Overhauser effect) não será aumentado apenas em virtude das interações entre as componentes longitudinais da magnetização dos núcleos, mas também pelas componentes transversais. A principal vantagem deste experimento é que essas condições permitem que todas as moléculas se comportem em regime de rOe positivo e a determinação deste efeito é melhorada mesmo para moléculas cujo produto $\omega \cdot \tau_c$ (ω é a frequência de Larmor e τ_c é o tempo de correlação rotacional) é pequeno (Neuhaus e Williamson, 1989), como ocorre nos complexos com CDs (Schneider et al, 1998).

A sequência de pulsos do experimento ROESY em 2D está mostrada na **Fig. 1.4.3.6** (Bax e Davis, 1985).

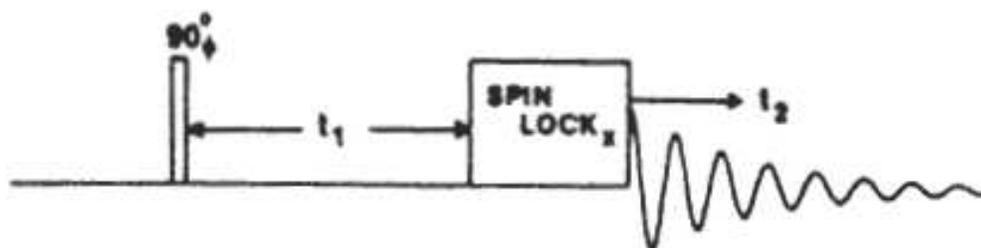


Fig. 1.4.3.6. Sequência de pulsos para o experimento ROESY-2D.

O experimento em 1D inicia-se com aplicação de um pulso seletivo de 180° , invertendo a fase de H_S . Em seguida, um pulso também seletivo de 90°_x intenso e coerente é imediatamente aplicado por um tempo τ_m , enquanto que no 2D este pulso é aplicado depois de t_f e não existe o pulso inicial de 180° (Fig. 1.8). Neste período τ_m (tempo de mistura), as projeções dos vetores de magnetização de H_S permanecem, precessando no plano XY (trava de spin), em que ocorrerá a interação dipolar com H_I e o rOe , de forma análoga aos fenômenos descritos para NOE. As funções de densidade espectrais que descrevem a interação no experimento de ROESY serão positivas para todos valores de τ_c , diferindo das funções obtidas em NOESY.

1.4.3.6) O Experimento DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

A difusão molecular em solução é um fenômeno estritamente relacionado à dinâmica molecular de sistemas químicos e biológicos. Seu estudo é empregado utilizando RMN, devido a característica não invasiva da técnica. Embora a difusão molecular não esteja relacionada explicitamente com as interações e energias localizadas dos spins, a relação desta propriedade com os fenômenos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) é mais facilmente interpretada. O movimento Browniano causa perturbações nos campos magnéticos locais dos núcleos, refletindo em seus respectivos T_1 e T_2 (Price, 1997). Como a difusão molecular resulta do movimento browniano molecular translacional, os tempos de relaxação podem ser correlacionados com esta propriedade.

Os estudos da difusão molecular por RMN iniciaram-se com a descoberta dos ecos de spin por Hahn em 1950. Neste experimento, a aplicação da sequência de pulsos $[90^\circ-\tau-180^\circ-\tau-(eco)-]_n$ resultará na perfeita refocalização da magnetização dos núcleos (eco dos spins) somente se não existir qualquer variação no gradiente de campo magnético G empregado durante o tempo 2τ . Entretanto, a difusão molecular não permite que G se mantenha totalmente

homogêneo, diminuindo as amplitudes dos ecos no tempo 2τ . A relação entre as amplitudes dos ecos de spin e o coeficiente de difusão D é obtida com a equação 1.4.3.4. (Souza e Laverde, 2002):

$$\frac{A(2\tau)}{A(0)} = \exp\left[-\left(\frac{2\tau}{T_2}\right) - \frac{2}{3} \gamma^2 G^2 D \tau^3\right] \quad (1.4.3.4)$$

A desvantagem na equação de Hahn é a difícil separação das contribuições referentes à relaxação transversal (T_2) e à difusão molecular (D).

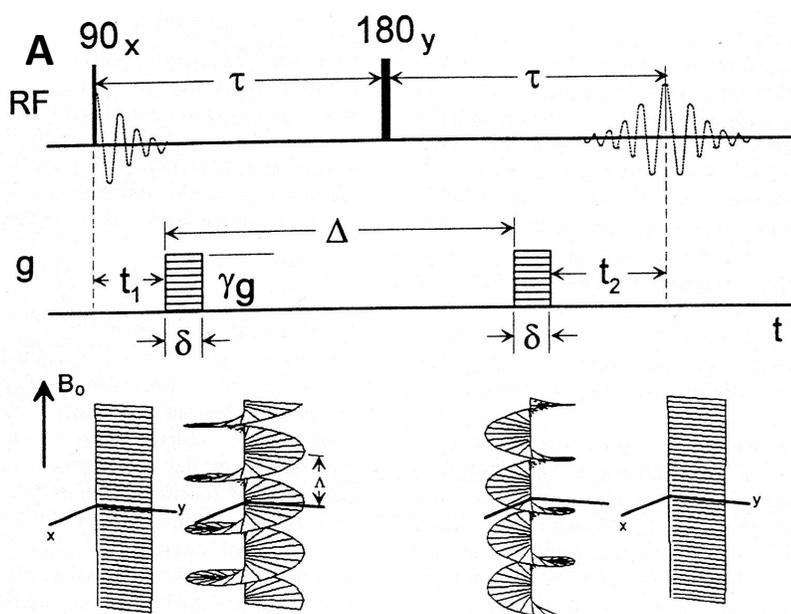
O efeito de D na atenuação do eco pode ser separado do efeito de T_2 com a sequência de pulsos de Carr e Purcell em 1954, $90^\circ-\tau-[180^\circ-\tau-(\text{eco})-\tau-180^\circ-\tau-(\text{eco})-]_n$, **Eq. 1.4.3.5**.

$$\frac{A(t)}{A(0)} = \exp\left[-\left(\frac{t}{T_2}\right)\right] \exp\left[-\frac{1}{3} (\gamma G \tau)^2 D \tau\right] \quad (1.4.3.5)$$

Mesmo com esta sequência e o melhoramento da amplitude do eco com o experimento de Ecos de Spin Estimulado (STE), também discutido por Hahn em seu trabalho em 1950, a utilização de gradientes de campo magnético estático (G) resultava na necessidade de se utilizar elevados G para medir D pequenos, o que provocava alargamento do eco e, conseqüentemente, diminuição da razão sinal/ruído, aumentando a dificuldade de detecção (Souza e Laverde, 2002). Estas dificuldades foram superadas com o emprego de gradientes de campo magnético pulsados (PFG), empregados em experimentos de ecos de spin (PFGSE) (Johnson Jr, 1999) e ecos de spin estimulados (PFGSTE) (Stilbs, 1987; Woessner,

1961, Tanner, 1970). Outras vantagens recorrentes da utilização de PFG são (Parella, 1998): a) redução do número de etapas de ciclos de fases para supressão de artefatos indesejáveis; b) diminuição do tempo de aquisição dos sinais; c) redução dos ruídos nos experimentos em 2-D; d) melhor processamento dos espectros; e) supressão eficiente de sinais indesejáveis, como os dos solventes e relativos a acoplamentos heteronucleares.

As seqüências de pulsos dos experimentos PFGSE e PFGSTE podem ser visualizadas na **Fig. 1.4.3.7** (Johnson Jr, 1999).



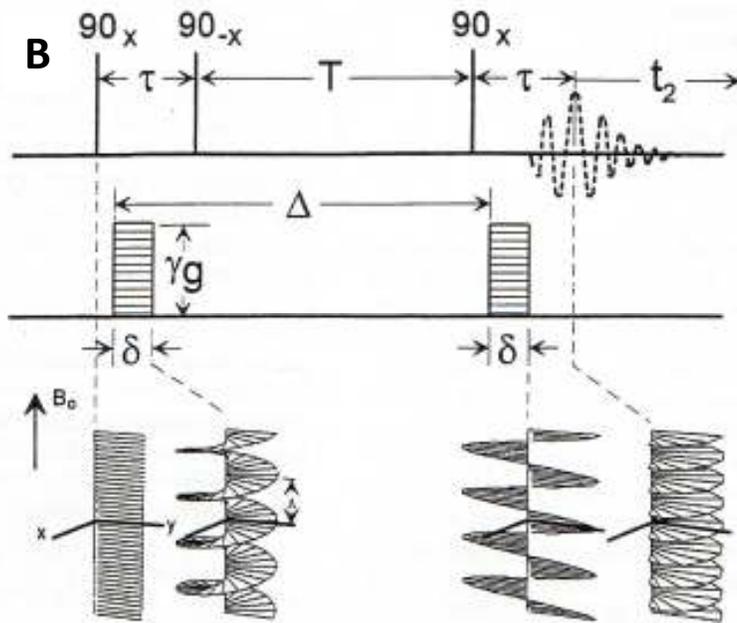


Fig. 1.4.3.7. Sequência de pulsos e comportamento das isocromatas nos experimentos PFGSE (A) e PFGSTE (B).

Quando o gradiente de campo é aplicado no campo magnético principal B_0 , os spins nucleares, com suas respectivas frequências de Larmor, se distribuem em posições dependentes do ângulo de fase $\phi(z) = -\gamma B(z)\delta$ (isocromatas em hélice, Fig. 1.4.3.7). A utilização de PFG possibilita as seguintes vantagens (Souza e Laverde, 2002): (a) separação do efeito de atenuação do eco devido à difusão do efeito devido a relaxação transversal (T_2), conduzindo-se o experimento a um intervalo τ fixo entre os pulsos de RF e variando-se a área de pulso do gradiente; (b) o eco de spin é detectado em condições de campo magnético homogêneo.

Em 1992, Morris e Johnson desenvolveram uma técnica analítica baseada em PFGSE que possibilitava a distinção entre os constituintes de uma amostra por meio dos coeficientes de difusão molecular para cada deslocamento químico. Esta técnica foi denominada DOSY (Diffused Ordered Spectroscopy). No experimento DOSY, o coeficiente de difusão molecular D é obtido do decaimento da

intensidade do sinal I , que é função da área do gradiente de campo magnético q ($q = \gamma g \delta$) (Eq. 1.4.3.6).

$$I(q, \nu) = \sum \left[A_n(\nu) \cdot \exp \left[-D_n \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) q^2 \right] \right] \quad (1.4.3.6)$$

Na equação acima, $A_n(\nu)$ é a intensidade dos sinais de RMN para $q = 0$, D_n é o coeficiente de difusão do componente n e Δ é o tempo de monitoramento da difusão. O espectro DOSY possui duas dimensões, na abcissa o deslocamento químico e na ordenada os respectivos D_n . Ele é obtido aplicando-se uma transformada inversa de Laplace após o processamento do sinal por transformada de Fourier.

O experimento DOSY permite uma análise global da dinâmica dos constituintes em uma mistura, compreendendo desde pequenas moléculas a agregados moleculares e complexos. Além disso, outras vantagens são obtidas, como detecção de impurezas sem interferência, avaliação de espécies em equilíbrio e seleção de uma determinada espécie para análises. A Baixa sensibilidade da RMN, sobreposição de sinais e coeficientes de difusão muito próximos prejudicam na qualidade dos espectros DOSY, dificultando a interpretação dos resultados. O experimento DOSY também requer boa estabilidade de sinal, que pode ser comprometida por fenômenos como correntes de vórtice induzida na amostra, acoplamento entre a bobina de gradiente e o campo magnético principal e distúrbios do sistema de trava da frequência e do campo. Assim, para tentar minimizar tais efeitos, várias sequências de pulsos foram desenvolvidas, cada uma apresentando vantagens e desvantagens de acordo com as características dos constituintes da amostra. Os principais exemplos de sequências de pulsos em DOSY são (Souza e Laverde, 2002): BPPSTE (Bipolar Pulser Pair STimulated Echo), BPPLIED (Bipolar Pulser Pair Longitudinal Eddy currents Decay), GCSTE (Gradient Compensated STimulated

Echo) e GCSTESL (Gradient Compensated STimulated Echo Spin Lock) (**Fig. 1.4.3.8**)

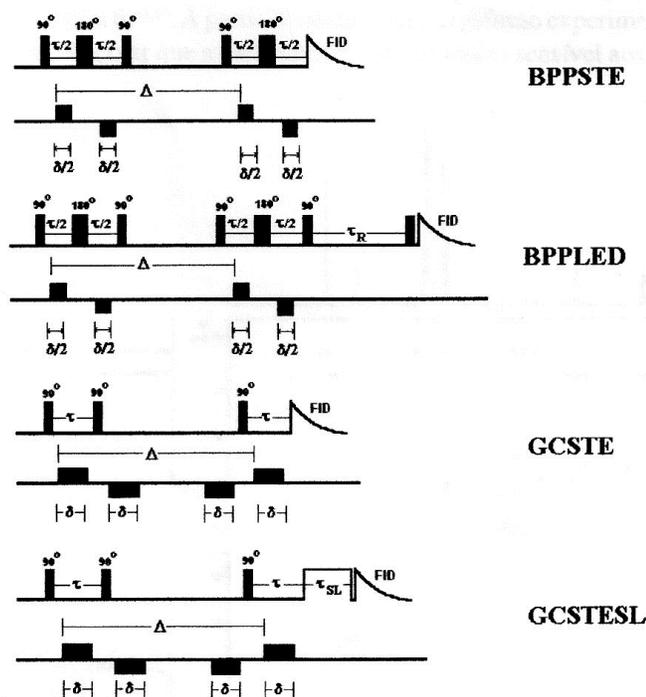


Fig. 1.4.3.8. Principais seqüências de pulsos utilizadas em DOSY.

A aplicação de experimentos simples de PFGSE em complexos de ciclodextrinas iniciou-se com Stilbs et al em 1983, e o primeiro estudo por DOSY com Lin et al em 1995. A formação do complexo de inclusão em solução contendo um determinado ativo e CD pode ser evidenciada com diminuição no valor de seu coeficiente de difusão. Quanto maior a diferença entre D na solução com CD em relação a D obtido em solução sem CD, maior será a fração deste ativo no complexo de inclusão. Assim, a porcentagem de encapsulação de um ativo pode ser obtida da **Eq. 1.4.3.7** (Calderini, 2008).

$$P = (D_{\text{livre}} - D_{\text{compl.}})/(D_{\text{livre}} - D_{\text{CD-observ.}}) \quad (1.4.3.7)$$

D_{livre} é o coeficiente de difusão do ativo em solução sem CD, $D_{\text{compl.}}$ o coeficiente de difusão do ativo na presença de CD e $D_{\text{CD-observ.}}$ o coeficiente de difusão da CD na ausência do ativo, pois é empregada a aproximação $D_{\text{CD-observ.}} = D_{\text{CD-livre}}$.

1.5) Caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido

1.5.1) Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)

Infravermelho compreende uma vasta região do espectro de radiação eletromagnética entre o visível e microondas, numa faixa de freqüências entre $14290 - 200 \text{ cm}^{-1}$. Esta região engloba radiações com energias da mesma ordem de grandeza das energias roto-vibracionais das moléculas, o que confere a esta técnica espectroscópica ampla aplicação na caracterização de compostos orgânicos e inorgânicos. Em Química Orgânica, a principal janela espectral de interesse compreende o intervalo de freqüências $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, em que os principais grupos orgânicos apresentam absorção de radiação. As regiões de $14290 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ e $400 - 200 \text{ cm}^{-1}$ são denominadas infravermelhos próximo e distante, respectivamente.

Existem dois tipos de vibrações moleculares: estiramentos e deformações. Estiramento corresponde ao movimento de vibração realizado ao longo do próprio eixo da ligação química, de forma que a distância entre os átomos oscile periodicamente. Na deformação, a oscilação ocorre entre os ângulos de ligação entre os átomos de um mesmo grupo ou então entre o grupo inteiro de forma conjunta em relação a uma outra parte mais fixa da molécula.

Embora as freqüências rotovibracionais de uma molécula sejam função de toda sua estrutura, alguns grupos orgânicos possuem certa faixa de absorção de

radiação i.v. que são praticamente independentes do resto da molécula e de importância fundamental para caracterizar esse tipo de compostos. Alguns exemplos das principais bandas de absorção de alguns grupos funcionais orgânicos podem ser visualizados na **Tabela 1.5.1**.

Tabela 1.5.1. Faixa de freqüência de absorção no i.v. de alguns grupos funcionais orgânicos.

Grupo	Freqüência (cm⁻¹)
OH	3200 – 3700 (est) ; 1000 – 1200 (def)
C=C	650 – 1000
C=C _(aromático)	1500 – 1700 (est) ; 650 – 900 (def)
C=O	1550 – 1900
C≡N	2250 – 2350
NH	3250 – 3550
S=O	1000 – 1050

A formação de complexos de inclusão com CDs pode ser caracterizada por espectroscopia de absorção no i.v. apenas em alguns casos, portanto, esta é uma técnica de caracterização menos abrangente em relação às demais. A causa disto é que as bandas de absorção das CDs e de muitos ativos raramente têm suas intensidades e freqüências de absorção alteradas em função da formação do complexo de inclusão. Além disso, a pouca massa de ativo em relação a da CD no complexo dificulta ainda mais a caracterização. Complexos de inclusão de ativos que possuem grupos carbonílicos são mais facilmente caracterizados, como o complexo envolvendo ácido acetilsalicílico (Nakai et al, 1978; El-Gendy et al, 1986) e outros (Gil et al, 2004; Nacsá et al, 2009; Maestrelli et al, 2009). Entretanto, complexos de inclusão que não possuem o grupo carbonílico, também

já foram caracterizados e alguns exemplos podem ser consultados nas referências Li e Xu, 2010; Tang et al, 2005; Viernstein et al, 1993.

1.5.2) Difratometria de raios-X (DRX)

A radiação X consiste de ondas eletromagnéticas de alta energia e comprimentos de onda na ordem de picômetros, portanto, da mesma magnitude de distâncias interatômicas. Assim, esta técnica permite que as posições e distâncias de ligações entre os átomos sejam determinadas, sendo importante na elucidação estrutural. A técnica é baseada na difração dos feixes de raios-X que incidentes em uma amostra (**Fig. 1.5.2.1**), cujo ângulo de difração depende do comprimento de onda λ do feixe incidente e da distância interplanar d_{hkl} (h, k, l são os índices de Miller, relacionados à estrutura cristalina do sólido) através da equação de Bragg (Smart e Moore, 2005).

$$n\lambda = 2.d_{hkl}.\text{sen}(\theta) \quad (1.5.2.1)$$

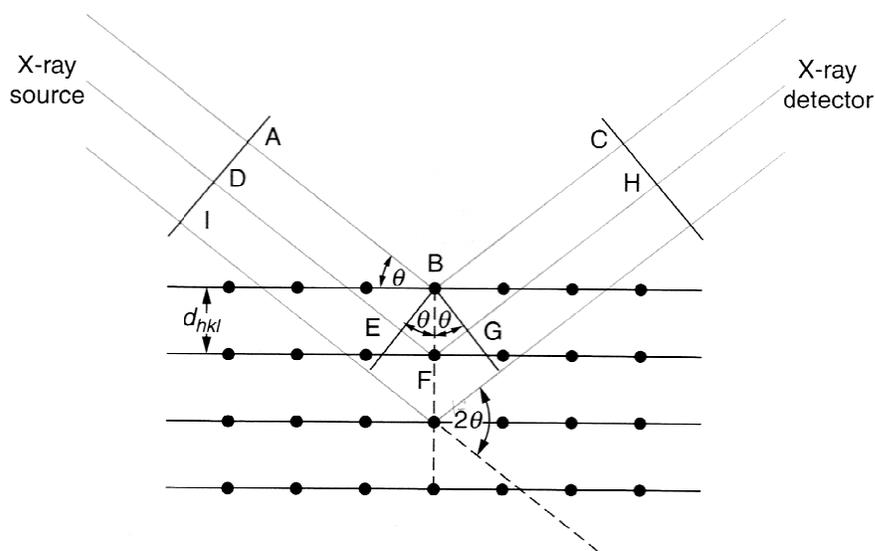


Fig. 1.5.2.1. Reflexões de Bragg em planos espaçados por d_{hkl} .

Em experimento de DRX, a radiação difratada é detectada em função do ângulo de incidência 2θ , conforme mostra o esquema na **Fig. 1.5.2.2** (Smart e Moore, 2005).

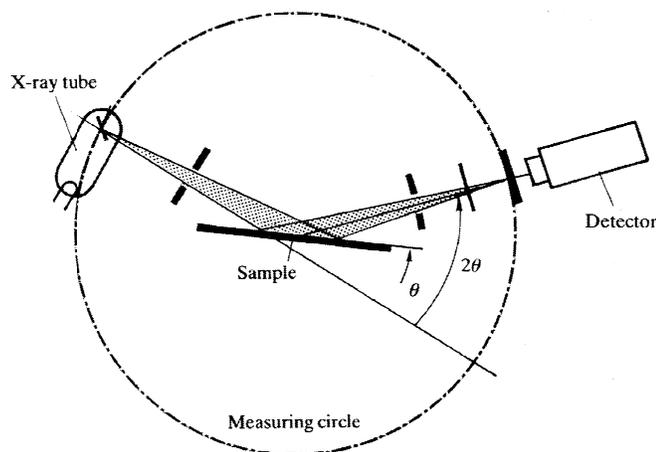


Fig. 1.5.2.2. Diagrama de um difratômetro de raios-X.

Embora a caracterização estrutural através de DRX seja tarefa muito complicada do ponto de vista de interpretação dos resultados experimentais, sua aplicação a complexos com CDs é relativamente simples, pois é baseada apenas em uma análise qualitativa do padrão de difração dos complexos de inclusão em relação aos respectivos padrões dos constituintes puros. CDs naturais são sólidos cristalinos, apresentando padrão definido de difratograma, o mesmo ocorrendo para ativos sólidos cristalinos. Entretanto, quando o complexo de inclusão ativo:CD se forma, sua estrutura no estado sólido será diferente da de seus constituintes puros, sendo na maioria das vezes amorfa. Assim, esta técnica se torna interessante na caracterização de complexos com CDs, podendo ser encontrados vários trabalhos nessa área (Giordano et al, 2001).

1.5.3) Análise termogravimétrica (TGA)

TGA é um tipo de análise térmica em que se registra continuamente a massa da amostra, que se encontra sob atmosfera controlada, em função da temperatura, que geralmente aumenta linearmente no tempo (Skoog, 2001). Portanto, nesta técnica é possível, por exemplo, analisar quantitativamente processos de desidratação e decomposição de amostras em função da temperatura, fenômenos como pseudo-fusão ou decomposições oriundas de reações químicas com a atmosfera do forno do equipamento (reduzora, oxidante ou inerte).

Análises térmicas possuem grande aplicabilidade na caracterização de complexos de inclusão com CDs no estado sólido. As principais técnicas empregadas são DSC e TGA. Quando na formação dos complexos de inclusão, as estruturas dos constituintes puros no estado sólido são substituídas pela nova estrutura do complexo, alterando os perfis das transições térmicas dos ativos e das CDs, como fusão e desidratação, por exemplo. A principal mudança nas transições térmicas do ativo ocorre na transição térmica relativa à sua fusão, em que no complexo essa transição deixará de existir. Nas CDs, com substituição das moléculas de água por moléculas de ativo no interior de sua cavidade, a transição referente à desidratação dessas moléculas deixará de existir na curva térmica do complexo de inclusão. Assim, as técnicas de análise térmica são importantes na caracterização de complexos de inclusão com CDs por fornecerem evidências conclusivas da sua formação (Giordano et al, 2001).

1.6) Cálculos teóricos

1.6.1) Fundamentos da Química Quântica, aplicações a sistemas multieletrônicos e orbitais moleculares

Mecânica Quântica descreve o comportamento físico dos corpos no mundo microscópico, portanto de partículas, onde as leis clássicas de Newton não se aplicam. Nessa dimensão de tamanho, partículas podem também ser definidas como ondas (dualidade partícula – onda), cujas energias são quantizadas. A posição no espaço e o momento linear dessas partículas se tornam propriedades não duplamente mensuráveis no tempo simultaneamente (Princípio da Incerteza de Heisenberg), portanto, sendo tratadas na partícula sob forma de probabilidades (McQuarrie e Simon, 1997).

O comportamento ondulatório das partículas em função da posição (r), no tempo (t), é descrito através de sua função de onda $\psi(r, t)$. Aplicando o operador Hamiltoniano H em $\psi(r, t)$ ($H\psi(r, t) = -i\hbar\partial\psi/\partial(t)$), a energia da função de onda é determinada. Para uma partícula no espaço tridimensional, esta equação é denominada Equação de Schrödinger (**Eq. 1.6.1.1**) (Levine, 1991).

$$i\hbar\frac{\partial\Psi(\mathbf{r},t)}{\partial t} = \left[-\frac{\hbar^2\nabla^2}{2m} + V(\mathbf{r},t)\right]\Psi(\mathbf{r},t) \quad (1.6.1.1)$$

Nesta equação, $\hbar = h/(2\pi)$, m é a massa da partícula e $V(r, t)$ é sua energia potencial e a energia cinética é expressa pelo operador $-\hbar^2\nabla^2/(2m)$ em $\psi(r, t)$.

A probabilidade de encontrar a partícula no tempo t é obtida integrando a função $|\psi(r, t)|^2$, denominada função densidade de probabilidade, no espaço (**Eq. 1.6.1.2**). Quando se aplica a função de onda dos elétrons dos átomos e moléculas, $|\psi(r, t)|^2$ descreverá os respectivos orbitais atômicos e moleculares.

$$\text{Pr}(a \leq x \leq b) = \int_a^b |\psi|^2 dx \quad (1.6.1.2)$$

A equação de Schrödinger pode ser resolvida analiticamente apenas para o átomo de hidrogênio ou íons dotados apenas de um elétron (He^+ , Li^{2+} , etc) considerando-os como sistemas em que os elétrons se encontram ao redor de um núcleo rígido (aproximação de Born-Oppenheimer). Para os demais átomos, a equação de Schrödinger não pode ser resolvida analiticamente, pois a contribuição da energia potencial referente as repulsões intereletrônicas ($V_{\text{interelet}}(r,t)$) não pode ser determinada, pois $V_{\text{interelet}}(r,t)$ associado a essa interação depende das distâncias entre os elétrons, grandeza esta que não pode ser determinada precisamente devido ao princípio da incerteza. Assim, faz-se necessário recorrer a métodos de aproximação para resolver a equação de Schrödinger quando aplicada a átomos multieletrônicos.

A utilização de métodos de aproximação para resolver a equação de Schrödinger compreende duas principais metodologias: Método Variacional e Teoria das Perturbações. No primeiro, quando se trata de átomos multieletrônicos, o termo referente a $V_{\text{interelet}}(r,t)$ do Hamiltoniano é eliminado, sendo esta energia compensada alterando $\psi(r, t)$. Tal alteração pode compreender tanto a introdução de um parâmetro variacional numa função de onda hidrogeniônica como a substituição por uma nova função de onda. Na Teoria de Perturbação, a principal alteração ocorre no Hamiltoniano, aplicando-se o Hamiltoniano perturbado em $\psi(r, t)$ de forma a compensar $V_{\text{interelet}}(r,t)$.

No estudo de átomos multieletrônicos, os dois métodos de aproximação podem ser empregados para resolver a equação de Schrödinger. O Método Variacional é empregado definindo ψ como produto de n funções de onda (**Eq. 1.6.1.3**), não necessariamente funções hidrogeniônicas, respectivas para cada elétron, de forma a se obter a energia mais próxima possível do sistema exato (obtida experimentalmente). Esse limite é denominado Limite de Hartree-Fock.

$$\Psi(r_1, r_2, \dots, r_n) = \phi(r_1) \cdot \phi(r_2) \cdot \dots \cdot \phi(r_n) \quad (1.6.1.3)$$

Para obter o valor aproximado da contribuição $V_{\text{interelet}}(r,t)$ à energia, a Teoria da Perturbação é empregada de forma iterativa, ou seja, atribuindo valores aleatórios para as distâncias interatômicas e realizando-se cálculos de energia por ciclos até que se atinja resultado convergente. O Hamiltoniano perturbado utilizado para calcular $V_{\text{interelet}}(r,t)$ é denominado Operador de Fock (\hat{F}). Este esquema é denominado Método do Campo Auto-Consistente e é empregado para diversos tipos de funções de onda.

A Mecânica Quântica descreve a ligação química através da Teoria do Orbital Molecular (TOM). OMs são funções de onda obtidas das combinações lineares dos orbitais atômicos (CLOA) (Eq. 1.6.1.4), de forma que os elétrons envolvidos na ligação ocuparão esses orbitais de acordo com seus níveis de energia. Os orbitais de menor energia são denominados “ligantes”, pois contribuirão para a formação da ligação química, enquanto que os de maiores energias serão denominados não-ligantes (energia próxima a dos antigos orbitais atômicos) e antiligantes (energias maiores que as dos antigos orbitais atômicos, portanto, orbitais que desestabilizam a molécula quando ocupados).

$$\Psi_{\text{mol}} = C_1\Psi_A \pm C_2\Psi_B \pm C_3\Psi_C \pm \dots \pm C_i\Psi_N \quad (1.6.1.4)$$

De acordo com a equação acima, uma molécula formada por N átomos terá N OMs, que serão ocupados pelos elétrons das ligações químicas de acordo com o princípio da exclusão de Pauli. As energias de cada ψ_{mol} são obtidas da equação de Schrödinger, resultando no determinante da matriz abaixo, denominado Determinante de Slater (Eq. 1.6.1.5)

$$\det \begin{bmatrix} H_{11} - E.S_{11} & \dots & H_{1N} - E.S_{1N} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ H_{1N} - E.S_{1N} & \dots & H_{NN} - E.S_{NN} \end{bmatrix} = 0 \quad (1.6.1.5)$$

Na matriz, H_{ij} e S_{ij} são definidos pelas equações abaixo (Eq. 1.6.1.6 e 1.6.1.7):

$$H_{ij} = \int \psi_i \cdot \hat{H} \cdot \psi_j \, d\mathbf{r} \quad (1.6.1.6)$$

$$S_{ij} = \int \psi_i \cdot \psi_j \, d\mathbf{r} \quad (1.6.1.7)$$

Quanto maior número de átomos da molécula e mais complexas suas respectivas funções de onda, maior o tempo de cálculo do determinante secular, constituindo fator limitante de acordo com a capacidade de processamento utilizada (McQuarrie e Simon, 1997).

1.6.2) Cálculos teóricos em nível semiempírico e o método PM3

A otimização molecular consiste na busca pela estrutura mais estável (ou seja, menor energia) de determinada molécula. Neste processo, as distâncias e ângulos das ligações são variados (à cada conformação atribui-se uma função de onda característica) até que as respectivas energias atinjam o campo auto – consistente. O tamanho da molécula, a natureza do cálculo (*ab-initio* ou semiempírico) e a capacidade de processamento computacional determinarão o tempo deste cálculo.

Métodos semiempíricos foram desenvolvidos para possibilitar cálculos quânticos de médias e grandes moléculas, em que a aplicação de métodos *ab-initio* se torna restrita computacionalmente. A principal característica da metodologia semiempírica é o emprego de aproximações mais grosseiras no sistema empregado, com objetivo de simplificar os cálculos. Os métodos semiempíricos mais simples foram desenvolvidos para moléculas orgânicas poliênicas planares, em que apenas os elétrons π são tratados explicitamente. Assim, o Hamiltoniano empregado apresenta a seguinte composição matemática (Eqs. 1.6.2.1 e 1.6.2.2):

$$\hat{H}\pi = \sum_{i=1}^{n(\pi)} \hat{H}\pi(i) + \sum_{i=1}^{n(\pi)} \sum_{j>i} \frac{1}{r(ij)} \quad (1.6.2.1)$$

$$\hat{H}\pi(i) = -\frac{1}{2} \nabla^2 + V(i) \quad (1.6.2.2)$$

Na Eq. 1.6.2.2, $V(i)$ é o potencial de repulsão do elétron de valência em relação ao núcleo e os demais elétrons internos, e $\sum_{i=1}^{n(\pi)} \sum_{j>i} \frac{1}{r(ij)}$ é o parâmetro de repulsão inter-eletrônica dos elétrons de valência.

A teoria mais simples é a do *Método do Orbital Molecular do Elétron Livre* (FE MO), em que além das considerações feitas, o parâmetro de repulsão inter-eletrônica no Hamiltoniano ($\sum_{i=1}^{n(\pi)} \sum_{j>i} \frac{1}{r(ij)}$) não é levado em conta, portanto, tratando a $\psi_{\text{molécula}}$ como um somatório de N funções de onda de cada elétron. Entretanto, o método semiempírico mais famoso empregado para este tipo de sistema é o *Método dos Orbitais Moleculares de Hückel* (HMO). Neste método, desenvolvido em 1950, o parâmetro de repulsão intereletrônica é tratado como um parâmetro médio implícito no Hamiltoniano e os orbitais π são definidos como

CLOA, obtendo um determinante secular dos elétrons π . Além disso, apenas são combinados átomos vizinhos, tornando mais simples a resolução deste determinante. O tratamento explícito da repulsão intereletrônica em $\hat{H}\pi$ surgiu em 1953 com o método de Pariser-Parr-Pople (PPP).

Após o desenvolvimento dos métodos semiempíricos para políenos orgânicos planares, surgiram métodos mais gerais, ou seja, aqueles que se aplicam a todas as moléculas e tratam elétrons de valência σ e π . O método de Hückel aplicado também em moléculas não planares foi denominado *Método de Hückel Estendido* (Levine, 1991).

A generalização do método PPP, envolvendo todas as moléculas e tratando elétrons de valência σ e π explicitamente, surgiu primeiramente com Pople, Santry e Segal em 1965 com o método denominado CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*). Neste método, emprega-se a aproximação ZDO (*Zero Differential Overlap*), em que as integrais envolvendo orbitais atômicos diferentes são consideradas nulas (Morgon e Coutinho, 2007), para as integrais de repulsão entre três ou mais átomos. Em um mesmo átomo ou entre 2 átomos vizinhos, tais integrais são consideradas usando orbitais de Slater do tipo s (s STOs). Melhorias nesse método foram obtidas com o surgimento do método INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) em 1967 por Pople, Beveridge e Dobosh, e posteriormente com o método NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), também elaborado por Pople, Santry e Segal em 1965. Neste último, apenas integrais de repulsão entre orbitais atômicos diferentes entre dois ou mais átomos passaram a ser negligenciadas, portanto, tornando o método mais completo dos três. Esses métodos, embora permitam resultados satisfatórios de otimização molecular, falham na estimativa de energias. Assim, Dewar e colaboradores em 1969 elaboraram um método de parametrização baseado em INDO, voltado para a boa determinação de propriedades químicas, como: energia de ligação, momento de dipolo, calor de formação, etc, que foi denominado MINDO/1 (*Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap version 1*) e duas versões posteriores. Em 1977, Dewar e Thiel desenvolveram um método de

parametrização superior baseado em NDDO, que foi denominado MNDO (*Modified Neglect Diatomic Overlap*).

Embora o método MNDO tenha possibilitado avanços significativos na determinação de propriedades químicas, ligações de hidrogênio e energias de ativação ainda eram mal determinadas. Então, em 1985, Dewar, Stewart e colaboradores desenvolveram o método AM1 (*Austin Model 1*), parametrizado par vários átomos, através de modificações nos orbitais de valência e na função de repulsão da parte atômica interna. O método AM1 permitiu melhor descrição das propriedades mencionadas, sendo posteriormente superado pelo método PM3 (*Parameterized Method 3*), desenvolvido por J.J.P. Stewart, em 1989. A superioridade do método PM3 frente ao AM1 está no aprimoramento da parametrização. No PM3, os parâmetros são obtidos de forma a reproduzir os dados experimentais, enquanto que no AM1 eles são obtidos diretamente dos dados experimentais ou introduzidos por intuição química (Levine, 1991).

A otimização dos parâmetros no PM3 é feita baseado em funções de referência, que são construídas considerando dados experimentais de geometria, entalpia de formação, momento de dipolo e potencial de ionização. A primeira é obtida de dados experimentais de difração de raios-X no estado sólido, enquanto que as demais de estudos em fase gasosa. No cálculo das funções de referência, inicialmente a geometria é otimizada, sendo as demais, que são dependentes da mesma, obtidas posteriormente. As funções de referência para entalpia de formação e momento de dipolo são obtidas dos respectivos campos auto – consistentes, enquanto que funções de potencial de ionização são obtidas de resultados das energias dos orbitais moleculares. Os elementos já parametrizados em PM3 são: H, C, Si, Ge, Sn, Pb, N, P, As, Sb, Bi, O, S, Se, Te, F, Cl, Br, I, Al, Ga, In, Tl, Be, Mg, Zn, Cd e Hg (Stewart, 1989). Em 2007, o mesmo autor publicou uma versão mais recente deste método, denominada PM6, melhorando a parametrização de alguns elementos e expandindo-a para até 70 elementos (Stewart, 2007).

Como os métodos PM3, AM1 e MNDO utilizam apenas funções de valência para orbitais s e p, tais métodos não podem ser empregados para metais de transição. Além disso, para elementos cuja contribuição dos orbitais d são importantes na formação de OMs (elementos a partir do segundo período da tabela periódica), o desempenho desses métodos pode ser comprometido (Levine, 1991).

1.6.3) Métodos quânticos *ab-initio* e a Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

Métodos *ab-initio* (do latim, “do começo”) são desenvolvidos utilizando os princípios fundamentais em todas as etapas de realização dos cálculos. Nesta metodologia, empregam-se Hamiltonianos corretos para determinação das energias das funções de onda, diferentemente dos Hamiltonianos semiempíricos, que são modificados. Em cálculos *ab-initio* Hartree – Fock SCF para sistemas multieletrônicos, a energia é determinada resolvendo-se o determinante de Slater, empregando o Hamiltoniano completo definido pela **Eq. 1.6.3.1** (Levine, 1991).

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_i \sum_{\alpha} \frac{Z(\alpha)}{r_{i(\alpha)}} + \sum_i \sum_{j > i} \frac{1}{r_{(ij)}} \quad (1.6.3.1)$$

As funções de onda empregadas para descrever os elétrons dos átomos nos cálculos HF são descritas em termos das funções de base. As funções podem ser do tipo orbitais de Slater (STO), Gaussianas (GTFs), etc. Quanto mais termos forem utilizados para descrevê-las, melhor qualidade terão os cálculos mas maior o recurso computacional necessário para o processamento.

A Teoria do Funcional de Densidade (DFT) é um método quântico utilizado para descrever propriedades moleculares, como função de onda e energia no

estado fundamental, além de todas outras propriedades eletrônicas de sistemas multieletrônicos, baseado unicamente na função de densidade eletrônica $\rho_0(x, y, z)$. Esta teoria foi desenvolvida por Hohenberg e Kohn em 1964. Na DFT, os parâmetros que constituem o Hamiltoniano são todos obtidos de ρ_0 (Levine, 1991) (Eq. 1.6.3.2)

$$E_0[\rho_0] = \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{(Ne)}[\rho_0] + \bar{V}_{(ee)}[\rho_0] \quad (1.6.3.2)$$

$$\bar{T} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 \quad \bar{V}_{(Ne)} = -\sum_{\alpha} \frac{Z(\alpha)}{r_i(\alpha)}$$

$$\bar{V}_{(ee)} = \sum_j \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}}$$

Na equação acima, $\bar{V}_{(Ne)}$ é denominado Potencial Externo, ou seja, o potencial que cada elétron sente igualmente pelo núcleo, que pode ser obtido analiticamente resolvendo a Eq. 1.6.3.3.

$$\bar{V}_{(Ne)} = \langle \psi_0 | \sum_{i=1}^n v(r_i) | \psi_0 \rangle = \int \rho_0(r) \cdot v(r) \cdot dr \quad (1.6.3.3)$$

Hohenberg e Kohn provaram que qualquer função de densidade eletrônica aplicável a sistemas multieletrônicos não poderia fornecer valores da energia menores que o valor no estado fundamental (E_0), ou seja, $E(\rho) \geq E(\rho_0)$. Entretanto, o teorema de H-K não mostra como obter ρ_0 , objetivo que foi alcançado por Kohn e Shan em 1965. O método desenvolvido por esses pesquisadores permitem a determinação analítica de ρ_0 , mas a resposta não pode ser considerada totalmente correta devido à utilização de funções aproximadas na resolução.

O método de K-S para determinar ρ_0 parte do pressuposto de um sistema referencial que descreva o mesmo número de elétrons do sistema real ($\rho_{\text{ref}} = \rho_0$), entretanto sem a energia de interação repulsiva inter-eletrônica. Assim, o Hamiltoniano deste sistema (\hat{h}_i^{KS}) torna-se mais simples e são obtidas as respectivas funções de onda ψ_0 orbitais, compostas pela parte espacial $\phi_i^{\text{KS}}(r_i)$ e de spin (σ_i). Neste sistema referencial, ρ_{ref} possui solução exata, mas \bar{T}_{ref} e $\bar{V}_{ee\text{ref}}$ são diferentes das respectivas energias no sistema real, em que não é possível obter a solução exata dessas energias. A variação entre as energias cinética $\Delta\bar{T}$ e de repulsão intereletrônica $\Delta\bar{V}_{ee}$ entre esses sistemas (real e referencial) são agrupadas em uma nova função, cuja energia associada é denominada Energia de Correlação – Troca $E_{\text{xc}}[\rho_0]$ (**Eq. 1.6.3.4**).

$$E_{\text{xc}}[\rho_0] = \Delta\bar{T}(\rho_0) + \Delta\bar{V}_{ee}(\rho_0) \quad (1.6.3.4)$$

Portanto, ao descrever a energia do sistema real (E_0) em função do sistema referencial pressuposto, obtêm-se a **Eq. 1.6.3.5**.

$$E_0 = \int \rho_0(r) \cdot v(r) \cdot dr + \bar{T}_{\text{ref}}[\rho_0] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r(12)} dr_1 dr_2 + E_{\text{xc}}[\rho_0] \quad (1.6.3.5)$$

Nesta equação $\frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r(12)} dr_1 dr_2$ é a energia de repulsão inter-eletrônica considerando os elétrons distribuídos em um meio contínuo de cargas com densidade ρ ($\rho = \rho_{\text{ref}} = \rho_0$). O primeiro parâmetro da equação apresenta o maior peso em E_0 , e pode ser obtido analiticamente. Mas a melhor solução para E_0 será tal quanto melhor for a aproximação empregada para determinar E_{xc} .

Várias são as aproximações empregadas em ρ para descrever E_{xc} e, portanto, E_0 e iniciaram-se considerando a função de densidade como um modelo de gás de elétrons. As aproximações LDA (*Local Density Approximation*) e LSDA (*Local Density Spin Approximation*) tratam ρ como constantes na molécula, enquanto funcionais híbridos e com gradientes de correção foram posteriormente desenvolvidos para melhorar a qualidade do tratamento dos sistemas. Um exemplo desses novos funcionais híbridos, que foi utilizado nesse projeto, é o B3LYP/6-31G**, que consiste do funcional de troca (E_x) de Becke (B3) e o de correlação (E_c) de Lee-Yang-Parr (LYP), este último formado por orbitais KS expandidos até base 6-31G** (Levine, 1991).

1.6.4) Aplicações de química quântica a complexos com CDs

A utilização de química teórica para estudos de complexos com CDs tem sido uma ferramenta muito empregada nos últimos vinte anos para auxiliar na proposição de estruturas e na interpretação das interações intermoleculares dos complexos de inclusão. As aplicações não se restringem a métodos puramente quânticos (HF, DFT, semiempíricos), abrigando também métodos baseados em pura mecânica molecular (Tabushi e Mizutani, 1987; Alvira et al, 1997) e com base em simulações, como Dinâmica Molecular (Amarato et al e Goschl et al, 1996) e Monte Carlo (Klein et al, e Marconi et al, 1995).

A escolha entre métodos quânticos ou clássicos, este último que em geral governam os métodos baseados em simulações, depende do objetivo do estudo, pois ambos apresentam vantagens e desvantagens. Ciclodextrinas são moléculas grandes e complexas quanto às suas propriedades estruturais e eletrônicas, pois possuem cavidade interna rica em densidade eletrônica e milhares de conformações estruturais decorrentes dos ângulos e diedros da molécula, **Fig. 1.6.4.1** (Lipkowitz, 1998). Prabhakaran utilizou Dinâmica Molecular para obter 2000 confôrmeros de β CD, concluindo que a molécula apresenta grande

flexibilidade estrutural. Os trabalhos de Koehler et al, também por DM, mostraram flexibilidade conformacional da β CD em água, resultando em mudanças de simetria e nas ligações de hidrogênio, comparando-as com sua estrutura no estado sólido. Portanto, estudar as variedades conformacionais das CDs e seus complexos de inclusão por métodos quânticos requer muito tempo computacional o que torna o processo inviável.

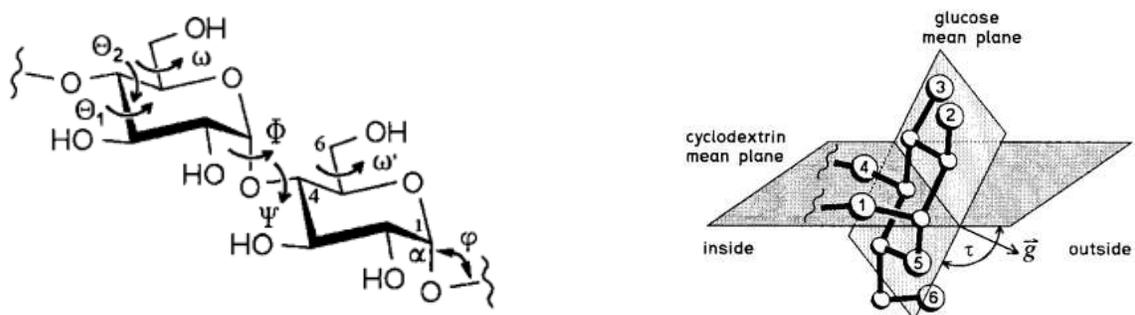


Fig. 1.6.4.1. Ângulos, diedros e planos existentes entre monômeros de α -D-glicose nas CDs.

Entretanto, métodos quânticos possuem a vantagem de melhor descrever a densidade eletrônica e as ligações químicas, resultando em valores mais corretos de momento de dipolo. Como esta propriedade é importante para a descrição das forças intermoleculares de van der Waals, que em geral governam a formação dos complexos de inclusão, a utilização de química quântica (mesmo por métodos semiempíricos) torna-se bastante vantajosa no estudo de interações dessa natureza (Lipkowitz, 1998).

A otimização molecular com CDs e complexos de inclusão por métodos quânticos é uma operação muito trabalhosa do ponto de vista computacional, devido ao grande número de átomos envolvidos. Portanto, esta etapa tem sido majoritariamente realizada através de métodos semiempíricos, pois eles apresentam formas mais simplificadas de descrever os orbitais atômicos e o

Hamiltoniano. Devido à superioridade do método PM3 frente aos demais, principalmente na descrição das ligações de hidrogênios, sua aplicação é majoritária nos estudos teóricos de complexos de inclusão com CDs. Uma série de trabalhos teóricos de complexos de inclusão com CDs com o método PM3 pode ser consultada nas revisões de Lipkowitz (1997) e, mais recentemente, Castro e Barbiric (2006). Mas conforme já mencionado por J.J.P. Stewart, criador do método PM3, métodos semiempíricos em geral são boas ferramentas para otimização estrutural, mas falham na estimativa de suas energias (Lipkowitz, 1997). Assim, alguns trabalhos envolvendo complexos com CDs utilizam métodos híbridos, que tratam parte do sistema de modo semiempírico e áreas mais específicas de interação com métodos *ab-initio* (HF e DFT), com objetivo de também descrever as energias de forma satisfatória (Yan et al, 2007; Huang et al, 2009; Holt, 2010).

Outra metodologia muito utilizada em química quântica para complexos com CDs emprega cálculos em nível semiempírico para determinar a estrutura mais estável e, posteriormente, em nível *ab-initio*, nesta estrutura otimizada, para melhor estimar as energias das moléculas (*single-point energy*). Na literatura, são encontrados cálculos *ab-initio* no *single point* de estruturas já previamente otimizadas semiempiricamente utilizando métodos HF e DFT (Sousa et al, 2008; Nascimento et al, 2007; Rafati et al, 2007)

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

2.1) Gerais

Preparação de complexos de inclusão entre o fármaco Tiabendazol e β -ciclodextrina, visando obter uma formulação que melhore características do fármaco como solubilidade, estabilidade química, biodisponibilidade, etc. Caracterização dos complexos no estado sólido e estudo termodinâmico e estrutural dos mesmos em solução aquosa. Confrontar e discutir os dados experimentais com resultados obtidos de cálculos semi-empíricos e *ab-initio*.

2.2) Específicos

1. Preparação de complexos de inclusão entre TBZ e β CD pelo método de co-precipitação, explorando diferentes formas de solubilização do fármaco.
2. Caracterização dos complexos em fase sólida, através de técnicas espectroscópicas e de análise térmica.
3. Estudo termodinâmico de formação do complexo de inclusão em fase aquosa, empregando diferentes condições de pH e temperatura, por meio de dados de espectroscopia de emissão de fluorescência.
4. Caracterização estrutural do complexo em solução por espectroscopia de RMN- 1 H.
5. Estudo teórico de otimização molecular do complexo de inclusão e determinação de energias associadas à sua formação, empregando métodos quânticos semi-empíricos e *ab-initio* no vácuo e simulando o meio aquoso.

CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL

3.1) Materiais

TBZ (grau farmacêutico) foi cedido pela empresa EMS farmacêutica (Lote M200242) e foi utilizado dentro do prazo de validade. β CD (99,5%) foi cedida pela empresa ISP Technologies, Inc., Brasil. Etanol e acetonitrila, ambos de grau HPLC, foram adquiridos da empresa Tedia – Brasil. Cloreto de sódio PA foi obtido da empresa Chemco, dihidrogenofosfato de potássio PA da empresa Art Lab e hidróxido de sódio PA da empresa Casas de Química Ind. e Com. Ltda. Ácido clorídrico concentrado (36,5 a 38%) foi obtido da empresa J. T. Baker. Óxido de deutério (99.9% D) foi obtido de Cambridge Isotope Laboratories Inc. Toda água deionizada (18,2 m Ω) utilizada nos experimentos foi obtida no equipamento Milli-Q, modelo Academic A10, Millipore.

3.2) Preparação das soluções utilizadas nos experimentos de fluorescência.

Os experimentos em fase aquosa foram realizados em meios que simulam fluidos gástrico e intestinal humano mas sem o emprego das enzimas constituintes devido à possibilidade das mesmas atuarem como interferentes. As preparações desses meios seguiram as respectivas metodologias encontradas na Farmacopéia Americana e serão descritas a seguir:

3.2.1) Preparação do meio que simula fluido intestinal humano

Inicialmente, 3,4 g de KH_2PO_4 foram dissolvidos em 125 mL de água deionizada. Foram adicionados 40 mL de solução de NaOH 8,0 g/L, seguido de mais 250mL de água deionizada. Finalmente, o pH da solução foi ajustado para

6,80 ± 0,05 com solução de NaOH utilizada previamente, utilizando pHmetro *Micronal* modelo *B-474*, calibrado com soluções tampão padrões de pH 4,00 e 7,00, respectivamente. Em seguida, a solução foi transferida para balão volumétrico de 500 mL e completado o volume final com água deionizada.

3.2.2) Preparação do meio que simula o fluido gástrico

Em balão volumétrico de 500 mL, foram adicionados 1,0 g de NaCl e 7,0 mL de HCl concentrado 37% m/m, completando o restante com água deionizada.

3.3) Preparação dos complexos de inclusão

O complexo foi preparado pelo método de co-precipitação, seguido de liofilização (Antoniadou-Vyza et al, 1997) utilizando liofilizador *FTS System*. Basicamente, o método de co-precipitação consiste na mistura de soluções do ativo e da ciclodextrina, seguido de precipitação do complexo formado. Quando o ativo é muito pouco solúvel em água, o mesmo é previamente dissolvido em solvente orgânico, geralmente álcool etílico devido à sua baixa toxicidade frente aos demais e sua total miscibilidade com a solução aquosa com CD (Szejtli e Frömring, 2004). Neste projeto, foram empregadas duas metodologias diferentes para a preparação, baseadas no diferente perfil de solubilidade deste fármaco em função do pH. Como TBZ apresenta pouca solubilidade em meio neutro, 66 µg/mL (Wang et al, 2009), o preparo de soluções aquosas neutras de TBZ para a síntese do complexo por co-precipitação tornaria a metodologia inviável. Entretanto, em meio ácido (pH 2,2), sua solubilidade passa a ser ≈3,7% (Merck Index, 1997), devido à formação do ácido conjugado TBZ.HCl, tornando possível a preparação do complexo neste meio. Em solução neutra, a preparação do complexo de inclusão TBZ:βCD só pode ser realizada utilizando solvente orgânico miscível em água. Assim, baseado nessas propriedades do TBZ, a preparação dos complexos de inclusão seguiu os procedimentos:

3.3.1) Preparação em meio ácido (pH 2,2)

A massa de 50,3 mg de TBZ ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol) foi dissolvida em béquer contendo 20 mL de solução de HCl pH 2,2 ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol de H^+). Em outro béquer, quantidade equimolar de β CD (320,5 mg) foi dissolvida em água, atingindo concentração de 12,5 mM, próxima da concentração de β CD em que se pode trabalhar sem ocorrer sua precipitação, ou seja, $[\beta CD]_{\text{limite}}$ 13 mM. Posteriormente, as soluções foram misturadas em balão de fundo redondo e deixada sob agitação por 2 h. Então, a solução final foi transferida para tubo tipo *falcon*, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada, levando 3 dias para se obter o complexo como um sólido fino e seco.

3.3.2) Preparação em meio neutro utilizando etanol

Inicialmente, 50,3 mg de TBZ ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol) foram dissolvidos em 20 mL de etanol P.A. Em outro béquer semelhante, a quantidade equimolar de β CD (320,5 mg) foi dissolvida em água. As soluções foram misturadas e deixadas sob agitação por 2 h. Então, o etanol foi removido desta solução, na forma de mistura azeotrópica %etanol:água 95:5 (Moore, 1962), sob pressão reduzida e temperatura ≈ 60 °C, no rota evaporador *Büchi* modelo 461. O complexo foi precipitado e a suspensão resultante ficou sob agitação durante ≈ 12 h. Na etapa final, a suspensão foi transferida para tubo tipo *falcon*, congelada sob nitrogênio líquido e liofilizada por 3 dias, obtendo o complexo TBZ: β CD como um sólido fino e seco.

3.4) Caracterização do complexo de inclusão TBZ:βCD em fase aquosa por espectroscopia de fluorescência

3.4.1) Determinação da constante de equilíbrio do complexo de inclusão

Inicialmente preparou-se soluções de βCD, nos meios gástrico e intestinal preparados anteriormente, em concentrações de 0, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 e 12,0 mM de CD. A estas soluções, foram adicionados 10 μL de solução padrão de TBZ ([TBZ] $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L em CH₃CN) até volume final de 10,0 mL, resultando em soluções de TBZ $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Os espectros foram adquiridos no espectrofluorímetro Varian – modelo Carry Eclipse, em temperaturas controladas de 25, 37 e 45 °C, através de dispositivo Peltier acoplado ao equipamento. Foram usados comprimento de onda de excitação 299 nm (fluido gástrico), 298 nm (fluido intestinal), fenda de excitação 10,0 nm, fenda de emissão 5,0 ou 10,0 nm e velocidade de varredura 600 nm/min. O experimento foi feito em duplicata.

3.4.2) Determinação da estequiometria do complexo de inclusão TBZ:βCD

A determinação da estequiometria do complexo TBZ:βCD foi feita pelo método de Job, somente no meio intestinal. Inicialmente foram preparadas soluções separadas de TBZ e βCD, ambas de concentração $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Então, estas soluções foram misturadas para obter novas soluções com frações molares de TBZ 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8. Os espectros dessas soluções foram obtidos no espectrofluorímetro *Perkin Elmer*, modelo *LS-55*, em cubeta de quartzo termostatizada a 37 ± 1 °C usando comprimento de onda de excitação 298 nm,

fenda de excitação 10,0 nm, fenda de emissão 10,0 nm e velocidade de varredura 600 nm/min. O experimento foi feito em duplicata.

3.4.3) Diagrama de solubilidade do complexo de inclusão TBZ:βCD e determinação da constante de equilíbrio segundo modelo de Higuchi – Connors

O diagrama de solubilidade foi construído conforme metodologia desenvolvida por Higuchi e Connors (Higuchi e Connors, 1986). Soluções supersaturadas de TBZ em diferentes concentrações de βCD foram preparadas adicionando 5,00 mg do fármaco em 9 tubos contendo 10mL das seguintes soluções de βCD: 0, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0 e 12,0 mol/L. Essas soluções foram todas preparadas no fluido intestinal. Em seguida, os tubos foram deixados sob agitação dentro de estufa termostaticada a 37 °C por 24 h, até que o equilíbrio de solubilidade do TBZ fosse atingido. Então, os tubos foram retirados da estufa e imediatamente transferidos para um banho previamente termostaticado à mesma temperatura, garantindo a temperatura constante durante todo o restante do procedimento. Com os tubos no banho, as respectivas soluções foram filtradas utilizando seringa acoplada de unidade filtrante Millipore 0,22 um de diâmetro de poro médio, e então diluídas adequadamente para quantificar TBZ por espectroscopia de fluorescência. Os espectros foram obtidos no espectrofluorímetro *Perkin Elmer*, modelo *LS-55*, empregando comprimento de onda de excitação 298 nm, fenda de excitação 5,0 nm, fenda de emissão 10,0 nm e velocidade de varredura 600 nm/min.

3.5) Caracterização do complexo de inclusão TBZ:βCD em fases aquosa e orgânica por espectroscopia de RMN-¹H

Os estudos de RMN em solução constituíram-se em três experimentos: caracterização estrutural do TBZ, βCD e do complexo TBZ:βCD via RMN de ¹H, caracterização da conformação do TBZ quando encapsulado no interior da cavidade da βCD mediante a técnica de ROESY-1D (*Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*) e determinação dos coeficientes de difusão das espécies TBZ, βCD e TBZ:βCD utilizando a técnica DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*). Os experimentos foram realizados utilizando D₂O e DMSO-d₆ como solventes. As amostras foram preparadas dissolvendo 4,0 mg das substâncias em 600 μL do solvente escolhido para o experimento, em tubo *Eppendorf*, com auxílio de banho de ultrassom, sendo a solução posteriormente transferida para tubo de RMN, com pipeta Pasteur. Os experimentos foram realizados no espectrômetro *INOVA-500 MHz* com sonda *bbsw* e os sinais foram referenciados conforme a ressonância HOD (δ4,67 ppm).

3.5.1) Espectros de ¹H das espécies TBZ, βCD e do complexo TBZ:βCD

Os espectros de ¹H foram obtidos nas mesmas condições para ambos os solventes (D₂O e DMSO-d₆): temperatura 24,6 °C, tempo de relaxação 1,000 s, pulso 45°, tempo de aquisição (at) 4,000 s, 32 repetições.

3.5.2) Caracterização estrutural do complexo TBZ:βCD por ROESY-1D

O complexo foi dissolvido em D₂O e a amostra preparada conforme descrito anteriormente. No experimento, foi empregada a sequência de pulsos 180° sel.– 90° sel.—spinlock – FID. As condições empregadas foram as mesmas para ambos os solventes: temperatura 24,6 °C, tempo de relaxação 1,0 s, pw90 9,25, tempo de mistura 1,5 s, tempo de aquisição 1,998 s, 1024 scans, tempo de espera de reciclagem (d1) 6 s, alargamento de linha (lb) 1,0 Hz e largura de varredura (sw) 4 kHz.

3.5.3) Determinação do coeficiente de difusão das espécies por DOSY

O experimento foi realizado empregando seqüência de pulso GCSTESL, 25 diferentes amplitudes de gradiente de pulsos em cada experimento, pulsos de 6,1 s, sw 10 kHz, at 3,3 s, d1 6,0 s e lb 0,2 Hz.

3.6) Caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido

3.6.1) Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas de amostras de TBZ, TBZ.HCl, βCD, misturas físicas equimolares TBZ:βCD e TBZ.HCl:βCD e dos complexos de inclusão, utilizando o equipamento 2050 TGA V5.3C, em painéis de alumínio no intervalo de temperatura 25-500 °C, velocidade de aquecimento 10 °C/min e atmosfera de argônio 100 mL/min.

3.6.2) Difractometria de raios X (DRX)

Os difratogramas foram adquiridos de amostras de TBZ, TBZ.HCl, β CD, misturas físicas equimolares TBZ: β CD e TBZ.HCl: β CD 1:1 e dos complexos de inclusão no equipamento Shimadzu 6000, radiação de Cu-K α (1,5406 Å) com 2θ no intervalo 5-50°, operado com 40 kV e 30 mA.

3.6.3) Espectroscopia no IV

Os espectros no infravermelho foram obtidos no equipamento Bomem FTIR modelo MB102, em pastilha de KBr, no intervalo de 400 – 4000 cm^{-1} , para amostras de TBZ, TBZ.HCl, β CD, misturas físicas equimolares TBZ: β CD e TBZ.HCl: β CD 1:1 e dos complexos de inclusão.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Determinação das propriedades termodinâmicas do complexo de inclusão TBZ:βCD por espectroscopia de emissão de fluorescência

TBZ é um cromóforo que apresenta absorção na região do UV, caracterizada por uma banda entre 250 e 330 nm, sendo observada emissão de fluorescência, que consiste de uma banda semelhante, entre 320 e 450 nm (Fig. 4.1.1).

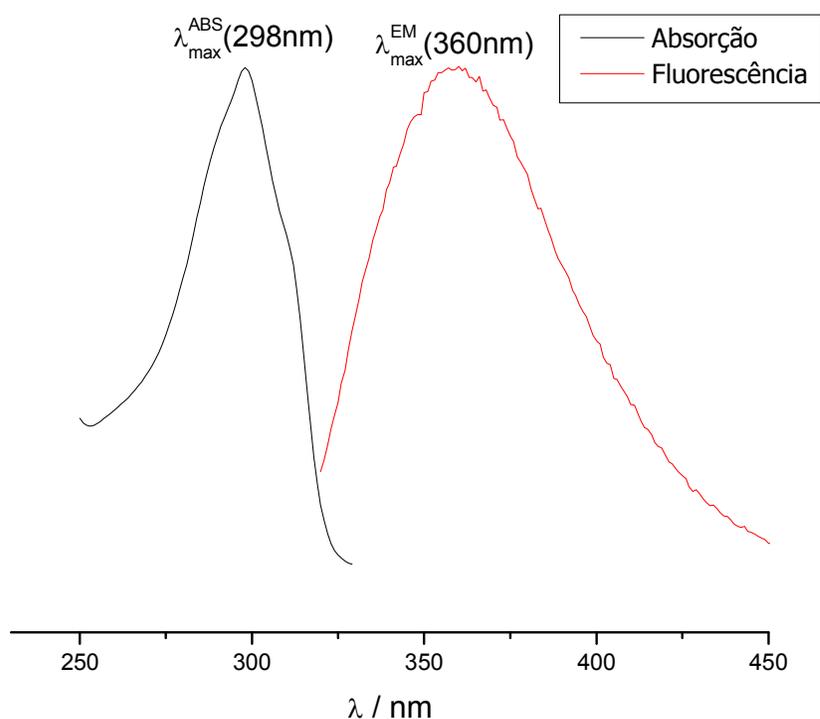
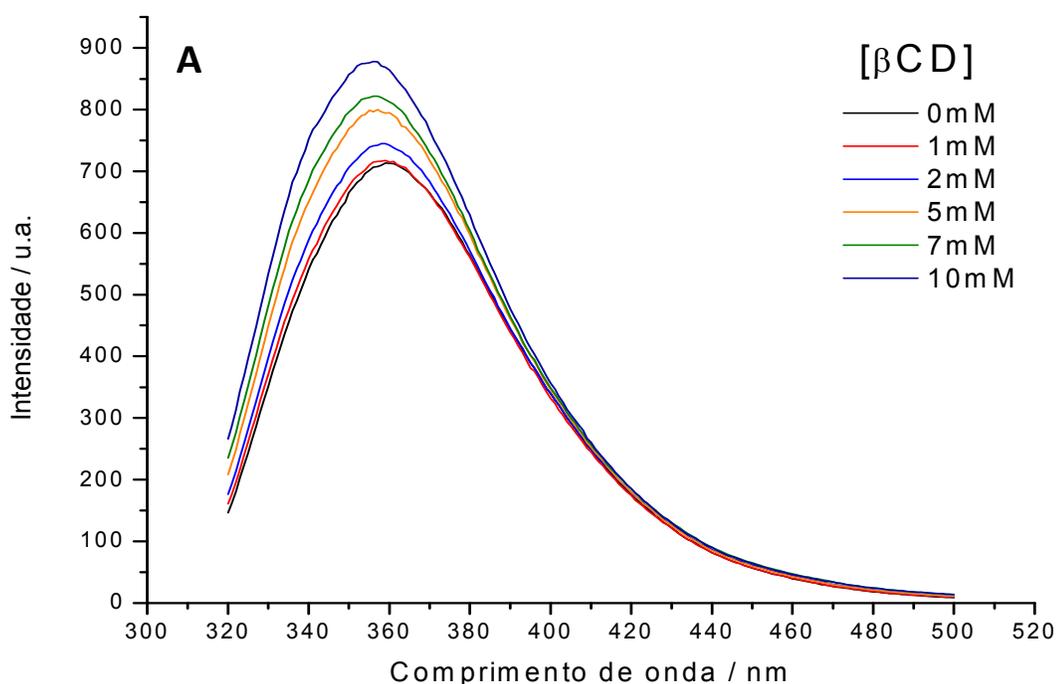


Fig. 4.1.1. Espectros normalizados de absorção e fluorescência (λ_{ex} 298nm) do TBZ em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 6,8.

A caracterização termodinâmica do complexo de inclusão TBZ: β CD foi realizada através de medidas de fluorescência do fármaco, devido à maior sensibilidade desta técnica em relação à espectrofotometria de absorção (Skoog, 2001). Os perfis espectrais obtidos quando a mesma quantidade de TBZ ($[TBZ] = 1,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L) foi adicionada a soluções de concentrações crescentes de β CD, preparadas nos meios que simulavam os fluidos gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8), em 37 °C, podem ser visualizados na **Fig. 4.1.2**.



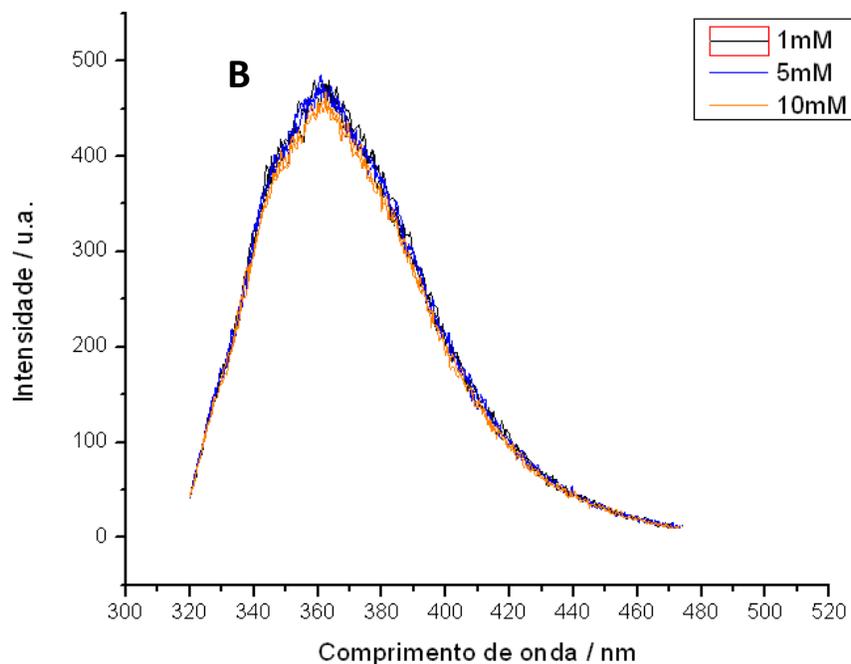


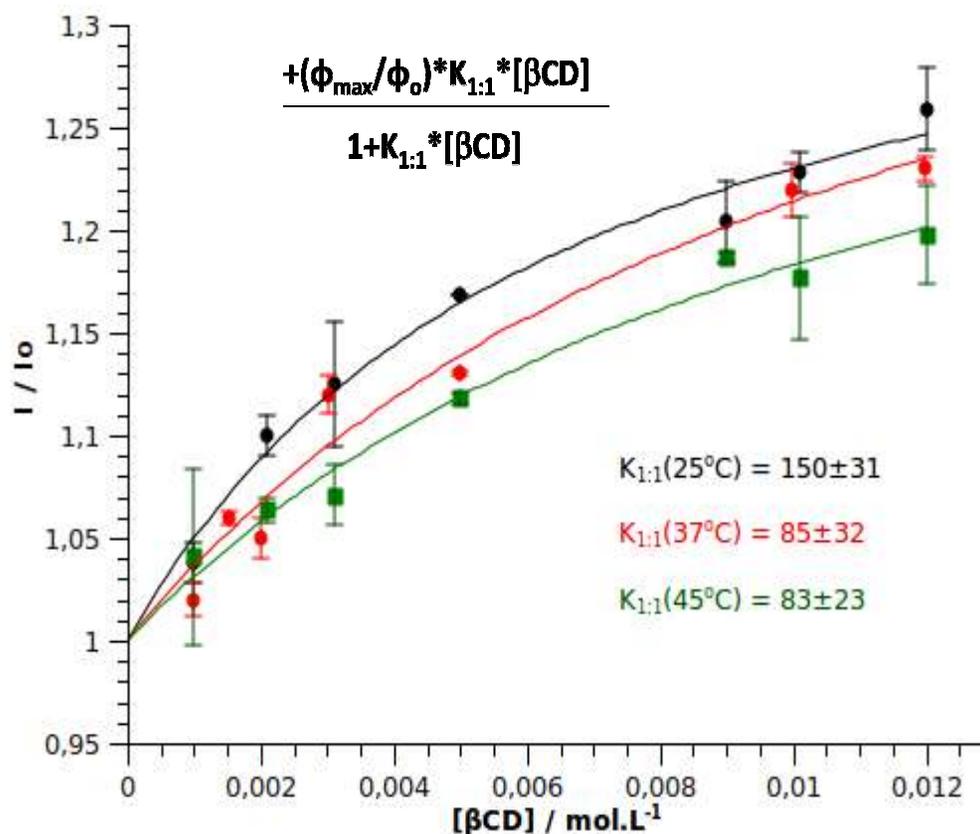
Fig. 4.1.2. Espectros de fluorescência do TBZ em soluções de β CD a 37 °C, nos fluidos intestinal (A) e gástrico(B).

Os espectros da Fig. 4.1.2A apresentaram aumento das intensidades de fluorescência do fármaco com incremento de β CD, discreto deslocamento no comprimento de onda correspondente à máxima intensidade de emissão para valores menores (*blue shift*) e inexistência de ponto isosbólico (ponto de mesma intensidade de emissão para todos os espectros). Essas características constituem evidências de formação de complexo de inclusão, cuja estequiometria TBZ: β CD permanece constante por toda faixa de β CD empregada (Szejtli e Frömmling, 1994; Lezcano et al, 2002; Velasco et al, 1998).

Nos espectros de fluorescência do TBZ obtidos nas soluções de β CD em pH 1,2 (Fig. 4.1.2B), a ausência das características mencionadas mostra que não há evidência de formação de complexo de inclusão neste meio. A literatura retrata presença do complexo TBZ: β CD em pH 2,5, justificando sua formação através das estruturas de ressonância de TBZH⁺ que favoreceriam sua interação com a CD (Tang et al, 2005). Assim, baseado na literatura, também seria esperado formação

do complexo de inclusão nesse meio, mas provavelmente esse processo não ocorre devido à maior influência de outros fatores, como força iônica, tipo de tampão empregado, etc, ou até mesmo o aumento da interação do fármaco protonado com o solvente, explicação que resulta em desacordo com os dados reportados. Consequentemente, as interações de natureza polar entre TBZH⁺ e água são maiores que as interações hidrofóbicas que levariam à formação do complexo TBZH⁺:βCD.

A formação do complexo de inclusão TBZ:βCD no meio tamponado de pH 6,80 foi também estudada a 25 e 45 °C. As intensidades de máxima emissão (360nm) dos espectros foram relacionadas com as constantes de equilíbrio, nas respectivas temperaturas, através do ajuste não linear dado pela Eq. 1.4.2.12. (Fig. 4.1.3).



es de
) e 45
no de

Nessa equação, ϕ_{\max} e ϕ_0 são os rendimentos quânticos de fluorescência de TBZ encapsulado e na ausência de β CD, respectivamente, I_0 e I são, nessa ordem, a intensidade de fluorescência do TBZ na ausência e presença de determinada concentração de β CD.

O ajuste dos dados experimentais com a Eq. 1.4.2.12 indica provável estequiometria 1:1 para o complexo de inclusão TBZ: β CD nas três temperaturas citadas. De maneira geral, I/I_0 decresceu com aumento da temperatura nas soluções de mesma concentração de β CD, indicando que a população do complexo de inclusão na solução diminui com aquecimento, conforme se verifica nos valores de $K_{1:1}(25\text{ }^\circ\text{C})$ e $K_{1:1}(45\text{ }^\circ\text{C})$. Para os dados a $37\text{ }^\circ\text{C}$, o pior ajuste obtido tornou o valor de K muito próximo ao de $K_{1:1}(45\text{ }^\circ\text{C})$, embora os dados experimentais mostrem maior população do complexo a $37\text{ }^\circ\text{C}$ para as soluções de $[\beta\text{CD}] \geq 3\text{ mM}$. Portanto, a pouca variação na ordenada entre ??? frase confusadados cujo $\Delta T < 15\text{ }^\circ\text{C}$ dificulta a comparação entre os valores das respectivas constantes K , tornando possível a comparação das constantes apenas entre dados cuja variação de T é maior, ou seja, $K_{1:1}(25\text{ }^\circ\text{C})$ e $K_{1:1}(45\text{ }^\circ\text{C})$.

A partir dos valores das constantes de equilíbrio em função de T , as funções termodinâmicas de formação no estado padrão entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°) são determinadas com a equação de van't Hoff, **Eq. 4.1.1** (Moore, 1962). Esta operação resulta no emprego da aproximação: as capacidades caloríficas das espécies são consideradas constantes no intervalo de temperatura empregado (Connors, 1997). Além disso, os erros experimentais dos valores de $K(T)$ tornam-se cumulativos em ΔH° e ΔS° na regressão linear com a Eq. 4.1.1. Com esta aproximação, pode-se estimar as grandezas termodinâmicas.

$$\ln K = (\Delta S^\circ/R) - (\Delta H^\circ/RT) \quad (4.1.1)$$

Esta equação foi aplicada aos valores médios de $K_{1:1}$ (25 °C) e $K_{1:1}$ (45 °C), pois se trataram das curvas relativas aos melhores resultados experimentais. Devido aos valores de K serem muito próximos, considerando as respectivas incertezas em seus valores, os valores das funções termodinâmicas refletem uma estimativa, pois a interpretação destas funções é importante para compreender os fenômenos químicos envolvidos na formação do complexo de inclusão (**Tabela 4.1.1**).

Tabela 4.1.1. Valores experimentais das funções termodinâmicas padrão de formação do complexo de inclusão TBZ:βCD.

	$\Delta_f H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_f S^\circ$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$\Delta_f G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)
TBZ:βCD (pH 6,80)	-24	- 39	- 12,4

O valor negativo de $\Delta_f H^\circ$ indica a reação de formação de TBZ:βCD como exotérmica, evidência também caracterizada na Fig. 4.1.3 pela diminuição dos valores de $K_{1:1}$ conforme aumenta T. Além disso, verifica-se diminuição na entropia do sistema ($\Delta_f S^\circ < 0$), situação condizente com a formação de uma estrutura supramolecular mais organizada que é o complexo de inclusão. No entanto, deve-se ressaltar que a variação de entropia nos sistemas com CDs ainda é um fenômeno não totalmente compreendido, devido a sua dependência com o solvente, o que torna o processo mais complexo (Liu e Guo, 2002; Connors, 1997). No entanto, o fator entálpico exerce maior peso em $\Delta_f G^\circ$, deixando o processo espontâneo ($\Delta_f G^\circ < 0$) nas condições padrão. Esta espontaneidade também existe nas demais temperaturas estudadas, pois $K_{1:1}$ (37 °C) e $K_{1:1}$ (45 °C) são maiores que 1.

A literatura não retrata a determinação dessas grandezas termodinâmicas nas condições experimentais de pH e força iônica empregadas neste projeto;

entretanto, Lezcano et al (2002) e Bernad-Bernad et al (2008) reportam valores de valores de $K_{1:1}$ (25 °C) e próximos aos obtidos nesta Dissertação (Tabela 4.1.2).

Tabela 4.1.2. Valores das propriedades termodinâmicas do complexo TBZ:βCD reportados na literatura e obtidas neste trabalho.

Propriedades termodinâmicas	Lezcano et al (2002)	Bernad-Bernad et al (2008)	Este trabalho
$K_{1:1}$	94,3 ± 2,5	49 ± 3	150 ± 31
$\Delta_f H^\circ$ (kJ/mol)	-----	-34,36 ± 0,03	-24
$\Delta_f S^\circ$ (J/mol.K)	-----	-83,2 ± 0,1	-39
$\Delta_f G^\circ$ (kJ/mol)	-----	-9,56	-12,4

4.2) Determinação da estequiometria do complexo de inclusão TBZ:βCD em solução: método de Job

A estequiometria dos complexos de inclusão com CDs é um dado necessário para interpretação desses sistemas supramoleculares. Além disso, a determinação das propriedades termodinâmicas dos complexos em solução é realizada baseando em equações de K deduzidas particularmente para cada condição estequiométrica ativo:CD. Embora o bom ajuste dessas equações sugira as respectivas estequiometrias, não há garantias de que as propriedades termodinâmicas determinadas estejam correlacionadas com o equilíbrio químico real do sistema descrito, pois outras equações deste tipo às vezes podem ser ajustadas

O método de Job, também conhecido como método do variacional contínuo, envolve experimentos que permitem determinar a estequiometria de complexos moleculares baseando em alguma propriedade espectroscópica de um dos constituintes deste sistema. Neste método, a resposta espectroscópica desta

espécie associada a um agente complexante é investigada em diferentes frações molares ativo:complexante, no equilíbrio (Gil et al, 1990). Quando o método de Job é empregado a complexos com CDs, as quantidades dos constituintes no equilíbrio, em função da fração molar do ativo, se relacionam conforme as equações 4.2.1. e 4.2.2. (Loukas, 1997).

$$[\text{ativo}] = rM - [\text{ativo:CD}] \quad (4.2.1)$$

$$[\text{CD}] = M(1-r) - n[\text{ativo:CD}] \quad (4.2.2)$$

em que:

r = fração molar do ativo

M = $[\text{ativo}]_0 + [\text{CD}]_0$

n = moléculas com CD complexadas em cada molécula de ativo

Rearranjando as equações 4.2.1 e 4.2.2, a maior população de ativo:CD (verificado através de medidas espectroscópicas) será atingida em $r = (n + 1)^{-1}$, correspondendo à estequiometria n mais estável do complexo em solução.

Quando o método de Job foi empregado em soluções de concentração de TBZ: β CD $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando o incremento na emissão de fluorescência do fármaco (ΔF) como parâmetro comparativo da população de TBZ: β CD na solução, foi possível verificar maior concentração do complexo de inclusão (maior valor do fator J) em $r = 0,5$, confirmando a estequiometria 1:1 ($n = 1$) para este sistema em fluido intestinal humano (**Fig. 4.2.1**).

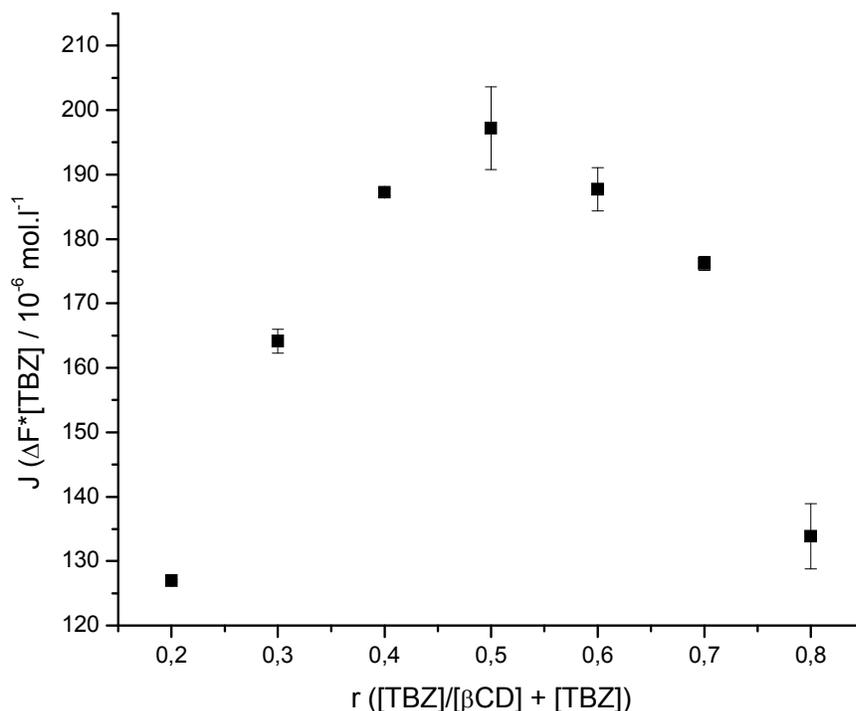


Fig. 4.2.1. Gráfico de Job para o complexo TBZ:βCD em meio que simula fluido intestinal humano, pH 6,8 (T = 37°C).

A determinação estequiométrica do complexo TBZ:βCD em água não está reportada na literatura até o presente momento. Nos trabalhos de Lezcano et al (2002), Tang et al (2005) e Bernad-Bernad et al (2008), as conclusões a respeito da estequiometria 1:1 do complexo foram obtidas de forma indireta, ou seja, baseadas em dados de isotermas de solubilidade e experimentos espectroscópicos (absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência), que ajustavam equações lineares e não lineares considerando $K_{1:1}$.

4.3) Diagrama de solubilidade dos complexos de inclusão TBZ:βCD

As propriedades dos complexos de inclusão com CDs relacionadas à sua estabilidade termodinâmica e estequiometria podem ser obtidas de seus diagramas de solubilidade. Este diagrama, desenvolvido por Higuchi e Connors em 1965, é construído medindo o incremento da solubilidade de determinado ativo, em geral pouco solúvel, quando o mesmo é adicionado a soluções de crescentes concentrações de CD. Devido ao alto caráter hidrofóbico deste ativo, o aumento de sua solubilidade em soluções com CDs pode ser considerado como resultado exclusivo da formação de complexos de inclusão (Szejtli, 1988).

Em solução aquosa sem CD, a concentração do ativo será função apenas de seu produto de solubilidade S_o (**Eq. 4.3.1**), enquanto que na presença de CD, outros equilíbrios passarão a co-existir (**Eqs. 4.3.2 e 4.3.3**).

$$\text{ativo}_{(s)} = \text{ativo}_{(aq)} \qquad S_o = [\text{ativo}_{(aq)}] / 1 \qquad (4.3.1)$$

$$n(\text{ativo}_{(aq)}) + m(\text{CD}_{(aq)}) = [n(\text{ativo}) : m(\text{CD})]_{(aq)}$$

$$K_{n:m} = ([n(\text{ativo}):m(\text{CD}_{(aq)})] / [\text{ativo}]^n_{(aq)} \cdot [\text{CD}]^m_{(aq)}) \qquad (4.3.2)$$

$$[n(\text{ativo}):m(\text{CD})]_{(s)} = [n(\text{ativo}):m(\text{CD})]_{(aq)}$$

$$S_c = [n(\text{ativo}):m(\text{CD})]_{(aq)} / 1 \qquad (4.3.3)$$

As Eqs. 4.3.2 e 4.3.3 correspondem a complexos com CDs de estequiometria geral (m e $n \geq 1$). Os diagramas de solubilidade de complexos de inclusão com CDs podem apresentar até cinco perfis diferentes, que são função da estequiometria e solubilidade dos complexos (**Fig. 4.3.1**).

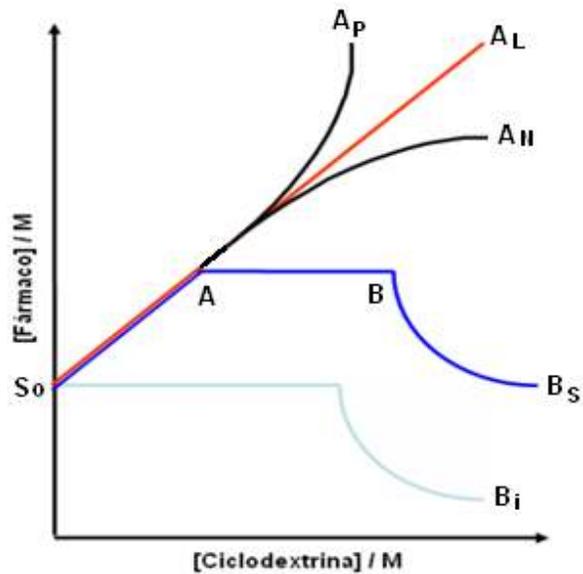


Fig. 4.3.1. Isotermas de solubilidade de complexos de inclusão com CDs.

Quando determinado complexo de inclusão possui estequiometria constante em toda faixa de concentração de CD, a solubilidade do ativo aumenta linearmente, obtendo o diagrama denominado A_L . Quando os complexos de inclusão passam a adotar estequiometrias mais complexas, ou então ocorrem alterações nas interações do ativo com o meio, ambos para concentração com CD mais elevadas, as isotermas se comportarão conforme A_P e A_N , respectivamente. No caso de formação de complexos de inclusão cuja solubilidade do ativo atinja um patamar as isotermas de solubilidade serão do tipo B.

Em B_i , a solubilidade do ativo não aumenta com formação do complexo de inclusão, portanto, trata-se de um complexo menos solúvel que o ativo puro. Em B_S , embora a solubilidade do complexo seja maior que a do ativo puro, esta atinge um limite a partir de uma determinada concentração de CD. Quando passa a diminuir as solubilidades do complexo (B_S) e do ativo puro (B_i), ou seja, após o patamar, o ativo deixa de estar supersaturado na solução e a maior concentração de CD nessas soluções desloca a reação de associação ativo:CD para o produto, diminuindo a concentração do ativo livre (Szejtli e Frömming, 1994)

Para complexos de inclusão com estequiometria 1:1 que apresentam isoterma de solubilidade do tipo A_L , a constante de equilíbrio deste sistema pode ser obtida dos coeficientes angulares e lineares da reta obtida experimentalmente. Fazendo um balanço de massa do ativo e da CD no equilíbrio, obtêm-se as Eqs. **4.3.4** e **4.3.5**.

$$[\text{ativo}]_{\text{Total}} = [\text{ativo}]_{\text{livre}} + [\text{ativo:CD}] = [\text{ativo}]_{\text{livre}} + K_{1:1} \cdot [\text{ativo}] \cdot [\text{CD}] \quad (4.3.4)$$

$$[\text{CD}]_{\text{Total}} = [\text{CD}] + [\text{ativo:CD}] = [\text{CD}] + K_{1:1} \cdot [\text{ativo}] \cdot [\text{CD}] \quad (4.3.5)$$

Neste experimento, como o ativo encontra-se supersaturado nas soluções com CD, $[\text{ativo}]_{\text{livre}}$ pode ser considerada como S_0 . Portanto, a inclinação da reta ($\tan \alpha$) pode ser definida como o aumento da solubilidade do ativo em função da concentração de CD. A relação entre $\tan \alpha$ e $K_{1:1}$ é obtida a partir das Eqs. 4.3.4 e 4.3.5, resultando nas Eqs. **4.3.7** e **4.3.8** (Szejtli, 1988).

$$\tan \alpha = ([\text{ativo}]_{\text{Total}} - [\text{ativo}]_{\text{livre}}) / [\text{CD}]_{\text{Total}} \quad (4.3.6)$$

$$K_{1:1} \cdot [\text{ativo}]_{\text{livre}} / (1 + K_{1:1} [\text{ativo}]_{\text{livre}}) \quad (4.3.7)$$

$$K_{1:1} = \tan \alpha / S_0 \cdot (1 - \tan \alpha) \quad (4.3.8)$$

A determinação das constantes de associação nas partes não lineares dos diagramas A_P e A_N não pode ser realizada utilizando estas equações, devido a existência de complexos de inclusão com uma ou mais estequiometrias diferentes nessas regiões. Assim, outros equilíbrios devem ser levados em conta para proposição de modelos matemáticos para esses sistemas.

O diagrama de solubilidade do complexo TBZ:βCD apresentou o perfil A_L (Fig. 4.3.2), indicando presença de apenas uma espécie molecular com estequiometria definida do complexo de inclusão.

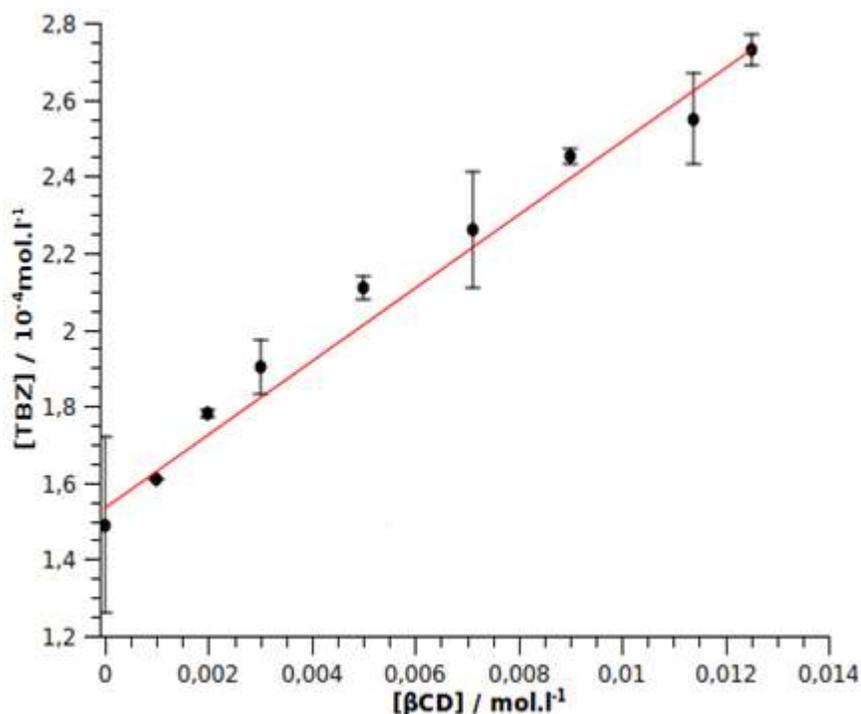


Fig. 4.3.2. Diagrama de solubilidade do complexo TBZ:βCD a 37 °C ($R^2 = 0,98$).

O diagrama obtido mostrou um incremento de aproximadamente 63% na solubilidade do TBZ em solução de βCD 12,5 mM, e a reta ajustada forneceu valores de coeficientes angular e linear de $(9,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$ e $(1,53 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$, respectivamente. O limite de solubilidade do complexo TBZ:βCD não pôde ser atingido, pois não foi possível preparar soluções estáveis de βCD acima dessa concentração. A constante de formação do complexo de inclusão foi determinada aplicando a Eq. 4.3.8 aos coeficientes obtidos do diagrama.

$$K_{1:1}(37^{\circ}\text{C}) = 63,1 \pm 3,1 \quad (4.3.9)$$

A baixa constante de formação obtida do diagrama de solubilidade mostra fraca interação entre os constituintes na forma de complexo de inclusão. Esta constante é denominada *constante aparente de formação*, pois ela é obtida a partir de soluções supersaturadas de ativo, não havendo garantias de que existam apenas complexos 1:1 no sistema (Szejtli, 1988). A constante aparente $K_{1:1}$ nessa temperatura não é conhecida na literatura. Porém, este diagrama é bastante semelhante ao já reportado na literatura a 25 °C (Lezcano et al, 2002). A boa proximidade de seu valor ($K_{1:1} = 92 \pm 4$) com os valores de constante obtidos com outros métodos também empregados nesta Dissertação reforçam a existência da espécie predominante TBZ:βCD 1:1, contudo, termodinamicamente pouco estável.

4.4) Caracterização do complexo de inclusão TBZ:βCD por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

4.4.1) Espectros de ^1H do TBZ, βCD e TBZ:βCD por RMN- ^1H em DMSO-d₆.

O espectro RMN de ^1H do complexo de inclusão TBZ:βCD em DMSO-d₆, que consiste basicamente na sobreposição dos espectros do TBZ e da βCD, pode ser visualizado na **Fig. 4.4.1.1A**. As atribuições dos sinais foram feitas com base no espectro das respectivas substâncias isoladas (**Fig. 4.4.1.1 B e C**). Os sinais (em ppm) no espectro do TBZ são atribuídos em (Tang et al, 2005): δ7,216(Ha), δ7,518-7,655(Hb), δ8,444(Hc), δ9,333(Hd), e δ12,948(He). Para a βCD, as atribuições são (Schneider et al, 1998): δ3,307-3,331(H2), δ3,449(H4), δ3,576–3,645(H3, H5 e H6), δ4,348–4,449(OH6) e δ4,836(H1), δ5,674(OH3) e δ5,726(OH2). Os sinais em δ2,510 e δ3,333ppm referem-se ao DMSO.

Foster e Fyfe, 1965, Scott, 1956, Wachter e Fried, 1979) e não lineares (Dodson et al, 1971, Wilson, 1972), derivados de modelos aplicados para medidas espectrofotométricas. As revisões de Schneider et al (1998) e, principalmente, Fielding (2000), reportam os trabalhos publicados posteriormente de estudos sobre $\Delta\delta$ em complexos com CDs. Para o complexo de inclusão TBZ: β CD, os valores de $\Delta\delta$ obtidos estão na **Tabela 4.4.2.1**.

Tabela 4.4.2.1. Variação de deslocamento químico δ entre espécies puras (δ_{livre}) e no complexo (δ_{compl}), em D_2O .

TBZ	$\Delta\delta$ ($\delta_{compl} - \delta_{livre}$) (ppm)	βCD	$\Delta\delta$ ($\delta_{compl} - \delta_{livre}$) (ppm)
Ha	0,015	H1	0,008
Hb	0,022	H2	0,006
Hc	0,05	H3	0,006
Hd	0,024	H4	0,007
		H5 e H6	0,0005

Estes resultados mostram que não há correlação de $\Delta\delta$ entre os prótons das espécies, não havendo informação estrutural do complexo de inclusão no ambiente aquoso. As causas envolvidas para o insucesso deste experimento já foram discutidas na literatura (Fielding, 2000) e são atribuídas a duas características que podem existir nos complexos de inclusão com CDs: baixa solubilidade e fraca constante de formação dos complexos. Tais características dificultam a existência de uma população considerável da espécie ativo:CD no meio, impossibilitando conclusões sobre a estrutura do complexo via $\Delta\delta$. A primeira característica não se atribuiu ao complexo TBZ: β CD (devido ao seu perfil A_L no diagrama de solubilidade). Portanto, o baixo valor de K, determinado por fluorescência, deve ter sido responsável pela falta de resolução em $\Delta\delta$.

4.4.3) Estrutura de TBZ:βCD em D₂O por ROESY-1D (Rotating frame Overhauser Enhancement SpectroscopY)

O experimento de ROESY-1D foi realizado na solução de TBZ:βCD. Os sinais referentes aos hidrogênios do grupo benzimidazol Ha (δ7,302 ppm) e Hb (δ7,637 ppm) e os hidrogênios do grupo tiazolil Hc (δ8,236 ppm) e Hd (δ9,076 ppm) foram pulsados individualmente, obtendo-se, em cada espectro, a respectiva correlação de rOe com os ¹H da βCD. Os espectros obtidos podem ser visualizados estão nas **Figs. 4.4.3.1 – 4.4.3.4**.

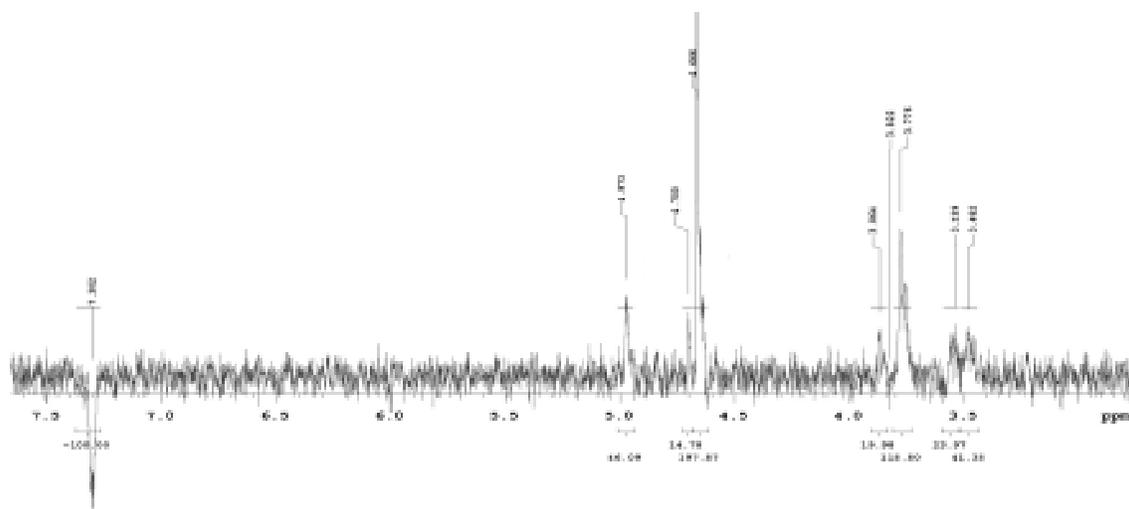


Fig. 4.4.3.1. Espectro 1 de ROESY-1D do complexo TBZ:βCD em D₂O. Pulsos em δ7,302 ppm (Ha do TBZ).

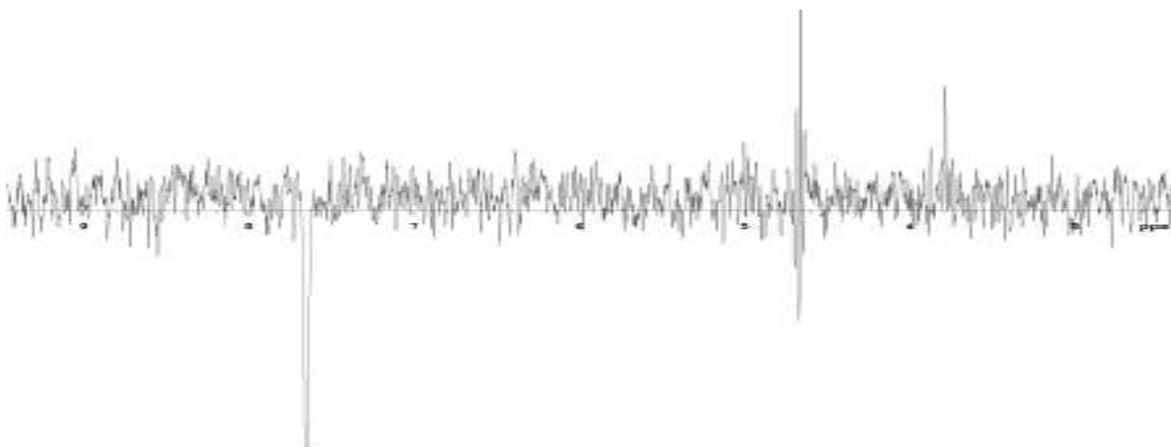


Fig. 4.4.3.2. Espectro 2 de ROESY-1D do complexo TBZ:βCD em D₂O. Pulsos em δ7,637 ppm (Hb do TBZ).

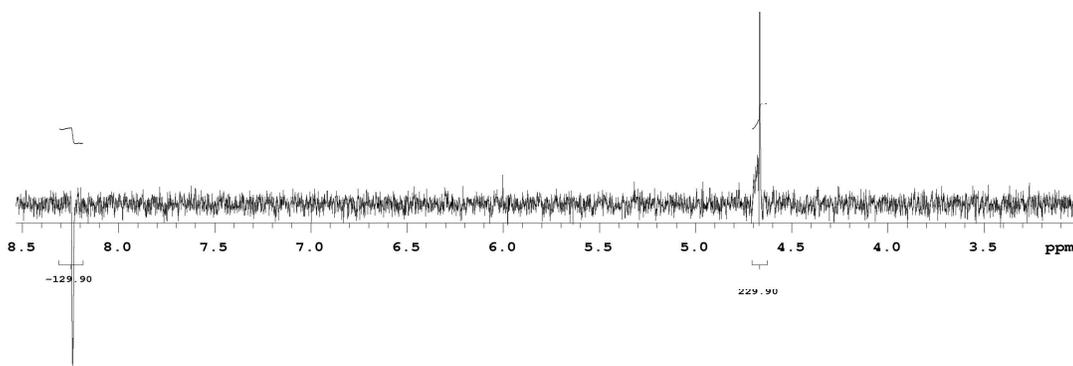


Fig. 4.4.3.3. Espectro 3 de ROESY-1D do complexo TBZ:βCD em D₂O. Pulsos em δ8,236ppm (Hc do TBZ).

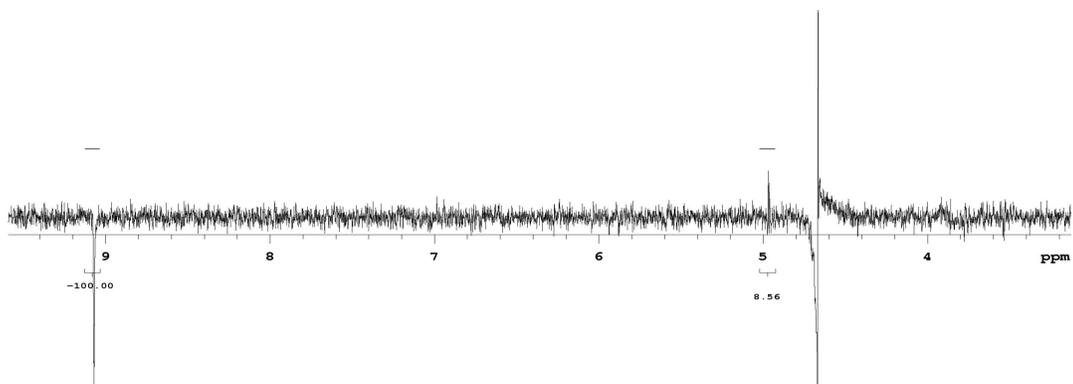


Fig. 4.4.3.4. Espectro 4 de ROESY-1D do complexo TBZ:βCD em D₂O. Pulsos em 9,076 ppm (Hd do TBZ).

Neste experimento, foi verificado que os hidrogênios do grupo benzimidazol do TBZ exerceram maior rOe com os prótons H5 e H6 (δ 3,776 – 3,822 ppm) da βCD, com destaque para Ha (δ 7,288 ppm). Entretanto, esses átomos também apresentaram interação, em menor intensidade, com os demais átomos de hidrogênio da βCD, mostrando que a população de TBZ na solução não encapsulado também é expressiva. No grupo tiazolil, apenas foi detectada rOe de Hd (δ 9,053ppm) com H1 da βCD (δ 4,960 – 4,967ppm).

O experimento demonstrou existência do complexo de inclusão TBZ:βCD, pois foram detectadas interações do TBZ com H3 e H5 da βCD. Além disso, foi possível concluir que a encapsulação do fármaco ocorre pelo grupo benzimidazol. Como em D₂O os sinais das hidroxilas da CD se acumulam com o do solvente (δ 4,670ppm), não é possível verificar se a encapsulação ocorre preferencialmente pela cavidade maior (OH2 e OH3) ou pela menor (OH6). Portanto, com base nos resultados deste experimento, foram propostas as seguintes estruturas para o complexo TBZ:βCD no meio aquoso (**Fig. 4.4.3.5**).

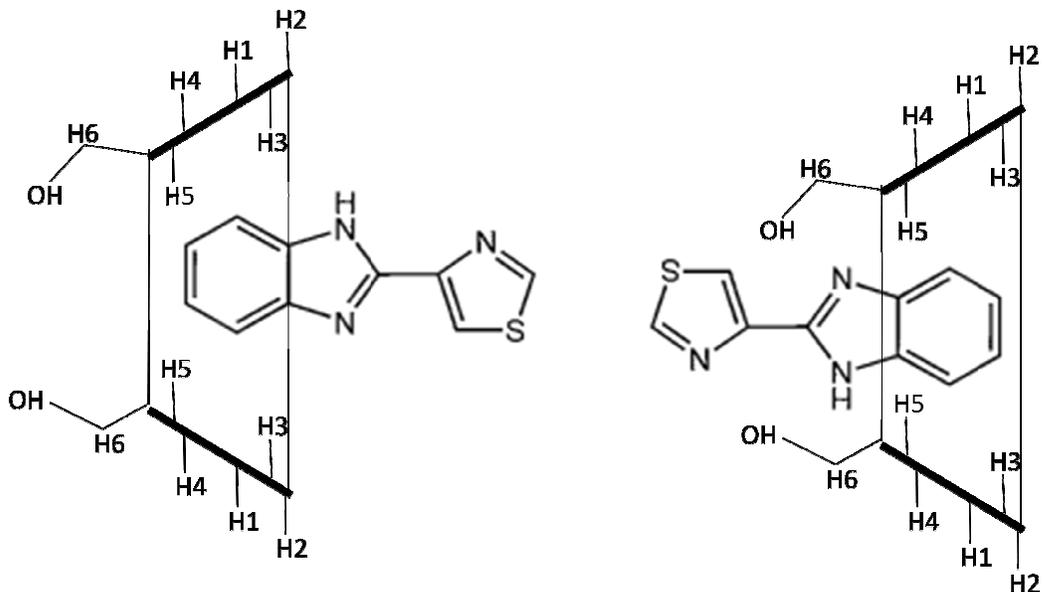


Fig. 4.4.3.5. Estruturas propostas para o complexo TBZ:βCD em água com base nos resultados do experimento ROESY-1D.

4.4.4) Coeficientes de difusão por DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

Os espectros DOSY do TBZ e βCD, isolados e no complexo de inclusão TBZ:βCD, em D₂O e à temperatura de 25°C, podem ser visualizados nas **Figs. 4.4.4.1 – 4.4.4.3**. Os valores dos coeficientes de difusão são dados na ordenada, em função dos deslocamentos químicos dos ¹H das amostras (abscissa).

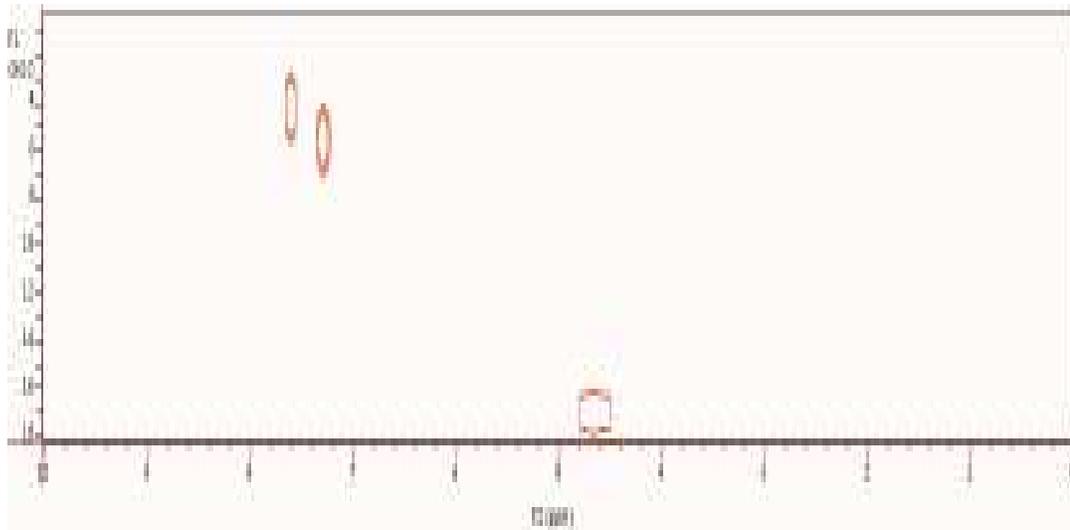


Fig. 4.4.4.1. Espectro DOSY do TBZ em D₂O.

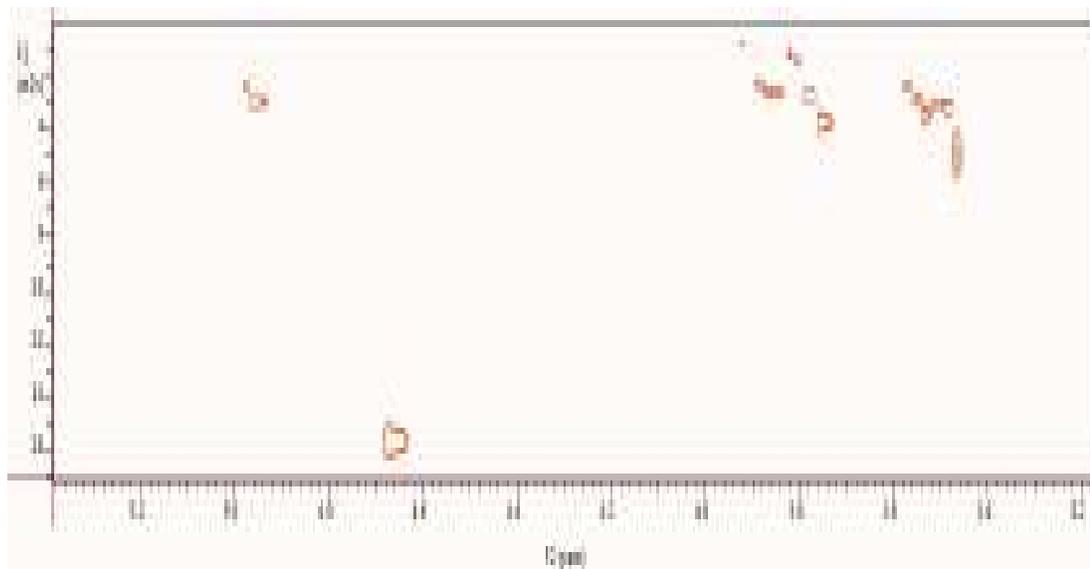


Fig. 4.4.4.2. Espectro DOSY da β CD em D₂O.

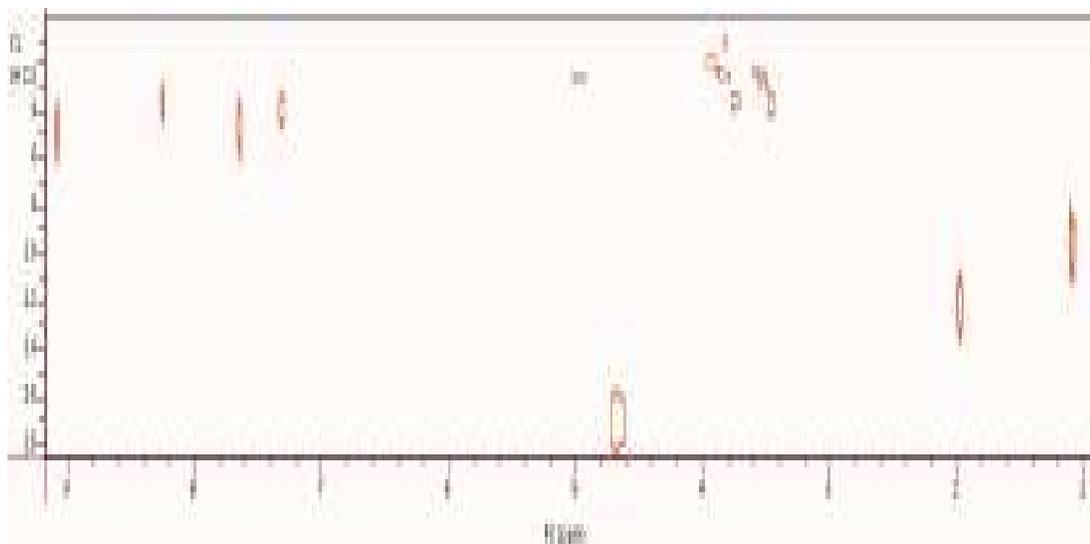


Fig. 4.4.4.3. Espectro DOSY do complexo TBZ:βCD em D₂O.

Os coeficientes de difusão médios do TBZ e βCD foram obtidos das médias aritméticas dos coeficientes individuais das respectivas espécies (**Tabela 4.4.4.1.**)

Tabela 4.4.4.1. Coeficientes de Difusão (D) das espécies TBZ e βCD livres e no complexo de inclusão.

Amostra	Composto	Coeficiente de Difusão D ($10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)
TBZ	TBZ	$4,6 \pm 0,7$
	D ₂ O	$16,8 \pm 0,3$
βCD	βCD	$2,51 \pm 0,04$
	D ₂ O	$15,6 \pm 0,2$
TBZ:βCD	TBZ	$4,2 \pm 0,6$
	βCD	$2,24 \pm 0,02$
	D ₂ O	$16,8 \pm 0,4$

Nesta tabela observa-se que D_{livre} e D_{complex} não foram estatisticamente diferentes, devido às altas incertezas desses coeficientes, portanto, não há evidências concretas de formação de complexo de inclusão a partir dos resultados

deste experimento. Como as maiores incertezas ocorreram para valores de D referente a protons do TBZ, à esses resultados foi atribuído a baixa quantidade do fármaco tanto na amostra do mesmo puro, devido a sua baixa solubilidade em água, quanto na amostra do complexo, cuja quantidade de fármaco dissolvido desta amostra ainda assim não pode ser muito aumentada. Entretanto, o menor valor médio de $D_{\text{complex.}}$ em relação a D_{livre} mostra que a menor difusão na solução com βCD se deve à formação do complexo de inclusão, cuja porcentagem de encapsulação foi determinada com a Eq. 1.4.3.7, utilizando apenas os valores médios dos respectivos coeficientes de difusão.

$$P = 18,4\%$$

O pequeno valor de P obtido no experimento DOSY é coerente com a fraca interação do sistema TBZ: βCD em solução aquosa. Como P reflete as populações das espécies livres e do complexo de inclusão, a constante de equilíbrio $K_{1:1}$ foi calculada (Rymdén et al, 1983), pois a concentração inicial de complexo era conhecida quando foi preparada a amostra para fazer o experimento.

$$K_{1:1}(\text{DOSY}) = 49$$

As altas incertezas nas medidas dos coeficientes de difusão para o TBZ tornam o valor de $K_{1:1}(\text{DOSY})$ o menos preciso dentre os obtidos com as demais técnicas espectroscópicas. Contudo, observa-se que os valores de $K_{1:1}$ obtidos por técnicas distintas são coerentes quanto à descrição da baixa estabilidade do complexo de inclusão em solução aquosa.

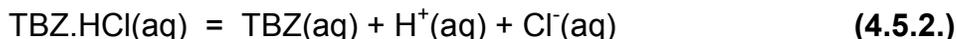
4.5. Caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido

4.5.1. Influência do meio na preparação do complexo de inclusão entre TBZ e β CD

A caracterização do complexo de inclusão foi realizada para os sólidos obtidos com os dois métodos de preparação empregados: um em que o fármaco foi dissolvido em solução de HCl pH 2,2 ($[H^+] = [TBZ]$) e outro dissolvendo o fármaco em etanol. Devido ao caráter básico do TBZ, ocasionado pela presença do grupo benzimidazol, adicioná-lo à solução ácida de igual concentração de H^+ , forma o cloridrato (isso não é aduto)aduto TBZ.HCl (**Eq. 4.5.1.**).



Como a espécie $TBZH^+$ é ácido relativamente fraco ($K_a = 2,29 \times 10^{-5}$) (Tang, et al, 2005), a equação (**Eq. 4.5.2**) do equilíbrio de dissociação estará pouco deslocada para a direita, existindo majoritariamente a espécie TBZ.HCl em solução ($[TBZ.HCl]/[TBZ] \approx 17/1$).



Portanto, ao fazer a preparação do complexo em meio ácido, devido à formação do cloridrato (não é aduto) TBZ.HCl na etapa de dissolução do TBZ, o complexo de inclusão que seria formado no final da co-precipitação teria a composição TBZ.HCl: β CD.

Como o etanol é um ácido muito fraco, a dissolução do TBZ neste solvente não implica na formação significativa da espécie ácida correspondente ($TBZH^+$), resultando no complexo de inclusão TBZ: β CD neste procedimento.

Os complexos de inclusão obtidos das preparações segundo os procedimentos cujas dissoluções do TBZ foram realizadas em meio ácido ou em que foi utilizado etanol serão designados TBZ.HCl:βCD e TBZ:βCD, respectivamente.

4.5.2. Caracterização dos complexos de inclusão por análise termogravimétrica (TGA)

4.5.2.1) A curva de TGA e a fusão do TBZ

TBZ é comumente reportado na literatura como um sólido cristalino que apresenta fusão em ≈ 300 °C. Entretanto, o trabalho de Macedo e Nascimento (2002) mostra que na verdade ocorre pseudo-fusão, ou seja, fusão acompanhada de decomposição. Esta decomposição depende das condições de aquecimento empregada, A curva de TGA do fármaco (obtida sob aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de argônio), obtida de uma amostra do TBZ utilizada neste projeto está na **Fig. 1.5.3.1**.

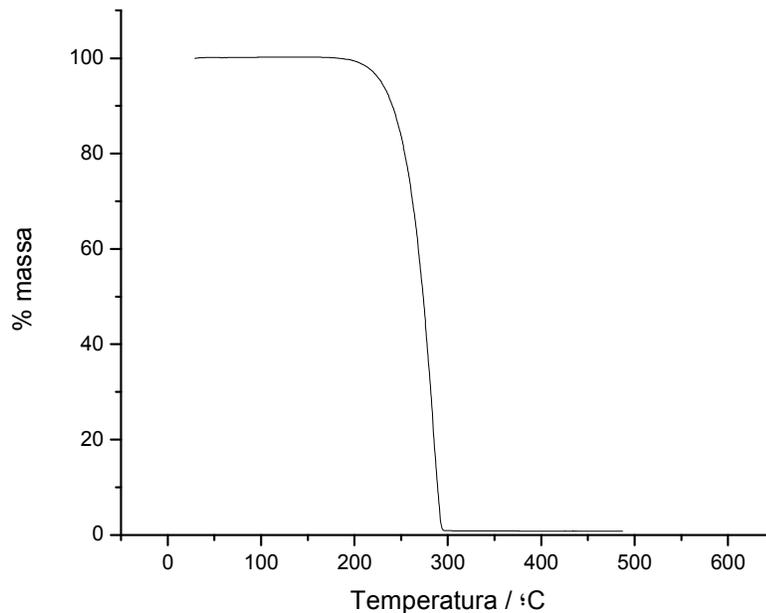


Fig. 4.5.2.1. Curva de TGA do TBZ, mostrando a fusão/decomposição do fármaco no intervalo aproximado de 200 – 300 °C.

Além da decomposição do TBZ, conforme se verifica com a perda de massa do fármaco na curva de TGA, a ausência de demais transições térmicas mostra a alta pureza da amostra sendo, portanto, adequada a este projeto.

4.5.2.2) A curva de TGA e as transições térmicas da β CD

Como CDs são cristalizadas de soluções aquosas na forma de hidratos, suas curvas de TGA apresentarão transições térmicas de desidratação de água (abaixo de 100 °C) e, no final, fusão acompanhada de decomposição, que inicia em ≈ 250 °C, esta última característica da estrutura glicosídica (Szejtli e Frömmling, 2004).

A curva de TGA da β CD (obtida sob aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de argônio), obtida experimentalmente da amostra utilizada neste projeto, pode ser visualizada na **Fig. 1.5.3.2**.

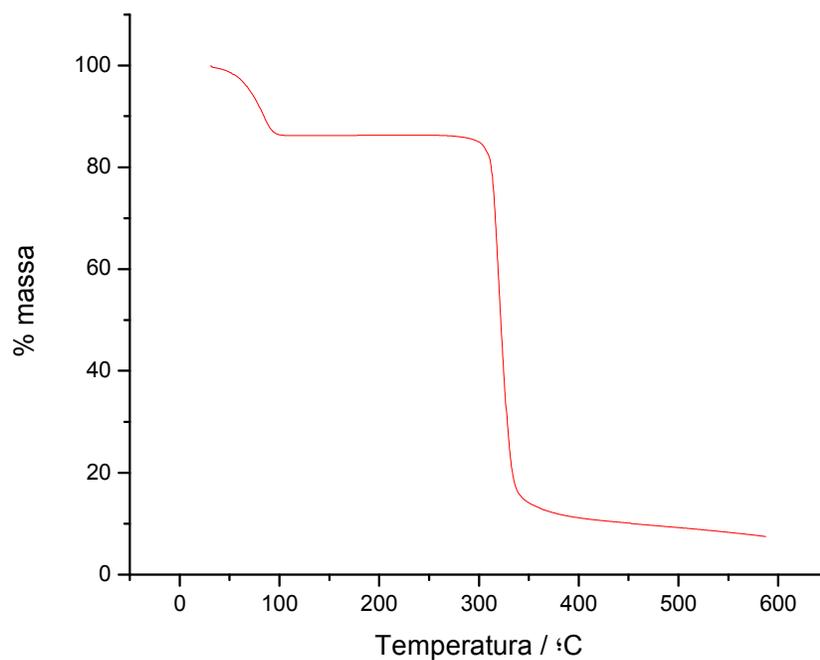
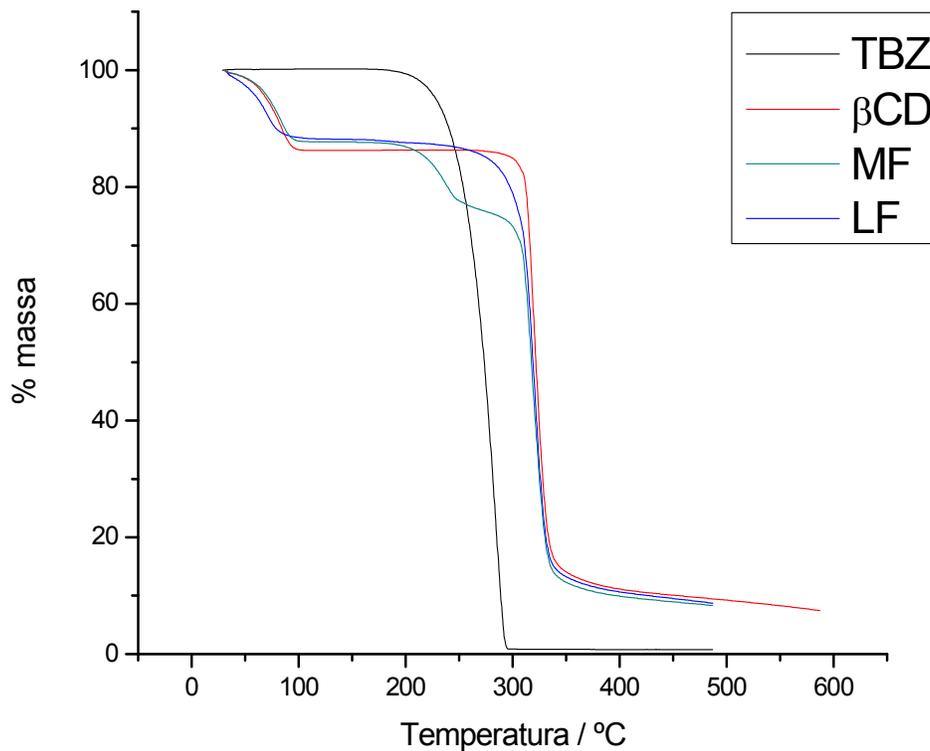


Fig. 4.5.2.2. Curva de TGA da β CD, mostrando as transições de desidratação (primeira) e fusão/decomposição (segunda).

Na amostra de β CD utilizada, a curva de TGA mostra apenas as duas transições esperadas para a CD: a desidratação, que se inicia desde a temperatura inicial da análise (25°C) até por volta de 96 °C e a fusão acompanhada de decomposição, que ocorre majoritariamente no intervalo de 270 - 360 °C.

4.5.2.3) A curva de TGA dos complexos de inclusão

Análises térmicas não têm sido reportadas até o momento como técnicas analíticas para caracterizar complexos de inclusão entre TBZ e CDs. Neste trabalho, os complexos entre TBZ e β CD obtidos via meio ácido (TBZ.HCl: β CD) e com etanol (TBZ: β CD) foram caracterizados utilizando análise termogravimétrica (TGA), com base na transição referente as fusões/decomposições do TBZ e TBZ.HCl. As curvas de TGA e derivadas para o complexo de inclusão TBZ: β CD, mistura física equimolar TBZ: β CD 1:1, e dos constituintes isolados estão na **Fig. 4.5.2.1** e as respectivas curvas relacionadas à caracterização do complexo TBZ.HCl: β CD estão na **Fig. 4.5.2.2**.



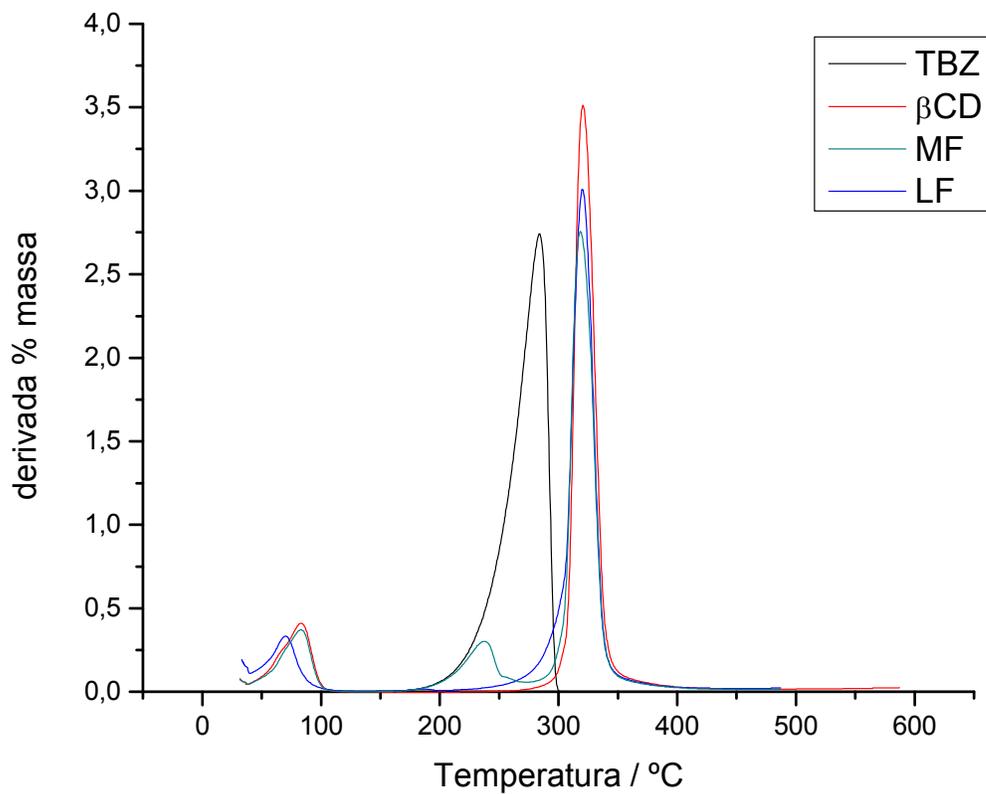


Fig. 4.5.2.3. Curvas de TGA e derivadas do TBZ, βCD, mistura física equimolar TBZ:βCD 1:1(MF) e do complexo de inclusão TBZ:βCD (LF).

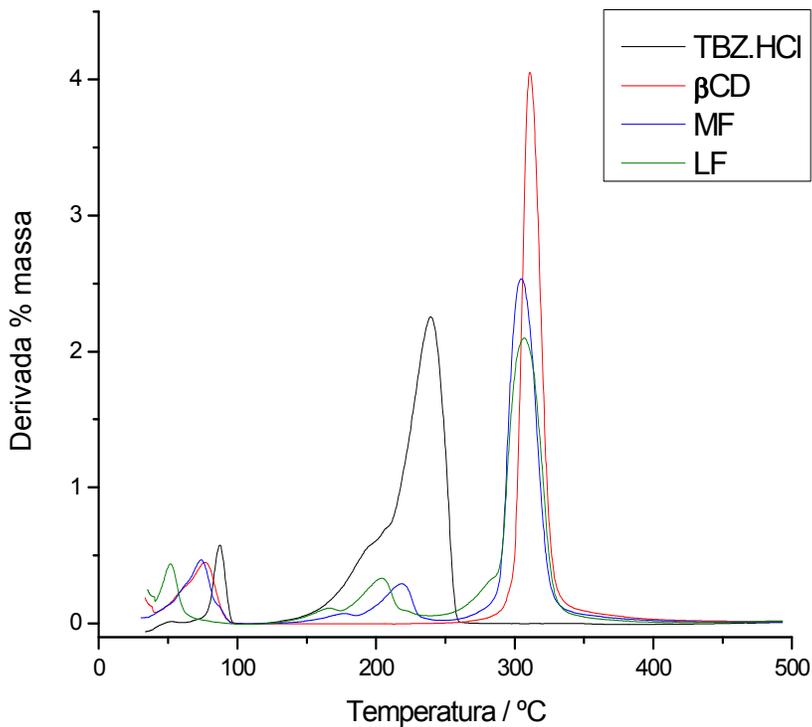
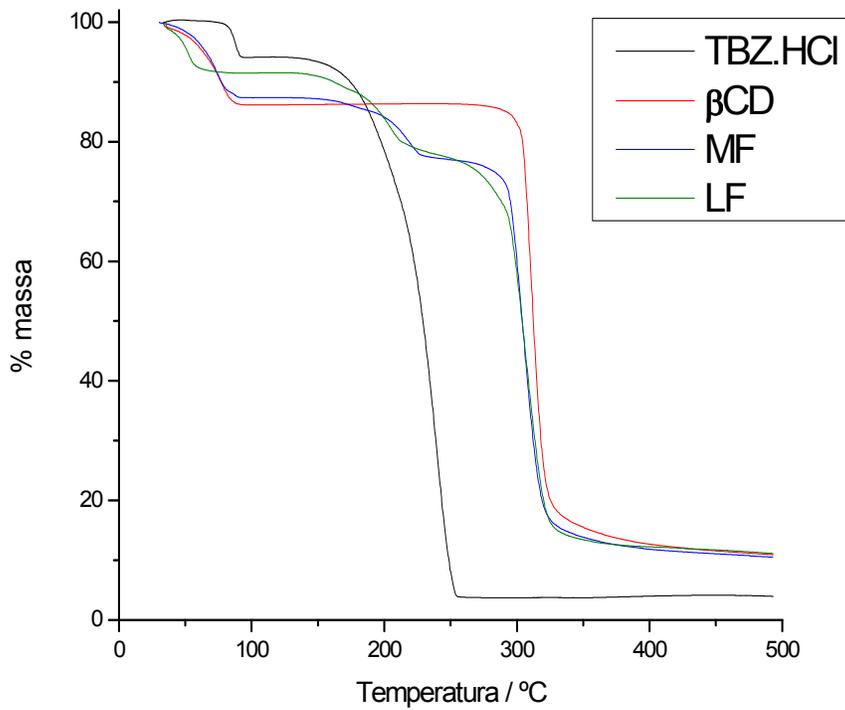


Fig. 4.5.2.4. Curvas de TGA e derivadas do TBZ.HCl, βCD, mistura física equimolar TBZ.HCl:βCD 1:1(MF) e do complexo de inclusão TBZ.HCl:βCD (LF)

A curva de TGA do complexo TBZ.HCl:βCD (LF) apresentou as mesmas transições térmicas existentes na MF (Fig. 4.5.2.2). Como a principal evidência de formação de complexo de inclusão ocorre majoritariamente com o desaparecimento da transição térmica referente à mudança de fase do ativo, os resultados mostraram que a preparação em meio ácido, que resulta na formação do aduto TBZ.HCl, não produz o complexo. Assim, embora esta metodologia tenha a vantagem de não empregar solvente orgânico na preparação, ela mostrou-se inadequada para obter o complexo de inclusão. A ausência de interação entre TBZ em meio ácido (TBZ.HCl) e βCD já havia sido verificada nos experimentos sobre caracterização, em solução, por fluorescência.

Nas curvas de TGA e derivada (Fig. 4.5.2.1.) foi observado desaparecimento da transição referente à fusão/decomposição do TBZ na amostra correspondente ao complexo TBZ:βCD, preparado empregando meio neutro e etanol. Além disso, a decomposição do fármaco é observada juntamente com a decomposição da βCD, conforme se verifica no deslocamento da banda (em direção à menor temperatura) dessa transição na curva da derivada de LF. Assim, essas evidências confirmam a obtenção do complexo TBZ:βCD.

4.5.3. Caracterização dos complexos de inclusão por espectroscopia no i.v.

A caracterização do complexo de inclusão TBZ:βCD no estado sólido através da espectroscopia de absorção no i.v. está reportada na literatura no trabalho de Tang e colaboradores de 2005. Nesse trabalho, os autores sugerem que a interação do TBZ com a cavidade interna da βCD ocorra pelo grupo benzimidazol do fármaco, com base nas alterações verificadas nas bandas referentes aos estiramentos deste grupo no espectro do complexo TBZ:βCD. Para o atual trabalho, os espectros dos complexos de inclusão preparados utilizando os meios ácido (TBZ.HCl:βCD) e neutro com etanol (TBZ:βCD), assim como os

espectros dos constituintes isolados e das respectivas misturas físicas equimolares (TBZ:TBZ.HCl: β CD 1:1), podem ser visualizados nas **Figs. 4.5.3.1 e 4.5.3.2.**

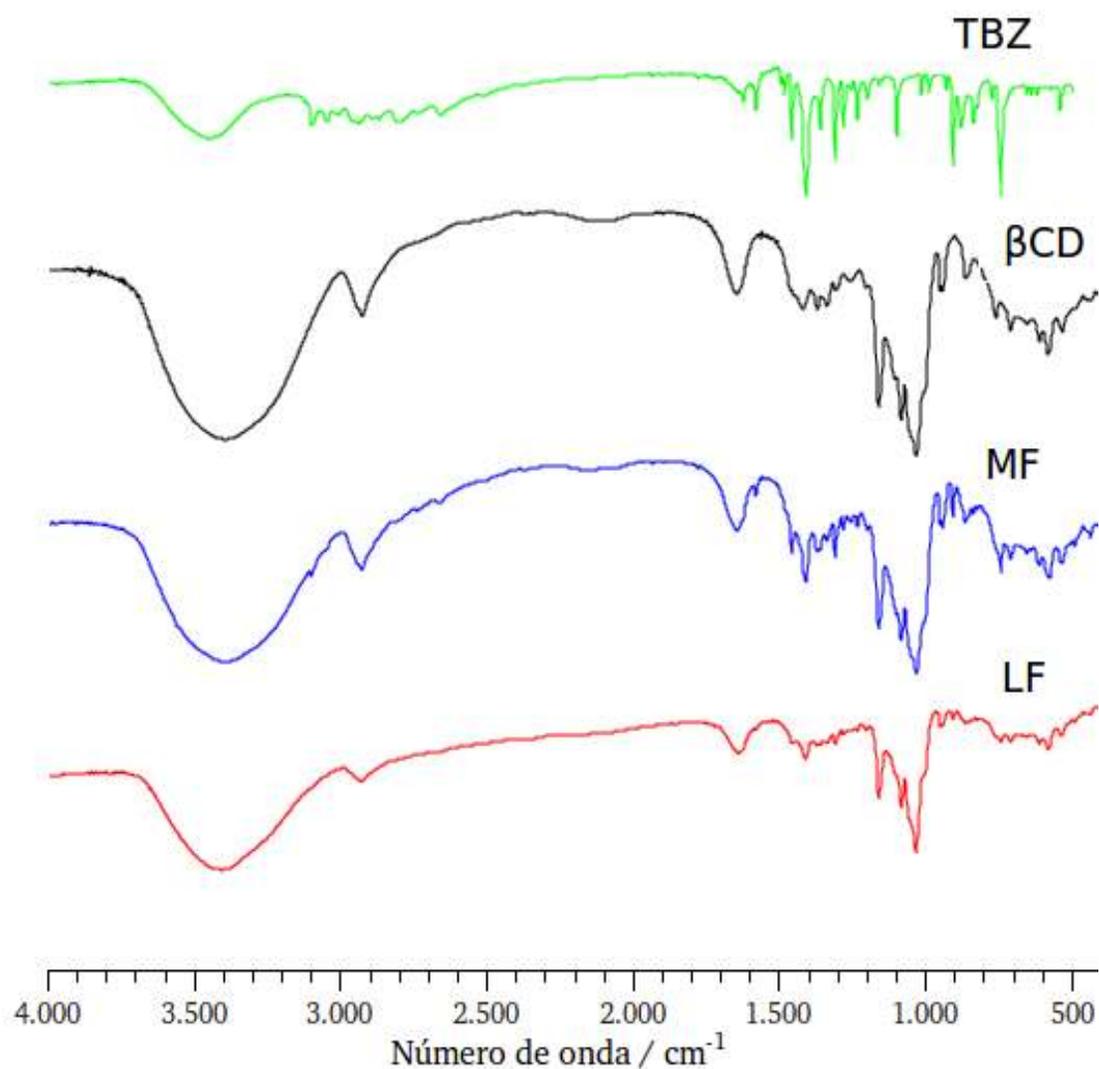


Fig. 4.5.3.1. Espectros no I.V. do TBZ, β CD, mistura física TBZ: β CD equimolar 1:1 (MF) e do complexo de inclusão TBZ: β CD (LF).

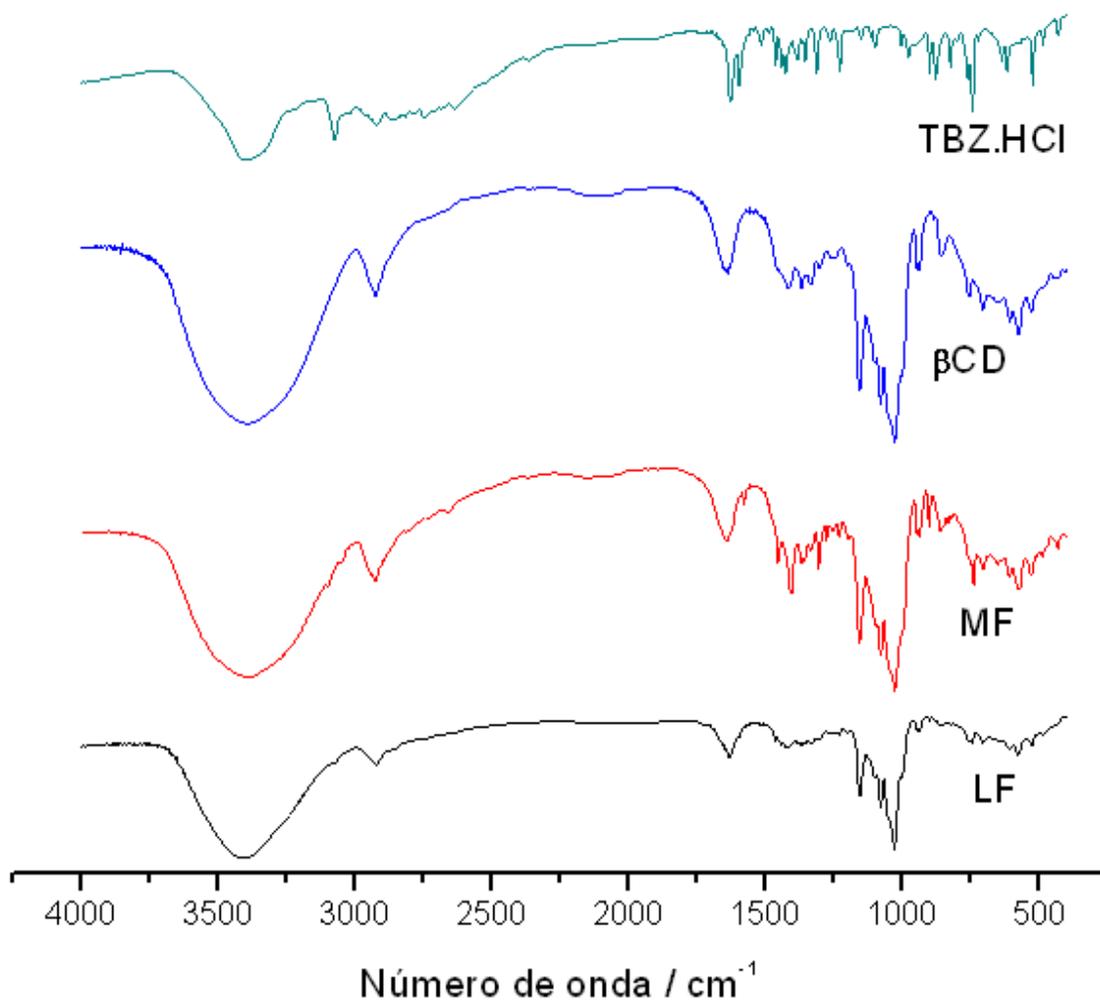


Fig. 4.5.3.2. Espectros no i.v. de TBZ.HCl, βCD, mistura física TBZ.HCl:βCD equimolar 1:1 (MF) e do complexo de inclusão TBZ.HCl:βCD (LF).

Em geral, os espectros dos complexos de inclusão TBZ:βCD e TBZ.HCl:βCD (LF) apresentaram bandas menos intensas em relação aos demais, principalmente quando comparados com os das respectivas misturas físicas (MF). Não foram observados deslocamentos nas bandas do TBZ relativo ao grupo tiazolil em 1300 cm^{-1} (estiramento esqueleto tiazolil) e do grupo benzimidazol em 1580 cm^{-1} (estiramento do esqueleto do anel benzênico), 1600 cm^{-1} (estiramento da ligação -C=C- do anel benzênico), 770 cm^{-1} (deformação dos hidrogênios do

anel benzênico), assim como não houve deslocamento das bandas de absorção para a β CD; $1000-1150\text{ cm}^{-1}$ (estiramentos assimétrico C-O-C e das ligações C-C/C-O), 950 cm^{-1} (estiramento ligação $\alpha-1,4$) (Tang et al, 2005). Em TBZ: β CD, as principais mudanças espectrais estão no perfil das bandas em 770 cm^{-1} (LF), que apresenta menor intensidade em relação às bandas vizinhas, e na banda da β CD em $1000-1150\text{ cm}^{-1}$, cuja largura foi diminuída (LF). Estes resultados sugerem que o TBZ possa estar encapsulado na β CD no estado sólido através do grupo benzimidazol, como descrito na literatura, mas as alterações espectrais do complexo obtido foram menores do que retrata esta referência.

No espectro do TBZ.HCl: β CD, foi observado deslocamento da banda em 740 cm^{-1} (MF) para 747 cm^{-1} (LF), o que, com base nas atribuições para o TBZ, deve corresponder à deformação dos hidrogênios do anel benzênico. As alterações em LF das bandas da β CD ocorreram da mesma forma que no espectro de TBZ: β CD. Como as curvas de TGA mostram inexistência de complexo de inclusão em TBZ.HCl: β CD, conclui-se que as mudanças espectrais observadas tanto em TBZ: β CD como em TBZ.HCl: β CD, por serem muito semelhantes, não podem ser consideradas evidências de formação de complexo de inclusão.

3.5.4) Caracterização dos complexos de inclusão por difratometria de raios-X

As características cristalinas do TBZ, TBZ.HCl e β CD no estado sólido permitiram que a possível formação de complexos de inclusão fosse caracterizada por meio desta técnica. Os difratogramas dos complexos de inclusão TBZ.HCl: β CD e TBZ: β CD obtidos foram comparados aos das misturas físicas ativo:CD com os respectivos constituintes. A distinção dos picos foi realizada com base nos difratogramas dos constituintes isolados (**Figs. 4.5.4.1 e 4.5.4.2**).

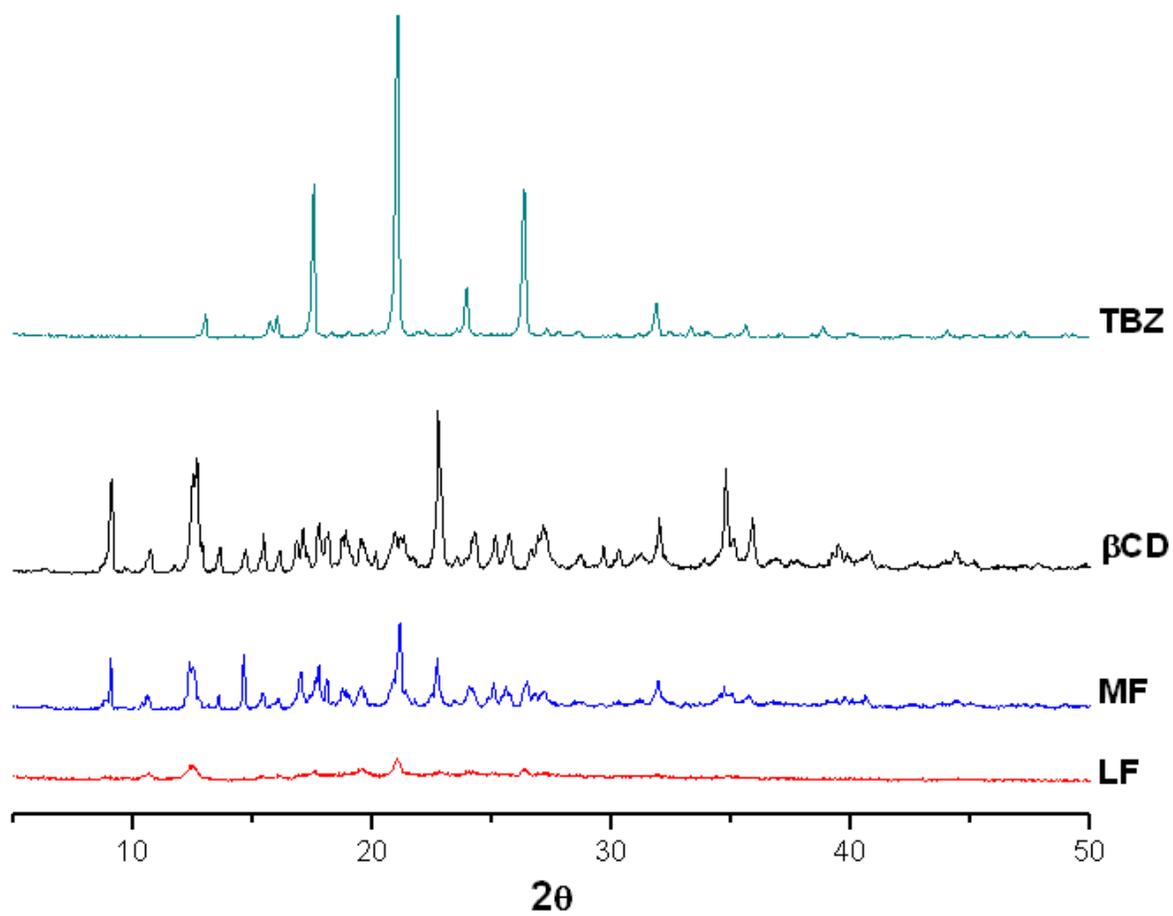


Fig. 4.4.3.1. Difratoqramas de raios-X de TBZ, β CD, mistura física TBZ: β CD equimolar 1:1 (MF) e do complexo de inclusão TBZ: β CD (LF).

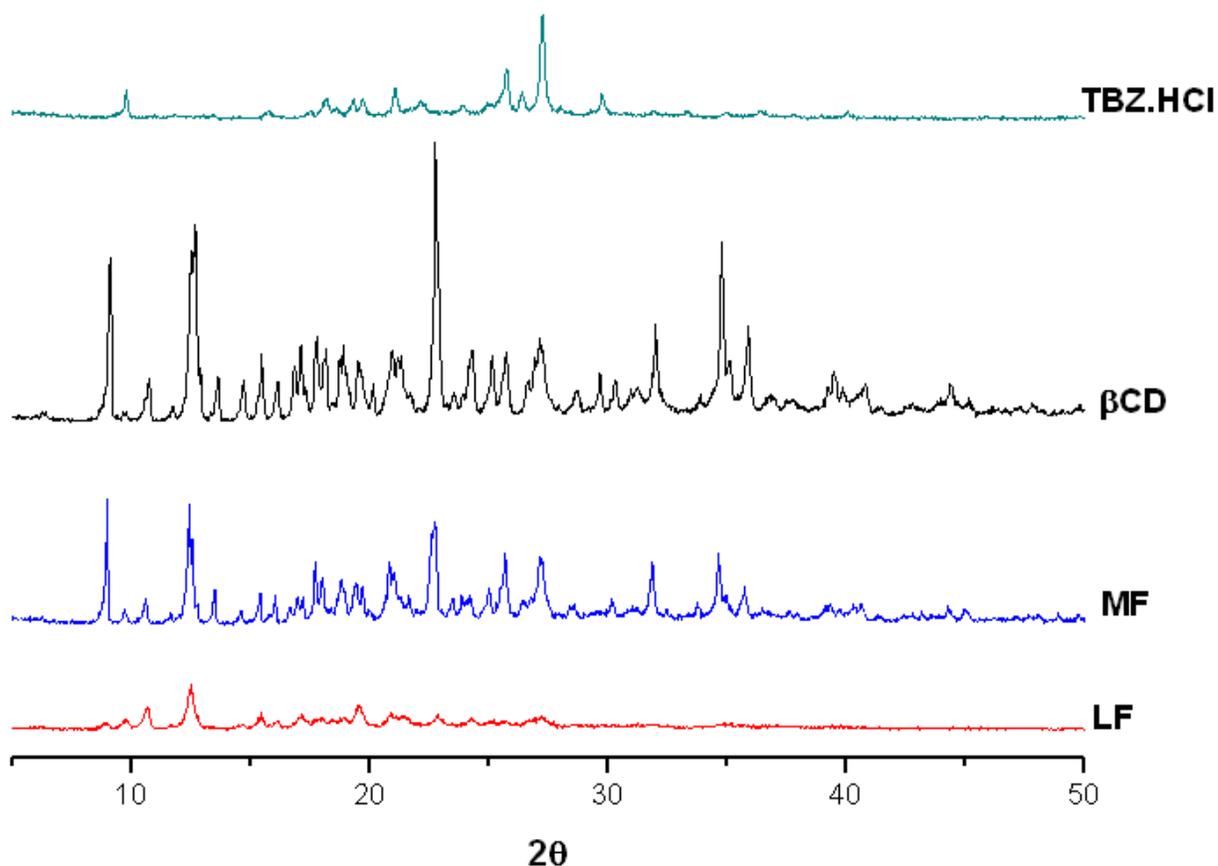


Fig. 4.5.4.2. Difratogramas de raios-X de TBZ.HCl, β CD, mistura física TBZ.HCl: β CD equimolar 1:1 (MF) e do complexo de inclusão TBZ.HCl: β CD (LF).

Ambos os difratogramas LF indicam que as amostras são amorfas, sendo mais evidente em TBZ: β CD. Assim, poder-se-ia confirmar a formação do complexo de inclusão por esta técnica em ambas preparações não fosse pela influência do processo de liofilização utilizado na síntese dos complexos, que pode causar amorfização parcial da estrutura cristalina das CDs. Entretanto, a formação do complexo de inclusão em TBZ: β CD, já verificada anteriormente por TGA, também se confirmou por DRX, visto o caráter amorfo dessa amostra que foi superior ao da amostra de TBZ.HCl: β CD, em que se verifica quantidade muito maior de picos indicativos de estrutura cristalina. Além disso, a presença desses pequenos picos, mesmo no complexo TBZ: β CD, que deveria apresentar padrão

de difração de substância totalmente amorfa, mostra que ainda existem resquícios dos constituintes isolados, que não formaram complexo.

4.6) Estudo teórico, do complexo TBZ:βCD, por métodos quânticos

A estrutura molecular do complexo de inclusão TBZ:βCD foi otimizada por métodos semiempíricos, simulando dois meios diferentes. O método PM3 do software Gaussian 2003 foi empregado para otimização do complexo no vácuo, enquanto que o método PM6 do software MOPAC 2007 foi empregado para otimização em ambiente aquoso. Inicialmente, tanto TBZ como βCD tiveram suas estruturas otimizadas isoladamente pelos métodos empregados. As estruturas iniciais dos compostos foram obtidas de banco de dados internacionais, sendo a do TBZ obtida do DrugBank Database e a da βCD do Protein Database (arquivo *1DMB2.pdb*). Os dados de distâncias e ângulos de ligações da βCD obtidos nesta otimização foram comparados com os dados experimentais no estado sólido (**Tabela 4.6.1**).

Tabela 4.6.1. Comprimento e ângulos de ligação da βCD otimizada pelo método PM3 e obtidos experimentalmente.

	βCD (Cristalina)	βCD (PM3)	Δ(PM3 – Crist.)
Comprimento das Ligações / Å			
C ₁ -C ₂	1,519	1,551	0,032
C ₂ -C ₃	1,530	1,556	0,026
C ₃ -C ₄	1,520	1,554	0,034
C ₄ -C ₅	1,529	1,554	0,025
C ₅ -C ₆	1,523	1,547	0,024

O ₅ -C ₁	1,398	1,414	0,016
C ₁ -O ₁	1,425	1,398	-0,027
C ₂ -O ₂	1,439	1,401	-0,038
C ₃ -O ₃	1,443	1,416	-0,027

Ângulos de Ligação / graus

C ₁ -C ₂ -C ₃	109,94	109,74	-0,20
C ₂ -C ₃ -C ₄	109,18	109,27	0,09
C ₃ -C ₄ -C ₅	111,06	110,89	-0,17
C ₄ -C ₅ -C ₆	113,63	112,15	-1,48
O ₆ -C ₆ -C ₅	110,37	111,50	1,13
O ₅ -C ₁ -C ₂	111,14	111,26	0,12
O ₂ -C ₂ -C ₃	110,93	111,38	0,45
O ₃ -C ₃ -C ₄	110,04	107,01	-3,03

Ângulos diedros / graus

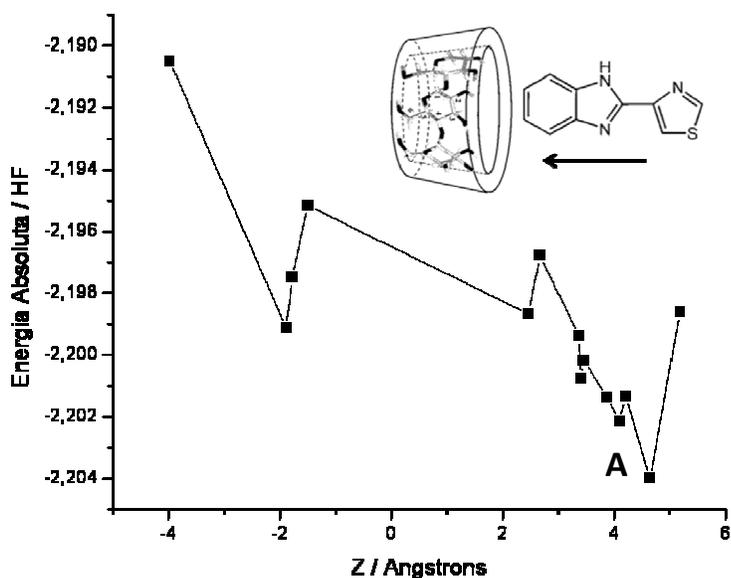
C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄	-53,81	-54,28	-0,47
C ₂ -C ₃ -C ₄ -C ₅	55,11	55,34	0,23
C ₃ -C ₄ -C ₅ -O ₅	-55,93	-53,91	2,02
C ₄ -C ₅ -O ₅ -C ₁	59,29	54,00	-5,29
C ₅ -O ₅ -C ₁ -C ₂	-60,10	-53,41	6,69
O ₅ -C ₁ -C ₂ -C ₃	56,02	52,71	-3,31
O ₂ -C ₂ -C ₃ -C ₄	176,03	178,6	2,57
O ₃ -C ₃ -C ₄ -C ₅	175,57	172,94	-2,63

Os dados desta Tabela mostram que a estrutura da β CD otimizada pelo método PM3 apresenta similaridade satisfatória com a estrutura obtida experimentalmente, pois os valores de $\Delta(\text{PM3} - \text{Exp.})$ em geral foram menores em relação a comparações dessa natureza já reportada na literatura (Xing et al, 2009).

A otimização do complexo de inclusão TBZ:βCD ocorreu conforme metodologia estabelecida (Yahi et al, 2009; Liu et al, 2000; Xing et al, 2009; Yousef et al, 2007). A estrutura otimizada da βCD foi posicionada no centro do plano XY, enquanto que a do TBZ foi posicionada simetricamente sobre o eixo Z, sendo a distância desta molécula ao centro do plano XY (centro da βCD) calculada tendo como referência o átomo de carbono do grupo tiazolil que se liga ao grupo benzimidazol. Então, foram permitidas todas as maneiras de movimentação da molécula de TBZ ao longo da cavidade da βCD, sendo a estrutura do complexo otimizada e os valores de energia do sistema obtidos a cada intervalo de 1Å em Z, sem nenhuma restrição de simetria.

4.6.1) Otimização estrutural do complexo TBZ:βCD, no vácuo, pelo método PM3.

As energias do complexo de inclusão, obtidas em função da posição do TBZ na βCD, estão na **Fig. 4.6.1.1**.



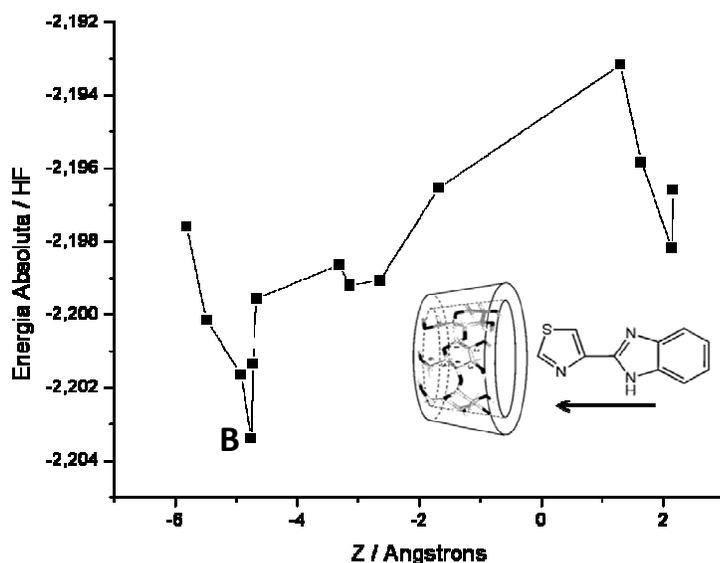


Fig. 4.6.1.1. Energias absolutas do complexo TBZ:βCD para todas as formas de encapsulação do fármaco e pontos de mínimo de energia (**A** e **B**): TBZ entrando pelo lado benzimidazol (primeiro) e pelo lado tiazolil (segundo).

Os pontos de mínimo global em cada gráfico forneceram as estruturas com menor energia do complexo de inclusão para cada orientação do fármaco dentro da cavidade da βCD. Os resultados de otimização mostraram mínimos globais muito próximos para as duas orientações do TBZ (ΔE 1,57kJ/mol, em que $E(\mathbf{A}) < E(\mathbf{B})$). Em ambas as estruturas, a interação do fármaco com a cavidade interna da βCD ocorre através de seu grupo benzimidazol, de forma semelhante às estruturas propostas do experimento ROESY-1D. As estruturas **A** e **B** podem ser visualizadas na **Fig. 4.6.1.2**.

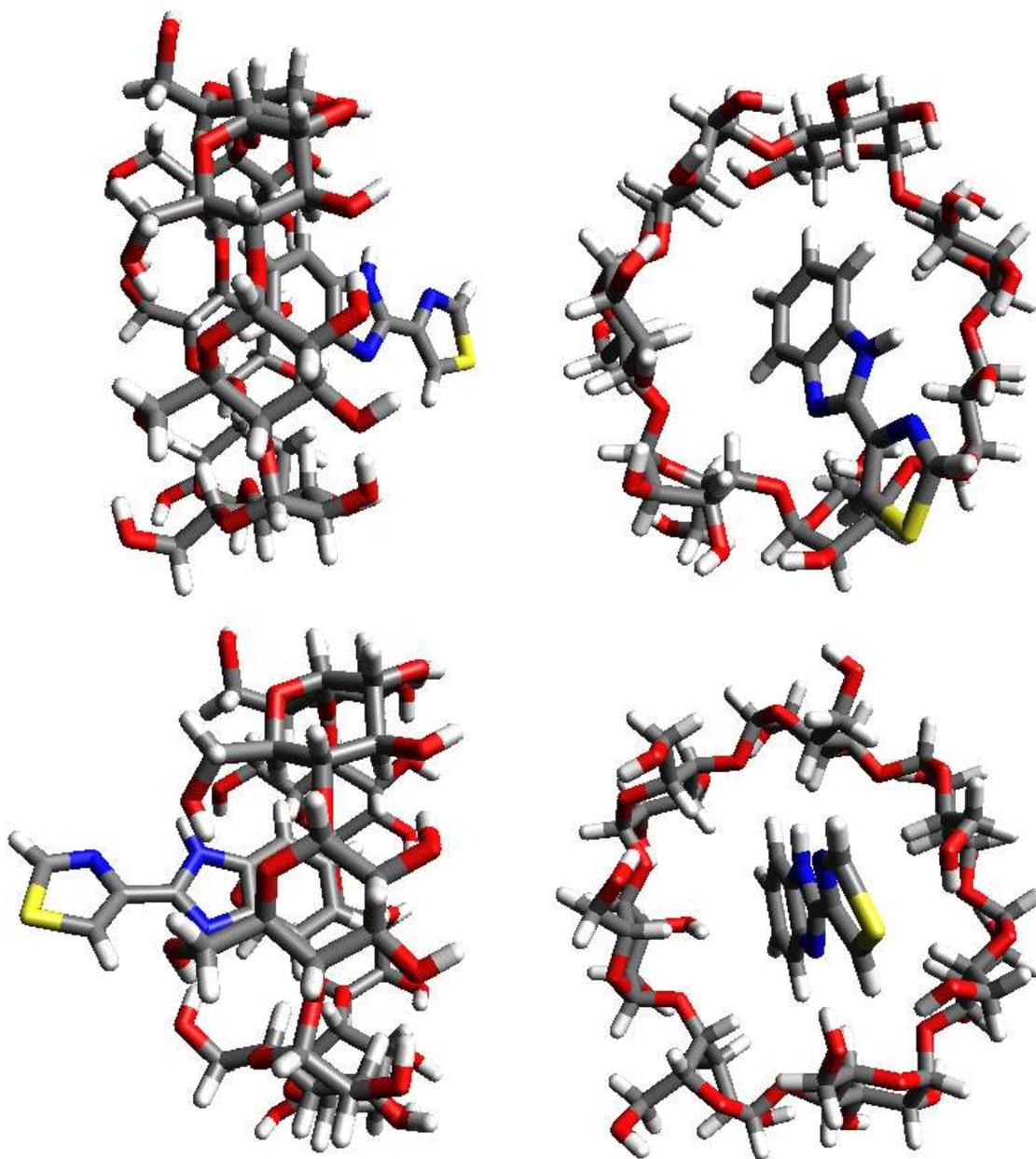


Fig. 4.6.1.2. Vistas lateral e frontal das estruturas químicas **A** (primeira) e **B** (segunda) mais estáveis do complexo TBZ:βCD obtidas pelo método PM3.

Como as estruturas **A** e **B** apresentaram valores de energia muito próximos, não é possível atribuir a uma delas a provável estrutura real deste complexo de inclusão. Portanto, os resultados de otimização por PM3 mostram apenas que a encapsulação ocorre preferencialmente pelo grupo benzimidazol do TBZ, mas

sem fornecer distinção entre em qual das bordas da cavidade da β CD a encapsulação seria mais favorecida.

A estrutura mais estável do complexo foi obtida recalculando suas respectivas energias (*single point energy*) em nível *ab-initio*, empregando DFT com a base híbrida B3LYP/6-31G(d, p). Além das energias de formação das estruturas do complexo de inclusão, foram exploradas variações nas energias conformacionais e de interação das espécies. Os resultados obtidos por PM3 e DFT estão na **Tabela 4.6.1.1**.

Tabela 4.6.1.1. Energias obtidas das estruturas **A** e **B** do complexo TBZ: β CD no vácuo, nos níveis semiempírico (PM3) e *ab-initio* (DFT).

Energias / kJ mol ⁻¹	PM3	B3LYP/6-31G(d,p)
TBZ	-358,70	- 2.488.312,68
β CD	-6101,49	-11.224.578,00
TBZ: β CD (A / B)	-5786,57 / -5785,00	-13.712.831,05 / -13.712.909,60
ΔE_f (A / B)	673,61 / 675,19	59,64 / -18,91
ΔE_{def} TBZ (A / B)	-----	24,58 / 25,69
ΔE_{def} β CD (A / B)	-----	10,84 / 0,33
ΔE_{int} (A / B)	-----	24,21 / -44,93

$$\Delta E_f = E(\text{TBZ}:\beta\text{CD}) - [E(\text{TBZ})_{\text{livre}} + E(\beta\text{CD})_{\text{livre}}]$$

$$\Delta E_{def} X = E(X)_{\text{complexo}} - E(X)_{\text{livre}}$$

$$\Delta E_{int} = E(\text{TBZ}:\beta\text{CD}) - [E(\text{TBZ})_{\text{complexo}} + E(\beta\text{CD})_{\text{complexo}}]$$

$$\Delta E_f = \Delta E_{def} X + \Delta E_{int}$$

Os valores de $E(\text{TBZ}:\beta\text{CD})$ obtidos por DFT mostram inversão na estabilidade dos complexos em relação aos valores obtidos por PM3, ou seja,

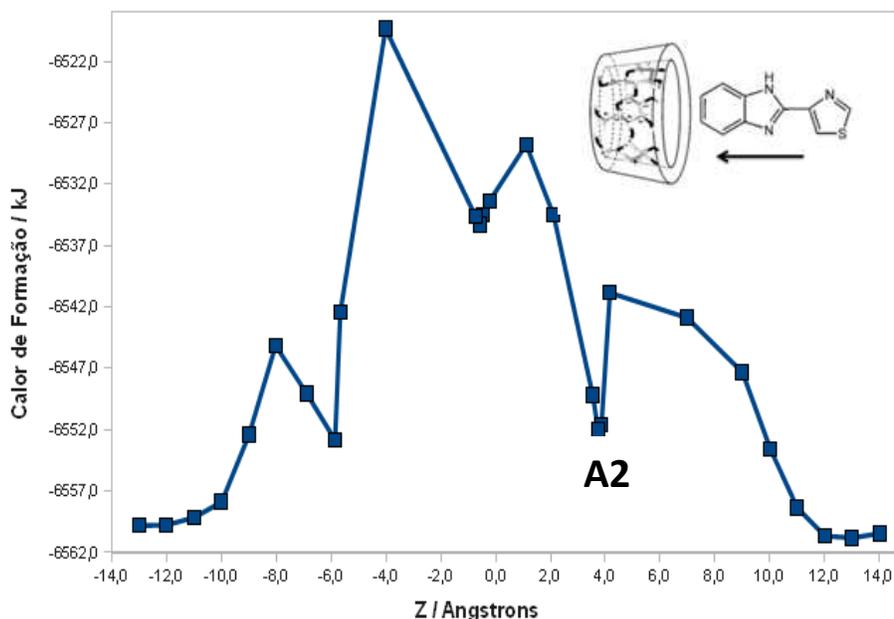
$E(\mathbf{B})$ torna-se menor que $E(\mathbf{A})$. Além disso, a energia de formação do complexo (ΔE_f) foi negativa em **B** (interação exotérmica), ao contrário do que mostram os resultados por PM3. A análise da formação do complexo de inclusão pôde ser estendida com a interpretação dos dados de variação de energia de deformação dos constituintes ($\Delta E_{def}X$, $X = \text{TBZ}$ ou βCD) e de interação TBZ: βCD (ΔE_{int}), ambas obtidas apenas dos cálculos por DFT. Em **A**, verifica-se ΔE_{def} positivo para TBZ e βCD , mostrando que a mudança de conformação das moléculas na formação do complexo de inclusão deixaram-nas mais instáveis em relação às mesmas livres. Além disso, $\Delta E_{int} > 0$ implica que $E(\text{TBZ}:\beta\text{CD})$ é maior do que a soma das energias das estruturas de TBZ e βCD isoladas, mas no complexo de inclusão [$E(\text{TBZ})_{\text{complexo}} + E(\beta\text{CD})_{\text{complexo}}$]. Assim, em **A** o valor positivo de ΔE_f é resultado tanto do aumento da energia oriunda de mudanças conformacionais como da predominância de interações repulsivas entre os constituintes. Para **B**, não foi verificada maior estabilização das espécies com formação do complexo de inclusão ($\Delta E_{def} > 0$) e predominância de interações atrativas na estrutura do complexo ($\Delta E_{int} < 0$). A ocorrência de interações predominantemente atrativas em **B** teve influência da presença de ligações de hidrogênio entre o nitrogênio mais básico do TBZ e uma hidroxila primária da βCD , não se verificando interação desta magnitude na estrutura **A**. Como o aumento de ΔE_{def} em **B** não foi tão expressivo frente ΔE_{int} (exotérmico), ΔE_f em desta estrutura foi negativo.

A grande discrepância nos valores obtidos de ΔE_f entre os métodos PM3 e DFT é um exemplo da constatação de Stewart, já mencionada neste texto, sobre a fraca energia de associação entre molécula do ativo e CD nos complexos, obtida por métodos semiempíricos. Entretanto, o método realizou boa otimização da estrutura, visto a semelhança das estruturas obtidas com as elucidadas via ROESY-1D.

4.6.2) Otimização estrutural do complexo TBZ:βCD, simulando meio aquoso, pelo método PM6 e algoritmo COSMO.

A simulação do ambiente aquoso em cálculos quânticos semiempíricos pode ser feita usando o algoritmo COSMO (*COnductor like Screening MOdel*) no qual o meio é tratado como um contínuo polarizável com constante de permissividade ϵ . O soluto é mergulhado neste meio, formando uma superfície de contato denominada superfície acessível do solvente (SAS), que terá sua distribuição de cargas de acordo com ϵ (Klamt e Schüürmann, 1993). Este algoritmo foi desenvolvido para o software MOPAC, possibilitando a simulação do solvente também em cálculos semiempíricos. Sua utilização em complexos de inclusão com CDs já é reportada na literatura (Yan et al, 2007; Song et al, 2008; Zhang et al, 2008), permitindo o estudo da influência de solvente de uma forma computacionalmente mais simples.

A otimização do complexo TBZ:βCD simulando o ambiente aquoso com o algoritmo COSMO foi realizada com a mesma metodologia empregada para cálculos da espécie no vácuo, com o método PM3. Os gráficos de energias das estruturas do complexo de inclusão, em função da posição e orientação do TBZ na βCD estão na **Fig. 4.6.2.1**.



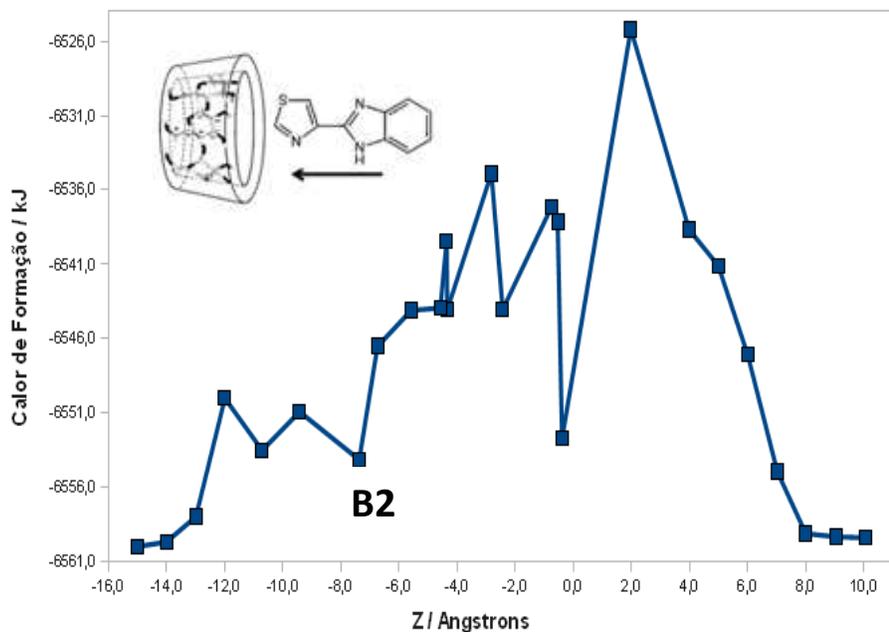


Fig. 4.6.2.1. Calor de formação do complexo TBZ:βCD, em meio simulando ambiente aquoso, para todas as formas de encapsulação do fármaco. Pontos de mínimo de energia **A2** e **B2** para as duas formas de encapsulação do TBZ.

Embora os perfis de energia sejam diferentes dos obtidos no cálculo, por PM3, considerando a espécie no vácuo, em água também se observou encapsulação do TBZ preferencialmente pelo grupo benzimidazol. Além disso, esta não ocorre de forma entalpicamente dirigida, pois $\Delta_f H(\text{TBZ}:\beta\text{CD}) > [\Delta_f H(\text{TBZ}) + \Delta_f H(\beta\text{CD})]$ em ambas as estruturas, assim como nos resultados obtidos via PM3. As estruturas correspondentes ao complexo de inclusão mais estáveis, **A2** e **B2**, estão na **Fig. 4.6.2.2**.

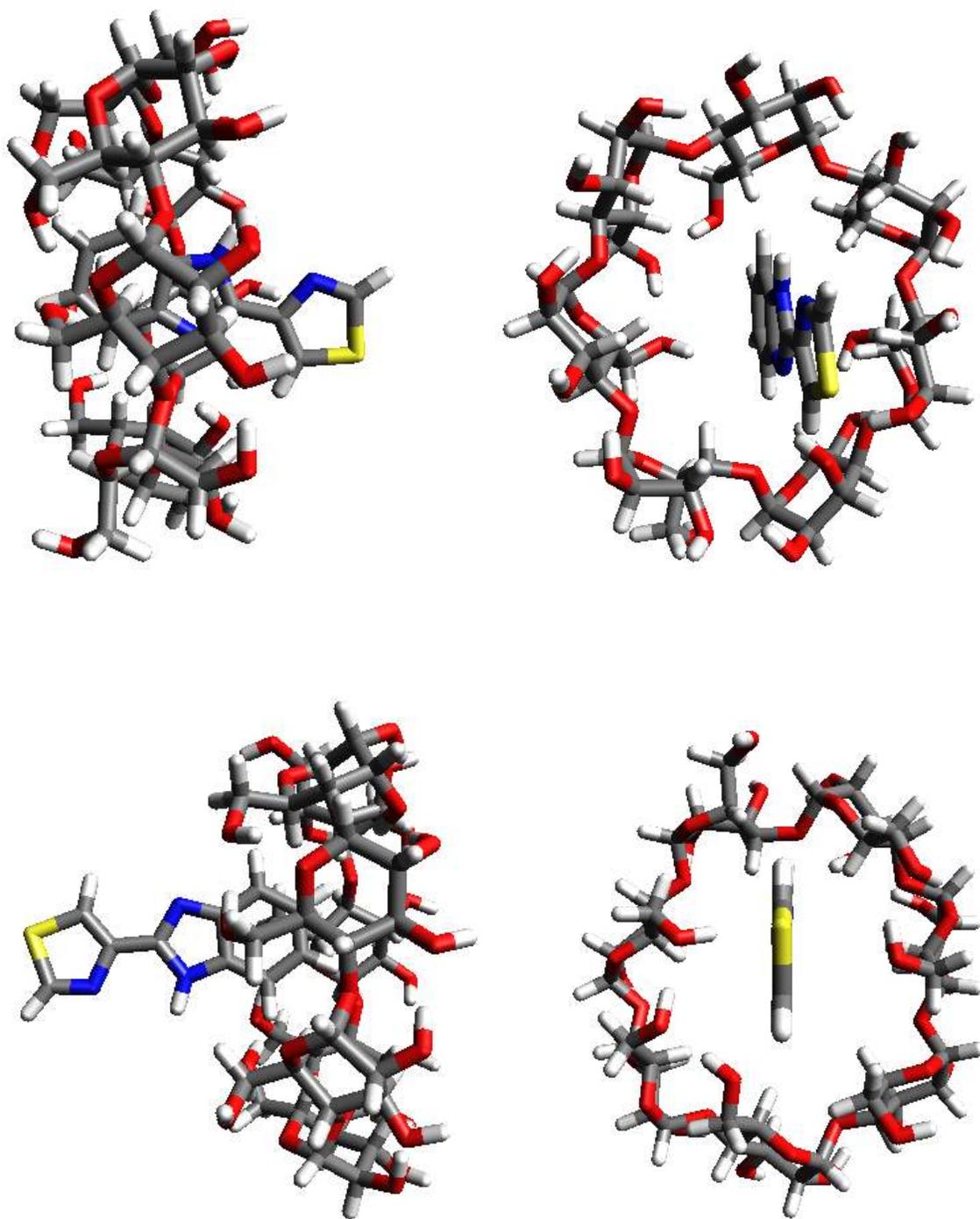


Fig. 4.6.2.2. Vistas frontais das estruturas químicas **A2** (primeira) e **B2** (segunda) mais estáveis do complexo TBZ: β CD em água, obtidas com o método PM6.

O complexo **B2** foi o que apresentou menor energia ($\Delta_f H(B) = 6,40 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta_f H(A) = 7,04 \text{ kJ mol}^{-1}$), sendo sua estrutura semelhante à mais estável conseguida por DFT, considerando o complexo no vácuo. Novamente, foram observados valores próximos de $\Delta_f H$ do complexo de inclusão, o que torna difícil a distinção de estabilidade no ambiente aquoso considerando apenas a entalpia de formação do complexo. A investigação de variação de entropia é mais complicada e não foi realizada com o COSMO, por depender de fenômenos relacionados com o solvente, que não é considerado de forma explícita (conjunto de moléculas) neste nível de cálculo. Assim, o estudo teórico sobre estabilidade de complexos com CD via variação da energia de Gibbs, se torna limitado. Entretanto, para o complexo TBZ: β CD em água, a principal diferença entre os resultados obtidos teórica (COSMO) e experimentalmente (espectroscopia de fluorescência) consistiu na variação de entalpia do processo, que foi negativa no último. Tanto os cálculos teóricos realizados simulando o vácuo como os simulando meio aquoso contínuo apresentaram estruturas do complexo TBZ: β CD condizentes com os resultados obtidos do experimento ROESY-1D, revelando a importância deste tipo de estudo para complementar a pesquisa experimental e enriquecer a compreensão dos fenômenos envolvidos na formação de complexos de inclusão com CDs.

As entalpias de formação positivas das estruturas **A2** e **B2** foram investigadas em termos das contribuições referentes a deformações das espécies (ΔE_{def}) e da natureza das interações envolvidas no complexo de inclusão (ΔE_{int}), também realizado para os cálculos considerando as espécies no vácuo. Os valores dessas energias estão na **Tabela 4.6.2.1**.

Tabela 4.6.2.1. Energias obtidas para as estruturas **A2** e **B2** do complexo TBZ:βCD em água.

Energias / kJ mol ⁻¹	PM6 + COSMO
TBZ	329,01
βCD	-6888,10
TBZ:βCD (A2 / B2)	-6552,84 / -6554,12
ΔH _f (A2 / B2)	6,24 / 4,97
ΔH _{def} TBZ (A2 / B2)	-0,79 / -0,28
ΔH _{def} βCD (A2 / B2)	-2,42 / -4,95
ΔH _{int} (A2 / B2)	9,46 / 10,19

Ambas as estruturas otimizadas em água mostraram predomínio de interações repulsivas, resultando em ΔH_{int} positivo. Embora tanto TBZ como βCD apresentem estruturas conformacionais de menor energia com a complexação (ΔH_{def} < 0), a contribuição dessa energia não foi suficiente para tornar o processo de formação deste complexo entalpicamente favorável, ou seja, com ΔH_f < 0.

Portanto, apenas os cálculos *ab-initio* apresentaram concordância com os resultados experimentais, que classifica o processo de formação do complexo de inclusão como exotérmico. Ambos os métodos semiempíricos forneceram estruturas com mínimos de energia condizentes entre e si e com as estruturas deduzidas dos experimentos com ROESY-1D. Ao analisar os valores de energia obtidos nesse nível de cálculo, o método PM6 + COSMO apresentou melhor qualidade, visto os resultados de entalpia de formação obtidos nesse método terem sido menos discrepantes do resultado experimental em relação aos mesmos obtidos por PM3 no vácuo.

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

O complexo de inclusão formado entre o fármaco TBZ e a β CD foi investigado em função do meio de preparação e, conseqüentemente, das espécies químicas envolvidas (TBZ e TBZ.HCl). As técnicas de caracterização empregadas, tanto em solução como no estado sólido, forneceram uma série de informações sobre a formação e organização desse sistema.

A caracterização mais completa do complexo de inclusão TBZ: β CD foi realizada com esse sistema em solução. Os resultados de espectroscopia de fluorescência mostraram evidências qualitativas de formação desse sistema supramolecular e, com emprego de modelos matemáticos derivados da descrição química desses tipos de sistemas no equilíbrio, o comportamento termodinâmico também foi estudado. Os experimentos de fluorescência também mostraram que não ocorre formação de complexo de inclusão em meio ácido (TBZ.HCl: β CD), o que foi confirmado posteriormente com a caracterização em fase sólida. Com a espectroscopia de RMN- 1 H, as prováveis estruturas químicas do complexo de inclusão em D₂O foram elucidadas a partir dos dados de ROESY-1D. Além disso, no experimento DOSY, também foi possível determinar o valor de constante de formação do complexo de inclusão próximo ao valor obtido dos dados de fluorescência, o que contribuiu para a confiabilidade dos experimentos empregados.

Na caracterização do complexo em fase sólida, as técnicas empregadas foram suficientes para confirmar o êxito da preparação de TBZ: β CD. Embora os espectros de absorção no i.v. não tenham fornecido IV apenas fornece isso no caso de haver ligação covalente ou de hidrogênio o que não é o caso evidências conclusivas quanto à formação desses sistemas, os dados de DRX e, principalmente TGA, mostraram características estruturais e físico-químicas coerentes com o produto esperado da preparação, assim como foi possível verificar que esta mesma metodologia de preparação não pode ser empregada para a obtenção de TBZ.HCl: β CD.

Com os cálculos teóricos, foram obtidas estruturas otimizadas muito semelhantes às estruturas propostas dos resultados experimentais, tanto para cálculos no vácuo como simulando o ambiente aquoso. As interações intermoleculares que governam a formação do complexo de inclusão foram calculadas, assim como a influência das mudanças conformacionais de TBZ e β CD neste processo e, conseqüentemente, na estabilidade final do sistema supramolecular. Com isso, os resultados mostraram que a encapsulação do TBZ por meio da cavidade menor da β CD leva à estrutura mais estável, mas como esta afirmação é embasada em cálculos realizados para sistema no vácuo, sua extrapolação ao ambiente aquoso (experimental) apenas torna-se uma proposição.

Com a utilização de várias técnicas experimentais, juntamente com os estudos teóricos, o complexo de inclusão TBZ: β CD foi extensivamente estudado e caracterizado, restando como perspectivas futuras para este trabalho o desenvolvimento de possíveis aplicações desse complexo como constituinte de novas formulações farmacêuticas, através, por exemplo, de estudos de perfil de dissolução, atividade biológica e possíveis preparações de complexos com o TBZ e outros tipos de ciclodextrinas.

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaron, J-J; Maafi, M; Lion, C. *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.* **1998**, 30, 227.
- Aicart, E.; Junquera, E. *Int. J. Pharmac.* **1999**, 176, 169.
- Alvira, E.; Mayoral, J. A.; García, J.I. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 271, 178.
- Amato, M. E.; Lipkowitz, K. B.; Lombardo, G. M.; Pappalardo, G. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1996**, 2, 321.
- Antoniadou-Vyza, E.; Buckton, G.; Michaleas, S. G.; Loukas, Y. L.; Efentakis, M. *Int. J. Pharm.* **1997**, 158, 233.
- Badr-Eldin, S. S.A. Elkheshen, M.M Ghorab. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 70, 819.
- Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Res.* **1985**, 63, 207.
- Benesi, M.L.; Hildebrand, J.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2703
- Bernad-Bernad, M.- J.; Gracia-Mora, J.; Díaz, D.; Castillo-Blum, S. E. *Curr. Drug. Discov. Tech.* **2008**, 5, 146.
- Bothner-By, A. A.; Stephens, R. L.; Lee, J.; Warren C. D.; Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 811.
- Calderini, A.; Pessine, F. B. T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, 60, 369.
- Carr, H. Y.; Purcell, E. M. *Phys. Rev.* **1954**, 94, 630.
- Castillo, B.; Martín, L.; León, A.; Olives, A. I.; Martín, M. A. *Talanta* **2003**, 60, 493.
- Castro, E. A.; Barbiric, D. A. *J. Curr. Org. Chem.* **2006**, 10, 715.
- Catena, G. C.; Bright, F. V. *Anal. Chem.* **1989**, 61, 905.
- Connors, K. A. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 796.
- Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1325.
- Dodson, B.; Foster, R.; Bright, A. A. S. *J. Chem. Soc. B* **1971**, 1283
- El-Gendy, G. A.; Terada, K.; Yamamoto, K.; Nakai, Y. *Int. J. Pharm.* **1986**, 31, 25.
- El-Kemary, M. A.; El-Mehasseb, I. M. *Talanta* **2004**, 62, 317.
- Escandar, G. *Analyst* **1999**, 124, 587.
- Fielding, L. *Tetrahedron* **2000**, 56, 6151.
- Foster, R.; Fyfe, C. A. *Trans. Faraday Soc.* **1965**, 61, 1626.

Frank, B. W.; Gray, J. E.; Weaver, R. N. *Amer. J. Pathol.* **1976**, 83, 367.

Freudenberg, K.; Blomquist, G.; Ewald, L.; Soff, K. *Ber.* **1936**, 69, 1258.

Funasaki, N.; Neya, S. *Langmuir* **2000**, 16, 5343.

Gelb, R. I.; Schwartz, L. M. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1989**, 7, 465.

Gil, A.; Chamayou, A.; Leverd, E.; Bougaret, J.; Baron, M.; Couarraze, G. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, 23, 123.

Gil, V. M. S.; Oliveira, N. C. *J. Chem. Educ.* **1990**, 67, 473.

Giordano, F.; Novak, C.; Moyano, J. R. *Thermochimica Acta* **2001**, 380, 123.

Goschl, M.; Crouzy, S.; Chapron, Y. *Eur. Biophys. J.* **1996**, 24, 300.

Guo, Q.-X.; Liu, L.; Li, X.-S.; Song, K.-S. *J. Incl. Phenom.* **2001**, 40, 35.

Guo, Q.-X.; Liu, L.; *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, 42, 1.

Hahn, E. L. *Phys. Rev.* **1950**, 47, 261.

Higushi, T.; Connors, K. A. *Adv. Anal. Chem. Instr.* **1965**, 4, 117.

Hirayama, F.; Harata, K.; Uekama, K.; Otagiri, M. *J. Incl. Phenom.* **1988**, 6, 135.

Holt, J. S. *J. Mol. Struct.* **2010**, 965, 31.

Huang, M.-J.; Quan, Z.; Liu, Y.-M. *Int. J. Quantum Chem.* **2009**, 109, 81.

Johnson Jr., C. S. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spectrosc.* **1999**, 34, 203.

Kapoor, V. *J. Anal. Prof. Drug Subst.* **1986**, 16, 611.

Klamt, A.; Schüürmann, G. *J. Chem Soc. Perkin Trans.* **1993**, 2, 799.

Klein, C. T.; Köhler, G.; Mayer, B.; Mraz, K.; Reiter, S.; Viernstein, H.;

Koehler, J. E. H.; Saenger, W.; van Gunsteren, W. F. *Eur. Biophys. J.* **1987**, 15, 197.

Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., Springer, **2006**.

Lambert, J. B.; Mazzola, E. P. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*, Prentice Hall, **2003**.

Lee, M. L.; Black, D. R.; Parker, C. G.; Zimmerman, S. S. *J. Comp. Chem.* **1996**, 17, 931.

Levine, I. N. *Quantum Chemistry*, 5th ed., Prentice Hall Inc., **1991**, EUA.

Lezcano, M.; Al-Soufi, W.; Novo, M.; Rodríguez-Núñez, E.; Tato, J. V. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 108.

Li, N.; Xu, L. *Thermochimica Acta* **2010**, 499, 166.

Lin, M.; Jayawickrama, D. A.; Rose, R. A.; DelViscio, J. A.; Larive, C. K. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 307, 449.

Lipkowitz, K. B. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1829.

Liu, L.; Li, X-S.; Song, K-S.; Guo, Q-X. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2000**, 531, 127.

Loukas, Y. L. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 4863.

Macêdo, R. O.; Nascimento, T. G. *Thermochim. Acta* **2002**, 392, 85.

Maestrelli, F.; Cecchi, M.; Cirri, M.; Capasso, G.; Mennini, N.; Mura, P. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2009**, 63, 17.

Marconi, G.; Monti, S.; Mayer, B.; Köhler, G. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 3943.

Matei, I.; Nicolae, A.; Hillebrand, M. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 57, 597.

Mathur, R.; Becker, E. D.; Bradley, R. B.; Li, N. C. *J. Phys. Chem.* **1963**, 67, 2190.

Matsui, Y.; Fujie, M.; Hanaoka, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 1451.

McQuarrie, D. A.; Simon, J. D. *Physical Chemistry – A Molecular Approach*; University Science Books, **1997**, EUA.

MINTEZOL, Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, **2003**.

Moore, W. J. *Physical Chemistry*, 3^a ed., Prentice-Hall, **1962**.

Morgon, N. H.; Coutinho, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*, 1^aed., Livraria da Física, São Paulo, **2007**.

Morris, K. F.; Johnson Jr, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3139.

Nacsa, Á.; Berkesi, O.; Szabó-Révész, P.; Aigner, Z. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2009**, 64, 249.

Nakai, Y.; Nakajima, S.; Yamamoto, Y.; Terada, K.; Konno, T. *Chem. Pharm. Bull* **1978**, 26, 3419.

Nascimento, C. S.; Anconi, C. P. A.; Lopes, J. F.; dos Santos, H. F.; de Almeida, W.B. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 59, 265.

Neuhaus, D.; Williamson, M. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH Publishers Inc., New York, **1989**.

Parella, T. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36, 467.

Prabhakaran, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 178,192.

Price, W.S. *Concepts Magn. Reson.* **1997**, 9, 299.

Rademacher, J. T.; Czarnik, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3018.

Rafati, A. A.; Hashemianzadeh, S. M.; Nojini, Z. B.; Safarpour, M. A. *J. Mol. Liquids* **2007**, 135, 153.

Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875.

Rymdén, R.; Carlfors, J.; Stilbs, P. *J. Incl. Phenom.* **1983**, 1,159.

Schneider, H-J; Hacket, F; Rüdiger, V; Ikeda, H. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1755.

Scott, R. L. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.* **1956**, 75, 787.

Scypinski, S.; Drake, J.M. *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 2432.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5^aed., McGraw Hill, **2001**.

Smart, L. E.; Moore, E. A. *Solid State Chemistry - An Introduction*, 5^aed. Taylor & Francis, **2005**.

Song, L. X.; Wang, H. M.; Xu, P.; Zhang, Z. Q.; Liu, Q. Q. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, 80, 2313.

Sousa, F. B.; Denadai, A. M. L.; Lula, I. S.; Lopes, J. F.; dos Santos, H. F.; de Almeida, W. B.; Sinisterra, R. D. *Int. J. Pharmaceutics* **2008**, 353, 160.

Souza de, A. A.; Laverde Jr, A. *Quim. Nova.* **2002**, 25, 6, 1022.

Stewart, J. J. P. *J. Comp. Chem.* **1989**, 10, 209.

Stewart, J. J. P. *J. Mol. Modeling* **2007**, 13, 1173.

Stewart, J. J. P.. *J. Comp. Chem.* **1989**, 10, 221.

Stilbs, P. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spectrosc.* **1987**, 19, 1.

Suzuki, M.; Ito, K.; Fushimi, C.; Kondo, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, 41, 942.

Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743.

Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publ., **1989**.

Szejtli, J. *Pure Appl. Chem.* **2004**, 76, 1825.

Szejtli, J.;Frömming, K.L. *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publ., **1994**.

Tabushi, T.; Mizutani, T. *Tetrahedron* **1987**, 43, 1439.

Tang, B.; Wang, X.; Liang, H.; Jia, B.; Chen, Z. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 8452.

Tanner, J. E. *J. Chem, Phys.* **1970**, 52, 2523.

The Merck Index, versão 12:2, Merck & Co., Inc., **1997**.

Trus, B. L.; Marsh, R. E. *Acta Cryst.* **1973**, B29, 2298.

USP Test Solutions, US Pharmacopeia, **2005**.

Velasco, J.; Guardado, P.; Carmona, C.; Muñoz, M. A.; Balón, M. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, 94, 1469.

Viernstein, H.; Stumpt, C.; Spiegl, P.; Reiter, S. *Arzneim. Forsch.* **1993**, 42, 818.

Wachter, H. N.; Fried, V. *J. Chem. Ed.* **1974**, 51, 798.

Wang, J.; Hou, T.; Xu, X. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 571.

Wickz, W.; Mrozek, J.; Szabelski, M.; Karolczak, J.; Guzow, K.; Malicka, J. *Chem. Phys. Letters* **2000**, 341, 161.

Wilson, N. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 2431.

Woessner, D. E. *J. Chem. Phys.* **1961**, 34, 2057.

Wolschann, P. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1995**, 22, 15.

Xing, S-K.; Zhang, C.; Ai, H-Q.; Zhao, Q.; Zhang, Q.; Sun, D-Z. *J. Theor. Comp. Chem.* **2009**, 8, 57.

Yahi, O. A.; Khatmi, D. E. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2009**, 912, 38.

Yan, C.; Xiu, Z.; Li, X.; Teng, H.; Hao, C. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 58, 337.

Yousef, F. O; Zughul, M.B.; Badwan, A. A. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 57, 519.

Zhang, Z.Q.; Yang, Y.; Xu, P.; Wang, H. M.; Song, L. X. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56, 468.