

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química

Estudo Sobre a Solvatação de Ciclodextrinas por
RMN Através da Relaxação das Moléculas de
Água

Fernanda do Carmo Egídio
Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Sabadini
Co-orientador: Prof. Dr. Fred Yukio Fujiwara

Campinas – 2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Eg41e Egídio, Fernanda do Carmo.
Estudo sobre a solvatação de ciclodextrinas por RMN através da relaxação das moléculas de água / Fernanda do Carmo Egídio. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Edvaldo Sabadini.

Co-orientador: Fred Yukio Fujiwara.

Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Ciclodextrinas. 2. Solvatação. 3. Relaxação de moléculas de água. I. Sabadini, Edvaldo. II. Fujiwara, Fred Yukio. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Study of cyclodextrins solvation using water relaxation in NMR experiments

Palavras-chaves em inglês: Cyclodextrins, Solvation, Relaxation of water molecules

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Edvaldo Sabadini (orientador), Fred Yukio Fujiwara (co-orientador), Luiz Alberto Colnago (membro externo), Francisco Benedito Teixeira Pessine (membro), Pedro Luiz Onório Volpe (suplente), Ronaldo Aloise Pilli (suplente), Antônio Gilberto Ferreira (suplente externo)

Data de defesa: 28/10/2005

*A meu pai
(in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todas as pessoas que me incentivaram a lutar para alcançar meus objetivos e a concluir esta etapa de minha formação. A minha mãe que sempre me apoiou nas decisões tomadas. A todos meus amigos pelo companheirismo e imensurável importância em minha vida. Agradeço, especialmente, aos meus amigos do laboratório pela harmoniosa convivência. Agradeço também aos professores e funcionários do Instituto de Química que muito colaboraram em minha pesquisa e aprendizagem.

Em especial, agradeço a orientação, o estímulo e a amizade dos professores Edvaldo Sabadini e Fred Yukio Fujiwara.

Agradeço ao professor Dr. Lauro Tatsuo Kubota pela concessão da glicose e dos filtros Milli-Q.

À empresa Wacker Chemical Co. pelo fornecimento das ciclodextrinas.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

CURRICULUM VITAE

Formação Acadêmica

- Bacharelado em Química
Universidade Estadual de Campinas
Março de 2000 – Novembro de 2003
- Mestrado em Química
Área: Físico-Química
Universidade Estadual de Campinas
Março de 2004 – Outubro de 2005

Congressos

- Egídio, F. C.; Sabadini, E. e Fujiwara, F. Y.
“Estudo Sobre a Solvatação de Açúcares por RMN Através da Relaxação das Moléculas de Água”.
In: 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas, MG (apresentação oral).
- Sabadini, E.; Egídio, F. C. e Monteiro, F.
“Solubility of Cyclodextrins in H₂O and D₂O. The Hydrogen Bonding Effect”.
In: 8th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry, 2005, Florianópolis, SC.

Publicações Científicas

- Sabadini, E.; Cosgrove, T. and Egídio, F. C.
“Solubility of Cyclodextrins in H₂O and D₂O: a Comparative Study”
artigo submetido ao periódico científico *Carbohydrate Research*

RESUMO

Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos produzidos pela ação enzimática microbiológica sobre o amido. As três ciclodextrinas naturais disponíveis comercialmente são α -CD, β -CD e γ -CD, constituídas por 6, 7 e 8 unidades glicosídicas, respectivamente. Possuem estrutura rígida representada como um cone truncado oco com cavidade hidrofóbica, formada pelos grupos CH_2 e éter, e exterior hidrofílico, contendo os grupos hidroxila. Esses oligossacarídeos interagem com uma ampla variedade de moléculas, formando complexos de inclusão, e a interação com polímeros pode levar à formação de estruturas supramoleculares. As ciclodextrinas apresentam uma solubilidade anômala em água, com uma tendência irregular, sendo a β -CD aproximadamente dez vezes menos solúvel que as outras duas ciclodextrinas da série homóloga. O mesmo comportamento é observado quando D_2O é o solvente, mas, neste caso, a solubilidade é ainda menor para as três ciclodextrinas. Pode-se explicar esse comportamento em termos do efeito causado pelas ciclodextrinas na estrutura do solvente e pela solvatação destas moléculas. A solvatação pode ser estudada por Ressonância Magnética Nuclear, RMN, através de medidas do tempo de relaxação transversal T_2 do solvente. Os valores de T_2 são diferentes para moléculas de solvente livres e ligadas à superfície do soluto, devido à processos dinâmicos, como a rotação molecular. O T_2 é muito sensível à interação do solvente com o soluto, de forma que a presença de um soluto diminui o T_2 das moléculas do solvente diretamente ligadas ao soluto. Este trabalho fez o estudo da solubilidade e solvatação das ciclodextrinas considerando também o equilíbrio entre o estado sólido e a solução saturada. Os cristais de ciclodextrinas foram estudados por Difração de Raios-X e Análise Termogravimétrica. A estrutura molecular dos oligômeros afetam sua flexibilidade, solvatação e acomodação no meio líquido, resultando na anomalia na solubilidade em H_2O e D_2O .

ABSTRACT

Cyclodextrins (CD) are cyclic oligomers produced by the action of certain microbial enzymes on starch. The commercially available members of this series are α -CD, β -CD and γ -CD, having 6, 7 and 8 glucose units, respectively. They have a rigid structure pictorially represented as a truncated cone with a hydrophobic cavity, which are formed by CH₂ and ether groups, and a hydrophilic exterior with hydroxyl groups at the rims. The cyclodextrins are known to interact with different types of molecules, including polymers, forming supramolecular inclusion compounds. The cyclodextrins molecules present an anomalous solubility in water and an irregular trend is observed in the series. β -CD is almost ten times less soluble than the others two cyclodextrins. The same behavior is observed when D₂O is the solvent, however, in this solvent the solubility of three cyclodextrins is much lower. This behavior is explained in terms of the effect caused by cyclodextrins on the water lattice structure and by the solvation of these molecules. The cyclodextrins solvation was studied using transversal relaxation time (T₂) of water in Nuclear Magnetic Resonance experiments. The T₂ of free water and the water bounded on the surface of a solute are different due to the differences in their molecular dynamics (mainly the rotation). Hence, T₂ of the solvent is very sensitive to interaction between solute and solvent and becomes lower as the solute concentration increases. In this work, not only the solubility and solvation of cyclodextrins were studied, but also the solid phase in equilibrium with the concentrated solution. The solid phase was studied by X-Ray Diffraction and Thermogravimetric Analysis. The molecular structures of cyclodextrins influence their flexibility and solvation, which leads to the anomalous solubility of the three cyclic oligomers in H₂O and D₂O.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Capítulo 1. Introdução e Objetivos.....	1
1.1 As Ciclodextrinas.....	1
1.1.1 Histórico.....	1
1.1.2 Estrutura e Propriedades.....	2
1.2 As Ciclodextrinas na Química Supramolecular.....	4
1.2.1 A Química Supramolecular.....	4
1.2.2 Complexos de Inclusão com Ciclodextrinas.....	6
1.2.3 Ciclodextrinas Como Hospedeiros Poliméricos.....	8
1.3 A Relaxação do Solvente.....	10
1.4 Objetivos.....	11
Capítulo 2. A Solubilidade das Ciclodextrinas.....	12
2.1 Metodologia.....	12
2.1.1 Purificação das Ciclodextrinas.....	12
2.1.2 Medidas de Solubilidade a 25 °C.....	13
2.1.3 Sorção das Ciclodextrinas com H ₂ O e com D ₂ O.....	15
2.1.4 Ciclodextrinas Recristalizadas.....	16
2.1.5 Glicose Recristalizada.....	17
2.2 Resultados e Discussões.....	17
2.2.1 Estudos da Solução.....	17
2.2.2 Termodinâmica de Solubilização.....	20
2.2.3 O Efeito Hidrofóbico.....	25
2.2.4 As Estruturas Cristalinas.....	31

Capítulo 3. Ressonância Magnética Nuclear – A Relaxação do Solvente no Estudo da Solvatação.....	44
3.1 Fundamentos.....	44
3.1.1 A Relaxação de Spins Nucleares.....	44
3.1.2 Os Tempos de Relaxação.....	49
3.1.3 A Relaxação e a Dinâmica de Líquidos.....	52
3.1.4 Medidas de T_2 – A Seqüência de Pulsos CPMG.....	54
3.1.5 T_2 e Dinâmica Molecular do Solvente.....	59
3.2 Metodologia.....	62
3.2.1 Soluções de Ciclodextrina.....	62
3.2.2 Complexação com Poli (etilenoglicol).....	62
3.3 Resultados e Discussões.....	63
Capítulo 4. Conclusões.....	70
Apêndices.....	72
A. Curvas de Calibração Para Soluções de Glicose em H_2O e em D_2O	72
B. Estimativa da Solubilidade da Glicose em H_2O a 25 °C.....	74
C. Parâmetros Otimizados Utilizados nas Medidas de T_2 Para a Seqüência de Pulsos CPMG.....	75
D. Estimativa do Erro nas Medidas de R_2 a Partir Dos Valores Obtidos Para a Água Pura.....	76
Bibliografia.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

Símbolo	Conceito
\vec{B}_0	campo magnético externo
\vec{B}_1	campo magnético associado à radiação de radiofrequência
CD	ciclodextrina
DRX	Difratometria de Raios-X
FID	<i>Free Induction Decay</i>
\vec{I}	vetor momento angular de spin
k	<i>constante de Boltzmann</i>
$K_{\alpha,Cu}$	linha K_{α} do cobre utilizada em Difratometria de Raios-X
m_i	isocromata de spin
\vec{M}	magnetização total da amostra
M_x	componente x da magnetização M
M_y	componente y da magnetização M
M_z	componente z da magnetização M
PEG	poli (etilenoglicol)
PPG	poli (propilenoglicol)
r.f.	radiofrequência
R_2	taxa de relaxação transversal
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
t_p	tempo de aplicação do pulso de radiofrequência
T_1	tempo de relaxação longitudinal
T_2	tempo de relaxação transversal
TG	Análise Termogravimétrica
α -CD	alfa-ciclodextrina
β -CD	beta-ciclodextrina
ϕ	ângulo de nutação
γ	razão magnetogírica
γ -CD	gama-ciclodextrina

Símbolo**Conceito**

$\vec{\mu}$	momento magnético nuclear
ν	freqüência da radiação de radiofreqüência
ν_1	freqüência de precessão nuclear (freqüência de Larmor)
τ	intervalo de tempo entre a aplicação do pulso de 90° e 180°
τ_c	tempo de correlação
ω_0	velocidade angular do sistema de spins

LISTA DE TABELAS

1.	Valores de solubilidade, em $g_{\text{soluto}}/g_{\text{solvente}}$, para α -CD, β -CD e γ -CD em H_2O e D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$	18
2.	Parâmetros termodinâmicos de solubilidade de ciclodextrinas hidratadas em soluções aquosas saturadas a $25\text{ }^\circ\text{C}$	18
3.	Valores de solubilidade, em $g_{\text{soluto}}/g_{\text{solução}}$, para glicose em H_2O nas temperaturas de 25 a $30\text{ }^\circ\text{C}$	19
4.	Valores de solubilidade, em $g_{\text{soluto}}/g_{\text{solução}}$, para glicose em D_2O nas temperaturas de 25 a $30\text{ }^\circ\text{C}$	20
5.	Parâmetros termodinâmicos de solubilização de ciclodextrinas, a $25\text{ }^\circ\text{C}$ – dois estudos comparativos.....	21
6.	Valores calculados para o grau de hidratação dos cristais de ciclodextrina submetida à análise termogravimétrica.....	36

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura molecular da α -ciclodextrina e sua representação pictórica na forma de um cone oco.....	3
2. Representação molecular das CD na forma de um cone truncado, com as dimensões aproximadas em ângstrons.....	3
3. Reação de substituição nucleofílica aromática no fenil metil éter complexado com α -CD.....	7
4. Estrutura supramolecular de estequiometria 2:1 formada entre α -CD e poli (etilenoglicol).....	9
5. Sistema montado para os experimentos de sorção.....	15
6. Ciclo termodinâmico de solubilização das ciclodextrinas anidras.....	22
7. Gráfico de entalpia e entropia de solubilização das ciclodextrinas nativas, adaptado dos valores de Danil de Namor <i>et al.</i>	23
8. Mapas da distribuição da água estruturada ao redor das ciclodextrinas, segundo estudos de dinâmica molecular.....	25
9. Modelo do Iceberg para o efeito hidrofóbico.....	27
10. Secção da estrutura cristalina da β -CD.12D ₂ O deuterada, onde as ligações de hidrogênio são indicadas pelas linhas tracejadas e, as ligações de hidrogênio “flip-flop”, pelas setas curvas.....	33
11. Termogramas das α -CD anidra, sorvidas com H ₂ O e com D ₂ O.....	35
12. Termogramas das β -CD anidra, sorvidas com H ₂ O e com D ₂ O.....	35
13. Termogramas das γ -CD anidra, sorvidas com H ₂ O e com D ₂ O.....	36
14. Difrátogramas de α -CD (a) seca, (b) com H ₂ O adsorvida e (c) com D ₂ O adsorvida.....	38
15. Difrátogramas de β -CD (a) seca, (b) com H ₂ O adsorvida e (c) com D ₂ O adsorvida.....	38
16. Difrátogramas de γ -CD (a) seca, (b) com H ₂ O adsorvida e (c) com D ₂ O adsorvida.....	39

17. DRX de α -CD recristalizada (a) em H ₂ O (b) em H ₂ O e seca à vácuo (c) em D ₂ O (d) em D ₂ O e seca à vácuo.....	40
18. DRX de β -CD recristalizada (a) em H ₂ O (b) em H ₂ O e seca à vácuo (c) em D ₂ O (d) em D ₂ O e seca à vácuo.....	41
19. DRX de γ -CD recristalizada (a) em H ₂ O (b) em H ₂ O e seca à vácuo (c) em D ₂ O (d) em D ₂ O e seca à vácuo.....	41
20. DRX da glicose (a) recristalizada por evaporação do solvente (b) anidra (c) recristalizada a partir de solução supersaturada em H ₂ O (d) recristalizada a partir de solução supersaturada em D ₂ O.....	43
21. Diagrama de níveis energéticos para núcleos de $I = \frac{1}{2}$ na ausência e presença de \vec{B}_0 , onde ν_1 é a frequência de precessão nuclear (frequência de Larmor).....	46
22. Magnetização resultante da diferença de população entre os níveis de energia de spin nuclear num sistema de spins nucleares em equilíbrio.....	47
23. Agrupamento de momentos magnéticos nucleares, decorrente da atuação do campo oscilatório \vec{B}_1 , com desvio de \vec{M} da direção z.....	48
24. Sistemas de spins nucleares em equilíbrio e em coerência e a interconversão entre estas situações. A relaxação ocorre em tempos característicos dados por T_1 e T_2	49
25. Trajetória aleatória típica de um átomo na superfície de uma molécula esférica submetida a uma difusão rotacional num líquido.....	53
26. Seqüência de pulsos CPMG utilizada para medidas de T_2 : a) aplicação de um pulso de 90° na direção x, \vec{M} se desloca para o eixo y'; b) isocromatas de spin precessando com velocidades diferentes, devido à não-homogeneidade de B_0 ; c) aplicação de um pulso de 180° na direção y, após um tempo τ ; d) inversão das isocromatas no plano $x'y'$, mantendo suas velocidades; e) todos os $\vec{\mu}$ entram em fase, após um tempo 2τ , no sentido negativo da direção y' , o eco é detectado; f) aplicação de um pulso de 180° na direção y, após um tempo 3τ ; g) todos os $\vec{\mu}$ entram em fase, após um tempo 4τ , no sentido positivo da direção y' , e o eco é novamente detectado.....	57

27. Ilustração do decaimento da altura do pico em função do tempo, cujo ajuste da curva permite a medida de T_2	58
28. Influência de 1% de glicose no decaimento da magnetização M_y para a água.....	63
29. Comportamento linear comparativo da taxa de relaxação da água em função da concentração de açúcar para α -CD, β -CD, γ -CD, glicose e dextrina na faixa de concentração 0,08 a 1% a 25 °C.....	65
30. Comportamento linear comparativo da taxa de relaxação da água em função da concentração de açúcar para soluções de α -CD e γ -CD, na faixa de concentração 1 a 7% (m/m) a 25 °C.....	67
31. Dependência do T_2 da água em soluções dos complexos de PEG 200 g mol ⁻¹ com α -CD, β -CD e γ -CD (na concentração de 1% m/m) e em soluções do polímero puro.....	69
A.1. Curva de calibração para soluções de glicose em H ₂ O, obtida através de medidas de índice de refração.....	72
A.2. Curva de calibração para soluções de glicose em D ₂ O, obtida através de medidas de índice de refração.....	73
B.1. Regressão linear para estimativa da solubilidade da glicose de 25°C.....	74

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 AS CICLODEXTRINAS

1.1.1 HISTÓRICO

As moléculas atualmente conhecidas como ciclodextrinas (CD) foram isoladas, pela primeira vez, em 1891 por Villiers¹, a partir da descoberta da formação de um oligossacarídeo quando o amido sofre uma clivagem enzimática.

Em 1904, Schardinger confirmou os resultados de Villiers identificando as estruturas de três ciclodextrinas de ocorrência natural (α -, β - e γ -CD) e da enzima responsável pela síntese destes oligossacarídeos cíclicos. Devido a estas descobertas, as ciclodextrinas eram conhecidas como açúcares ou dextrinas de Schardinger.

Entre 1911 e 1935, Pringsheim, na Alemanha, foi o principal pesquisador nessa área, demonstrando que estes oligossacarídeos são capazes de formar complexos estáveis com outras moléculas em meio aquoso.

Porém, apenas em 1938 a estrutura química correta das ciclodextrinas foi publicada. Freudenberg observou que as unidades de glicose, nesses açúcares, são conectadas por ligações glicosídicas α -1,4.

Em 1953, Freudenberg, Cramer e Plieninger registraram a primeira patente sobre as ciclodextrinas e seus complexos de inclusão, tendo estudado as possíveis aplicações para estes complexos.²

Em meados dos anos 70, cada uma das ciclodextrinas naturais foi caracterizada química e estruturalmente e os estudos com seus complexos de inclusão foram intensificados.³⁻⁴

1.1.2 ESTRUTURA E PROPRIEDADES

As ciclodextrinas, CD, são uma família de oligossacarídeos cíclicos constituídos por unidades de α -D-glicose, opticamente ativas⁵, conectadas por ligações glicosídicas α -1,4. São produzidas a partir da amilose do amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), qual é produzida por vários microorganismos, como o *Bacillus macerans*. Dessa família de açúcares, as três ciclodextrinas que apresentam maior disponibilidade são: α -CD (ciclohexaamilose ou ciclomaltohexose), β -CD (cicloheptaamilose ou ciclomaltoheptose) e γ -CD (ciclooctaamilose ou ciclomaltooctose). Essas substâncias são conhecidas como ciclodextrinas nativas e constituídas por seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente.

A ciclização do amido, para produzir as ciclodextrinas, faz estas moléculas adquirirem a forma de um cone truncado oco. Sendo n o número de unidades glicosídicas das ciclodextrinas em suas estruturas, as n hidroxilas primárias se situam na borda menor do cone e, as $2n$ hidroxilas secundárias, ocupam a borda maior. A cavidade que se forma, nessas estruturas, contém uma seqüência de grupos CH dos carbonos C3 e C5 e uma seqüência dos oxigênios glicosídicos, ou seja, a cavidade é relativamente hidrofóbica, comparada com o exterior hidrofílico.⁶ Uma representação da estrutura da α -CD, e sua correspondente forma pictórica de um cone oco é mostrada na Figura 1.

As ciclodextrinas, por apresentarem uma cavidade apolar, em solução aquosa são capazes de interagir com diversas classes de moléculas, formando complexos estabilizados por ligações não covalentes, denominados compostos de inclusão. Estes complexos são caracterizados pela penetração parcial ou total de moléculas na cavidade das ciclodextrinas, e esta propriedade tem sido principalmente explorada no que diz respeito ao encapsulação de fármacos e na química supramolecular.^{6,8} A Figura 2 fornece as dimensões, em ângstrons, das ciclodextrinas, representadas na forma de um cone oco.

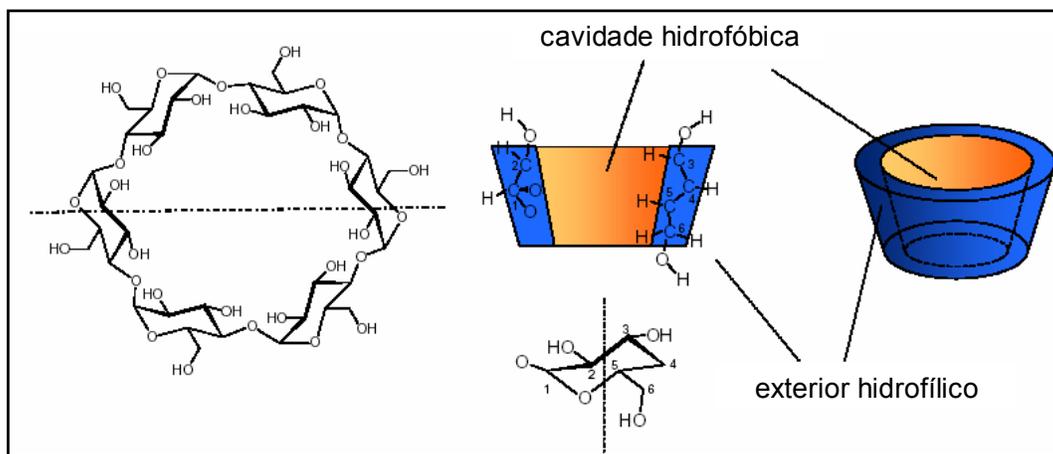


Figura 1. Estrutura molecular da α -ciclodextrina e sua representação pictórica na forma de um cone oco.⁷

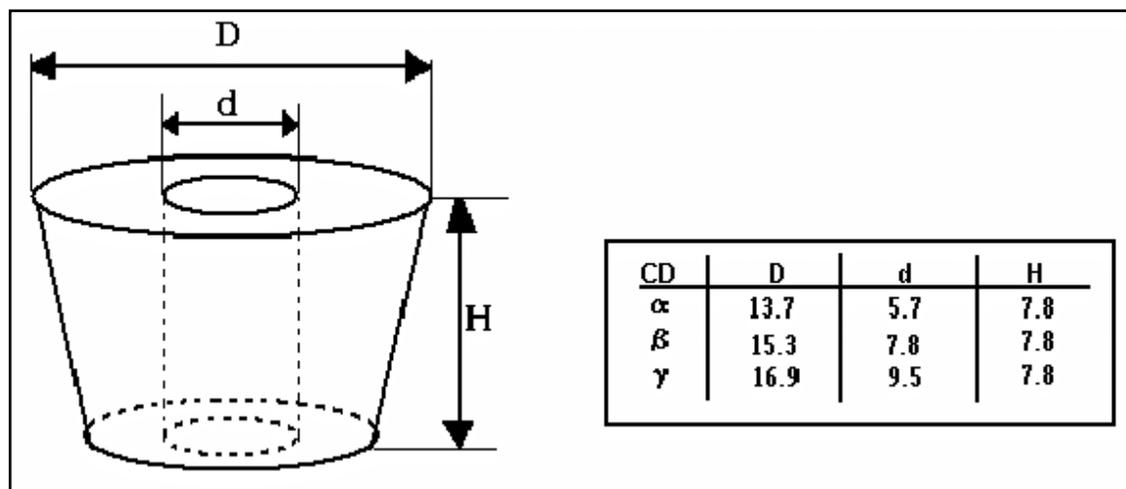


Figura 2. Representação molecular das CD na forma de um cone truncado, com as dimensões aproximadas em ângstroms.⁹

Contrastando com as diversas aplicações das ciclodextrinas, uma propriedade básica destas espécies, e de grande interesse na físico-química, ainda não está completamente elucidada: sua solubilidade em água. A solubilidade das ciclodextrinas nativas, em água, apresenta uma tendência irregular, crescente na ordem: β -CD, α -CD e γ -CD, sendo a β -CD uma ordem de grandeza menos solúvel que as demais. Esse comportamento anômalo é atribuído à diferente estruturação das moléculas de água na cavidade e no exterior das moléculas de β -CD, ou seja, na forma como estas moléculas são solvatadas e é principalmente regido pela entropia desfavorável de dissolução da β -CD, relacionado ao efeito hidrofóbico, e a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares nas CD.^{6,10-12}

O estudo, por tanto, da forma como o solvente se estrutura na superfície das ciclodextrinas para solvatá-las poderá ajudar a esclarecer o comportamento anômalo de suas solubilidades em água, considerando o equilíbrio entre a fase sólida e a solução.

1.2 AS CICLODEXTRINAS NA QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

1.2.1 A QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

A química supramolecular está relacionada com a organização molecular e envolve não apenas os conceitos da química molecular, estrutura e energia, mas também o conceito de informação. As substâncias supramoleculares são caracterizadas por se formarem espontaneamente. Os componentes da química supramolecular se “comunicam”, formam associações, possuem preferências e aversões, obedecem a instruções e passam as informações. Ou seja, a química supramolecular trata dos arranjos moleculares e das ligações intermoleculares. No centro destas estratégias está o conceito de reconhecimento molecular, isto é, uma molécula é capaz de reconhecer outra de acordo com a forma ou as propriedades que esta apresenta. A interação e associação entre essas moléculas é uma consequência desse reconhecimento.

Os sistemas supramoleculares diferem dos sistemas da química molecular em vários aspectos, como na estrutura e nos tipos de interações. São essas diferenças que permitem a transferência das informações. A organização estrutural tem um papel fundamental nos sistemas supramoleculares, onde grupos de duas ou mais moléculas distintas interagem especificamente para formar um agregado organizado. Esses sistemas podem ser menores que algumas das moléculas orgânicas mais primorosas sintetizadas atualmente, porém apresentam alto grau de organização estrutural.

Enquanto as moléculas consistem em uma rede contínua de átomos mantidos unidos por ligações covalentes, as supramoléculas compreendem a união de íons e/ou moléculas através de ligações fracas não-covalentes numa unidade discreta com estrutura e dinâmica bem definidas. As forças intermoleculares que levam à formação de estruturas supramoleculares podem ser ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações doador-receptor (por exemplo, ácido-base de Lewis) ou interações iônicas. Esses tipos de forças são importantes na formação de complexos de inclusão e no controle de estados de agregação. Existem vários campos de aplicação para a química supramolecular, como na construção de receptores, agentes de transportes, modelagem enzimática, liberação controlada de fármacos, sensores químicos e circuitos elétricos moleculares, dentre outros.

Os compostos supramoleculares apresentam três níveis distintos de organização estrutural: a estrutura primária (a nível molecular); a estrutura secundária que consiste da associação de moléculas (entidades supramoleculares que resultam das interações intermoleculares); a estrutura terciária (o empacotamento cristalino das entidades supramoleculares). Essa hierarquia de níveis estruturais, do molecular ao supramolecular, pode ser facilmente encontrada em sistemas complexos da natureza, como os vírus, as células e os tecidos.¹³⁻¹⁶

1.2.2 COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS

Nos estudos de reconhecimento molecular, os compostos macrocíclicos, como éteres de coroa, criptanos, ciclofanos e calixarenos foram extensivamente utilizados como hospedeiros moleculares, devido à presença de uma cavidade intramolecular. Entretanto, em muitos casos, os hóspedes moleculares ficavam limitados a moléculas pequenas e íons simples. Tornou-se necessário encontrar hospedeiros moleculares que pudessem reconhecer e responder sensivelmente a moléculas maiores e mais complexas.

Desde sua descoberta, as ciclodextrinas têm sido amplamente empregadas com essa finalidade. Além de se complexarem com vários compostos de baixa massa molar, como hidrocarbonetos e aminas, essas moléculas são capazes de formar complexos de inclusão, com alto grau de seletividade, com uma ampla faixa de moléculas hóspedes através de interações não covalentes em suas cavidades hidrofóbicas.¹⁷⁻¹⁹

Os complexos de ciclodextrina e moléculas pequenas, não poliméricas, são solúveis em água, quirais, apresentam baixa toxicidade e preços, relativamente, baixos, tornando-os de grande interesse para o desenvolvimento de análogos enzimáticos e importância industrial, principalmente na encapsulação, liberação controlada e direcionamento de fármacos.¹⁸⁻²³

É sabido que muitos fármacos apresentam problemas de biodisponibilidade devido à baixa solubilidade em água, baixa taxa de dissolução e instabilidade no trato gastrointestinal. As ciclodextrinas, através da encapsulação desses fármacos, exibiram alta performance em solucionar esses problemas. A dimensão da cavidade da β -ciclodextrina (β -CD) é apropriada para sua interação com fármacos de massa molar entre 200 e 800 g mol⁻¹. É mais comum utilizar a β -CD substituída, pois desta forma sua solubilidade em água é aumentada.²³⁻²⁵

As ciclodextrinas têm também um papel importante como catalisadores em reações químicas, como hidrólise, oxidação e substituição, onde se observa a ocorrência de estereosseletividade. A α -ciclodextrina (α -CD) acelera em 100 vezes a hidrólise do isômero *meta* de ésteres fenílicos dissustituídos, comparada

à hidrólise dos isômeros *orto* e *para*, por exemplo. Essa estereoespecificidade é atribuída aos diferentes modos de interação dos isômeros com a α -CD.⁵

Um exemplo muito interessante, ilustrado na Figura 3, é da reação do anel benzênico do fenil metil éter. A substituição nucleofílica por cloro ocorre, exclusivamente, na posição *para* quando esta molécula é complexada com α -CD, pois a única parte do anel aromático que fica exposta para esta reação é o hidrogênio *para* do anel (oposto ao grupo metil éter).¹³

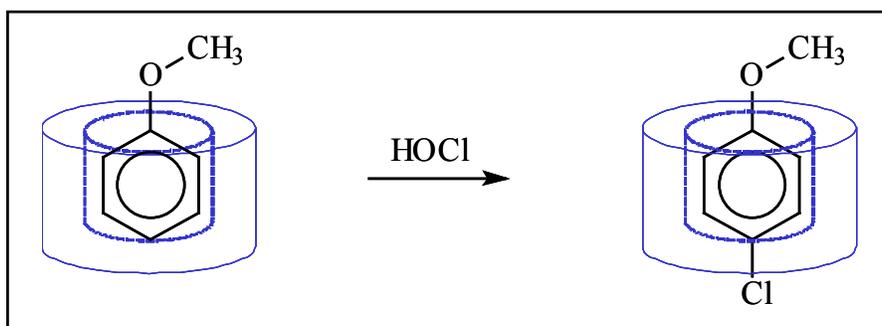


Figura 3. Reação de substituição nucleofílica aromática no fenil metil éter complexado com α -CD.¹³

Ciclodextrinas e ciclodextrinas substituídas são comercializadas como fases estacionárias quirais para eletrocromatografia capilar, permitindo a análise enantiosseletiva de fármacos. Essa é uma técnica híbrida entre eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência. Dos vários seletores quirais empregados, as ciclodextrinas e seus derivados são os mais importantes e utilizados em cerca de 80% das separações enantioméricas através dessa técnica. Para que ocorra o reconhecimento quiral, ao menos uma parte do enantiômero deve entrar na cavidade da ciclodextrina e o complexo de inclusão deve ser estável.²⁶

1.2.3 CICLODEXTRINAS COMO HOSPEDEIROS POLIMÉRICOS

Desde a descoberta das ciclodextrinas nativas, foi preparado e caracterizado um número muito grande de complexos de inclusão com CD e compostos orgânicos e inorgânicos de baixa massa molar. Em 1990, Harada e Kamachi²⁷ publicaram, pela primeira vez, estudos sobre a formação de complexos de inclusão em meios aquosos, com α -CD e poli (etinoglicol) (PEG) de massas molares entre 400 e 10000 g mol⁻¹, quais produziram complexos estequiométricos, com alto rendimento, no estado sólido. Atualmente um grande número de complexos envolvendo ciclodextrinas e polímeros são conhecidos.

Os complexos de inclusão entre ciclodextrinas e macromoléculas lineares, como os polímeros, designados polipseudorotaxana, vêm sendo muito estudados por serem precursores para a síntese de tubos de ciclodextrinas não-covalentes e por formarem, em alguns casos, hidrogéis supramoleculares.^{8,13,21,28} Nesse tipo de estrutura, a cadeia polimérica penetra na cavidade de várias moléculas de ciclodextrina e o complexo se mantém estabilizado devido à formação de vários tipos de ligações não-covalentes: van der Waals entre o polímero e as CD; e ligações de H entre os grupos hidroxilas das moléculas de ciclodextrina vizinhas, mediadas por moléculas de água. São, na verdade, os mesmos tipos de ligações que envolvem toda a química supramolecular.²⁹⁻³⁰

A Figura 4 exemplifica a estrutura de uma polipseudorotaxana formada entre α -CD e poli(etilenoglicol), onde observa-se a estequiometria 2:1 (dois monômeros da molécula hóspede para cada molécula hospedeira de α -CD).¹⁷

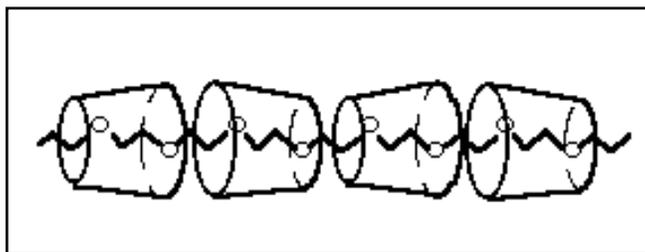


Figura 4. Estrutura supramolecular de estequiometria 2:1 formada entre α -CD e poli (etilenoglicol)¹⁷

O diâmetro da cavidade das ciclodextrinas desempenha um papel fundamental na produção das polipseudorotaxanas. Enquanto o poli (etiloglicol) se complexa com a α -CD, o processo não ocorre com a β -CD devido à cavidade deste oligossacarídeo ser muito grande para manter o polímero nela, pois as interações fracas não-covalentes não são capazes de manter a cadeia inserida na cavidade maior da β -CD.

Entretanto, o PEG é capaz de se complexar com a γ -CD, produzindo um sólido cristalino com alto rendimento, como no caso da α -CD, onde a razão estequiométrica é de quatro unidades monoméricas para cada molécula de γ -CD. Esse resultado indica que duas cadeias poliméricas conseguem penetrar na cavidade dessa ciclodextrina.^{27,31}

As polipseudorotaxanas formadas com β -CD envolvem polímeros mais volumosos, como o poli (propilenoglicol) (PPG), que possui grupos metila ligados à cadeia principal. A presença desses grupos torna as interações não-covalentes efetivas para a ocorrência da complexação, que também possui estequiometria 2:1. Porém, o PPG não se complexa com a α -CD, devido à área seccional do polímero ser maior que a cavidade desta ciclodextrina.^{8,32} Da mesma forma, o poli (isobutileno), que possui dois grupos metila ligados ao carbono quaternário da cadeia principal, complexa com a γ -CD com rendimento de 90% e com a β -CD em apenas 8%, enquanto não ocorre a complexação deste polímero com a α -CD.^{8,17}

1.3 A RELAXAÇÃO DO SOLVENTE

Apesar do enorme interesse pelas ciclodextrinas, como substâncias encapsuladoras e como componentes importantes na química supramolecular, propriedades elementares, tal como a solubilidade em água, são ainda de grande interesse dentro da físico-química. Dentre as forças motrizes que levam a formação de compostos de inclusão, as interações das ciclodextrinas com moléculas de água desempenham um papel fundamental, embora ainda tenha sido pouco investigada. Diante disso, é de fundamental interesse científico o estudo da solubilidade das ciclodextrinas, bem como suas características de solvatação.

A solvatação de um soluto pode ser estudada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) através de medidas do tempo de relaxação transversal (T_2) do solvente, também chamado de tempo de relaxação spin-spin. Os valores de T_2 são diferentes para moléculas de solvente livres e ligadas à superfície do soluto, devido a processos dinâmicos, principalmente a difusão rotacional.

O T_2 é proporcional ao inverso do tempo de correlação (τ_c), que é o tempo característico da função de autocorrelação que caracteriza as flutuações dos campos magnéticos locais, devido a processos dinâmicos.

Moléculas livres do solvente apresentam valores pequenos de τ_c , devido ao alto grau de mobilidade. Porém, quando o solvente está ligado a uma superfície, o movimento molecular se torna mais anisotrópico e mais restrito, aumentando τ_c e diminuindo T_2 .

Em sistemas onde ocorra troca rápida entre as moléculas de solvente, livres e ligadas ao soluto, o tempo de relaxação pode ser descrito pelo T_2 médio do solvente. Assim, o T_2 é muito sensível à interação do solvente com o soluto, de forma que a presença de um soluto diminui o T_2 das moléculas do solvente diretamente ligadas ao soluto.³³⁻³⁴

1.4 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho envolveu o desenvolvimento de um estudo sistemático sobre a solubilidade de ciclodextrinas em água. Neste sentido, pretendeu-se investigar a anomalia na solubilidade das ciclodextrinas nativas em água leve e deuterada, sendo, o último, um solvente capaz de formar pontes de hidrogênio mais intensas entre suas moléculas, produzindo um maior efeito hidrofóbico.

Para o desenvolvimento desse estudo, foi também necessário considerar o equilíbrio entre a fase sólida e a solução saturada. Procurou-se estudar a estrutura cristalina das fases formadas em H₂O e D₂O usando Difração de Raios-X (DRX). A determinação do número de moléculas de água de hidratação foi obtida por Análise Termogravimétrica (TG). Estudos sobre a fase líquida são de fundamental importância para compreender a solubilidade das ciclodextrinas. Neste caso, procurou-se utilizar a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), através de medidas de Tempo de Relaxação Transversal (T₂) das moléculas de água em soluções de α-CD, β-CD e γ-CD. Investigou-se o efeito que a cavidade desses oligossacarídeos podem causar na estruturação da água, e comparou-se os resultados de T₂ da água obtidos com soluções de glicose e de dextrina, um polímero linear de glicose.

CAPÍTULO 2. A SOLUBILIDADE DAS CICLODEXTRINAS

Conforme apresentado no Capítulo anterior, existe enorme interesse pelas ciclodextrinas como substâncias encapsuladoras e como componentes importantes na química supramolecular. Dentre as forças motrizes que levam a formação de compostos de inclusão, as interações das ciclodextrinas com moléculas de água desempenham um papel fundamental, embora ainda tenha sido pouco investigada. Em alguns casos, como a formação do complexo entre poli (etilenoglicol) e α -CD, existe certa polêmica se de fato a cadeia polimérica é encapsulada em solução, ou se quantitativamente o processo somente ocorre durante a separação de fase (precipitação do complexo).³⁵ Diante disso, é de fundamental interesse científico o estudo da solubilidade das ciclodextrinas, bem como suas características em solução aquosa. As ligações de hidrogênio entre as moléculas de D₂O são mais intensas que em H₂O. Assim, estudos sobre a solubilidade das ciclodextrinas nos dois solventes podem permitir a correlação das estruturas dos oligossacarídeos com a intensidade do efeito hidrofóbico. Neste caso, considerando o equilíbrio entre a fase sólida e solução saturada, torna-se necessário conhecer a estrutura cristalina dos hidratos das ciclodextrinas formados em H₂O e em D₂O para entender seus comportamentos em solução. Estudos sobre as duas fases em equilíbrio serão tratados neste Capítulo.

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 PURIFICAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS

Foram preparadas soluções supersaturadas [25% (m/m)] de α -CD (Wacker Cavamax® W6 lote 60T005) e γ -CD (Wacker Cavamax® W8 lote 80P200) em H₂O deionizada, as quais foram levadas, em frascos vedados, à estufa a 70 °C. Após 24 horas na estufa, as soluções foram centrifugadas, a quente, por 10 minutos a

3000 rpm. Aos sobrenadantes foram adicionadas quantidades calculadas de etanol p.a. (Merck lote K29673283 136) para formar soluções 34% (m/m) do álcool. Estas soluções permaneceram em repouso por 24 horas e os sólidos formados foram filtrados a vácuo e levados à estufa, a 70 °C, até completa secagem. O processo foi realizado em triplicata e a última secagem levou 5 dias. Para os estudos em D₂O, à metade de cada amostra seca, após as três recristalizações, foram adicionadas quantidades mínimas necessárias de água deuterada, D₂O, (Goss Scientific Instruments Ltd lote CatDM-4) para o enriquecimento destas amostras com este solvente, isto é, até que todo o sólido ficasse ligeiramente recoberto pelo solvente. As soluções foram levadas à estufa a 70 °C até a completa secagem dos sólidos. Este procedimento foi realizado pelo fato de que é experimentalmente difícil obter as ciclodextrinas completamente secas.

A β-CD (Wacker Cavamax® W7 Pharma lote 70P229) foi recristalizada uma única vez preparando-se soluções 7% (m/m) do açúcar em H₂O deionizada e em D₂O. Estas soluções foram levadas, em frascos vedados, à estufa a 70 °C, por 24 horas e centrifugadas, a quente, por 10 minutos a 10000 rpm. Os sobrenadantes foram mantidos em geladeira para a recristalização. As fases líquidas foram removidas e os sólidos lavados com um mínimo dos respectivos solventes e levados à estufa a 70 °C até a secagem completa.

Em todos os experimentos foram utilizadas as ciclodextrinas purificadas.

2.1.2 MEDIDAS DE SOLUBILIDADE A 25 °C

Foram preparadas, em tubos de ensaio com tampas, soluções supersaturadas das ciclodextrinas e de glicose (β-D-glicose, Calbiochem lote B36911, usada como recebida) em H₂O deionizada e em D₂O [15% (m/m) para a α-CD, 4% (m/m) para a β-CD, 28% (m/m) para a γ-CD e 60% (m/m) para a glicose]. Os tubos foram devidamente vedados e as soluções mantidas, sob agitação lenta por 10 dias, em banho a 25,00 ± 0,01 °C, para atingir o equilíbrio de solubilização.

Num ambiente termostatzado a 25 °C, os sobrenadantes das soluções de ciclodextrinas foram filtrados em filtros descartáveis com poros de 0,45 µm de diâmetro (Milli-Q membrane filters). As soluções filtradas foram colocadas em ependorfs tarados e as massas das mesmas anotadas. Os ependorfs foram levados à estufa, a 60 °C por um dia, e a 70 °C por mais quatro dias, para a evaporação do solvente. Pesaram-se os ependorfs, até as massas permanecerem constantes, e as massas de sólidos foram anotadas.

A solubilidade da glicose foi determinada a partir de uma curva de calibração baseada no índice de refração em função da concentração, a temperatura de 25,0 ± 0,2 °C, num refratômetro Carl-Zeiss Jena. Para tanto, foram feitas curvas de calibração, índice de refração *versus* concentração, para soluções na faixa de 1 a 10% (m/m) de glicose em H₂O e em D₂O. Medidas do índice de refração dos solventes puros também foram realizadas. Tais medidas e as curvas de calibração encontram-se no Apêndice A.

Duas alíquotas da solução de glicose em água, em equilíbrio, foram retiradas e diluídas a, aproximadamente, 10% da concentração original, para que a concentração final estivesse dentro da faixa de concentração da curva de calibração. Os índices de refração destas alíquotas diluídas foram medidos e as concentrações das soluções originais (solubilidade) foram calculadas. Para a solução de glicose em D₂O não foi possível determinar a solubilidade, pois, durante o período em que as amostras foram mantidas no banho, ocorreu recristalização da amostra com a formação de uma estrutura semelhante a um gel. Em um segundo experimento, utilizando uma concentração inicial de 65 % (m/m) de glicose em H₂O e em D₂O, ocorreu a recristalização nas duas soluções. Estas estruturas foram, posteriormente, analisadas por difratometria de raios-X.

Tornou-se necessário, portanto, utilizar outra metodologia para determinar a solubilidade da glicose, em H₂O e em D₂O. O procedimento utilizado foi o seguinte.

Foram preparadas soluções de glicose 40% (m/m) nos dois solventes. Os frascos vedados foram mantidos em banho termostatzado a 35,00 ± 0,01 °C e adições diárias de glicose, cerca de 0,2 g, foram feitas até observar que não

houve solubilização completa da quantidade adicionada. A temperatura do banho foi diminuída para $30,00 \pm 0,01$ °C e as amostras mantidas nesta temperatura por dois dias, garantindo a supersaturação das soluções. Alíquotas das duas soluções foram retiradas e diluídas a, aproximadamente, 10% da concentração original para as medidas do índice de refração. As medidas foram realizadas em duplicata. A partir deste ponto, a temperatura do banho foi diminuída de 1 °C, as amostras foram mantidas nesta temperatura por sete dias e as medidas foram novamente realizadas. Esse procedimento foi repetido até atingir a temperatura de 25 °C.

2.1.3 SORÇÃO DAS CICLODEXTRINAS COM H₂O E COM D₂O

Com cada uma das três ciclodextrinas, secas em estufa a 70 °C, foram montados sistemas como o da Figura 5 para água e para água deuterada.

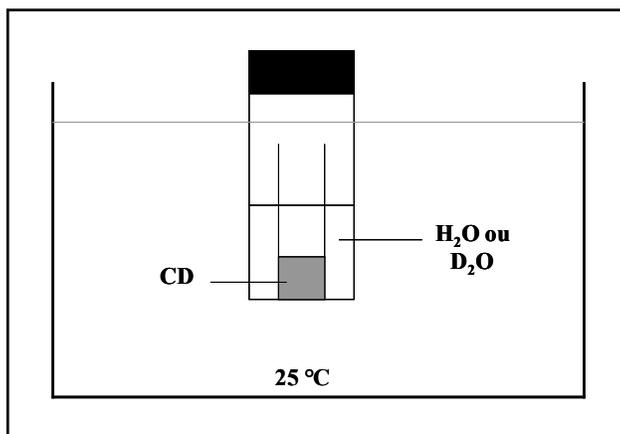


Figura 5. Sistema montado para os experimentos de sorção.

Os açúcares foram colocados em frascos abertos, quais foram inseridos em frascos maiores contendo água ou água deuterada. Os sistemas foram vedados e mantidos em banho termostatizado a $25,00 \pm 0,01$ °C por 20 dias, para sorção de moléculas do vapor do líquido nas ciclodextrinas. Após este período, realizou-se a análise termogravimétrica no Termogravímetro TA Instruments modelo 2950 com os açúcares que sofreram sorção e com amostras de cada ciclodextrina, secas em estufa a 70 °C por cinco dias. As condições experimentais utilizadas foram: taxa de aquecimento de 10 °C/min, faixa de temperatura 25 a 600 °C e atmosfera oxidante. Com essas nove amostras, foram feitas, também, análises por difratometria de raios-X no Difratômetro de Raios-X Shimadzu XRD7000 ($K_{\alpha, \text{Cu}} = 1,5406$ Å, 40,0 kV, 30,0 mA).

2.1.4 CICLODEXTRINAS RECRISTALIZADAS

Com amostras das ciclodextrinas nativas, foram preparadas soluções supersaturadas em H₂O e D₂O, como para purificação (item 2.1.1). Essas soluções foram mantidas em estufa a 70 °C por um dia e centrifugadas. Os sobrenadantes foram colocados em ependorfs (em duplicatas), quais foram mantidos em banho termostatizado a $25,00 \pm 0,01$ °C, para que os açúcares recristalizassem. Após a recristalização, os sobrenadantes foram removidos para a secagem dos cristais. Uma das duplicatas de cada ciclodextrina foi seca naturalmente à temperatura ambiente (25 a 27 °C) por 12 dias, a outra duplicata foi seca à vácuo por 24 h, a 25 °C, para evitar que os cristais sofressem alguma modificação estrutural devido a possíveis efeitos térmicos decorrentes da secagem. Com essas amostras foram realizadas análises por difratometria de raios-X no Difratômetro de Raios-X Shimadzu XRD7000 ($K_{\alpha, \text{Cu}} = 1,5406$ Å, 40,0 kV, 30,0 mA).

2.1.5 GLICOSE RECRISTALIZADA

Foram obtidos os difratogramas de Raios-X das amostras de glicose que sofreram recristalização, durante a etapa de determinação da solubilidade em H₂O e em D₂O. Os difratogramas foram comparados com os das amostras de glicose: i) não recristalizada e anidra e ii) recristalizada em um sistema aberto, a temperatura ambiente (25 a 27 °C), a partir da evaporação da água de uma solução saturada, sem promover a secagem desta amostra. Para as medidas, utilizou-se o Difratorômetro de Raios-X Shimadzu XRD7000 ($K_{\alpha\text{Cu}} = 1,5406 \text{ \AA}$, 40,0 kV, 30,0 mA).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.2.1 ESTUDOS DA SOLUÇÃO

Os valores encontrados para a solubilidade das ciclodextrinas nativas, em gramas de soluto por grama de solução, para a água e água deuterada, encontram-se na Tabela 1, onde a diferença relativa entre a solubilidade em H₂O e em D₂O também está expressa, bem como a solubilidade da glicose em H₂O para o primeiro experimento realizado. A medida de solubilidade da glicose em D₂O, nesse primeiro experimento, não pôde ser realizada, devido à recristalização da amostra com a formação de uma estrutura semelhante a um gel na solução saturada. Os estudos com a glicose foram realizados para que se pudesse verificar, comparativamente com aqueles realizados com as ciclodextrinas, o efeito da cavidade do macrociclo na solubilidade em ambos os solventes.

Tabela 1. Valores de solubilidade, em $g_{\text{soluto}}/g_{\text{solvente}}$, para α -CD, β -CD e γ -CD em H_2O e D_2O a 25 °C.

Soluto	H ₂ O	D ₂ O	Diferença relativa (%)
α -CD	0,1147 ± 0,0007	0,0705 ± 0,0005	41
β -CD	0,0181 ± 0,0002	0,0107 ± 0,0001	41
γ -CD	0,1995 ± 0,0002	0,1658 ± 0,0006	20
glicose	0,4908 ± 0,0160	---	---

A solubilidade da β -CD, em água, é uma ordem de grandeza menor que para as demais ciclodextrinas da série homóloga, de acordo com os resultados encontrados para a solubilidade das ciclodextrinas em H_2O são coerentes com os valores encontrados na literatura.⁶ O comportamento anômalo da solubilidade das ciclodextrinas em água tem sido objeto de intensa pesquisa. Connors *et al.*³⁶ mediram precisamente a solubilidade desses oligossacarídeos em água e determinaram os parâmetros termodinâmicos relativos a solubilização das ciclodextrinas nas formas hidratadas, usando o método de vant' Hoff (Tabela 2). A partir dos parâmetros termodinâmicos, concluíram que na série das ciclodextrinas, a entalpia de solução não varia significativamente, entretanto, a entropia de solução é menor (menos favorável) para a solubilização de β -CD, relativo às outras duas ciclodextrinas. Portanto, a solubilização da β -CD seria dificultada entropicamente. Essa questão será retomada detalhadamente na seção 2.2.2.

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos de solubilidade de ciclodextrinas hidratadas em soluções aquosas saturadas a 25 °C.^{6,36}

Ciclodextrina	Unidades Glicosídicas	Solubilidade (g / g _{solução})	$\Delta_{\text{sol}}H$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{sol}}S$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹) *
α -CD	6	0,1136	32,06	57,68
β -CD	7	0,0185	34,74	48,91
γ -CD	8	0,2038	32,31	61,45

* baseados na fração molar do soluto

Um aspecto interessante, que está apresentado na Tabela 1, é a diferença relativa nas solubilidades das ciclodextrinas em água e em água deuterada. A solubilidade das ciclodextrinas em D₂O é muito menor que em H₂O e o comportamento anômalo da série é também observado para aquele solvente. Porém a diferença relativa entre a solubilidade da γ -CD nos dois solventes é de 20%, enquanto para a α -CD e β -CD é de 41%, de acordo com os dados experimentais. Do nosso conhecimento, esta é a primeira vez que este resultado foi observado.

A princípio, pode-se explicar este resultado considerando o fato de que a ligação de hidrogênio é mais intensa entre as moléculas de D₂O,¹¹ intensificado o efeito hidrofóbico, levando à menor solubilidade das ciclodextrinas em D₂O.

Para a glicose, os valores de solubilidade em H₂O e D₂O, obtidos quando foi utilizada a segunda metodologia (que envolveu o acréscimo progressivo de glicose em temperaturas maiores que 25 °C) estão, respectivamente, apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Valores de solubilidade, em g_{soluto}/g_{solução}, para glicose em H₂O nas temperaturas de 25 a 30 °C.

Temperatura (°C)	Amostra 1	Amostra 2	Valor Médio
25,00 ± 0,01	0,49	0,54	0,52
26,00 ± 0,01	0,51	0,55	0,53
27,00 ± 0,01	0,55	0,51	0,53
28,00 ± 0,01	0,50	0,56	0,53
29,00 ± 0,01	0,56	0,57	0,57
30,00 ± 0,01	0,56	0,58	0,57

Tabela 4. Valores de solubilidade, em $g_{\text{sóluto}}/g_{\text{solução}}$, para glicose em D_2O nas temperaturas de 25 a 30 °C.

Temperatura (°C)	Amostra 1	Amostra 2	Valor Médio
25,00 ± 0,01	0,51	0,48	0,49
26,00 ± 0,01	0,48	0,48	0,48
27,00 ± 0,01	0,53	0,51	0,52
28,00 ± 0,01	0,51	0,52	0,52
29,00 ± 0,01	0,55	0,52	0,53
30,00 ± 0,01	0,57	0,56	0,56

O que se observa, nos dados das Tabelas 3 e 4, é que a solubilidade aumenta com a temperatura e que existe uma grande flutuação entre os valores das duplicatas. Isto pode ter ocorrido devido à presença de pequenos cristais nas alíquotas analisadas, uma vez que as soluções eram supersaturadas. Acredita-se que uma maior exatidão possa ser alcançada com a centrifugação das alíquotas. Neste caso, deve ser utilizada uma centrífuga com controle de temperatura. De qualquer forma, considerando os resultados encontrados para a solubilidade de glicose nos dois solventes (diferença em torno de 5%), não há dúvidas sobre a correlação entre a existência de uma cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas e a menor solubilidade em D_2O .

2.2.2 TERMODINÂMICA DE SOLUBILIZAÇÃO

Connors *et al.*³⁶ determinaram as entalpias de solubilização para as ciclodextrinas nativas pelo método de van't Hoff, as quais não apresentaram diferenças significativas. Porém a entropia de solubilização calculada da β -CD foi menor que das demais, como mostram os dados das Tabelas 2 e 5. Esse

resultado mostra que a entropia desfavorável é a força motriz da menor solubilidade da β -CD e se relaciona com a menor flexibilidade destas moléculas em solução, quando comparadas com a α -CD e γ -CD.

Entretanto, Danil de Namor *et al.*³⁷, em estudos calorimétricos mais recentes, encontraram outros valores para os parâmetros de solubilização das ciclodextrinas, como se observa na Tabela 5. Desses parâmetros, as entropias negativas de solubilização se destacam, onde o menor valor foi encontrado para a γ -CD, e não para a β -CD, como nos valores de Connors *et al.*³⁶ Nenhuma descontinuidade anômala foi mostrada.

Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos de solubilização de ciclodextrinas, a 25 °C – dois estudos comparativos.^{1,36-37}

Connors^{1,36}	α-CD	β-CD	γ-CD
$\Delta_{\text{sol}}H$ (kJ mol ⁻¹)	32,36	34,74	32,31
$\Delta_{\text{sol}}S$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	57,68	48,91	61,45
$\Delta_{\text{sol}}G$ (kJ mol ⁻¹)	14,96	20,11	13,96
Danil de Namor³⁷	α-CD	β-CD	γ-CD
$\Delta_{\text{sol}}H$ (kJ mol ⁻¹)	-62,69	-75,52	-96,31
$\Delta_{\text{sol}}S$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	-224,7	-287,5	-337,3
$\Delta_{\text{sol}}G$ (kJ mol ⁻¹)	4,72	10,21	4,26

Os valores discrepantes para entalpia, entropia e energia livre de solubilização decorrem do fato de que cada estudo partiu de um estado padrão diferente das ciclodextrinas. Isto é, Connors *et al.* utilizaram ciclodextrinas recristalizadas a partir de soluções supersaturadas, não mencionando qualquer secagem para obtenção dos açúcares anidros, ou seja, o estado padrão estabelecido por eles foi a forma hidratada de cada oligossacarídeo. Entretanto, Danil de Namor *et al.* secaram as ciclodextrinas à vácuo, entre 60 e 70 °C, por vários dias antes de realizarem os estudos, para a obtenção das ciclodextrinas anidras.

O processo de solubilização das ciclodextrinas anidras envolve a formação dos respectivos hidratos e a solubilização destes hidratos, como ilustra o ciclo termodinâmico da Figura 6.³⁸ Connors *et al.*, portanto, estudaram apenas uma etapa desse processo, a solubilização dos hidratos.

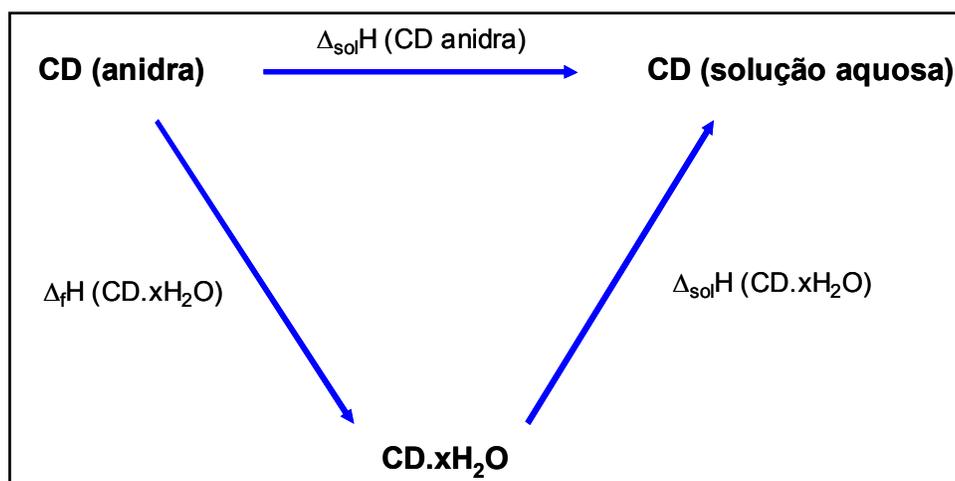


Figura 6. Ciclo termodinâmico de solubilização das ciclodextrinas anidras.

Essa afirmação pode ser justificada pelos estudos calorimétricos de Bastos *et al.*³⁸, onde foram medidas as entalpias de solubilização da α -CD anidra e hidratada. A solubilização da forma hidratada mostrou-se endotérmica ($+31 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$), de acordo com o valor obtido por Connors *et al.*³⁶ Porém, a solubilização da forma anidra apresentou-se exotérmica, com valor próximo ao encontrado por Danil de Namor *et al.* ($-60 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$).³⁷

Em ambos os estudos demonstrados na Tabela 5, a energia livre de Gibbs foi calculada a partir da solubilidade dos açúcares. Obviamente, os valores de solubilidade são concordantes, no entanto, cada autor expressa os valores em unidades diferentes, implicando em diferentes valores de $\Delta_{\text{sol}}G$. Connors *et al.* expressam a solubilidade em fração molar e, de Namor *et al.*, em mol dm^{-3} . Uma vez que

$$\Delta_{\text{sol}}G = -R T \ln(\text{solubilidade}) \quad [\text{Equação 1}]$$

os valores de $\Delta_{\text{sol}}G$ serão diferentes. As entropias de solubilização foram, então, obtidas a partir da relação termodinâmica:

$$\Delta_{\text{sol}}G = \Delta_{\text{sol}}H - T \Delta_{\text{sol}}S \quad [\text{Equação 2}]$$

Além das considerações anteriores, deve-se reforçar que os valores obtidos por Danil de Namor *et al.* são sem dúvida mais confiáveis, considerando que as medidas calorimétricas são muito mais precisas que as determinadas pelo método de vant'Hoff, por Connors *et al.*

Enquanto as entalpias de solubilização das ciclodextrinas hidratadas não possuem diferenças significativas em seus valores,³⁶ as entalpias de solubilização das ciclodextrinas anidras diminuem com o aumento do número de unidades glicosídicas,³⁷ como mostra o gráfico da Figura 7. O mesmo comportamento é observado para as entropias de solubilização, confrontando com os valores do primeiro estudo.

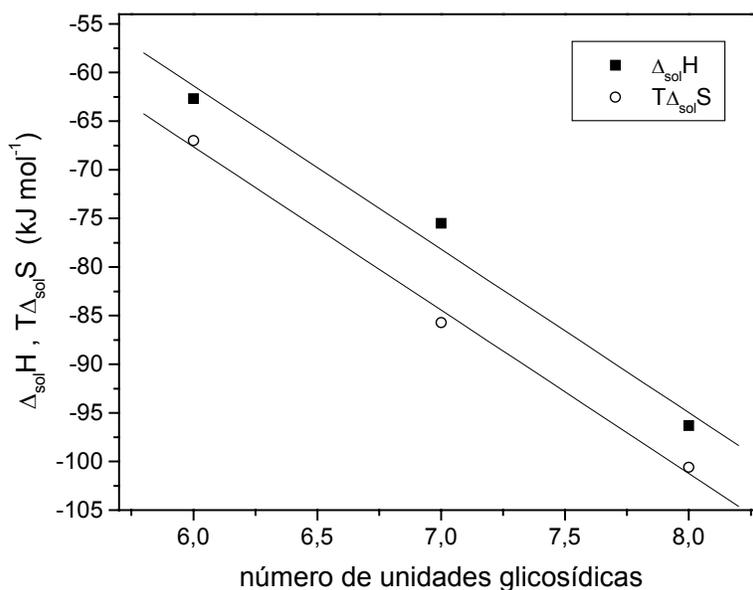


Figura 7. Gráfico de entalpia e entropia de solubilização das ciclodextrinas nativas, adaptado dos valores de Danil de Namor *et al.*³⁷

O gráfico da Figura 7, mostra que as entalpias e entropias de solubilização seguem uma linearidade e que a β -CD é a espécie que apresenta o maior desvio em relação a esse comportamento, possuindo desvios para maior entalpia (menos negativa) e menor entropia (mais negativa), o que talvez possa estar relacionado com sua menor solubilidade. Genericamente, os resultados obtidos por Danil de Namor *et al.*, indicam que, apesar da solubilização das ciclodextrinas em água ser entalpicamente favorável, ocorre intensa compensação entrópica, que acaba levando à baixa solubilidade dos oligossacarídeos.

O decréscimo na solubilidade da β -CD hidratada em água, relativo às demais ciclodextrinas, aparenta ser devido à estruturação da água provocada pela interação do oligossacarídeo com o solvente, que corresponderia a menor entropia de solução.¹²

Estudos de dinâmica molecular^{10,12} mostraram que a ciclodextrina menos solúvel (β -CD) induz mais fortemente a estruturação das moléculas de água ao seu redor, enquanto a γ -CD induz menos e é, portanto, mais solúvel, como mostrado na Figura 8. Os contornos em azul representam um mapa da distribuição das moléculas de água estruturadas ao redor das ciclodextrinas. O mapa foi construído de forma a indicar as moléculas de água que tenham probabilidade maior que 50% de se estruturarem diferentemente das moléculas de água do meio da solução, interagindo apenas entre si.

Observa-se que as moléculas de água estão mais estruturadas ao redor e no interior da cavidade da β -CD do que nas outras ciclodextrinas. Desta forma, estabelece-se uma estreita relação entre a solubilidade e o grau de interferência das moléculas de ciclodextrina na estrutura da água líquida. A flexibilidade dessas moléculas está associada ao movimento interno de cada unidade glicosídica e às distorções na estrutura do macrociclo, refletindo em sua acomodação no meio líquido. Ou seja, a estruturação da água afeta diretamente o movimento interno e a acomodação das moléculas de ciclodextrina no líquido.¹⁰

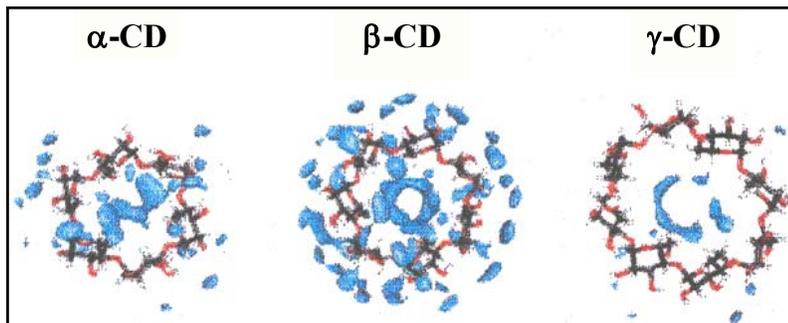


Figura 8. Mapas da distribuição da água estruturada ao redor das ciclodextrinas, segundo estudos de dinâmica molecular.¹⁰

A água deuterada, por apresentar um efeito hidrofóbico mais pronunciado que a água leve,¹¹ dificulta essa acomodação dos macrociclos, o que reflete na menor solubilidade dos oligossacarídeos em D₂O. Faz-se necessário, portanto, discorrer sobre o efeito hidrofóbico.

2.2.3 O EFEITO HIDROFÓBICO

As chamadas interações hidrofóbicas estão relacionadas com a tendência de moléculas relativamente apolares se manterem unidas em uma solução aquosa. Essas interações são de grande importância em diversas áreas da química e da biologia, como as interações enzima-substrato, a organização de lipídeos em biomembranas, o reconhecimento molecular e a agregação de moléculas de surfactantes.

A hidratação de moléculas apolares e as interações não-covalentes entre estas moléculas, em água, ainda não são processos bem entendidos. Porém, a força motriz para a ocorrência dessas interações está intimamente relacionada com as propriedades da água líquida e também com a hidratação do soluto apolar.

As moléculas apolares são pouco solúveis em água, a temperatura e pressão moderadas, o que é atribuído a hidrofobicidade das mesmas, embora o termo hidrofobicidade seja um tanto enganoso, nesta situação, pois as forças de dispersão de London, entre a água e as moléculas apolares, são favoráveis às interações destas com o líquido. Em muitos casos, a entalpia de mistura entre água e substâncias apolares é negativa.

Portanto, para tratar do efeito hidrofóbico, é mais apropriado considerar que o soluto apolar deve ser introduzido em um líquido caracterizado por uma extensa rede de ligações de hidrogênio com energia coesiva muito intensa. As moléculas de água tendem a não “sacrificarem” suas ligações de hidrogênio, levando a uma situação de reorientação das moléculas do solvente na superfície do soluto apolar. Devido a seu pequeno volume molecular e a sua capacidade de formar uma rede molecular com coordenação tetraédrica e compressibilidade isotérmica extremamente baixa, a água é única dentre os solventes. Ou seja, a água tem a capacidade de se rearranjar ao redor do soluto apolar de forma a manter parcial ou totalmente suas ligações de hidrogênio, embora seja um solvente ruim para substâncias apolares.³⁹

Na busca de uma interpretação molecular para a hidrofobicidade de moléculas apolares, vários modelos foram criados. Em 1945, Frank e Evans⁴⁰ propuseram o Modelo do *Iceberg*, o qual explica a incomum perda de entropia das moléculas de água após a solubilização de solutos apolares em termos da estruturação da água nas vizinhanças do soluto. Quando um gás nobre, ou uma molécula apolar, é dissolvido em água, em torno de 25 °C, ele modifica a estrutura da água, tendendo a aumentar sua cristalinidade e fazendo-a construir um *iceberg* microscópico ao redor dele. A criação dessas regiões é sustentada pelo fato dessas estruturas possuírem um espaço livre maior para a acomodação das partículas do soluto. A explicação desse processo é baseada na relação termodinâmica dada pela Equação 2.

Em baixas temperaturas, o processo é conduzido pelas baixas entalpia e entropia, pois não ocorre o rompimento das ligações de hidrogênio na primeira camada de solvatação do soluto. Em temperaturas elevadas, ocorre o aumento da

distribuição orientacional dessas moléculas de água em detrimento da quebra de suas ligações de hidrogênio, ou seja, o aumento da entalpia e da entropia direciona o processo de solubilização. A complexidade que resulta da orientação da água na primeira camada de solvatação não contribui muito para a energia livre de formação da cavidade, devido à compensação entre entalpia e entropia do processo. A Figura 9 ilustra o Modelo do Iceberg.^{39,41}

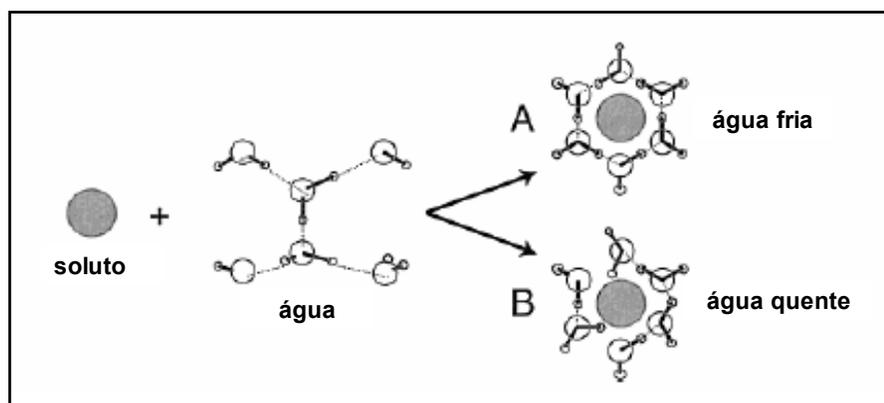


Figura 9. Modelo do Iceberg para o efeito hidrofóbico.⁴¹

Um outro modelo surgido foi o Modelo *Small-Size*, criado por Lucas e Lee como uma alternativa para o Modelo do *Iceberg*.⁴¹ Esse modelo tenta explicar apenas a energia livre de Gibbs de solvatação, e não a entalpia e entropia do processo separadamente. Nesse modelo, o alto custo energético para inserir um soluto apolar em água não é devido à estruturação da água na primeira camada de solvatação do soluto, mas pela dificuldade de soluto encontrar uma cavidade apropriada na água para se acomodar, devido à pequena dimensão das moléculas de água.

Abrir uma cavidade na água poderia envolver um custo entrópico e entálpico, como no Modelo do *Iceberg*, porém Lee afirma que a primeira camada de solvatação não contribui muito para a energia livre de formação da cavidade na água. Se as moléculas do solvente são pequenas, seus volumes livres também o são. Mas, se as moléculas do solvente são grandes, seus volumes livres serão

maiores. Desta forma, solutos grandes são dissolvidos, preferencialmente, em solventes com moléculas grandes, onde o volume livre, ou a cavidade, do solvente é mais adequado.

De acordo com o Modelo *Small-Size*, a água, por ser um solvente formado por uma das menores moléculas existentes, envolve um custo em energia livre maior que em outros solventes para abrir uma cavidade para um soluto de um dado tamanho.⁴¹

Todos esses conceitos e modelos se estendem à água deuterada, qual é também um líquido associativo, muito semelhante à água leve,^{42a,42b} porém apresenta um efeito hidrofóbico mais acentuado para solutos grandes, como proteínas e surfatantes.¹¹

A Mecânica Quântica mostra que a frequência vibracional fundamental da água deuterada é menor que da água, devido a sua maior massa molecular, o que reflete em uma maior massa reduzida μ (Equação 3) e em uma menor frequência vibracional no estado fundamental, resultando no aumento na força das ligações de hidrogênio, ou seja, em uma energia coesiva maior que a da água.^{11,43}

$$v_{O-H} = \frac{1}{2\pi} \left[\frac{k}{\mu} \right]^{1/2} \quad \text{[Equação 3]}$$

k é a constante de força da ligação O-H e μ é a massa reduzida da hidroxila da água (-O-H).

De acordo com os dois modelos apresentados, dissolver um soluto grande em água requer um custo energético para que este soluto se acomode na malha do solvente e, portanto, dissolvê-lo em água deuterada envolve um custo energético ainda maior.

Hummer *et al.*¹¹, em seus estudos sobre o efeito hidrofóbico, utilizando a Teoria da Informação (IT) procuraram explicar a razão da maior solubilidade de solutos apolares pequenos (como alcanos de pequena massa molecular) em água deuterada, em relação à água, e o comportamento inverso para solutos apolares

grandes (por exemplo a concentração micelar crítica de surfatantes é menor em D₂O que em H₂O).

Os próprios autores comentam sobre a dificuldade de desenvolver uma teoria sobre o efeito hidrofóbico, que unifique solutos que contenham ampla faixa de tamanhos, que vão desde átomos como He, até moléculas complexas como proteínas. A teoria IT se baseia na energia livre (μ_{ex}) envolvida na formação de cavidades no interior do líquido:

$$\mu_{ex} = kT \ln p_0 \quad [\text{Equação 4}]$$

onde p_0 é a probabilidade de observar cavidades de um determinado tamanho e forma no interior do líquido. Na teoria IT, procura-se ao invés de calcular p_0 a partir de simulações computacionais, correlacionar p_0 com informações do solvente, como: densidade, função de distribuição radial, compressibilidade, etc. Usando a teoria IT, Hummer *et al.* procuraram avaliar as diferenças de hidrofobicidade entre H₂O e D₂O. Concluem que a teoria prevê qualitativamente a tendência da transferência do soluto entre os dois solventes, no entanto, falham ao explicar a importância do tamanho do soluto hidrofóbico nas propriedades termodinâmicas do sistema aquoso.

Em um nível qualitativo, Hummer *et al.* propõem que a maior solubilidade de pequenos solutos apolares em D₂O relativo a H₂O, se deve a formação de pontes de hidrogênio mais fortes no líquido. Isto pode levar a uma pequena diferença na formação das estruturas tipo *iceberg* em D₂O, resultando em uma menor densidade. Esta estrutura mais aberta acarreta um aumento no número de pequenas cavidades e, assim, leva à maior solubilidade do soluto pequeno.

É observado experimentalmente que a energia livre de transferência do soluto hidrofóbico da H₂O para D₂O ($\Delta_{tr}G_{H_2O-D_2O}$) não varia, significativamente, com o tamanho do soluto e não se torna menos negativa (mais favorável) com o aumento do tamanho do soluto. Uma possível explicação é que o efeito provocado pelo tamanho do soluto não é tão importante quanto o efeito atrativo de interação entre o soluto e a água, pois as interações atrativas afetam, qualitativa e

quantitativamente, a termodinâmica de hidratação. Tanto a densidade do solvente no meio da solução quanto a densidade local próxima ao soluto são menores em D₂O que em H₂O, tornando as interações de dispersão menos favoráveis entre soluto e solvente.

Sendo as ciclodextrinas moléculas grandes e possuidoras de cavidades hidrofóbicas, com a flexibilidade dos macrociclos tendo um papel fundamental em suas solubilidades, a acomodação delas em água deuterada será mais difícil que em água leve. O efeito das interações menos favoráveis de dispersão também contribuem para essa menor solubilidade dos macrociclos em D₂O.

A espécie que apresentar maior flexibilidade conseguirá se acomodar com mais facilidade no fluido mais fortemente associado, ou seja, em D₂O. A molécula de γ -CD estrutura mais fracamente moléculas de água em sua cavidade e ao seu redor, ou seja, é mais flexível.¹⁰ Portanto, apresenta uma diferença relativa menor para a solubilidade em H₂O e em D₂O, pois consegue se acomodar melhor em água deuterada que as outras duas ciclodextrinas.

Para a glicose, a diferença relativa entre as solubilidades em água e água deuterada, a 25 °C, é de aproximadamente 5%. Nas soluções de glicose, além da diminuição no tamanho do soluto, o efeito da cavidade hidrofóbica foi eliminado e o resultado foi uma solubilidade maior que para as ciclodextrinas em ambos os solventes, sendo que o valor encontrado para a solubilidade em água é coerente com dados da literatura, 1g dissolve em 1 ml de água, a 25 °C,⁴⁴ ou tem valor estimado de 51,1 % (m/m),⁴⁵ cuja estimativa encontra-se no Apêndice B.

No cenário apresentado, mostrou-se que as três ciclodextrinas possuem entropias negativas de solubilização, que reduz a solubilidade das mesmas se comparadas à solubilidade da glicose. O efeito torna-se ainda mais pronunciado em D₂O. Assim, se for possível a saída das moléculas de ciclodextrina da solução aquosa, o sistema experimenta um grande aumento de entropia. Isto pode ocorrer em uma solução aquosa saturada, ou mesmo pela formação de um complexo supramolecular, como ocorre entre α -CD e poli (etilenoglicol). Lo Nostro *et al.*³⁰ observaram que a cinética de complexação é mais rápida em D₂O. Explicam que a força motriz desta complexação pode ser a ocupação da cavidade hidrofóbica.

No entanto, como proposto por Davis³⁵, é bem possível que a complexação somente ocorra quantitativamente no momento da separação de fase do complexo, quando a solução torna-se turva. Em outras palavras, a força motriz da complexação envolve a expulsão das moléculas de α -CD do interior da solução aquosa, resultando em um aumento significativo de entropia.

2.2.4 AS ESTRUTURAS CRISTALINAS

As ciclodextrinas nativas são macrociclos que no estado sólido, apresentam geometria bem definida, onde os átomos do oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (O4) são coplanares, com desvios menores que 0,25 Å do plano médio formado entre eles. A distância O4...O4' é aproximadamente constante para as três espécies, enquanto o ângulo O4...O4'...O4'' aumenta com o número de unidades glicosídicas, mas são as ligações de hidrogênio que desempenham o papel principal para o estabelecimento dessa geometria.

Além das ligações de hidrogênio entre as hidroxilas O-H...O-H, é comum ocorrer em carboidratos ligações de hidrogênio do tipo C-H...O-H, quais representam cerca de 25% do total. Elas ocorrem quando um átomo de oxigênio não satisfaz todo seu potencial receptor de ligações de hidrogênio e existem átomos de hidrogênio de grupos -CH com suficiente potencial doador de ligações de hidrogênio.

No caso das ciclodextrinas, esse tipo de ligação não apenas ajuda a estabilizar as interações no complexo de inclusão, como também contribui para a estabilização do arranjo cristalino e da conformação do macrociclo.⁴⁶

As ligações de hidrogênio intramoleculares entre hidroxilas de unidades monoméricas vizinhas, O2...O3', são as responsáveis pela estabilidade da estrutura cristalina das ciclodextrinas, qual nem sempre é um cone truncado perfeito. A α -CD.6H₂O apresenta todas as moléculas de água extremamente ordenadas, porém o macrociclo desta ciclodextrina sofre uma pequena distorção devido à ligeira rotação de uma unidade glicosídica, que se desalinha das outras

cinco. Esta rotação leva à ruptura de duas das seis ligações de hidrogênio O2...O3'. Dessa forma, a hidroxila primária desse monômero se aproxima do centro da α -CD para fazer uma ligação de hidrogênio com uma das duas moléculas de água contidas na cavidade do açúcar, estabilizando o complexo aquoso. Esta conformação distorcida para a α -CD é observada somente quando a água é a molécula hóspede. Com outros solventes, os complexos formados apresentam as seis ligações de hidrogênio O2...O3' e não há distorções no macrociclo.

A γ -CD também forma uma estrutura circular mantida por ligações de hidrogênio O2...O3' intramoleculares, possuindo a menor distância O2...O3' dentre as três ciclodextrinas e ligações de hidrogênio O2...O3' mais efetivas. A geometria formada pelas oito unidades glicosídicas é semelhante à geometria da β -CD,^{5,46} discutida a seguir, porém a estrutura do macrociclo é mais flexível que as estruturas da α -CD e β -CD.¹⁰

No anel macrocíclico da β -CD, as sete ligações de hidrogênio O2...O3' são estabelecidas, mantendo a estrutura do macrociclo rígida, pois as unidades glicosídicas sofrem distorções muito menores que a α -CD, semelhante à γ -CD. A distância O2...O3' é menor para a β -CD, em relação à α -CD, o que torna a ligação de hidrogênio mais efetiva, neste caso, e reduz a liberdade rotacional em torno da ligação glicosídica. Como consequência, a complexação da β -CD não afeta significativamente a conformação do macrociclo.^{5,47} Uma outra evidência da maior força das ligações de hidrogênio na β -CD foi observada por Casu *et al.*,⁴⁸ através das constantes de equilíbrio de troca do hidrogênio por deutério nas hidroxilas secundárias da α -CD e β -CD (0,65 para a β -CD e 0,75 para a α -CD).

O dodecaidrato de β -CD, β -CD.12H₂O, possui sete moléculas de água em sua cavidade e, as outras cinco moléculas, em seu exterior. As moléculas de água na cavidade são desordenadas e ocupam parcialmente onze sítios possíveis. Estudos de difração de nêutrons com β -CD com todas as hidroxilas deuteradas e com água deuterada, mostrou que das 53 ligações de hidrogênio da unidade cristalina, 35 eram do tipo O-($\frac{1}{2}$ D)...($\frac{1}{2}$ D)-O, que representam o equilíbrio

dinâmico $D-O...D-O \leftrightarrow O-D...O-D$, denominadas ligações de hidrogênio “flip-flop”.^{49,50}

Essas ligações de hidrogênio ocorrem devido a uma desordem no cristal β -CD.12H₂O e são encontradas em todas as sete ligações de hidrogênio intramoleculares $O2...O3'$, como mostra a Figura 10.

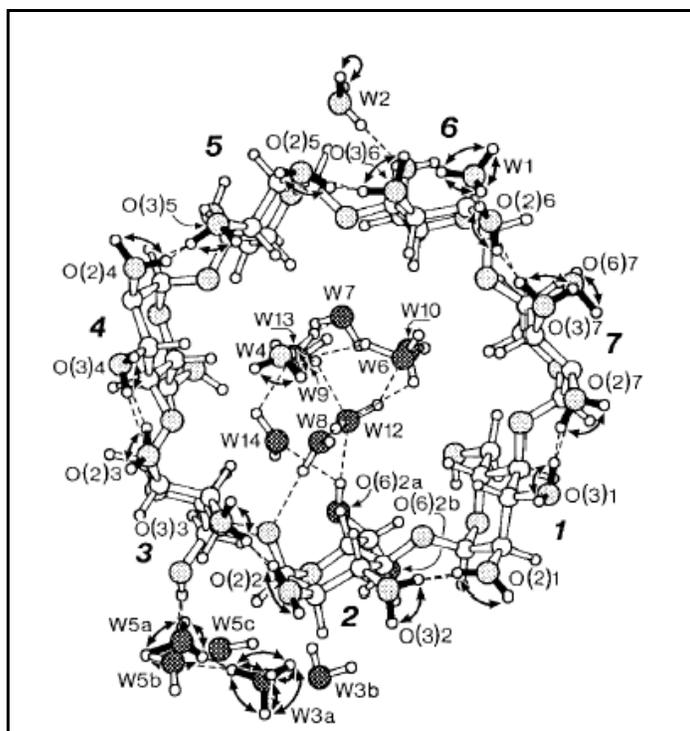


Figura 10. Secção da estrutura cristalina da β -CD.12D₂O deuterada, onde as ligações de hidrogênio são indicadas pelas linhas tracejadas e, as ligações de hidrogênio “flip-flop”, pelas setas curvas.⁴⁶

A desordem dos grupos D-O apresenta uma vantagem energética para o cristal e é um comportamento característico da β -CD, podendo ocorrer também na γ -CD, mas não na α -CD. Essa afirmação é comprovada por análises de raios-X, as quais permitem observar a localização dos átomos de hidrogênio das hidroxilas secundárias apenas no cristal de α -CD, onde eles estão ordenados. Entretanto, os

átomos de hidrogênio das hidroxilas secundárias não podem ser localizados nos cristais de β -CD e γ -CD, provavelmente devido à desordem destes átomos.

A desordem “flip-flop” está confinada aos anéis de sete e oito unidades glicosídicas por causa da geometria entre estas unidades otimizar a estabilização das ligações de hidrogênio O2...O3', uma vez que as distâncias O2...O3' são similares para a β -CD e γ -CD, enquanto é muito maior para a α -CD. Como a geometria na α -CD é diferente devido à maior curvatura do macrociclo, as condições para a ocorrência de desordem “flip-flop” são menos adequadas que para as outras duas ciclodextrinas. Por razões entrópicas, uma rede de desordem “flip-flop” é mais favorável que uma rede ligações de hidrogênio ordenadas e permite uma melhor estabilização estrutural do macrociclo.⁴⁶

Em solução, as ciclodextrinas são moléculas bastante flexíveis e abrangem uma ampla faixa de conformações, algumas das quais se afastam consideravelmente de uma alta simetria.⁶ Em frente disso, assume-se que a ciclodextrina de estrutura cristalina mais rígida, β -CD, apresentará menor número de conformações quando em solução.

Como todos os estudos de solubilidade foram realizados a partir das ciclodextrinas recristalizadas, ou seja, dos cristais hidratados, tornou-se necessário determinar o número de moléculas de água que formam os hidratos estáveis com H₂O e com D₂O e analisar suas estruturas cristalinas.

O grau de hidratação foi determinado por Análise Termogravimétrica, a partir de amostras dos oligossacarídeos sorvidas com água e com água deuterada. Os termogramas obtidos foram expandidos na região de interesse e são apresentados nas Figuras 11, 12 e 13, para α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente. O grau de hidratação foi determinado a partir da razão entre o número de moles de H₂O ou de D₂O por mol de ciclodextrina e os resultados estão expressos na Tabela 6.

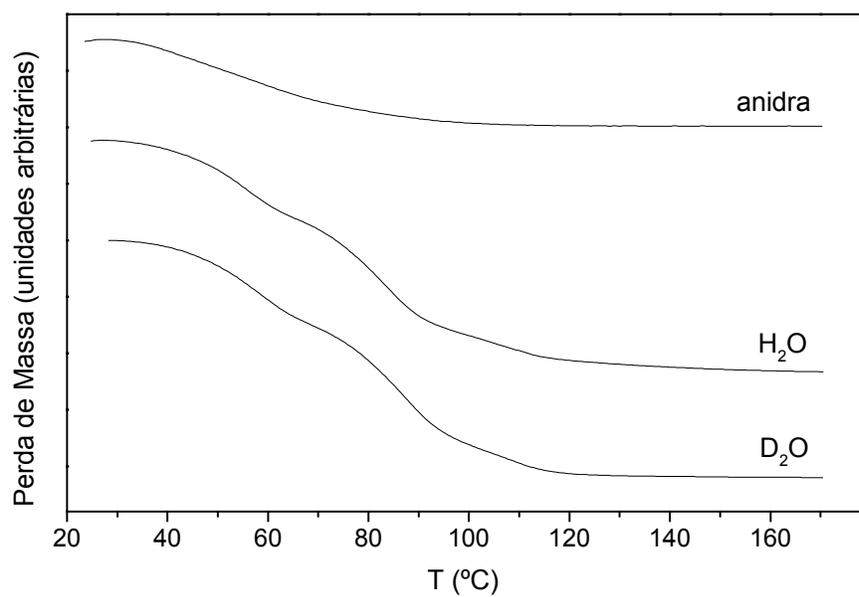


Figura 11. Termogramas das α -CD anidra, sorvidas com H₂O e com D₂O.

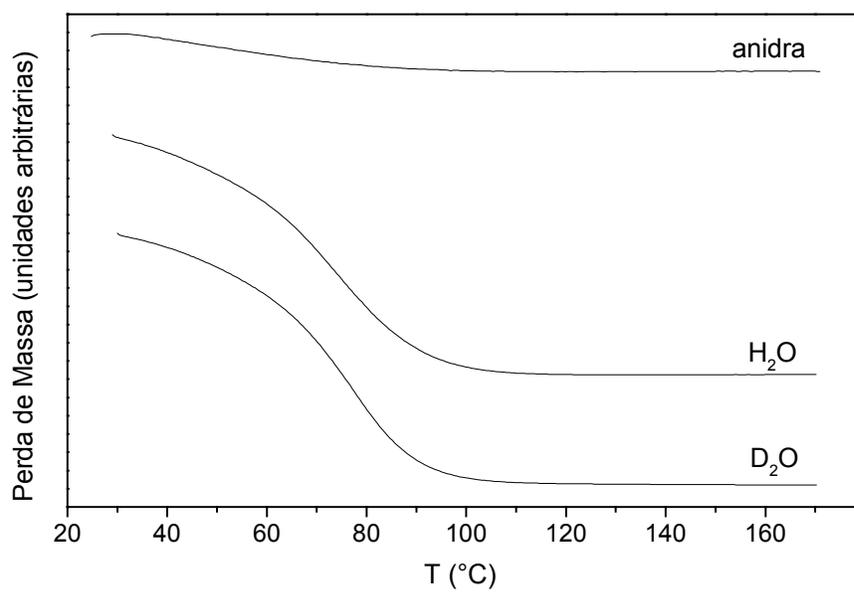


Figura 12. Termogramas das β -CD anidra, sorvidas com H₂O e com D₂O.

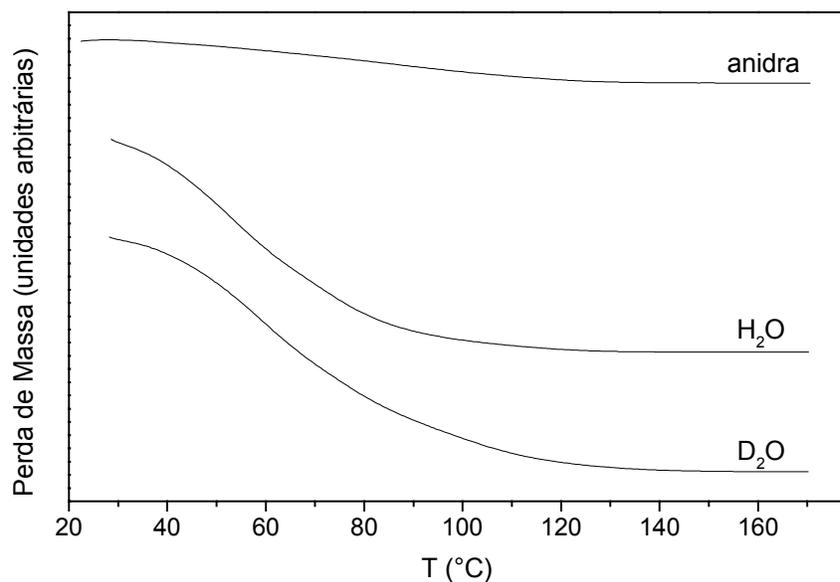


Figura 13. Termogramas das γ -CD anidra, sorvidas com H_2O e com D_2O .

Tabela 6. Valores calculados para o grau de hidratação dos cristais de ciclodextrina submetida à análise termogravimétrica.

Amostra	Massa inicial (mg)	Massa solvente (mg)	$n_{\text{solvente}} / n_{\text{CD}}$
α -CD seca	6,95	0,28	2,3
α -CD / H_2O	11,79	1,24	6,3
α -CD / D_2O	15,03	1,62	5,8
β -CD seca	6,23	0,13	1,4
β -CD / H_2O	9,50	1,25	9,6
β -CD / D_2O	10,62	1,48	9,2
γ -CD seca	9,64	0,33	2,5
γ -CD / H_2O	11,75	1,94	14,2
γ -CD / D_2O	17,02	3,08	14,4

Pode-se observar a presença de água nas amostras secas, indicando uma secagem incompleta dos cristais. Para as demais amostras, o mesmo grau de hidratação é observado para as amostras de uma mesma ciclodextrina que sofreram sorção de água e de água deuterada, permitindo supor que a distribuição das moléculas de H₂O e de D₂O é a mesma. Os resultados obtidos são coerentes com o valores dos hidratos estáveis das ciclodextrinas: 1 mol de α -CD apresenta 6 moles de água, 1 mol de β -CD apresenta 11 ou 12 moles, dependendo da umidade relativa, e 1 mol de γ -CD pode apresentar de 8 a 17 moles.⁶

Assumir que a estequiometria dos hidratos estáveis de α -CD se mantém constante em solução, para H₂O e D₂O, é uma suposição baseada nos valores de entalpia de formação do hexaidrato de α -CD (- 91 kJ mol⁻¹) e de solubilização do hexaidrato de α -CD a 25 °C (+ 31 kJ mol⁻¹). Ou seja, a formação de hidratos com mais de seis moléculas de água, para a α -CD, é entalpicamente desfavorável.³⁸ Esta suposição é também assumida para as outras ciclodextrinas, uma vez que são desconhecidos estudos calorimétricos para estas.

As estruturas dos hidratos obtidos por sorção foram analisadas por difratometria de Raios-X e comparadas com as estruturas das ciclodextrinas secas. Os difratogramas são mostrados nas Figuras 14, 15 e 16, para α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente.

A presença de picos característicos da forma hidratada da α -CD ($2\theta = 11,7$, $13,3$, $14,0$, $15,8$, $18,1$ e $21,6$ °), na amostra seca (Figura 14a), comprovam que a secagem não foi completa. A Figura 15a mostra uma estrutura menos cristalina para a β -CD, em comparação com as formas hidratadas. Esta estrutura é semelhante à da β -CD submetida a um ambiente de umidade relativa 31%. A amostra seca de γ -CD (Figura 16a) apresenta menor cristalinidade que as amostras hidratadas, mas tem conjuntos de picos semelhantes às últimas, indicando umidade nos cristais.⁵¹ Estes dados comprovam os valores de hidratação encontrados nas amostras secas por análise térmica.

Deve-se aqui ressaltar que a solubilidade de um determinado soluto depende apenas da fase líquida. No entanto, procurou-se também investigar o efeito da

mudança isotópica nas estruturas cristalinas dos três hidratos dos oligossacarídeos, de forma a apresentar uma representação completa das duas fases envolvidas no equilíbrio de solubilidade das ciclodextrinas.

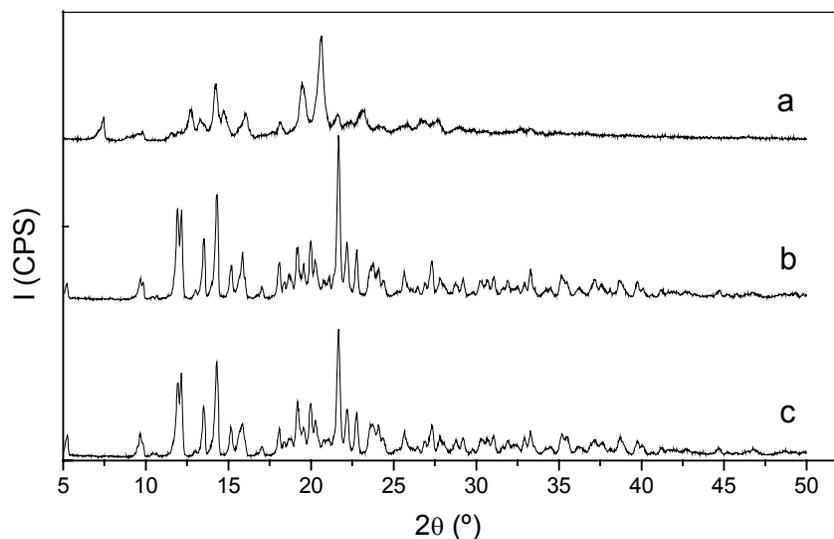


Figura 14. Difratogramas de α -CD (a) seca, (b) com H₂O adsorvida e (c) com D₂O adsorvida.

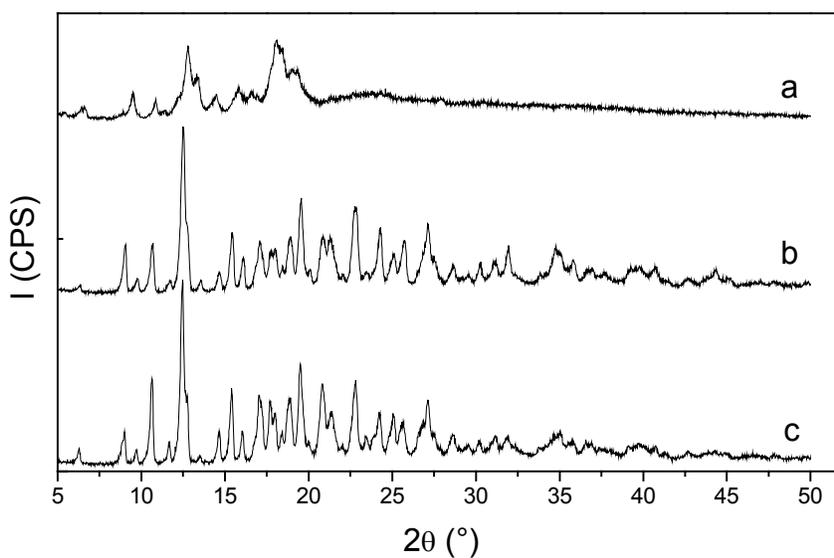


Figura 15. Difratogramas de β -CD (a) seca, (b) com H₂O adsorvida e (c) com D₂O adsorvida.

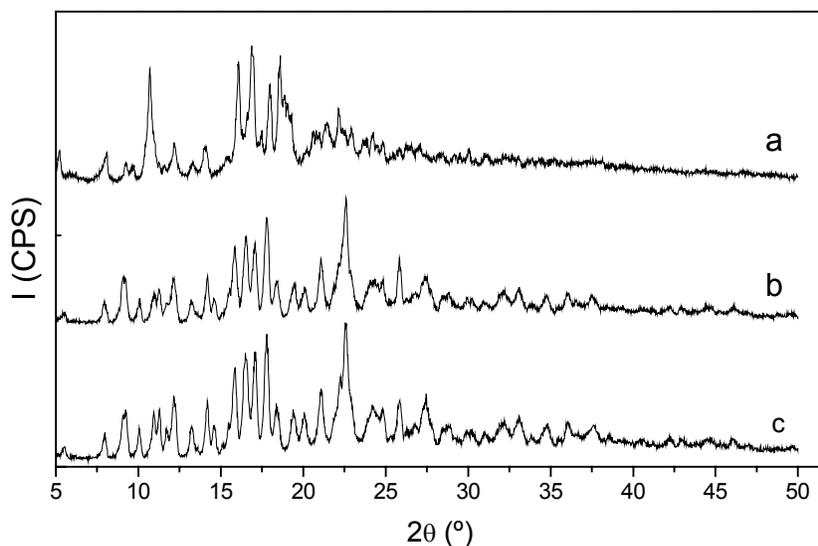


Figura 16. Difratogramas de γ -CD (a) seca, (b) com H_2O adsorvida e (c) com D_2O adsorvida.

Os estudos das estruturas cristalinas das ciclodextrinas nativas recristalizadas, por Difractometria de Raios-X, visam, unicamente, comparar se o hidrato é modificado quando formado em água deuterada, em relação ao processo realizado em água.

Observa-se nos difratogramas Figura 17, obtidos para a α -CD, que os picos característicos da forma hidratada estão presentes em todas as amostras ($2\theta = 11,7, 13,3, 14,0, 15,8, 18,1$ e $21,6^\circ$), enquanto os picos característicos da forma anidra não são observados ($2\theta = 13,0, 13,7, 14,7$ e $20,5^\circ$). Estes resultados indicam que, mesmo à vácuo, a secagem dos cristais de α -CD à temperatura de $25^\circ C$ não leva à forma desidratada, qual necessita de temperaturas maiores e vácuo para ser obtida.⁵¹⁻⁵² A cristalinidade da α -CD recristalizada em água (Figuras 17a e 17b) é semelhante à recristalizada em água deuterada (Figuras 17c e 17d), porém em água, aparecem picos melhor definidos.

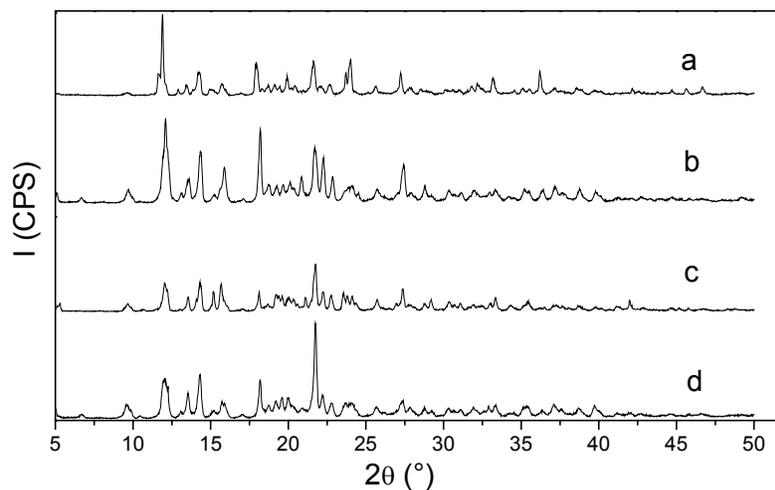


Figura 17. DRX de α -CD recristalizada (a) em H_2O (b) em H_2O e seca à vácuo (c) em D_2O (d) em D_2O e seca à vácuo.

Na Figura 18 estão representados os difratogramas obtidos para a β -CD. Observa-se que as estruturas cristalinas das formas secas sem vácuo são similares para o açúcar recristalizado em ambos os solventes (Figuras 18a e 18c), por possuírem conjuntos semelhantes de picos, e apresentam maior cristalinidade que os cristais secos à vácuo (Figuras 18b e 18d). Sabendo-se que a forma hidratada dos cristais de β -CD é mais cristalina que a forma anidra, pode-se afirmar que a secagem à vácuo foi mais eficiente, mas não conseguiu eliminar totalmente o solvente, pois o padrão cristalográfico do açúcar desidratado não foi obtido.⁵²

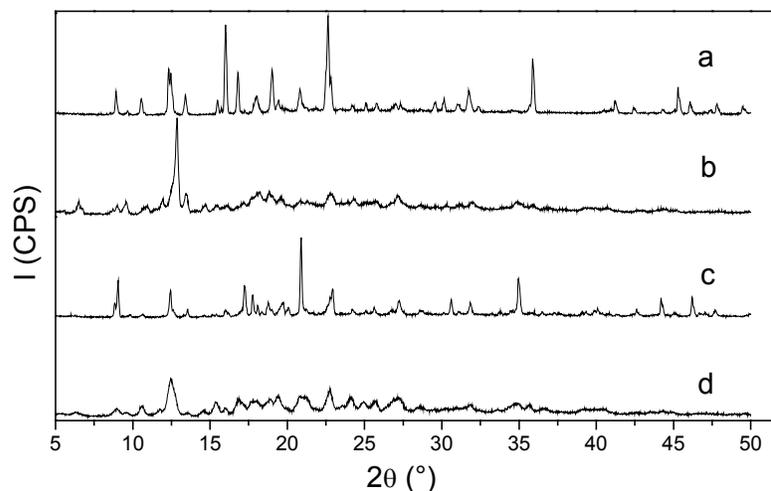


Figura 18. DRX de β -CD recrystalizada (a) em H_2O (b) em H_2O e seca à vácuo (c) em D_2O (d) em D_2O e seca à vácuo.

Os picos referentes à forma desidratada dos cristais de γ -CD ($2\theta = 12,7$, $17,0$ e $22,2^\circ$) não são observados nos difratogramas da Figura 19, indicando que a secagem à temperatura ambiente, mesmo à vácuo, não foi eficiente para produzir a forma anidra. As amostras secas sem vácuo, (Figuras 19a e 19c) apresentaram cristalinidade maior que das amostras secas à vácuo (Figuras 19b e 19d). O difratograma da Figura 19a segue o padrão cristalográfico do açúcar hidratado.⁵¹

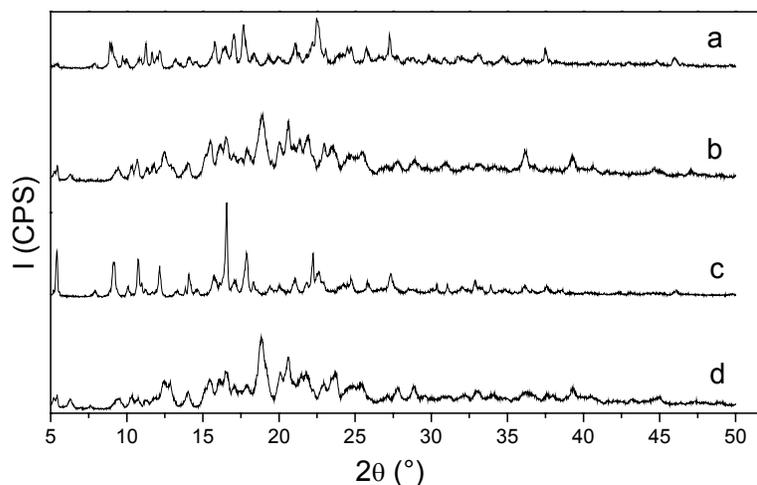


Figura 19. DRX de γ -CD recrystalizada (a) em H_2O (b) em H_2O e seca à vácuo (c) em D_2O (d) em D_2O e seca à vácuo.

A análise comparativa dos difratogramas das Figuras 17, 18 e 19 indica semelhanças estruturais entre as respectivas ciclodextrinas recristalizadas em água ou em água deuterada. Pode-se concluir, a partir destes resultados, que a estrutura cristalina dos hidratos das três ciclodextrinas é pouco afetada se formados com H₂O ou D₂O.

Os difratogramas apresentados na Figura 20 mostram como o padrão cristalográfico da glicose varia entre o açúcar anidro (Figura 20b), usado como recebido, e o açúcar recristalizado por evaporação do solvente (Figura 20a) ou a partir de soluções supersaturadas em água e em água deuterada (Figuras 20c e 20d, respectivamente). A estrutura cristalina da glicose também não é afetada quando esta é recristalizada em água ou em água deuterada. Observa-se que as estruturas formadas nas soluções supersaturadas (com aspecto de gel) possuem o mesmo padrão cristalográfico, onde as posições dos picos são as mesmas, mas as intensidades relativas de alguns picos são significativamente aumentadas na glicose recristalizada em D₂O. No segundo procedimento que foi usado para medir a solubilidade da glicose a 25 °C, não ocorreu a recristalização com formação da estrutura com aspecto de gel. Concluimos, portanto, que a cristalização observada no primeiro grupo de experimentos, foi controlada cineticamente, isto é, a alta viscosidade das soluções e a grande dispersão de pequenos cristais, acabaram induzindo uma intensa cristalização da glicose, dando às amostras um aspecto gelatinoso.

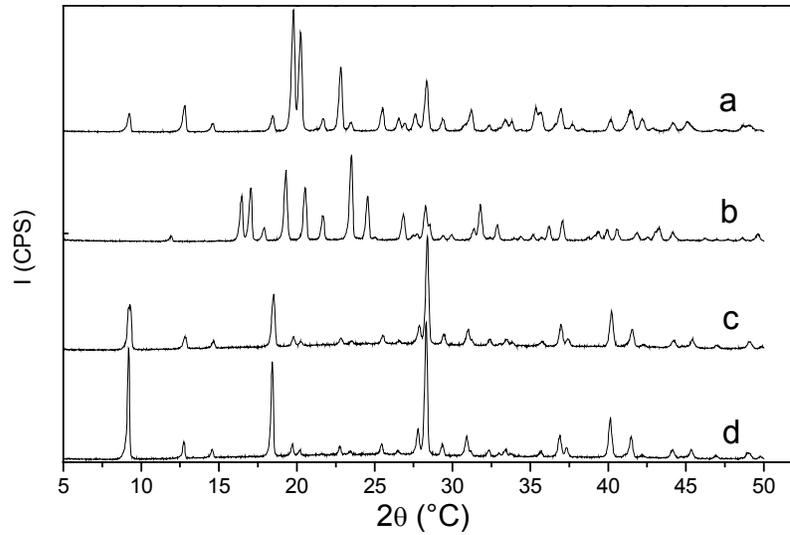


Figura 20. DRX da glicose (a) recristalizada por evaporação do solvente (b) anidra (c) recristalizada a partir de solução supersaturada em H_2O (d) recristalizada a partir de solução supersaturada em D_2O .

CAPÍTULO 3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – A RELAXAÇÃO DO SOLVENTE NO ESTUDO DA SOLVATAÇÃO

Os estudos dos hidratos das ciclodextrinas, na fase sólida, mostraram que os respectivos hidratos estáveis são semelhantes se recristalizados ou sorvidos em água leve ou em água deuterada. Estes resultados indicam que a diferença de solubilidade nos dois solventes está relacionada apenas com as propriedades da fase líquida, ou seja, a solvatação desempenha um papel central nesta propriedade.

Este capítulo é voltado, exclusivamente, para o estudo da solvatação das ciclodextrinas, por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, RMN, através de medidas do tempo de relaxação transversal (T_2) do solvente, também chamado de tempo de relaxação spin-spin.

O estudo é baseado na mobilidade mais restrita das moléculas de solvente estruturadas na superfície do soluto, em relação às moléculas livres, que afeta consideravelmente o seu tempo de relaxação transversal. Portanto, a técnica possui grande potencial para investigar o comportamento das ciclodextrinas em água.

3.1 FUNDAMENTOS

3.1.1 A RELAXAÇÃO DE SPINS NUCLEARES

As técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) se fundamentam na absorção seletiva da componente magnética da radiação eletromagnética, no domínio da radiofrequência, r.f. (10^6 a 10^9 Hz), por amostras colocadas num campo magnético. A amostra é excitada de forma muito tênue, devido à pequena energia dos fótons de r.f., e regressa ao estado inicial emitindo energia também na região de r.f. A determinação precisa dos valores destas radiofrequências emitidas

e da velocidade com que a amostra retorna ao estado inicial de equilíbrio (relaxação) fornece informações tanto sobre a estrutura molecular da amostra como sobre a dinâmica interna e global das respectivas moléculas.

Para uma molécula ser ativa para RMN, ela deve possuir núcleos magnéticos, quais apresentam número atômico e/ou número de massa ímpar e, portanto, momento angular de spin \vec{I} e momento magnético nuclear $\vec{\mu}$ não nulos. A interação do campo magnético com $\vec{\mu}$ produz a magnetização total da amostra, cujo valor corresponde ao somatório dos momentos magnéticos nucleares de cada núcleo magnético da amostra. Para que o sistema entre em ressonância, é necessário que a frequência da radiação r.f. (ν) seja igual à frequência de precessão nuclear (ν_1), denominada frequência de Larmor.

A relaxação pode ser definida, em termos gerais, como o retorno ao equilíbrio de um sistema que tenha sofrido uma perturbação em uma de suas variáveis físicas de estado por ação externa. Essas podem ser a temperatura, a pressão, o campo elétrico ou magnético aplicado ao sistema. A inexistência do fenômeno de relaxação acarretaria, a qualquer sistema, a impossibilidade de atingir novamente o equilíbrio num universo não estacionário.

Na presença de um campo magnético externo, homogêneo e estático \vec{B}_0 , os núcleos magnéticos de uma amostra adquirem energias diferentes e se distribuem entre os estados energéticos quantizados de spin nuclear, com pequeno excesso de população no nível de menor energia, de acordo com a agitação térmica do meio. A Figura 21 ilustra essa situação para o caso de núcleos de número quântico de spin nuclear $I = 1/2$, como o ^1H .

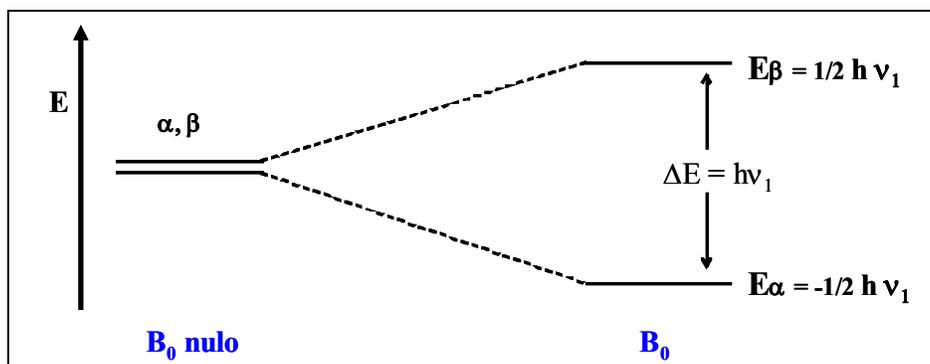


Figura 21. Diagrama de níveis energéticos para núcleos de $l = \frac{1}{2}$ na ausência e presença de \vec{B}_0 , onde ν_1 é a frequência de precessão nuclear (frequência de Larmor).

O excesso de população no nível α obedece a distribuição de Boltzmann, numa dependência da energia térmica do meio:

$$n_\alpha/n_\beta = \exp(\Delta E / kT) \approx 1 + \Delta E / kT \quad [\text{Equação 5}]$$

A aproximação feita se justifica pelo fato de ΔE ser um valor muito pequeno em relação à energia térmica, à temperatura ambiente, (k é a constante de Boltzmann e T , a temperatura absoluta). Como os níveis energéticos de spin nuclear são muito próximos, $\Delta E \ll kT$.

A absorção de energia, na região de radiofrequência, por núcleos no estado de spin α , tende a igualar as populações nos dois estados. Nesse caso, ocorre a saturação do estado de maior energia e a absorção de energia deixa de ser observada. Os mecanismos de relaxação fazem o sistema de spins nucleares atingirem novamente o equilíbrio, através de troca de energia ou não com o meio, retomando o excesso de população no estado α e fornecendo os dados sobre a amostra analisada.

O processo de relaxação trata de transições induzidas por campos magnéticos flutuantes locais, de frequência apropriada (ν_1), que têm origem no movimento

Browniano do meio, relacionando-se à dinâmica molecular, principalmente à rotação. São os mesmos mecanismos que permitem a distribuição das populações entre os níveis energéticos quando o campo magnético externo é aplicado. Esses campos magnéticos flutuantes locais são associados a interações entre os momentos magnéticos nucleares de núcleos vizinhos.

Do ponto de vista macroscópico, se uma amostra está submetida a um campo magnético externo, a diferença entre as populações dos estados energéticos determina a magnetização macroscópica total desta amostra, advinda da interação entre \vec{B}_0 e $\vec{\mu}$, como já mencionado. Essa magnetização resultante se alinha paralelamente a \vec{B}_0 na direção z, definida como a direção de aplicação de \vec{B}_0 , porque a distribuição dos vetores momento magnético nuclear no cone de precessão em torno de \vec{B}_0 é aleatória, como ilustra a Figura 22. O sistema de spins nucleares, nesta situação, encontra-se em equilíbrio e os $\vec{\mu}$ precessam em torno de B_0 com velocidade angular ω_0 .

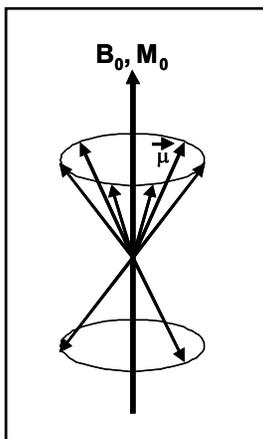


Figura 22. Magnetização resultante da diferença de população entre os níveis de energia de spin nuclear num sistema de spins nucleares em equilíbrio.

A aplicação de um pulso de r.f., na direção x, faz alguns núcleos, do estado menos energético, absorverem energia, alterando as populações entre os níveis. Um campo magnético oscilatório ou rotativo, \vec{B}_1 , associado à radiação r.f., varia periodicamente, no plano xy, com frequência ν e velocidade angular $\omega = \omega_0$. A

interação entre \vec{B}_1 e os momentos magnéticos nucleares da amostra altera a distribuição dos núcleos magnéticos entre os estados energéticos. Devido à natureza coerente da radiação, o pulso de r.f. induz os spins nucleares a precessarem em fase criando uma “coerência”. Assim, a magnetização macroscópica é deslocada da direção z por um ângulo ϕ chamado de ângulo de nutação. Essa magnetização precessa ao redor de B_0 com frequência ν . Tal situação está ilustrada na Figura 23.

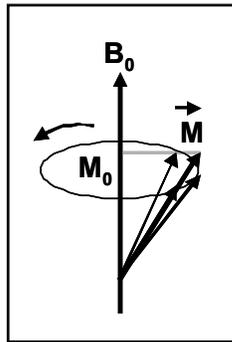


Figura 23. Agrupamento de momentos magnéticos nucleares, decorrente da atuação do campo oscilatório \vec{B}_1 , com desvio de \vec{M} da direção z.

Como o campo magnético oscilatório \vec{B}_1 roda na mesma frequência que \vec{M} , adota-se um outro referencial cartesiano chamado de referencial rotativo (x' , y' e z'). Esse referencial apresenta z' paralelo a z e x' e y' , rodando ao redor de z' com a mesma velocidade angular de \vec{B}_1 (ω). Com esta mudança de referencial, todo o sistema se movimenta com a mesma velocidade angular, como se o movimento de precessão deixasse de ocorrer e o sistema estivesse parado.

Quando o sistema entra em coerência, ocorre o aparecimento de componentes da magnetização nos eixos cartesianos, M_x , M_y e M_z e, conseqüentemente, a magnetização deixa de ter valor M_0 na direção z' . A presença da coerência é detectada através da corrente induzida em uma bobina, devido à oscilação das componentes M_x e M_y . A recuperação da magnetização ao longo do eixo z' ocorre

através dos processos de relaxação, ou seja, as componentes da magnetização voltam a ter os valores $M_z = M_0$ e $M_x = M_y = 0$, como mostra a Figura 24.⁵³

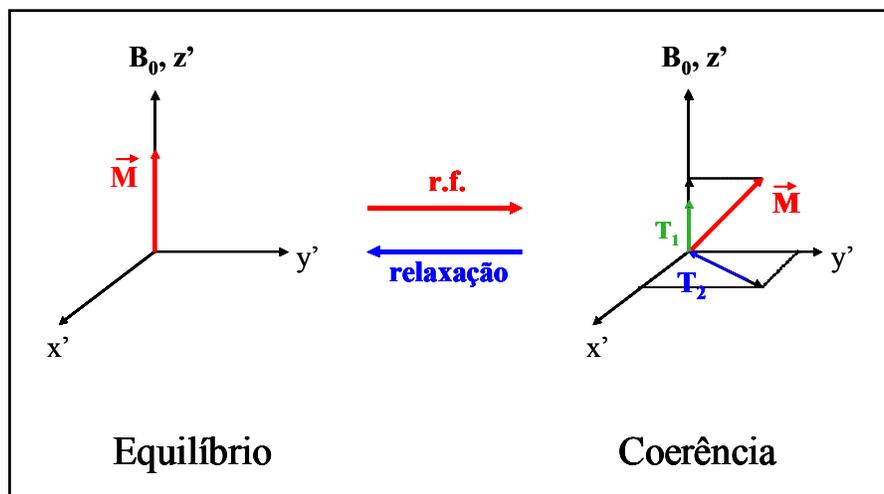


Figura 24. Sistemas de spins nucleares em equilíbrio e em coerência, e a interconversão entre estas situações. A relaxação ocorre em tempos característicos dados por T_1 e T_2 .

3.1.2 OS TEMPOS DE RELAXAÇÃO

O retorno do sistema de spins nucleares à situação de equilíbrio ocorre pela relaxação deste sistema quando o pulso de r.f. deixa de ser aplicado e, portanto, o campo magnético oscilatório \vec{B}_1 é retirado.

Atribui-se um tempo de relaxação próprio para cada componente da magnetização do sistema, T_1 e T_2 , quais podem apresentar valores de ms até horas, dependendo da amostra analisada.

T_1 está associado a M_z e é, por isso, chamado de tempo de relaxação longitudinal, enquanto T_2 está associado a M_x e M_y e é chamado tempo de relaxação transversal. Os processos de relaxação longitudinal e transversal são, mecanisticamente, muito semelhantes, porém seus significados físicos são

totalmente diferentes. Primeiramente, será discutido o tempo de relaxação longitudinal para, então, se discorrer sobre o tempo de relaxação transversal.

O processo de *relaxação longitudinal*, dado pelo tempo T_1 , tem caráter energético e é descrito pela evolução temporal de M_z , que depende das populações nos níveis de energia. Nesse processo, o sistema de spins nucleares transmite o excesso de energia ao ambiente, descrito genericamente pela palavra *rede*, pois os primeiros estudos de relaxação foram realizados em amostras de sólidos cristalinos, estendendo-se o uso do termo *rede* para qualquer amostra. Portanto, T_1 também é denominado de tempo de relaxação spin-rede.

Essa transferência de energia para a rede faz com que esta sofra um aumento de temperatura para manter a energia total constante. Esse aumento de temperatura, devido à transformação da energia potencial magnética em energia cinética molecular, é extremamente pequeno e não pode ser determinado diretamente. Desta forma, a variação da temperatura em função do tempo é medida, indiretamente, pela variação da componente M_z da magnetização macroscópica do sistema de spins em função do tempo.

Entretanto, o fenômeno de RMN implica também em variações nas componentes transversais da magnetização M_x e M_y . Os valores não-nulos dessas componentes é uma consequência da coerência de fase na precessão dos momentos magnéticos individuais em torno da direção z' , ou seja, ocorre o aumento da ordem no sistema de spins nucleares, fazendo sua entropia diminuir. Esse estado macroscópico de coerência do sistema de spins é, então, caracterizado por menor entropia e maior energia, uma vez que $M_z < M_0$ devido à tendência de igualar as populações entre os níveis energéticos de spins nucleares.

O estado de coerência de spins nucleares é induzido, como mencionado acima, pela interação do campo magnético oscilatório, aliado à radiação r.f., com os momentos magnéticos nucleares do sistema. Esse é um estado estacionário apenas se o sistema de spins e rede permanecer não isolado, ou seja, com um fluxo contínuo de energia através de \vec{B}_1 , mantendo a transferência de energia do sistema de spins para a rede, evitando a saturação do nível mais energético.

Com a retirada de \vec{B}_1 , o sistema evolui para a situação de equilíbrio caracterizada por $M_z = M_0$ e $M_x = M_y = 0$. A evolução das componentes da magnetização segue funções temporais dadas pelas Equações Diferenciais de Bloch:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma [M_y B_0 + M_z B_1 \text{sen}(wt)] - \frac{M_x}{T_2} \quad \text{[Equação 6]}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma [M_z B_1 \text{cos}(wt) - M_x B_0] - \frac{M_y}{T_2} \quad \text{[Equação 7]}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = -\gamma [M_x B_1 \text{sen}(wt) - M_y B_1 \text{cos}(wt)] - \frac{(M_z - M_0)}{T_2} \quad \text{[Equação 8]}$$

A variação da magnetização, em função do tempo, para as componentes transversais M_x e M_y é descrita como *relaxação transversal* e caracterizada pelo tempo T_2 . Esse processo de relaxação é, fundamentalmente, diferente da relaxação longitudinal, pois corresponde à perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos nucleares individuais na sua precessão e, portanto, a um aumento de entropia. A recuperação de M_x e M_y não exige transferência de energia, exigindo apenas uma perda da coerência.

É atribuída a esse processo a denominação relaxação spin-spin, pois, em muitos casos, a perda da coerência de fase é devida a interações diretas entre os momentos individuais de spin, sem qualquer modificação na energia do sistema de spins.

O tempo de relaxação transversal está intimamente relacionado ao sinal RMN, pois este depende diretamente da variação de M_y com o tempo (dM_y / dt). A taxa com que o sinal surge e desaparece, na vizinhança da condição de ressonância, ou seja, a forma da banda, depende de T_2 . As Equações de Bloch prevêm uma banda de forma lorentziana, cuja largura a meia-altura é dada por:

$$\Delta\nu_{1/2} = 1 / \pi T_2^* \quad \text{[Equação 9]}$$

onde

$$1 / T_2^* = 1 / T_2 + 1 / T_2^{\text{nh}} \quad \text{[Equação 10]}$$

T_2^* é um tempo de relaxação transversal efetivo e T_2^{nh} é a contribuição da não-homogeneidade do campo magnético aplicado.

A projeção de \vec{M} no plano $x'y'$ é a responsável pelo sinal detectado e decai exponencialmente para zero com um tempo de relaxação próprio T_2 . Esse sinal, designado como FID (*free induction decay*), ao ser tratado matematicamente por uma Transformada de Fourier, transforma o domínio temporal do sinal para um domínio de frequências, fornecendo um espectro de RMN.⁵³

3.1.3 A RELAXAÇÃO E A DINÂMICA DE LÍQUIDOS

A relaxação entre níveis de energia nuclear é muito mais lenta que em outros processos analisados por espectroscopia, originando tempos de relaxação que podem ser até de segundos. A relaxação nuclear consiste em transições de spin nuclear estimuladas por campos magnéticos locais que oscilem com a frequência de Larmor (ν_1) e possuem uma dependência aleatória com o tempo. Para um núcleo de uma molécula no meio líquido, esses campos magnéticos locais são devidos ao movimento Browniano das moléculas neste meio. Considerando um núcleo de spin $1/2$, este pode sofrer a influência de campos magnéticos locais associados aos momentos magnéticos nucleares de outros núcleos próximos a ele, na mesma molécula ou em moléculas vizinhas.

Os campos magnéticos flutuantes podem ser resolvidos em várias componentes, oscilando com diferentes frequências. Considerando moléculas, cujo tempo entre colisões sucessivas seja de 10^{-12} s, seus movimentos apresentarão componentes de frequência entre 0 e 10^{12} Hz, uma vez que, em um dado instante, algumas moléculas se movem muito rapidamente e outras, muito lentamente.

Uma condição necessária para que ocorra relaxação é que os movimentos moleculares tenham uma escala de tempo adequada, a qual para RMN é lenta, pois é definida pela frequência de Larmor, cujo valor típico é da ordem de 10^7 Hz. Os movimentos de translação e rotação são muito importantes em líquidos, assim como as vibrações da rede em sólidos. Porém, processos muito rápidos, em relação a ω_0 , como as vibrações moleculares, não são eficientes para a relaxação.⁵³

Em gases a baixa pressão, o livre caminho médio de uma molécula é grande e esta pode rotacionar várias vezes antes de colidir com outras e alterar seu estado rotacional. Em líquidos, as colisões ocorrem com maior frequência e as moléculas sofrem colisões de todos os lados, sendo que cada colisão acelera ou desacelera seu movimento rotacional e altera seu eixo de rotação.

Um exemplo disso pode ser dado por uma molécula esférica, como o metano CH_4 , com o átomo de C ocupando o centro da esfera de raio igual ao comprimento da ligação C-H. Em solução, cada molécula de metano, ao colidir com outra molécula vizinha, faz com que seus átomos de H percorram, cada um, caminhos aleatórios na superfície dessa esfera.⁵³⁻⁵⁴ A Figura 25 ilustra essa situação.

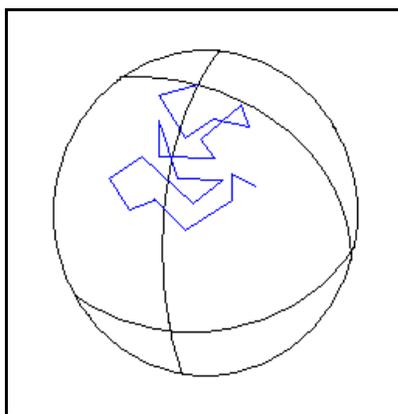


Figura 25. Trajetória aleatória típica de um átomo na superfície de uma molécula esférica submetida a uma difusão rotacional num líquido.

Para esse tipo de movimento, é definido um tempo característico denominado tempo de correlação, τ_c . O tempo de correlação pode ser entendido como o tempo

médio entre as colisões moleculares para uma molécula num determinado estado de movimento, sendo que o eixo de rotação desta molécula é constantemente alterado devido às colisões. Em outras palavras, o τ_c é o tempo característico da função de autocorrelação, qual mede o tempo que uma determinada propriedade de um sistema persiste até ser anulada pelo movimento aleatório microscópico das moléculas deste sistema. Essa função tem um valor elevado para tempos muito curtos e decai para zero à medida que o tempo aumenta. No caso da RMN, a função de autocorrelação caracteriza as flutuações dos campos magnéticos locais devido ao movimento Browniano.

Em tempos muito menores que τ_c , a maioria das moléculas está próxima de suas posições originais, enquanto para tempos muito maiores que τ_c , as moléculas possuem orientações completamente randomizadas e toda a “memória” da orientação original é perdida. Valores típicos de τ_c para moléculas em solventes não viscosos, em torno de 25 °C, estão na faixa de 100 ps.⁵³⁻⁵⁴

O tempo de correlação está intimamente associado aos tempos de relaxação T_1 e T_2 , pois a relaxação está relacionada com o movimento aleatório.

3.1.4 MEDIDAS DE T_2 - A SEQUÊNCIA DE PULSOS CPMG

Na técnica pulsada de RMN, é aplicado um pulso de radiofreqüência muito intenso (B_1 da ordem de 10^{-2} T), num intervalo de tempo muito curto (t_p entre 1 e 50 μ s), em relação a T_1 e T_2 . Esse pulso faz \vec{M} se deslocar de um ângulo ϕ da direção z' , denominado ângulo de nutação. Se a freqüência do pulso de r.f. corresponde à situação de ressonância, ou seja, é igual à freqüência de Larmor (ν_1), o campo magnético efetivo, ao longo do eixo rotativo x' , é equivalente a \vec{B}_1 e a magnetização roda com velocidade angular γB_1 , ao redor do plano $y'z$, definindo ϕ . Se a aplicação de \vec{B}_1 em ressonância ocorre durante um tempo t_p , a amplitude de ϕ é dada por:

$$\phi = \gamma B_1 t_p$$

[Equação 11]

onde γ é a razão magnetogírica do sistema de spins nucleares, qual é característica para cada núcleo magnético.⁵³

Um campo magnético oscilatório \vec{B}_1 com amplitude e duração adequadas para produzir uma rotação ϕ de $\pi/2$ rad, é chamado de pulso de 90° . Se o pulso ajustado para produzir uma rotação de π rad, será designado como pulso de 180° . Desta forma, a variação da duração do pulso de r.f. aplicado permite que a magnetização seja colocada em qualquer direção escolhida, sem perda da grandeza de \vec{M} , desde que t_p seja muito menor que T_1 e T_2 . Portanto, o controle de ϕ é a base da técnica utilizada, neste trabalho, para as medidas de T_2 , qual envolve a detecção de ecos de spin através da aplicação de seqüência de pulsos de radiofrequência.

As medidas de T_2 possuem dificuldades experimentais devido, principalmente, à contribuição da não-homogeneidade do campo magnético B_0 , ao decaimento do sinal FID e à largura da banda a meia-altura. O alargamento das linhas mascara o efeito da relaxação natural T_2 .

Na presença de um campo magnético estático não-homogêneo, o vetor \vec{M} é considerado a soma vetorial dos vetores magnetização elementares provenientes de volume suficientemente pequenos da amostra, de forma que nestes volumes o campo seja homogêneo. Esses vetores são denominados *isocromatas de spin*, pois todos os momentos magnéticos nucleares que determinam uma isocromata precessam com a mesma frequência de Larmor. Portanto, nesse caso, existem várias isocromatas de spin m_i caracterizadas por frequências de ressonância ν_i ligeiramente diferentes, referentes aos núcleos situados em regiões diferentes da amostra e que, conseqüentemente, experimentam valores ligeiramente diferentes do campo magnético estático. Devido a essa dispersão de frequências de ressonância, as isocromatas de spin perdem rapidamente a coerência de fase após um pulso de excitação, levando à aceleração do desaparecimento da componente transversal da magnetização.

Entretanto, esse processo de defasagem é reversível, sendo possível efetuar a refocagem das isocromatas de spin utilizando condições apropriadas, como o controle de t_p . Assim, obtêm-se *ecos do sinal FID*, que é a base da técnica de determinação de T_2 .

Caso a correção para a não-homogeneidade do campo não seja feita, o que se mede é um tempo de relaxação transversal efetivo T_2^* , como mostra a Equação 10.

A técnica de aplicação de seqüência de pulsos para medir T_2 , foi desenvolvida por Hahn⁵⁵ e aperfeiçoada por Carr, Purcell, Meiboom e Gill,⁵⁶⁻⁵⁷ levando o nome dos quatro últimos cientistas.

A seqüência de pulsos CPMG, ilustrada na Figura 26, consiste na aplicação primeira de um pulso de 90° na direção x (no referencial do laboratório), ou seja, a magnetização é deslocada para o eixo y' (Figura 26a). O pulso de r.f. é aplicado no referencial do laboratório, segundo o eixo x , que cria \vec{B}_1 ao longo do eixo x' do referencial rotativo. Devido à não-homogeneidade do meio, os núcleos magnéticos da amostra sentem B_1 com pequenas diferenças e precessam ao redor de z' com velocidade angular maior ou menor que do referencial rotativo e de \vec{B}_1 , movendo-se em sentidos opostos (Figura 26b). O sinal percebido depende da resultante dos vetores magnetização dos grupos de spin e decai com a constante de tempo T_2^* , pois o decaimento combina os efeitos da não-homogeneidade do campo e da relaxação spin-spin. Após um tempo τ , a aplicação de um outro pulso na direção y , porém de 180° , faz os núcleos manterem suas respectivas velocidades, mas inverte seus sentidos no plano $x'y'$ (Figuras 26c e 26d). Os vetores continuam a precessar, porém o afastamento das isocromatas começa a diminuir e o sinal resultante começa a crescer para se tornar um eco. Após um tempo correspondente a 2τ , todos $\vec{\mu}$ os da amostra entram em fase, ao longo do eixo negativo de y' , refocalizando-se o espalhamento angular provocado pela não-homogeneidade do campo e obtendo-se um eco de spins (Figura 26e). O sinal do eco passa a ser atenuado pelo fator $\exp(-2\tau/T_2)$, originado exclusivamente da relaxação spin-spin. Depois do intervalo 2τ , a magnetização continua a precessar e as isocromatas voltam a se separarem. Após um tempo 3τ , é aplicado

novamente um pulso de 180° , ao longo de y (Figura 26f), e todos os $\vec{\mu}$ entram em fase, após 4τ , ao longo de eixo positivo de y' , quando outro eco de spins é detectado (Figura 26g). Desse modo, todos os ecos pares têm amplitudes correlatas e podem ser captados pelo detector.

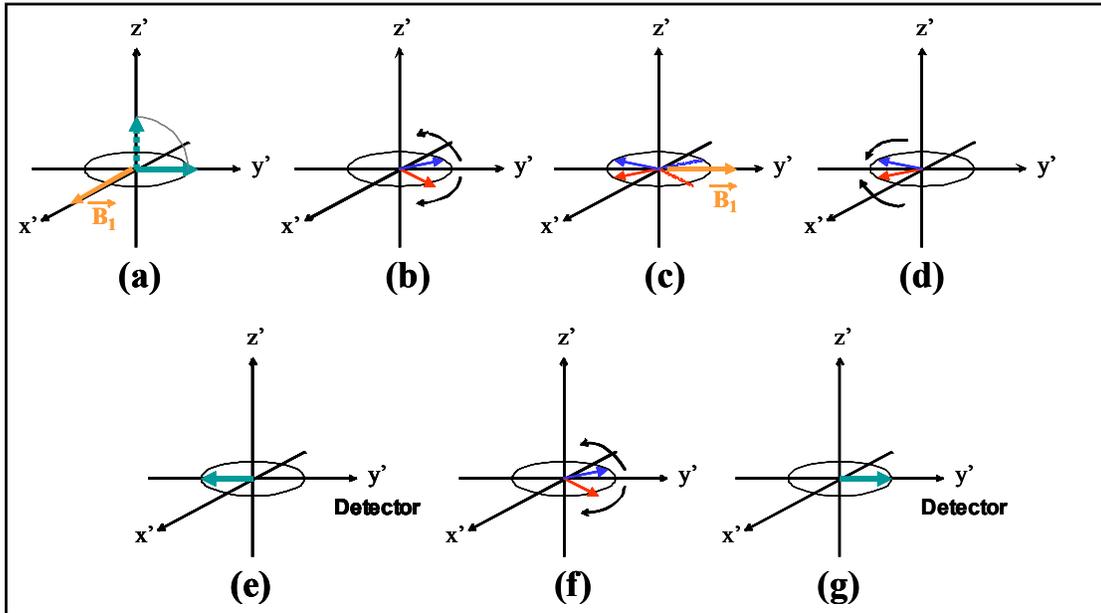


Figura 26. Seqüência de pulsos CPMG utilizada para medidas de T_2 : **a)** aplicação de um pulso de 90° na direção x , \vec{M} se desloca para o eixo y' ; **b)** isocromatas de spin precessando com velocidades diferentes, devido à não-homogeneidade de B_0 ; **c)** aplicação de um pulso de 180° na direção y , após um tempo τ ; **d)** inversão das isocromatas no plano $x'y'$, mantendo suas velocidades; **e)** todos os $\vec{\mu}$ entram em fase, após um tempo 2τ , no sentido negativo da direção y' , o eco é detectado; **f)** aplicação de um pulso de 180° na direção y , após um tempo 3τ ; **g)** todos os $\vec{\mu}$ entram em fase, após um tempo 4τ , no sentido positivo da direção y' , e o eco é novamente detectado.

A seqüência de pulsos utilizada pode ser repetida n vezes e representada por:^{53,56-58}

$$[90^\circ x - \tau - 180^\circ y - \tau - (\text{eco}) - \tau - 180^\circ y - \tau - (\text{eco})]_n$$

Com a remoção de \vec{B}_1 , após a aplicação do pulso, a magnetização M_y retorna a zero de acordo com o processo de relaxação. Este retorno ao valor de equilíbrio ocorre na forma de um decaimento exponencial de primeira ordem e a taxa com que esta relaxação evolui é dada pela integração de uma das Equações Diferenciais de Bloch, sendo $t = 2\tau$:

$$M_y(t) = M_y(0) \exp(-t / T_2) \quad \text{[Equação 12]}$$

Desta forma, a transformada de Fourier fornece espectros onde a intensidade dos picos decai em função do tempo e permite a determinação de T_2 . A situação é ilustrada na Figura 27. O método utiliza uma regressão não-linear para determinar T_2 .

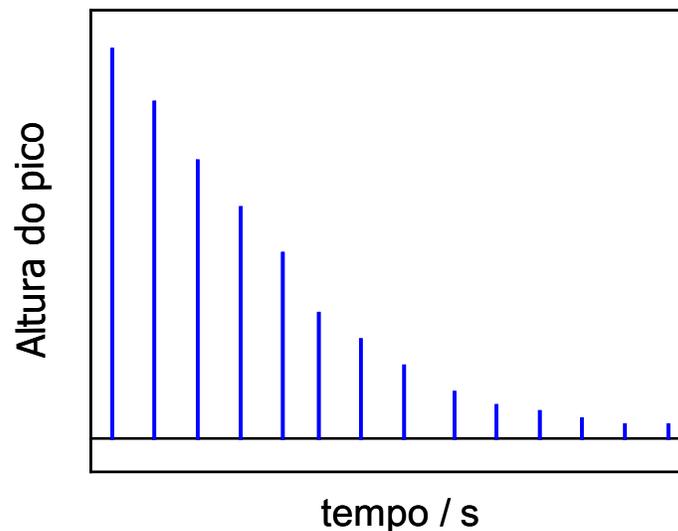


Figura 27. Ilustração do decaimento da altura do pico em função do tempo, cujo ajuste da curva permite a medida de T_2 .

Uma importante característica dessa técnica é a independência entre a intensidade do eco e quaisquer campos locais que tenham permanecido constantes durante os intervalos de tempo entre as aplicações dos pulsos. As

isocromatas não alteram suas velocidades com as aplicações dos pulsos de 90° e 180° , pois um aumento na velocidade, adquirida no primeiro pulso, será descontada no segundo. Desta forma, o valor do eco independe da não-homogeneidade do campo magnético, pois esta não é alterada quando τ é suficientemente curto para que o efeito da difusão translacional seja desprezível. A relaxação transversal real ocorre devido à flutuação dos campos locais, numa escala de tempo molecular, e não há garantia de um grupo de spins manter sua velocidade durante a refocalização. Por isso, os spins no interior dos grupos se espalham, angularmente, com a constante de tempo T_2 . Ou seja, os efeitos da verdadeira relaxação não são refocalizados, porém o valor do eco de spin decai com o tempo de relaxação transversal, de acordo com a Equação 12.^{53,58}

3.1.5 T_2 E DINÂMICA MOLECULAR DO SOLVENTE

O tempo de relaxação transversal (T_2) dos prótons da água, em soluções aquosas diluídas contendo carboidratos, é, em geral, menor que o valor obtido para a água pura. Os estudos de Halstead *et al.*⁵⁹ mostram que a difusão de moléculas da água e a troca entre prótons da água e das hidroxilas dos carboidratos são extremamente rápidas nessas soluções, mesmo em regiões próximas a $\text{pH}=7$, garantindo que o decaimento da magnetização transversal seja uma exponencial simples, caracterizada por uma única taxa de relaxação spin-spin, $1/T_2$, para os prótons do solvente. Como consequência dessa troca, os prótons da água retêm uma “memória” dos vários meios visitados na escala de tempo da relaxação (T_2) e esta relaxação pode servir para monitorar, indiretamente, a dinâmica e outras propriedades do soluto. Os autores utilizaram, nos experimentos, a seqüência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) para as medidas de T_2 , discutida na seção 3.1.4.

Em soluções aquosas homogêneas de carboidratos pequenos, nas quais essa troca entre prótons ocorra, a taxa de relaxação transversal dos prótons da água é dada por:

$$1 / T_2 = 1 / T_{2a} + f_{CR}(P_b, k_b, \delta\omega_b, T_{2b}, \tau) \quad \text{[Equação 13]}$$

Os prótons da água do meio da solução são designados por *a* e, os prótons das hidroxilas que podem sofrer a troca, por *b*. f_{CR} é uma função analítica que depende de cinco variáveis: P_b é a fração de prótons de hidroxilas que podem sofrer a troca; k_b é a taxa de troca entre os prótons da água e das hidroxilas; $\delta\omega_b$ é o deslocamento químico da hidroxila em relação à água; T_{2b} é o tempo de relaxação transversal dos prótons das hidroxilas (valores baixos de T_{2b} indicam, geralmente, um movimento lento dos grupos hidroxilas); τ é o intervalo de tempo entre a aplicação dos pulsos de 90° e 180° na seqüência CPMG, ou seja, é a variável que pode ser controlada pelo analista.

Segundo esse modelo, a água ligada à superfície dos carboidratos, anisotropicamente orientada, que também participa da solvatação do carboidrato e que apresenta curto tempo de residência, não é considerada.

Uma vez que a questão da estruturação das moléculas de água dentro da cavidade e ao redor das moléculas de ciclodextrinas é um assunto central neste estudo, o modelo para a dependência do tempo de relaxação transversal do solvente foi transposto para o modelo aplicado a soluções coloidais, que considera a fração de moléculas de água ao redor da partícula.^{33-34,60}

Segundo este modelo, os valores para o tempo de relaxação transversal T_2 do solvente, em uma solução coloidal, dependem da mobilidade relativa das moléculas livres e ligadas ao soluto. Para moléculas pequenas de solvente, o T_2 é proporcional ao inverso do tempo de correlação (τ_c), que está relacionado a processos dinâmicos moleculares, como a rotação.

As moléculas livres de solvente se movem isotropicamente na solução, apresentando τ_c relativamente pequeno e T_2 da ordem de segundos. Em contrapartida, as moléculas de solvente ligadas ao soluto perdem a alta mobilidade e o movimento molecular se torna mais restrito e anisotrópico, o que aumenta o τ_c e faz o T_2 diminuir.

A difusão rotacional da água, que é uma molécula não esférica, é sempre anisotrópica, necessitando de três tempos de correlação para descrever seu movimento, porém consegue-se medir apenas um valor médio para relacionar com o tempo de relaxação transversal.

Em um sistema onde ocorra troca rápida entre as moléculas de solvente, livres e ligadas, o tempo de relaxação é obtido através da taxa de relaxação média destas moléculas, de acordo com a Equação 14.³³⁻³⁴

$$R_2 = R_{2l} (1 - \rho) + R_{2s} \rho \quad \text{[Equação 14]}$$

onde R_2 é a constante da taxa de relaxação igual ao inverso de T_2 . R_{2l} e R_{2s} são constantes das taxas de relaxação para as moléculas de solvente livres e ligadas ao soluto, respectivamente, ρ é definido como a fração de solvente ligado à superfície do soluto relativo à quantidade total do solvente no sistema:³³⁻³⁴

$$\rho = k [\text{soluto}] / [\text{solvente}] \quad \text{[Equação 15]}$$

onde k é a concentração do solvente ligado à superfície de uma molécula do soluto.

Em sistemas diluídos, $\rho \ll 1$, pode-se assumir que R_{2l} é independente da concentração do soluto e com valor igual ao da taxa de relaxação do solvente puro. Desta forma, pode-se obter uma relação linear do inverso de R_2 do solvente com a concentração da solução combinando as Equações 14 e 15:³³⁻³⁴

$$R_2 = (k [\text{soluto}] / [\text{solvente}]) R_{2s} + R_{2l} \quad \text{[Equação 16]}$$

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 SOLUÇÕES DE CICLODEXTRINAS

Foram preparadas soluções, na faixa de concentração de 0,08 a 1, % (m/m), de α -CD, β -CD, γ -CD, glicose e dextrina (Sigma D-2006 lote 73H0041, usada como recebida) e, na faixa de 1 a 7% (m/m), de α -CD e γ -CD.

Todas as soluções foram preparadas de três a quatro dias antes das medidas de T_2 serem realizadas e mantidas, durante este período, em banho termostaticado a $25,00 \pm 0,01$ °C. Foi realizada também a medida do T_2 da água pura.

Para as medidas, foi utilizado um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Varian 500 MHz, modelo Inova, e a técnica de ecos de spin através da seqüência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)^{53,56-57} com os parâmetros otimizados (Apêndice C). Utilizou-se tubo de RMN com 5 mm de diâmetro interno e uma sonda de detecção indireta. Um capilar de benzeno deuterado contendo tetrametil-silano (TMS) foi colocado no tubo para fornecer uma referência e um sinal de deutério para travar o campo magnético e a radiofrequência. A temperatura foi fixada em 25,0 °C.

3.2.2 COMPLEXAÇÃO COM POLI (ETILENOGLICOL)

Foram preparadas soluções de α -CD, β -CD e γ -CD com poli (etilenoglicol) de massa molar 200 g mol^{-1} , PEG 200, (Sigma lote 67H1558, usado como recebido), de forma a fixar concentração das ciclodextrinas em 1% (m/m) e variar a concentração do polímero entre 0,05 e 2,5 % (m/m).

Para comparar com o efeito causado pela interação do PEG 200 com as ciclodextrinas, foram preparadas soluções do polímero na faixa de concentração 0,05 a 2,5 % (m/m).

Essas soluções foram preparadas independentemente, ou seja, não por diluição, e foram mantidas em banho termostatizado a $25,00 \pm 0,01$ °C por três a quatro dias para serem analisadas. As medidas de T_2 foram feitas no espectrômetro citado no item 3.2.1, utilizando a mesma técnica e o mesmo procedimento.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A presença de um soluto afeta o decaimento da magnetização transversal da água e a Figura 28 mostra como este decaimento ocorre para a água pura e para uma solução de glicose 1% (m/m), evidenciando como o T_2 da água é afetado pela presença do soluto, devido à estruturação das moléculas de água que solvatam o soluto. A presença de glicose, na concentração de 1% (m/m), diminui o T_2 da água de 2,54 segundos para 0,59 segundo.

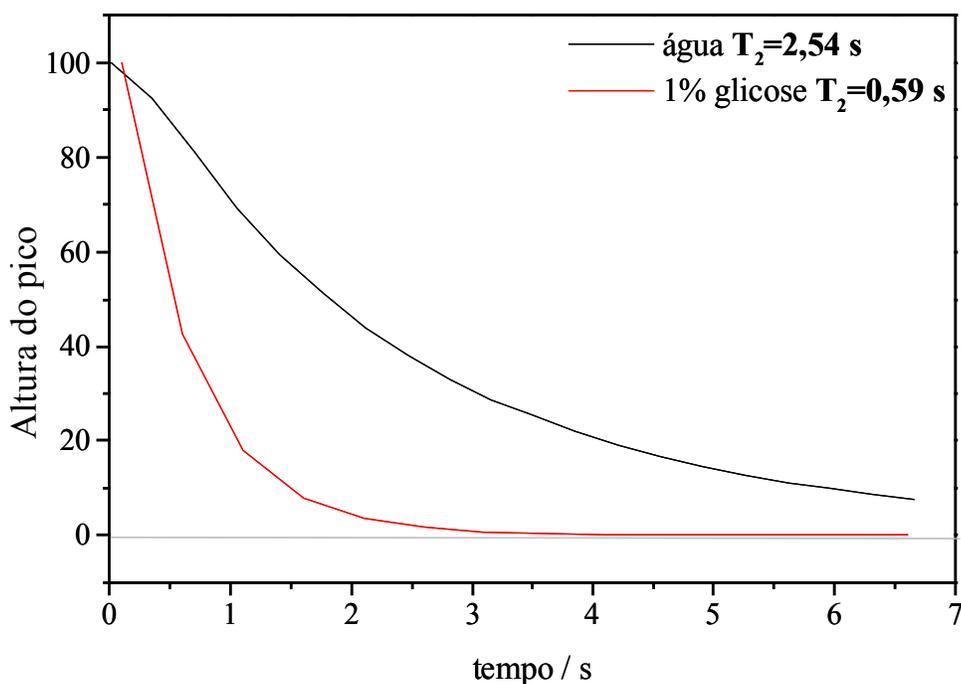


Figura 28. Influência de 1% de glicose no decaimento da altura do pico para a água.

Sabendo-se que os processos de relaxação nuclear dependem da existência de movimentos moleculares aleatórios geradores de campos magnéticos que variam ao acaso (B_1), é possível obter informações sobre esta dinâmica molecular a partir das velocidades ou dos tempos de relaxação medidos experimentalmente. Para tal, é necessário obter relações entre os tempos de relaxação e parâmetros característicos de movimentos moleculares, como o tempo de correlação (τ_c).⁵³

Conhecendo-se a eficiência das medidas do tempo de relaxação transversal, T_2 , no estudo de adsorção de polímeros sobre partículas de sílica coloidal,^{33-34,61-62} utilizou-se esta técnica para o estudo dos sistemas propostos, investigando a relaxação das moléculas da água, solvente das soluções.

A relaxação da água em soluções de α -CD, β -CD, γ -CD, glicose e de dextrina (polímero contendo unidades de glicose), na faixa de concentração 0,08 a 1 % (m/m) e 25°C foi estudada e os resultados estão contidos no gráfico da Figura 29, onde a relação linear, dada pela Eq. 13, é observada. O valor de R_{2l} foi obtido pela extrapolação das concentrações dos solutos para zero e é concordante com o valor obtido para a água pura, 0,39 s⁻¹. Observa-se que na faixa de concentração estudada, o tempo de relaxação das moléculas de água é praticamente igual para as três ciclodextrinas. Procurou-se, então, verificar o efeito da cavidade dessas moléculas na taxa de relaxação R_2 . Com este objetivo, foram estudadas soluções aquosas de glicose e de dextrina, que, intrinsecamente, não apresentam cavidade. Deve-se enfatizar que se optou pelo gráfico de R_2 em função da concentração em massa, de forma a obter a condição aproximada de que, em uma dada concentração, o número de moles de unidades de glicose fosse aproximadamente o mesmo para as três classes de açúcar. Nesse caso, pode-se inferir sobre a influência da estrutura molecular do soluto no tempo de relaxação das moléculas de água diretamente ligadas aos resíduos de glicose. Os erros nas medidas foram estimados a partir dos valores de R_2 da água pura (Apêndice D).

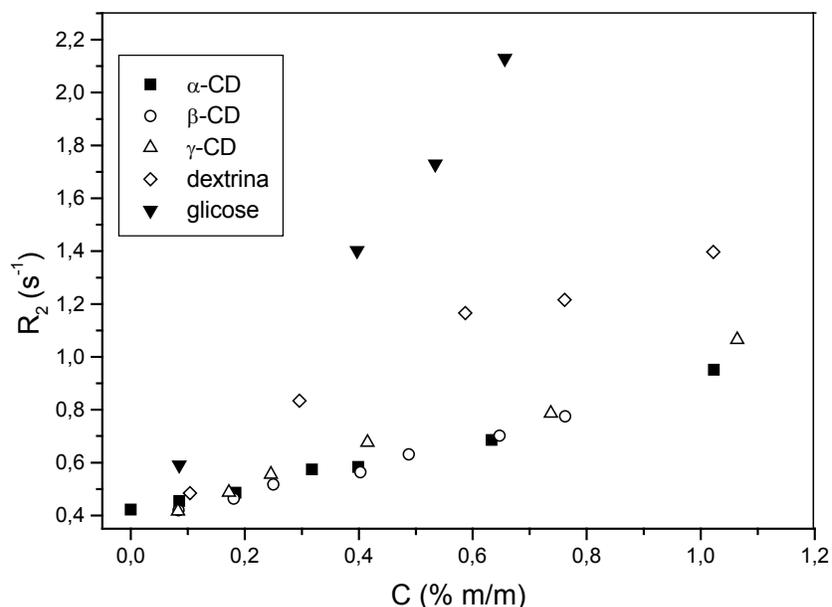


Figura 29. Comportamento linear comparativo da taxa de relaxação da água em função da concentração de açúcar para α -CD, β -CD, γ -CD, glicose e dextrina na faixa de concentração 0,08 a 1% a 25 °C.

Observou-se uma diferença significativa na taxa de relaxação das moléculas de água, que procuraremos explicar com base na interpretação de Halstead *et al.*,⁵⁹ sobre soluções de açúcares em água e de Cosgrove *et al.*^{33-34,61-62} nos estudos envolvendo dispersões de partículas.

A glicose é um açúcar simples de alta mobilidade estrutural que pode se apresentar na forma cíclica ou aberta. Na forma cíclica, a estrutura mais estável, existem duas conformações possíveis: cadeira e barco, onde a maior ou menor estabilidade depende da maior ou menor repulsão entre os substituintes dos átomos de carbono. Na forma aberta, as rotações em torno de suas ligações podem ocorrer mais facilmente.⁶³ O processo de mutarotação, em que um isômero se transforma em outro, em solução, através da abertura do anel, também contribui para a mobilidade da glicose, refletindo no T_{2b} .

As dextrinas são polímeros de glicose com estrutura química semelhante ao amido, porém de menor massa molar.⁶³ A flexibilidade destas moléculas é menor em relação à glicose, pois as rotações em torno das ligações se tornam mais

restritas, devido aos anéis de glicose permanecerem fechados. Desta forma, as rotações em torno das ligações glicosídicas devem ser as principais responsáveis pela mobilidade da cadeia polimérica.

As ciclodextrinas, como discutido nos capítulos anteriores, apresentam rigidez estrutural decorrente de sua ciclização, ou seja, a mobilidade relativa de cada unidade glicosídica é dificultada, assim como as rotações nos eixos das ligações.

Segundo o modelo utilizado por Halstead *et al.*,⁵⁹ a perda da mobilidade estrutural diminui a taxa de relaxação transversal da água, o que está principalmente relacionado com os valores de T_{2b} .

A Equação 13 mostra que, para esse modelo, a magnitude do efeito depende da concentração do açúcar, pois quanto maior for esta concentração, maior será o valor do parâmetro P_b , aumentando a taxa de relaxação spin-spin do solvente. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, este modelo não considera todas as moléculas de água que estão na esfera de solvatação do soluto.

A análise dos resultados foi também considerada, a partir do modelo de Cosgrove *et al.*,³³⁻³⁴ para a relaxação de água em soluções coloidais. Segundo esse modelo, o valor de T_2 observado, será ponderado pela fração total de moléculas ligadas ao soluto. Assim, os açúcares com menor esfera de hidratação, sem considerar os aspectos intrínsecos do modelo de Halstead *et al.*⁵⁹, são aqueles nos quais os valores de R_2 das moléculas de água são menores e, portanto, as menores inclinações da curva de R_2 em função da concentração do açúcar é observada. Na faixa de concentração estudada, as populações de moléculas de água estruturadas ao redor das moléculas de ciclodextrinas são próximas para as três ciclodextrinas. A configuração estrutural rígida dessas moléculas, aliada à presença da cavidade hidrofóbica, restringe sua solvatação. Para o polímero (dextrina), além da ausência de cavidade, a rigidez estrutural é menor e, portanto, a solvatação é mais efetiva, resultando em maiores valores para o R_2 da água. Porém, a configuração estrutural do polímero ainda não permite uma solvatação tão ampla como nas moléculas de glicose, que apresentou os maiores valores para R_2 da água, indicando que uma população

maior de moléculas de água está estruturada na esfera de solvatação das moléculas de glicose.

Baseado nos estudos de dinâmica molecular de Naidoo *et al.*¹⁰ sobre a estruturação das moléculas de água dentro da cavidade e ao redor das ciclodextrinas, procurou-se diferenciar as populações de água de solvatação das três ciclodextrinas. Para tanto, realizou-se um estudo a partir dos valores de R_2 da água em soluções de α -CD e γ -CD, na faixa de concentração de 1 a 7 % (m/m). Soluções de β -CD não foram estudadas devido à baixa solubilidade deste açúcar, em relação aos outros dois. Porém, mesmo em concentrações mais elevadas, não é possível distinguir, por esta técnica, qual ciclodextrina é mais efetivamente solvatada. Os dados podem ser observados no gráfico da Figura 30.

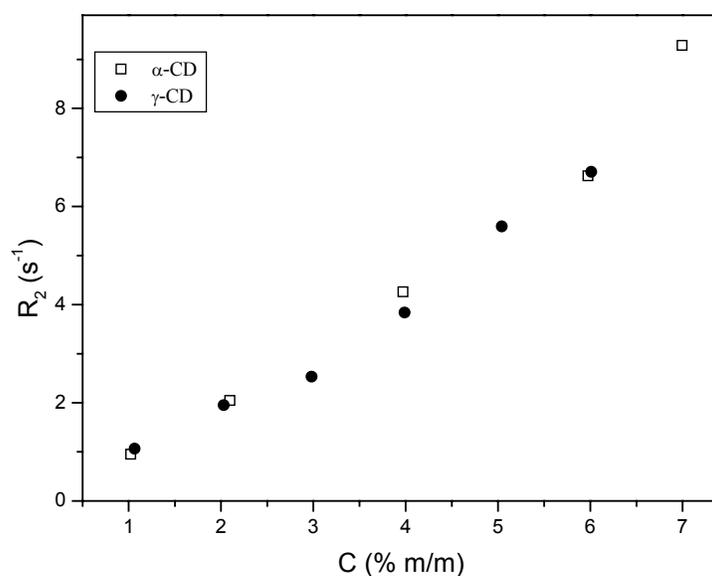


Figura 30. Comportamento linear comparativo da taxa de relaxação da água em função da concentração de açúcar para soluções de α -CD e γ -CD, na faixa de concentração 1 a 7% (m/m) a 25 °C.

O estudo preliminar sobre complexação de ciclodextrinas com poli (etilenoglicol) de baixa massa molar mostrou como a formação das estruturas supramoleculares afeta o T_2 do solvente. Esse experimento foi também concebido, por considerar que a formação do complexo envolve a liberação das moléculas de

água do interior da cavidade das ciclodextrinas. Em solução, as moléculas de α -, β - e γ -CD podem conter, respectivamente 2, 6,5 e 5,3 moléculas de água, em média, no interior de suas cavidades.⁶

Os dados deste estudo estão expressos em valores de T_2 , e não de R_2 como nas soluções dos açúcares, pois o efeito da complexação é pequeno e melhor visualizado usando o tempo de relaxação transversal.

Os resultados obtidos estão apresentados no gráfico da Figura 31. Observa-se que T_2 da água também é significativamente afetado pela presença de PEG 200, pois o tempo de relaxação transversal do solvente é sensível à interação entre soluto e solvente. Como nas soluções contendo PEG e os açúcares (concentração fixa em 1%) a população total de soluto é maior, os valores de T_2 encontrados são menores que para as soluções contendo apenas polímero.

Como a β -CD não sofre complexação com PEG de nenhuma massa molar,⁸ o efeito observado deve-se apenas ao efeito aditivo da quantidade de soluto presente nas soluções e a curva dessas soluções localiza-se numa região de maiores valores de T_2 , em relação às demais ciclodextrinas. Por outro lado, a curva para as soluções contendo γ -CD está muito próxima daquela para as soluções contendo α -CD, pois aquele açúcar também se complexa com PEG, sendo que, neste caso, duas moléculas do polímero conseguem penetrar em uma molécula de γ -CD, devido à maior cavidade desta ciclodextrina.³¹

A interpretação deste resultado é bastante complexa, uma vez que, além da saída de moléculas de água da cavidade das ciclodextrinas, ocorre também a dessorção das moléculas de água das cadeias poliméricas. Era esperado que os dois processos aumentassem o valor do T_2 da água, pois aumentaria o número de moléculas de solvente livres. Entretanto, a formação da estrutura supramolecular pode envolver uma redução da mobilidade molecular e mesmo alterar a população de moléculas de água que solvatam o complexo.

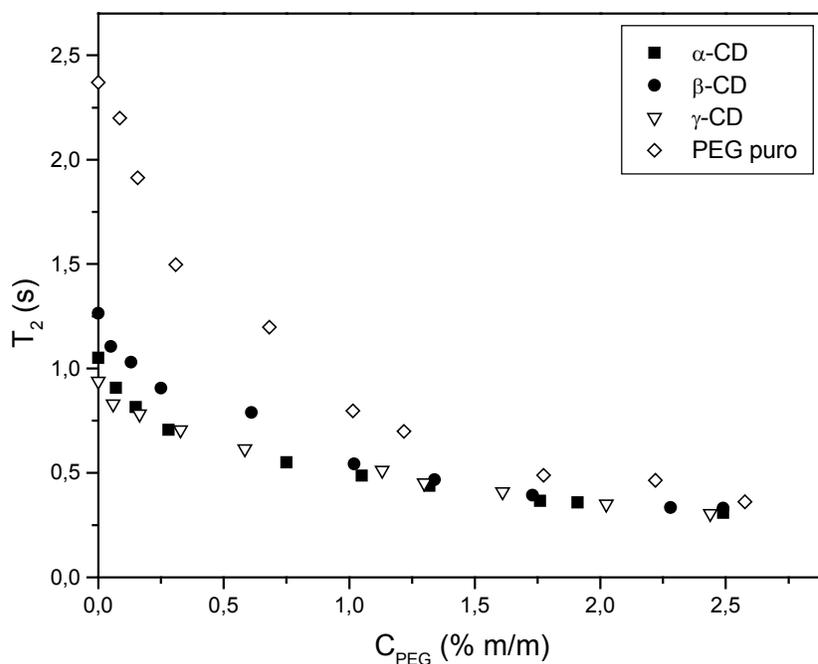


Figura 31. Dependência do T_2 da água em soluções dos complexos de PEG 200 g mol^{-1} com α -CD, β -CD e γ -CD (na concentração de 1% m/m) e em soluções do polímero puro.

A diferença entre o comportamento dos sistemas contendo α -CD e γ -CD do da β -CD ocorre na faixa de concentração 0 a 1 % (m/m) de PEG. Porém, nas concentrações mais elevadas, observa-se que ocorre a convergência para um dado valor de T_2 . O efeito de formação das polipseudorotaxanas é suprimido pelo efeito causado pelo excesso do soluto polimérico, uma vez que a relação estequiométrica entre PEG e ciclodextrina é, teoricamente, obtida na concentração de 0,15 % de PEG para a α -CD e, em 0,08%, para a γ -CD. Adicionalmente, o efeito da concentração de PEG 200 sobre o T_2 da água se torna preponderante.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES

A solubilidade anômala da série homóloga de ciclodextrinas, em água, é também observada para D₂O, porém neste solvente, os oligossacarídeos são muito menos solúveis. Para os dois solventes, a diferença relativa na solubilidade da γ -CD é menor que para as outras duas ciclodextrinas, devido à diferença de energia envolvida no processo de dissolução dos açúcares por estes solventes, pois o efeito hidrofóbico é muito mais acentuado em água deuterada para solutos apolares grandes. As ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas de D₂O são mais intensas que nas de H₂O.

Os dados obtidos por Difractometria de Raios-X e Análise Termogravimétrica mostraram que o número de moléculas de água presentes nos hidratos das ciclodextrinas é o mesmo para H₂O e D₂O e que a estrutura cristalina destes hidratos é pouco afetada pela diferença isotópica. Ou seja, a solubilidade e a solvatação desses oligossacarídeos são propriedades apenas da solução.

A solubilidade é diretamente afetada pela forma como as moléculas do solvente se estruturam na superfície do oligossacarídeo e pela flexibilidade relativa de cada uma das ciclodextrinas. A β -CD é o carboidrato menos flexível da série homóloga e o que estrutura maior número de moléculas de água. Isto reflete em sua menor solubilidade, em relação a α -CD e γ -CD.

A solvatação dos açúcares pelas moléculas de água está intimamente ligada à configuração estrutural do soluto e à flexibilidade deste, influenciando no tempo de relaxação transversal, T₂, das moléculas deste solvente. Isso advém do fato de as moléculas de água estruturadas na superfície do soluto se moverem mais anisotropicamente que as moléculas livres. Entretanto, através de medidas de relaxação transversal, não foram observadas diferenças na população de água de solvatação entre as ciclodextrinas nativas. A estrutura rígida e a presença de cavidade hidrofóbica restringem a solvatação das ciclodextrinas, diminuindo sua esfera de hidratação e, portanto, a taxa de relaxação da água nas soluções destes açúcares.

As medidas de T_2 das moléculas de água mostraram-se muito sensíveis à flexibilidade intrínseca das moléculas do açúcar estudado. Para uma mesma concentração, os valores de T_2 da água diminuem conforme o açúcar se torna menos flexível: $T_{2, \text{glicose aquosa}} > T_{2, \text{dextrina aquosa}} > T_{2, \text{ciclodextrinas aquosas}}$.

A complexação da α -CD e da γ -CD com PEG pôde ser acompanhada por medidas do T_2 do solvente, mostrando um decréscimo nestes valores em relação às soluções contendo o polímero e β -CD. A formação da estrutura supramolecular envolveu uma redução da mobilidade molecular e, até mesmo, pode ter alterado a população de moléculas de água que solvatavam o complexo.

APÊNDICES

APÊNDICE A

CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA SOLUÇÕES DE GLICOSE EM H₂O E EM D₂O

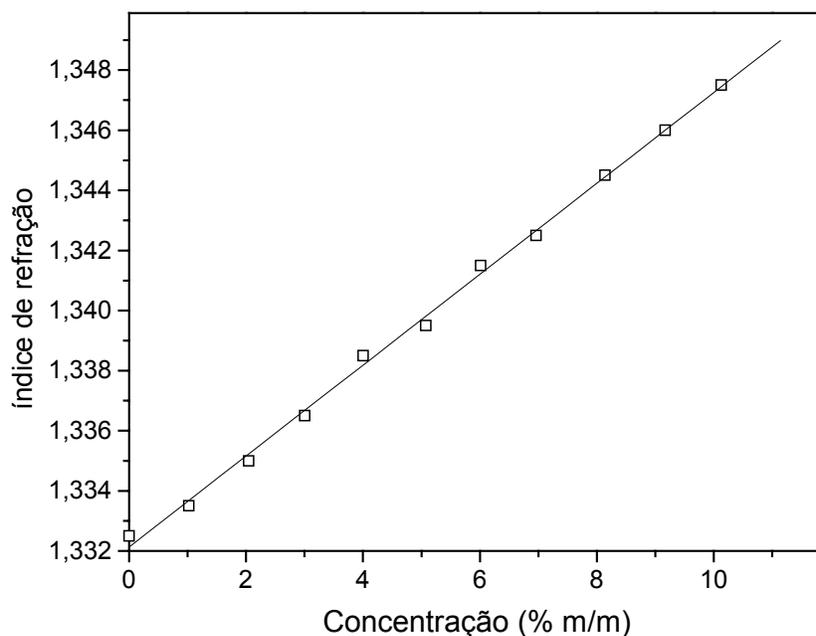


Figura A.1. Curva de calibração para soluções de glicose em H₂O, obtida através de medidas de índice de refração.

$$n = 1,3321 + 0,0015 \times C$$

$$\text{correlação} = 0,99895$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,3325 \text{ (medido experimentalmente)}$$

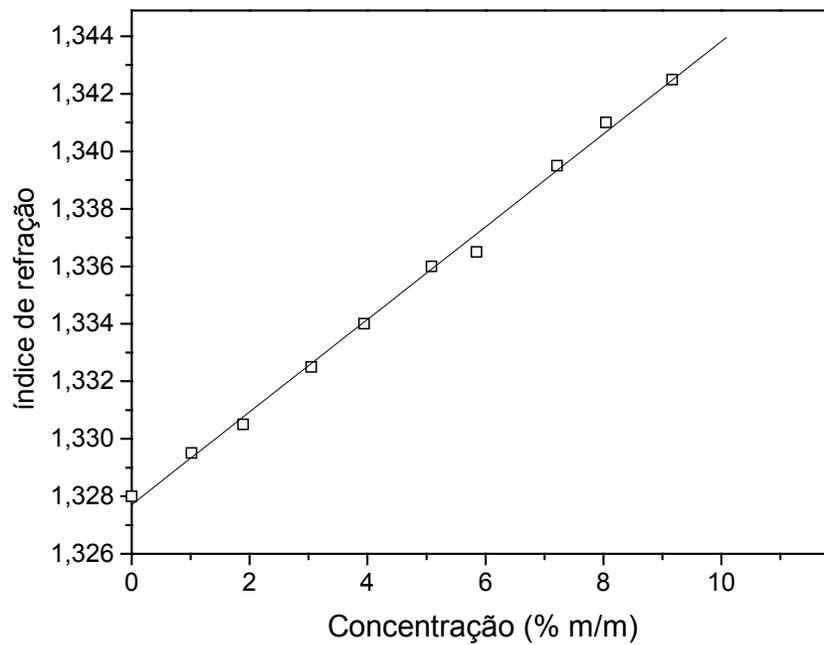


Figura A.2. Curva de calibração para soluções de glicose em D₂O, obtida através de medidas de índice de refração.

$$n = 1,3274 + 0,0017 \times C$$

$$\text{correlação} = 0,9984$$

$$n_{D_2O} = 1,3280 \text{ (medido experimentalmente)}$$

APÊNDICE B

ESTIMATIVA DA SOLUBILIDADE DA GLICOSE EM H₂O A 25 °C

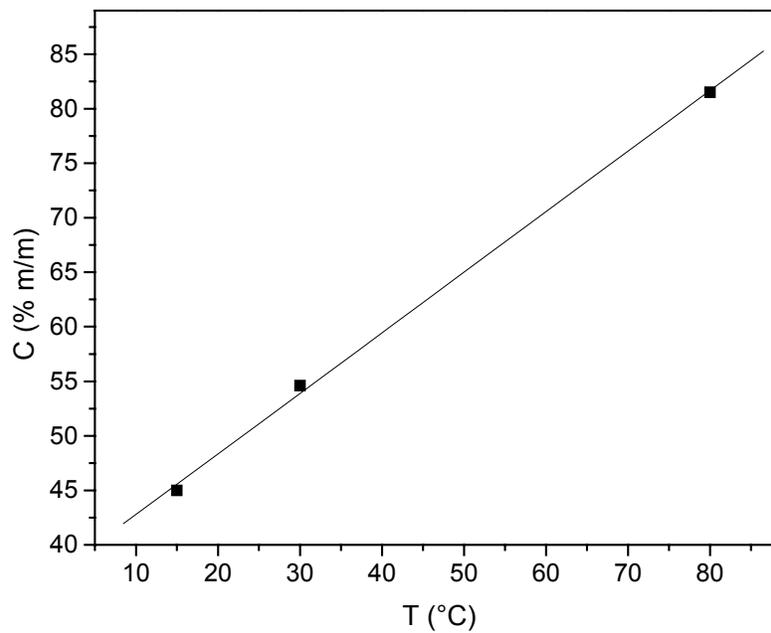


Figura B.1. Regressão linear para estimativa da solubilidade da glicose de 25°C.⁴⁵

$$C = 37,2162 + 0,5556 \times T$$

$$\text{Correlação} = 0,9994$$

À temperatura de 25 °C, a solubilidade estimada da glicose é 51,1 % (m/m).

APÊNDICE C

PARÂMETROS OTIMIZADOS UTILIZADOS NAS MEDIDAS DE T_2 PARA A SEQUÊNCIA DE PULSOS CPMG

d_1 = 5,000 s (tempo para o sistema voltar ao equilíbrio após a seqüência de pulsos)

d_2 = 0,001 s (tempo entre as aplicações dos pulsos de 90° e 180°)

p_w = 6,8 μ s (duração do pulso de 90°)

p_1 = 13,6 μ s (duração do pulso de 180°)

bt = variável de acordo com a amostra, com número de valores entre 10 e 15. É o tempo total da relaxação transversal.

at = 3 s (tempo de aquisição)

nt = 4 (número de transientes)

APÊNDICE D

ESTIMATIVA DO ERRO NAS MEDIDAS DE R_2 A PARTIR DOS VALORES OBTIDOS PARA A ÁGUA PURA

Número de medidas = 5

Valores medidos = 0,39; 0,42; 0,40; 0,37; 0,40 s^{-1}

R_2 médio = 0,40 s^{-1}

Desvio padrão = 0,02 s^{-1}

Erro = 0,01 s^{-1}

* valores obtidos a partir de análise estatística realizada pelo programa computacional Origin, versão 5.0.

BIBLIOGRAFIA

1. Villiers, A. *Rend. Acad. Sci.* **1891**, 112, 536.
2. K. Freudenberg, F. Cramer; H. Plieninger, *German patent No. 895, 769*, **1953**.
3. van den Boogaard, M. *Cyclodextrin-containing supramolecular structures from pseudo-polyrotaxanes towards molecular tubes, insulated molecular wires and topological networks*, Ph.D. Thesis, University of Groningen, The Netherlands, 2003.
4. <http://www.cyclodex.com>, acessada em agosto de 2005.
5. Harata, K. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1803.
6. Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1325.
7. Wacker Basis, 2000.
8. Harada, A. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 148, 115.
9. Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743.
10. Naidoo, K. J.; Chen, J. Y.; Jansson, J. L. M.; Widmalm, G.; Maliniak, A. J. *Phys. Chem. B* **2004**, 108, 4236.
11. Hummer, G.; Garde, S.; García, A. E.; Pratt, L. R. *Chem. Phys.* **2000**, 258, 349.
12. Linert, W.; Margl, P.; Renz, F. *Chem. Phys.* **1992**, 161, 327.
13. Hall, N. *The New Chemistry*, Cambridge University Press, United Kingdom, **2000**.
14. <http://www.dq.ufscar.br/Labs/LACREMM/supra.html>, acessada em agosto de 2005.
15. Lehn, J. M. *Science* **1985**, 227, 849.
16. Conn, M. M.; Rebek Jr., J. *Chem Rev.* **1997**, 97, 1647.
17. Harada, A. *Supramol. Sci.* **1996**, 3, 19.
18. Hamdan, A. A.; Bugnon, P.; Sandan, C.; Lye, G. P.; Merbach, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 592.
19. Rusa, C. C.; Luca, C.; Tonelli, A. E. *Macromolecules* **2001**, 34, 1318.
20. Shuai, X.; Merdan, T.; Unger, F.; Kissel, T. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 322.
21. Ohira, A.; Sakata, M.; Tanigushi, I.; Hirayama, C.; Kunitake, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5057.
22. Gafni, A.; Cohen, Y. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 120.
23. Sigurdsson, H. H.; Stéfansson, E.; Gudmundsdóttir, E.; Eysteinnsson, T.; Thorsteinsdóttir, M.; Loftsson, T. *J. Control. Rel.* **2005**, 102, 255.
24. Zingone, G.; Rubessa, F. *Int. J. Pharm.* **2005**, 291, 3.
25. Winters, C. S.; York, P.; Timmins, P. *European J. Pharm. Sci.* **1997**, 5, 209.
26. Bonato, P.S.; Jabor, V. A. P. *Quím. Nova* **2005**, 28, 683.
27. Harada, A.; Kamachi, M. *Macromolecules* **1990**, 23, 2821.
28. Sabadini, E.; Cosgrove, T.; Taweeprada, W. *Langmuir* **2003**, 19, 4812.

29. Topchieva, I. N.; Tonelli, A. E.; Panova, I. G.; Matuchina, E. V.; Kalashnikov, F. A.; Gerasimov, V. I.; Rusa, C. C.; Rusa, M.; Hunt, M.A. *Langmuir* **2004**, *20*, 9036.
30. Ceccato, M.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. *Langmuir* **1997**, *13*, 2436.
31. Panova, I. G.; Gerasimov, V. I.; Kalashnikov, F. A.; Topchieva, I. N. *Vysok. Soed. B* **1998**, *40*, 2077.
32. Lo Nostro, P.; Lopes, J. R.; Cardelli, C. *Langmuir* **2001**, *17*, 4610.
33. Mears, S. J.; Cosgrove, T.; Thompson, L.; Howell, I. *Langmuir* **1998**, *14*, 997.
34. Nelson, A.; Jack, K. S.; Cosgrove, T.; Kozak, D. *Langmuir* **2002**, *18*, 2750.
35. Tait, C. N.; Davies, D. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 2453.
36. Jozwiakowski, M. J.; Connors, K. A. *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 51.
37. Danil de Namor, A. F.; Traboulssi, R.; Lewis, D. F. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8442.
38. Bastos, M.; Milheiras, S.; Bai, G. *Thermochim. Acta* **2004**, *420*, 111.
39. Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1545.
40. Frank, H. S.; Evans, M. W. *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 507.
41. Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521.
42. Kestin, J.; Sengers, J. V.; Kamgar-Parsi, B.; Levelt Sengers, J. M. H. (a) *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1984**, *13*, 175. (b) *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1984**, *13*, 601.
43. McQuarrie, D. A.; Simon, J. D. *Physical Chemistry – A Molecular Approach*, University Science Books, California, **1997**.
44. *The Merck Index*, 12th ed., Merck & Co., Inc., New Jersey, **1996**.
45. *Handbook of Chemistry and Physics*, 85th ed., CRC Press, Florida, **2004**.
46. Saenger, W.; Jacob, J.; Gessler, K.; Steiner, T.; Hoffmann, D.; Sanbe, H.; Koizumi, K.; Smith, S. M.; Takaha, T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1787.
47. Casu, B.; Reggiani, M.; Gallo, G. G.; Vigevani, A. *Tetrahedron* **1966**, *22*, 3061.
48. Casu, B.; Gallo, G. G.; Reggiani, M.; Vigevani, A. *J. Chem. Soc., Spec. Publ.*, **1968**, *23*, 217.
49. Saenger, W.; Betzel, Ch.; Hingerty, B.; Brown, G. M. *Nature* **1982**, *296*, 581.
50. Betzel, Ch.; Saenger, W.; Hingerty, B.; Brown, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7545.
51. Nakai, Y.; Yamamoto, K.; Terada, K.; Kajiyama, A.; Sasaki, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2178.
52. Rusa, C. C.; Bullions, T. A.; Fox, J.; Porbeni, F. E.; Wang, X.; Tonelli, A. E. *Langmuir* **2002**, *18*, 10016.
53. Gil, V. M. S.; Geraldés, C. F. G. C. *Ressonância Magnética Nuclear Fundamentos, Métodos e Aplicações*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, **1987**.
54. Hore, P. J. *Nuclear Magnetic Resonance*, The Bath Press, Great Britain, **1998**.
55. Hahn, E. L. *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580.
56. Carr, H. Y.; Purcell, E. M. *Phys. Rev.* **1954**, *94*, 630.
57. Meiboom, S.; Gill, D. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29*, 688.

58. Atkins, P. W. *Físico Química*, 6^a ed, vol. 2, LTC Editora S.A., Rio de Janeiro, **1999**.
59. Fabri, D.; Williams, M. A. K.; Halstead, T. K. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 889.
60. Piculell, L. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **1986**, *82*, 387.
61. Cosgrove, T.; Griffiths, P. C.; Lloyd, P. M. *Langmuir* **1995**, *11*, 1457.
62. van der Beek, G. P.; Stuart, M. A.C.; Cosgrove, T. *Langmuir* **1991**, *7*, 327.
63. Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. *Introdução à Química de Alimentos*, 2^a ed, Livraria Varela Ltda., São Paulo, **1989**.