



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2009

**Mariana Isabel
Coutinho Rodrigues
Sardo**

**Interacções Intermoleculares Fracas em Materiais
Funcionais Avançados**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2009

**Mariana Isabel
Coutinho Rodrigues
Sardo**

**Interacções Intermoleculares Fracas em Materiais
Funcionais Avançados: um estudo espectroscópico
e computacional**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Paulo Jorge de Almeida Ribeiro Claro, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio (Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/23400/2005).

Aos meus Pais: Isabel e Vitor

o júri

presidente

Prof. Dr. Manuel Augusto Marques da Silva
professor catedrático do Departamento de Geociências da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Juan Carlos Otero Fernández de Molina
professor catedrático do Departamento de Química-Física da Universidade de Málaga, Espanha

Prof. Dr. José Joaquim Cristino Teixeira Dias
professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria das Dores Melo da Cruz Ribeiro da Silva
professora associada com agregação da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Doutor Paulo Jorge de Almeida Ribeiro Claro
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Pedro Miguel Duarte Vaz
investigador auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à Universidade de Aveiro, ao Departamento de Química e ao Centro de Investigação de Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) por terem criado as condições necessárias à realização desta dissertação. À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pela bolsa de Doutoramento (SFRH / BD / 23400 / 2005) e pelo apoio concedido à participação em conferências internacionais.

Ao orientador deste trabalho de investigação, Professor Paulo Ribeiro Claro, por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades, pelo incentivo e apoio na realização da tese, orientação científica prestada, disponibilidade para esclarecimento de dúvidas e amizade demonstrada.

Ao Professor Juan Carlos Otero, uma palavra de apreço pela forma amável como me acolheu em Málaga, pela disponibilidade científica e pessoal, que tornou a minha estadia muito positiva a todos os níveis. ¡Gracias! Uma palavra de agradecimento também aos Professores Isabel López Tocón, José Luis Castro, Juan Soto e Juan Arenas pela ajuda e disponibilidade demonstradas.

Um agradecimento à Guida pela discussão de alguns temas científicos e ensinamentos no início dos trabalhos de doutoramento.

A todos os colegas do Departamento de Química, pela ajuda na resolução de pequenas dificuldades, pelo excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram e pela amizade. Em especial queria agradecer à Vânia, Márcia, Isabel e Sérgio Santos pelas conversas, boa disposição e conselhos preciosos.

O meu agradecimento à Mariela, companheira de tantas horas de trabalho, e também à Cristina Ruano por me ter ensinado tantas coisas de espanhol, pelas tão produtivas discussões científicas, pela amizade sincera, por ter tornado tão agradável o meu trabalho em Málaga, a nível profissional e pessoal *“hecho de menos a nuestras conversaciones”*.

À Daniela, por estar sempre lá, onde é preciso, na hora em que é preciso.

Ao João. Por fazer parte do meu projecto de vida. Ter-te na minha vida faz-me muito feliz.

À minha irmã, por ser um exemplo a seguir: um exemplo de determinação e sabedoria.

Aos meus PAIS pela força e coragem que sempre me transmitiram e principalmente pelo exemplo de vida que são todos os dias e por tudo o que me ensinaram.

palavras-chave

Ligações de hidrogénio, espectroscopia vibracional, cálculos DFT, ciclodextrinas, polimorfismo, agregados de água.

resumo

A utilização combinada de espectroscopia vibracional e de cálculos envolvendo a teoria do funcional de densidade (DFT) possibilita o estudo de ligações de hidrogénio em fase condensada, assim como a análise da estrutura molecular dos sistemas em estudo. Por um lado, a espectroscopia vibracional permite a detecção de associações moleculares, enquanto os métodos computacionais auxiliam na obtenção de informação referente aos mecanismos de associação, nomeadamente no que diz respeito à possível estrutura de dímeros e compostos de inclusão em ciclodextrinas e às energias de interacção e de inclusão.

O estudo que originou a presente dissertação pretende contribuir para o reforço da aplicação de estudos espectroscópicos e computacionais na elucidação de diversos fenómenos químicos, com especial destaque para o papel desempenhado por interacções intermoleculares fracas na estrutura e propriedades de materiais moleculares. No âmbito desta tese foram investigados os seguintes tópicos: polimorfismo e pseudopolimorfismo em sólidos farmacêuticos, transições de fase em misturas binárias de ácidos gordos, inclusão em ciclodextrinas, interacção de compostos farmacêuticos com superfícies metálicas e formação de agregados de água em materiais híbridos orgânicos-inorgânicos.

Os sistemas foram analisados utilizando a espectroscopia vibracional – particularmente a espectroscopia de difusão de Raman – como técnica fundamental. Para uma melhor caracterização de processos envolvendo transições de fase, foram efectuados estudos com variação de temperatura, variação de humidade relativa e substituição isotópica. O estudo da interacção com superfícies metálicas foi realizado por espectroscopia de Raman intensificada à superfície.

Dada a complexidade dos sistemas em estudo, a informação obtida por espectroscopia vibracional foi complementada por resultados de cálculos mecânico-quânticos. Em particular, os cálculos DFT foram utilizados para a optimização de geometrias e previsão de frequências vibracionais de moléculas e associações moleculares, permitindo assim a análise e interpretação de espectros vibracionais e a caracterização da estrutura de materiais.

keywords

Hydrogen bonding, vibrational spectroscopy, DFT calculations, cyclodextrins, polymorphism, water clusters.

abstract

The characterisation of hydrogen bonds in condensed phase and analysis of molecular structure for several systems is possible combining the use of vibrational spectroscopy and DFT calculations. While vibrational spectroscopic techniques allow the detection of molecular associations, computational methods help assemble information regarding association mechanisms, especially viable dimer structures and inclusion compounds in cyclodextrins (interaction and inclusion energies).

The research work developed throughout the course of the present thesis aims to strengthen the application of spectroscopic and computational studies in the elucidation of several chemical phenomena, with special emphasis on the role of weak intermolecular interactions in the structure and properties of molecular materials. The following topics were explored: polymorphism and pseudopolymorphism in pharmaceutical solids, phase transitions in binary mixtures of fatty acids, inclusion compounds in cyclodextrins, interaction of pharmaceutical drugs with metal surfaces and formation of water clusters in hybrid organic-inorganic materials.

The aforementioned systems were analysed using vibrational spectroscopy – mainly Raman spectroscopy – as a fundamental tool. In order to improve global understanding of processes involving phase transition, several studies were performed with temperature variation, relative humidity variation and isotopic substitution. The study of the interaction with metal surfaces was performed using surface-enhanced Raman spectroscopy.

Due to the complexity of the systems, the information obtained from vibrational spectroscopy was complemented by results provided by mechanical-quantum methods. In particular, DFT calculations were used in order to optimise geometries and predict vibrational frequencies of molecules and molecular associations, promoting the analysis and interpretation of vibrational spectra and the structural characterisation of materials.

Conteúdos Gerais	xv
Lista de Figuras	xx
Lista de Tabelas	xxvi
Abreviaturas e Símbolos	xxviii

CONTEÚDOS GERAIS

Capítulo 1. Enquadramento Científico

Resumo.....	3
1.1. Contextualização.....	4
1.2. Interações Intermoleculares.....	4
1.2.1. Ligação de Hidrogénio.....	5
DESCRICÃO.....	5
CLASSIFICAÇÃO.....	7
LIGAÇÃO DE HIDROGÉNIO FRACA.....	8
NATUREZA DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO.....	9
PARÂMETROS GEOMÉTRICOS E ENERGÉTICOS.....	10
CARACTERIZAÇÃO.....	12
1.3. Exemplos da ocorrência de ligações de hidrogénio.....	13
1.3.1. Sistemas orgânicos, bioquímicos e organometálicos.....	13
1.3.2. Materiais Funcionais Avançados.....	18
1.3.3. Polimorfos e Pseudopolimorfos.....	19
1.3.4. Sistemas hóspede-hospedeiro.....	22
1.3.5. Agregados de água em materiais funcionais.....	25
1.4. Objectivos da dissertação.....	27
1.5. Publicações científicas.....	30
1.6. Referências.....	31

Capítulo 2. Estudos espectroscópicos e computacionais

Resumo.....	41
2.1. Espectroscopia Vibracional.....	42
2.1.1. Técnicas de estudo.....	42
2.1.2. Aplicação ao estudo de Ligações de Hidrogénio.....	44

2.1.3. Propriedades vibracionais da ligação de Hidrogénio	47
BANDA DE ELONGAÇÃO A-H	47
PARÂMETROS ESTRUTURAIS, ENERGÉTICOS E VIBRACIONAIS DA LIGAÇÃO A-H.....	47
2.1.4. Estudo de interacções hóspede-hospedeiro.....	49
2.2. Métodos Computacionais.....	50
FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	51
2.2.1. Aplicação ao estudo de Ligações de Hidrogénio.....	53
2.3. Referências	56

Capítulo 3. Análise Espectroscópica de transições anidro-hidrato em sólidos farmacêuticos

Resumo	63
3.1. Introdução	64
TRANSIÇÕES POLIMÓRFICAS E PSEUDOPOLIMÓRFICAS	64
NICLOSAMIDA	65
3.2. Metodologia aplicada à monitorização de transições pseudopolimórficas	68
3.3. Resultados e discussão	71
3.3.1. Regiões espectrais mais sensíveis às transições pseudopolimórficas.....	71
3.3.2. Calibração	73
3.3.3. Determinação dos mecanismos associados às transições anidro↔hidrato.....	76
HIDRATAÇÃO DA NICLOSAMIDA ANIDRA	76
DESIDRATAÇÃO DA NICLOSAMIDA HIDRATADA.....	78
3.3.4. Determinação do valor de RH crítica nos processos de hidratação e desidratação	81
3.4. Conclusões	83
3.5. Referências	85

Capítulo 4. Pares em Materiais Moleculares: PiMM

Resumo	91
4.1. Metodologia PiMM: descrição.....	92
CASOS DE ESTUDO	93
4.2. Polimorfismo de sólidos farmacêuticos: Nitrofurantoína.....	93
4.2.1. Pares moleculares mais relevantes existentes nas estruturas cristalinas.....	94
4.2.2. Atribuição vibracional baseada na aplicação da metodologia PiMM	101
4.2.3. Estatística da aplicação da metodologia PiMM em sólidos farmacêuticos	110
4.2.4. Discussão.....	112

4.3.	Diagramas de fase sólido-líquido de misturas binárias de ácidos gordos.....	113
4.3.1.	Sistemas em estudo	114
4.3.2.	Resultados e discussão.....	116
4.3.3.	Conclusões.....	124
4.4.	Referências.....	125

Capítulo 5. Inclusão de compostos aromáticos em ciclodextrinas

Resumo.....	131	
5.1.	Introdução.....	132
5.2.	Caracterização de compostos de inclusão de alguns derivados do fenol	133
5.2.1.	Moléculas hóspede	133
5.2.2.	Resultados e discussão	140
	ESTUDOS TÉRMICOS (TG E DSC)	140
	ESPECTROSCOPIA DE RAMAN	142
	GEOMETRIAS DE INCLUSÃO	151
5.3.	Conclusões	155
5.4.	Referências.....	157

Capítulo 6. Análise de sólidos farmacêuticos por SERS

Resumo.....	165	
6.1.	Características Gerais da Espectroscopia de Raman intensificada à superfície	166
6.1.1.	Factores que influenciam a intensificação SERS.....	169
	NATUREZA DO ADSORBATO	169
	NATUREZA E MORFOLOGIA DO METAL.....	169
6.1.2.	Mecanismos de intensificação	170
	ELECTROMAGNÉTICO (EM)	171
	QUÍMICO OU DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA (CT).....	172
6.1.3.	Técnicas de aquisição de espectros experimentais.....	174
6.2.	Detecção de processos CT nos espectros SERS de sólidos farmacêuticos	175
6.2.1.	Ácido trans-3-Hidroxicinâmico	175
6.2.1.1.	Resultados e discussão	176
6.2.2.	5-Fluorouracil	182
6.2.2.1.	Resultados e discussão	183
6.3.	Conclusão	191

6.4. Referências	192
------------------------	-----

Capítulo 7. Caracterização de agregados de água

Resumo	199
7.1. Conceitos Gerais.....	200
7.1.1. Agregados de água.....	200
7.1.2. Aplicação de métodos computacionais	201
7.2. Rede 3D de moléculas de água.....	201
7.2.1. Métodos computacionais na determinação da estabilidade de agregados de água.....	202
7.2.2. Estudos espectroscópicos	206
7.3. Rede 2D de moléculas de água.....	210
7.4. Conclusões.....	216
7.5. Referências	217

Capítulo 8. Considerações finais

8.1. Discussão final.....	221
PSEUDOPOLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS	221
POLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS E TRANSIÇÃO DE FASE DE MISTURAS DE ÁCIDOS GORDOS	221
COMPOSTOS AROMÁTICOS INCLUÍDOS EM CICLODEXTRINAS	222
INTERACÇÃO DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS COM SUPERFÍCIES METÁLICAS	222
AGREGADOS DE ÁGUA EM MATERIAIS HÍBRIDOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS	223
8.2. Perspectivas Futuras	224
PSEUDOPOLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS	224
PARES EM MATERIAIS MOLECULARES	224
AGREGADOS DE ÁGUA EM MATERIAIS HÍBRIDOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS	224

Capítulo 9. Métodos experimentais e computacionais

SECÇÃO EXPERIMENTAL.....	231
9.1. Materiais.....	231
9.2. Preparação de amostras de niclosamida hidratada	231
9.3. Preparação de amostras de niclosamida a humidades relativas definidas	232
9.4. Estudos de calibração para o sistema niclosamida.....	233
9.5. Preparação das duas formas polimórficas da Nitrofurantoína.....	233

9.6. Preparação de várias misturas binárias de ácidos gordos	233
9.7. Preparação de compostos de inclusão de derivados fenólicos em α -, β - e γ -ciclodextrinas	234
9.8. Preparação de colóides para registo de espectros SERS.....	234
9.9. Preparação da superfície do eléctrodo e das soluções necessárias à obtenção de espectros SERS em eléctrodo	235
9.10. Estudos de deuteração com $(\text{H}_2\text{pip})_3[\text{Ge}(\text{hedp})_2]\cdot 14(\text{H}_2\text{O})$	237
INSTRUMENTAÇÃO.....	237
9.11. Técnicas de caracterização.....	237
9.11.1. Espectroscopia de Raman	237
9.11.2. Espectroscopia de Infravermelho	238
9.11.3. Espectroscopia de Raman intensificada à superfície (SERS)	239
9.11.4. Análises termogravimétricas e calorimétricas	239
TRATAMENTO DE DADOS	240
9.12. Obtenção de pontos pseudo-isobésticos e ajuste de bandas.....	240
9.13. Tratamento matemático	241
MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	241
9.14. Cálculos DFT	241
9.15. Referências.....	243

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Enquadramento Científico

Figura 1.1 - Definição dos parâmetros geométricos d , D , r , θ e ϕ para uma ligação de hidrogénio.....	10
Figura 1.2 - Representação esquemática da energia potencial de uma ligação de hidrogénio em função da distância internuclear.	11
Figura 1.3 - Em muitos ácidos cubanocarboxílicos, os grupos carboxílicos (CO_2H) formam padrões baseados em ligações $\text{O-H}\cdots\text{O}$ e $\text{C-H}\cdots\text{O}$	13
Figura 1.4 - Padrão de ligações de hidrogénio $\text{C}^\alpha\text{-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ e $\text{N-H}\cdots\text{O}$ em cadeia, observado no modelo de Fraser <i>et al.</i> na molécula de colagénio.....	15
Figura 1.5 - Exemplos representativos de contactos $\text{C-H}\cdots\text{O}$ entre folhas- β adjacentes e α -hélices.	16
Figura 1.6 - Rede bidimensional de ligações de hidrogénio $\text{C-H}\cdots\text{O}$ no complexo 1:1 de trinitrobenzeno e dibenzantraceno.	17
Figura 1.7 - Moléculas de $(p\text{-MeOC}_6\text{H}_4\text{COCH}_2)_2\text{TeBr}_2$ ligadas por intermédio de ligações de hidrogénio do tipo $\text{C-H}\cdots\text{O}$	18
Figura 1.8 - Representação esquemática da estrutura molecular do 1,3-dibromo-2,4,6-trinitrobenzeno.	19
Figura 1.9 - a) Representação esquemática da estrutura molecular de 4,4-difenil-2,5-ciclohexadienona e b) três padrões distintos (I, II e III) de ligações de hidrogénio do tipo $\text{C-H}\cdots\text{O}$ utilizados na formação dos diferentes polimorfos.	20
Figura 1.10 - Hélices de ligações de hidrogénio $\text{C-H}\cdots\text{O}$ entre moléculas da forma A e padrão centrossimétrico de ligações de hidrogénio $\text{C-H}\cdots\text{O}$	21
Figura 1.11 - Ligações de hidrogénio $\text{C-H}\cdots\text{O}$ nos polimorfos C e D de 4,4-difenil-2,5-ciclohexadienona.....	21
Figura 1.12 - Diagramas de empacotamento das quatro formas polimórficas da carbamazepina exibindo padrões de ligações de hidrogénio	22
Figura 1.13 - Fórmula molecular e esquemática da β -Ciclodextrina.	24
Figura 1.14 - Contactos estabelecidos pela molécula hóspede 2-Butin-1,4-diol com a β -CD. Para além dos contactos convencionais $\text{O}\cdots\text{O}$ existem algumas interações fracas: $\text{C-H}\cdots\text{O}$ e $\text{C-H}\cdots\pi$	24
Figura 1.15 - Vista parcial segundo um eixo perpendicular às bicamadas de calix(4)resorcinareno.	25
Figura 1.16 - a) rede unidimensional de “cadeiras” de água e b) octâmero centrossimétrico de água que inclui os contactos por ligações de hidrogénio com os átomos de oxigénio do grupo carboxilato.....	26

Capítulo 3. Análise Espectroscópica de transições anidro-hidrato em sólidos farmacêuticos

Figura 3.1 - Representação esquemática na Niclosamida (NC).	66
---	----

Figura 3.2 - Estrutura otimizada ao nível B3LYP/6-31G* do monómero da NC, com respectiva numeração dos átomos indicada.....	67
Figura 3.3 - Espectro FT-Raman da niclosamida anidra (NCa, a) e da niclosamida hidratada (NCh, b) nas regiões espectrais 50-1000, 1200-1700 e 3000-3200 cm^{-1}	72
Figura 3.4 - Comparação dos espectros FT-Raman da niclosamida anidra (NCa, linha a cheio) e da niclosamida hidratada (NCh, linha a tracejado) nas regiões espectrais 620-646 e 1620-1710 cm^{-1}	73
Figura 3.5 - Espectros Raman, na região 1610-1720 cm^{-1} de misturas físicas com fracções molares de NCh iguais a 0.0, 0.18, 0.58, 0.77 e 1.0.	74
Figura 3.6 - Procedimento de calibração, realizado na região espectral 1620-1710 cm^{-1} , de misturas físicas com fracções molares de NCh iguais a 0.0, 0.18, 0.58, 0.77 e 1.0.....	75
Figura 3.7 - Comparação entre o espectro Raman das formas NCa e NCh nas regiões espectrais 620-646 e 1620-1710 cm^{-1} depois de aplicar o factor de escala de forma a reflectir as intensidades intrínsecas relativas de cada banda.	75
Figura 3.8 - a) Espectros FT-Raman, na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} , de amostras de NCa armazenadas a 24 °C e RH100% no decorrer de duas semanas e b) representação da fracção de hidratação (α_h) em função do tempo de exposição a um ambiente de RH100%.	77
Figura 3.9 - a) Espectros FT-Raman, na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} , de amostras de NCh armazenadas a 24 °C e RH0% no decorrer de duas semanas e b) representação da fracção de desidratação (α_d) em função do tempo de exposição a um ambiente de RH0%.	79
Figura 3.10 - Resultados obtidos para a desidratação da NCh a diferentes temperaturas. Representação da fracção de desidratação (α_d) em função do tempo de armazenamento a a) 45 °C e b) 60 °C.	81
Figura 3.11 - a) Espectros FT-Raman, na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} , de amostras de NCa armazenadas a diferentes valores de RH, no decorrer de duas semanas e b) representação da fracção de hidratação (α_h) em função de diferentes valores de RH e à temperatura de 24 °C. A fracção α_h toma os valores de 0.25, 0.37 e 0.98 para as amostras expostas a RH=90, 92 e 97% respectivamente.	82
Figura 3.12 - Espectros FT-Raman, na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} , amostras de NCh armazenadas a diferentes valores de RH, no decorrer de duas semanas.....	83

Capítulo 4. Pares em Materiais Moleculares: PiMM

Figura 4.1 - Representação esquemática da Nitrofurantoína (NF) e numeração atómica utilizada no texto, tabelas e figuras.	94
Figura 4.2 - Representação esquemática dos pares moleculares com contactos intermoleculares relevantes observados na estrutura cristalina obtida na CSD: a) NFa- α (ref. LABJON01) e b) NFa- β (ref. LABJON02). ...	95
Figura 4.3 - Geometrias optimizadas para os pares moleculares seleccionados de forma a descrever os contactos intermoleculares na estrutura cristalina de NFa- α	97

Figura 4.4 - Geometrias otimizadas para os pares moleculares seleccionados de forma a descrever os contactos intermoleculares na estrutura cristalina de NFA- β	99
Figura 4.5 - Espectro de Raman de a) polimorfo α e b) polimorfo β nas regiões 50-350 cm^{-1} , 500-650 cm^{-1} e 1125-1275 cm^{-1}	102
Figura 4.6 - Espectro de FT-IR de NFA- α na região espectral compreendida entre 350-650 cm^{-1} para a) monómero calculado, contribuições calculadas para b) par I, c) par II e d) espectro experimental.	103
Figura 4.7 - Espectro de FT-Raman de NFA- α na região espectral compreendida entre 1280-1460 cm^{-1} para a) monómero calculado, contribuições calculadas para b) par I, c) par III e d) espectro experimental.	104
Figura 4.8 - Espectro de FT-IR de NFA- β na região espectral compreendida entre 625-850 cm^{-1} para a) monómero calculado, contribuições calculadas para b) par V, c) VI e d) espectro experimental.	107
Figura 4.9 - Espectro de FT-Raman de NFA- β na região espectral compreendida entre 1280-1460 cm^{-1} para a) monómero calculado, contribuições calculadas para b) par V, c) par VI e d) espectro experimental.	108
Figura 4.10 - Representação esquemática do ácido láurico ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$) – $\text{C}_{12:0}$	115
Figura 4.11 - Geometria otimizada para o par molecular seleccionado de forma a descrever os contactos intermoleculares na estrutura cristalina do ácido láurico.	116
Figura 4.12 - Espectro de Raman a) experimental, calculado ao nível B3LYP/6-31G* para o b) dímero e para o c) monómero.....	117
Figura 4.13 - Espectros de Raman do sistema C12C14 com $\chi_{\text{C12}}=0.30$ dependente da temperatura nas regiões a) 50-300 cm^{-1} , b) 1350-1520 cm^{-1} e c) 2800-3000 cm^{-1}	118
Figura 4.14 - Variação com a temperatura dos espectros de Raman do sistema C14C18 com $\chi_{\text{C14}}\cong 0.25$ nas regiões a) 50-300 cm^{-1} , b) 1350-1520 cm^{-1} e c) 2800-3000 cm^{-1}	119
Figura 4.15 - Espectros de Raman do sistema C12C14 a 305 K. As linhas a tracejado representam os espectros das amostras antes da fusão e as linhas a cheio depois da fusão.	120
Figura 4.16 - Espectros de Raman do sistema C14C18 a 313 K. As linhas a tracejado representam as amostras antes da fusão e as linhas a cheio após a fusão das amostras.	121
Figura 4.17 - Espectros de Raman do sistema C14C18 a 322 K na região 2800-3050 cm^{-1} . A linha a tracejado representa a amostra ($\chi_{\text{C14}}\cong 0.50$) antes da fusão.....	122
Figura 4.18 - Espectros de Raman do sistema C14C18 para $\chi_{\text{C14}}\cong 0.30$ na região 2800-3050 cm^{-1}	123

Capítulo 5. Inclusão de compostos aromáticos em ciclodextrinas

Figura 5.1 - Representação esquemática dos compostos 3-Metoxifenol, 2-Metoxifenol e 3-Metilfenol evidenciando a numeração dos átomos utilizada ao longo do texto.	132
Figura 5.2 - Geometrias otimizadas ao nível B3LYP/6-31G* para os diferentes confórmeros de a) 3MeOPh, b) 2MeOPh e c) 3MePh.	134

Figura 5.3 - Geometrias otimizadas ao nível B3LYP/6-31G* para dímeros de a) 3MeOPh, b) 2MeOPh e c) 3MePh.	136
Figura 5.4 - Análise térmica: curvas obtidas por análise de a) DSC e b) TG do composto de inclusão α CD•2MeOPh (linha a cheio), α CD pura (.....) e hóspede puro 2MeOPh (----).....	141
Figura 5.5 - Espectro de Raman, nas regiões 220-270 e 715-750 cm^{-1} , do hóspede puro 3MeOPh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.....	144
Figura 5.6 - Espectro de Raman, na região 1540-1660 cm^{-1} , do hóspede puro 3MeOPh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.....	145
Figura 5.7 - Espectro de Raman, na região 1520-1680 cm^{-1} , do hóspede puro 2MeOPh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.....	147
Figura 5.8 - Espectro de Raman, nas regiões 190-270 e 500-560 cm^{-1} , do hóspede puro 3MePh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.....	148
Figura 5.9 - Espectro de Raman, na região 1540-1680 cm^{-1} , do hóspede puro 3MePh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.....	149
Figura 5.10 - Espectro de Raman, na região 2800-3120 cm^{-1} , dos hóspedes puros no estado líquido a) 3MeOPh, b) 2MeOPh e c) 3MePh e respectivos compostos de inclusão com α -, β - e γ CD.....	150
Figura 5.11 - a) representação esquemática da estrutura do composto α CD•3MeOPh e b) estrutura otimizada do par molecular construído com base na interacção intermolecular $\text{O}_{(2)}\cdots\text{H}-\text{O}_{(1)}$	152
Figura 5.12 - Estrutura esquemática do composto de inclusão α CD•2MeOPh (estequiometria 2:1).	153
Figura 5.13 - Estrutura esquemática do composto de inclusão α CD•3MePh (estequiometria 1:2).	154

Capítulo 6. Análise de sólidos farmacêuticos por SERS

Figura 6.1 - Estados implicados nos mecanismos de Raman, ressonância de Raman (RR) e SERS em ressonância com estados de transferência de carga (SERS-CT) do complexo superficial M-A.	173
Figura 6.2 - Esquema do mecanismo CT para a transferência foto-induzida de um electrão do nível de Fermi do metal (FL – <i>Fermi level</i>) para orbitais vazias do adsorbato.	174
Figura 6.3 - Representação esquemática do ácido <i>trans</i> -3-hidroxinâmico (t-3OHClA).	175
Figura 6.4 - Espectro de Raman de duas soluções aquosas 1 M de <i>trans</i> -3-hidroxicinamato a) pH=7, b) pH=14 e espectros SERS 10^{-4} M de soluções coloidais de prata c) pH=7 e d) pH=12.	176
Figura 6.5 - Espectros SERS-CT calculados para a) dianião, b) anião e c) espécie neutra do <i>trans</i> -3-hidroxicinamato e d) espectro SERS experimental pH=7.	180
Figura 6.6 - Representação pictórica das orbitais LUMO e estruturas calculadas para a espécie AH^- nos pontos de viragem da vibração 8a localizada a 1598 cm^{-1}	181
Figura 6.7 - Diferença de energias entre as formas di-cetónica e di-enólica ($\Delta E = E_{\text{diceto}} - E_{\text{dienol}}$) de 5-Flu e entre os dois aniões da forma di-cetónica, N1 e N3 ($\Delta E = E_{\text{N1}} - E_{\text{N3}}$).	183

Figura 6.8 - a) Espectro de Raman do 5-Flu sólido (linha de excitação $\lambda=1064$ nm), espectros de Raman (linha de excitação $\lambda=514.5$ nm) de soluções aquosas de 5-Flu 0.5 M a b) pH=10, c) pH=14 e espectros SERS em colóide de prata de uma solução 10^{-3} M a d) pH=7 e e) pH=12.....	184
Figura 6.9 - a) Espectro de Raman da solução aquosa de 5-Flu 0.5 M a pH=10, espectros SERS em prata a diferentes valores de potencial de eléctrodo b) 0.00 V, c) -0.25 V e d) -0.50 V obtidos com uma solução aquosa 0.1 M em Na_2SO_4 e 10^{-3} M em 5-Flu a pH=7.....	189
Figura 6.10 - Espectros calculados para processos CT-RR para as diferentes espécies de 5-Flu consideradas: a) molécula neutra (forma di-enólica), b) anião N1, c) anião N3 e d) molécula neutra (forma di-cetónica). O espectro SERS em colóide a e) pH=7 está também representado.....	190

Capítulo 7. Caracterização de agregados de água

Figura 7.1 - Perspectiva ao longo da direcção [100] da célula unitária da estrutura tridimensional de ligações de hidrogénio. Estrutura 3D de moléculas de água.....	202
Figura 7.2 - Representação esquemática do arranjo de moléculas de água existente na estrutura cristalina do composto 1 . É possível distinguir um hexâmero (se considerarmos as moléculas mais próximas entre si) e também um octâmero, formado no interior da cavidade.....	203
Figura 7.3 - Representação esquemática de seis cadeiras tricíclicas centrossimétricas de octâmeros de água, combinando as distintas localizações dos seis grupos OH “livres”.....	204
Figura 7.4 - Octâmero tricíclico e centrossimétrico (estrutura I) de moléculas de água otimizado por cálculos DFT e numeração atómica utilizada no texto.....	206
Figura 7.5 - Espectros de Raman do composto 1 na região de vOD para diferentes tempos de exposição a uma atmosfera de D_2O	207
Figura 7.6 - Espectro de Raman de D_2O à temperatura ambiente.....	208
Figura 7.7 - Espectros de Raman do composto 1 na região $780\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ para diferentes intervalos de exposição a uma atmosfera de D_2O (troca $\text{H} \rightarrow \text{D}$).....	209
Figura 7.8 - Espectros de Raman do composto 1 (após a deuteração) na região $1140\text{-}1225\text{ cm}^{-1}$ para diferentes intervalos de exposição a uma atmosfera de H_2O (troca $\text{D} \rightarrow \text{H}$).....	210
Figura 7.9 - Unidade básica (em cima) da rede bidimensional de moléculas de água encontrada no espaço intercamadas do composto 2 (em baixo).....	211
Figura 7.10 - Espectros de Raman do composto 2 a várias temperaturas.....	212
Figura 7.11 - Espectros de Raman do composto 2 puro (H_2O), cristalizado em D_2O (ao centro) e resultado da subtracção algébrica dos dois primeiros espectros na região $150\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ ($T=143\text{ K}$).....	213
Figura 7.12 - Espectros de Raman do composto 2 puro (H_2O), cristalizado em D_2O (ao centro) e resultado da subtracção algébrica dos dois primeiros espectros na região na região $800\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ ($T=143\text{ K}$).....	214

Figura 7.13 - Espectros de Raman do composto 2 puro (H ₂ O), cristalizado em D ₂ O (ao centro) e resultado da subtração algébrica dos dois primeiros espectros na região na região 3050-3550 cm ⁻¹ (T=143 K).....	214
Figura 7.14 - Espectros de Raman do composto 2 a) exposto a D ₂ O na região de νO-D e b) puro na região νO-H.	215

Capítulo 9. Métodos experimentais e computacionais

Figura 9.1 - Representação esquemática do reservatório utilizado na exposição de amostras a determinados valores de humidade relativa (RH).	232
Figura 9.2 - Fotografia da célula utilizada, no interior da qual se coloca a solução com a amostra a analisar, o eléctrodo de prata, o de referência e o de platina.....	235
Figura 9.3 - a) Eléctrodo de referência (contendo no seu interior um fio de prata e solução saturada de KCl), b) cilindro oco de vidro com um disco de prata na extremidade e no qual se insere c) o fio de cobre.....	236
Figura 9.4 - Montagem da célula com a solução aquosa de adsorbato no seu interior bem como a) local onde é inserido o eléctrodo de referência, b) eléctrodo de platina e c) eléctrodo de prata.....	236
Figura 9.5 - Sequência de pulsos utilizada no processo de oxidação-redução para preparar a superfície de prata.	237
Figura 9.6 - Espectro de Raman na região compreendida entre 1620-1710 cm ⁻¹ de amostras de NCh armazenadas a condições de RH 0% durante 96 h (linha a preto).....	240
Figura 9.7 - Espectro de Raman na região compreendida entre 620-646 cm ⁻¹ de amostras de NCh armazenadas a condições de RH 0% durante 96 h.....	241

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Enquadramento Científico

Tabela 1.1 - Classificação, energia, exemplos e algumas particularidades dos diversos tipos de ligações de hidrogénio.....8

Capítulo 3. Análise Espectroscópica de transições anidro-hidrato em sólidos farmacêuticos

Tabela 3.1 - Bandas mais relevantes no espectro Raman que apresentam diferentes números de onda para as formas NCa e NCh e respectiva atribuição proposta.....68

Tabela 3.2 - Mecanismos de reacções no estado sólido e respectivas equações.70

Tabela 3.3 - Resultados obtidos na calibração das várias misturas físicas (NCa + NCh) com fracções molares conhecidas.76

Tabela 3.4 - Valores da constante de velocidade de hidratação (k), desvio padrão do declive (S_b), coeficiente de correlação (R^2) e tempos de meia hidratação ($t_{1/2}$) e de hidratação completa (t_h), obtidos com os melhores ajustes lineares ($f(\alpha)$) estabelecidos para a NCa nas duas regiões espectrais consideradas.78

Tabela 3.5 - Valores da constante de velocidade de desidratação, desvio padrão do declive, coeficiente de correlação e tempos de meia desidratação e de desidratação completa, obtidos com os melhores ajustes lineares estabelecidos para a NCh nas duas regiões espectrais consideradas.80

Capítulo 4. Pares em Materiais Moleculares: PiMM

Tabela 4.1 - Números de onda (cm^{-1}) calculados para o monómero de NF e três associações moleculares construídas com base na estrutura de raios-X de NFa - α97

Tabela 4.2 - Números de onda (cm^{-1}) calculados para o monómero de NF e três associações moleculares construídas com base na estrutura de raios-X de NFa - β100

Tabela 4.3 - Atribuição completa do espectro de FT-Raman e FT-IR do polimorfo α da NF, aplicando a metodologia com apoio computacional PiMM.....104

Tabela 4.4 - Atribuição completa do espectro de FT-Raman e FT-IR do polimorfo β da NF, aplicando a metodologia com apoio computacional PiMM.....109

Tabela 4.5 - Análise estatística dos resultados obtidos neste trabalho e em trabalhos anteriores relativa à aplicação da metodologia PiMM na atribuição completa de espectros vibracionais de compostos farmacêuticos que exibem polimorfismo e pseudopolimorfismo.111

Tabela 4.6 - Atribuições vibracionais propostas para as bandas mais relevantes no âmbito deste estudo, presentes no espectro de Raman do ácido láurico.	117
---	-----

Capítulo 5. Inclusão de compostos aromáticos em ciclodextrinas

Tabela 5.1 - Proposta de atribuição completa dos espectros vibracionais do 3MeOPh.....	137
Tabela 5.2 - Proposta de atribuição completa dos espectros vibracionais do 2MeOPh.....	138
Tabela 5.3 - Proposta de atribuição completa dos espectros vibracionais do 3MePh.	139
Tabela 5.4 - Estequiometria dos compostos de inclusão, baseada em análise de DSC e TG.	142
Tabela 5.5 - Valores de número de onda (cm^{-1}) e descrição aproximada para as bandas mais relevantes observadas no espectro de Raman dos hóspedes puros.	143
Tabela 5.6 - Valores de número de onda (cm^{-1}) e possível atribuição para as bandas desdobradas observadas no composto de inclusão $\alpha\text{CD}\cdot 3\text{MePh}$	155

Capítulo 6. Análise de sólidos farmacêuticos por SERS

Tabela 6.1 - Atribuições vibracionais propostas para as bandas observadas nos espectros experimentais de Raman e SERS do <i>trans</i> -3-hidroxicinamato (números de onda em cm^{-1}).....	177
Tabela 6.2 - Atribuições vibracionais propostas para os espectros de Raman calculados ao nível B3LYP/6-31G* do <i>trans</i> -3-hidroxicinamato na região de 1600 cm^{-1}	181
Tabela 6.3 - Atribuições propostas para as bandas observadas nos espectros experimentais de Raman e SERS a vários valores de pH e bandas calculadas ao nível B3LYP/6-31G* para os aniões di-cetônicos N3 e N1 do 5-Flu (números de onda em cm^{-1}).	185
Tabela 6.4 - Atribuição proposta para bandas Raman e SERS calculadas para a forma di-cetônica e observadas experimentalmente para soluções em colóide e em eléctrodo a diferentes valores de potencial do 5-Flu. (números de onda em cm^{-1}).....	187

Capítulo 7. Caracterização de agregados de água

Tabela 7.1 - Energia e estruturas otimizadas de três hexâmeros de água.....	203
Tabela 7.2 - Energia e estruturas otimizadas dos cinco octâmeros de água considerados neste estudo. .	205
Tabela 7.3 - Parâmetros geométricos do octâmero I.....	206
Tabela 7.4 - Parâmetros cinéticos para o processo de troca $\text{H} \rightarrow \text{D}$ (Deuteração).....	208
Tabela 7.5 - Parâmetros cinéticos para o processo de troca $\text{D} \rightarrow \text{H}$ (inverso da deuteração).	209

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGA - Aspartilglucoaminidase

ATR – Reflectância total atenuada, do inglês *Attenuated Total Reflectance*

B3LYP – Potencial de permuta de Becke com três parâmetros e o funcional de correlação de Lee, Yang e Parr

BSSE – Erro de sobreposição de bases, do inglês *Basis Set Superposition Error*

CD - Ciclodextrina

DFT – Teoria do funcional de densidade, do inglês *Density Functional Theory*

DSC – Calorimetria diferencial, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*

EO – Electro-óptica, do inglês *Electro-Optical*

FT-IR – Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*

FT-Raman – Espectroscopia de difusão de Raman com transformada de Fourier

HF – Hartree-Fock

LanL2DZ – Base de funções de valência dividida com potenciais eficazes

MP2 – Teoria de perturbações de 2ª ordem de Møller-Plesset

NBO – Orbitais de ligações naturais, do inglês *Natural Bond Orbitals*

NC – Niclosamida

NCa – Niclosamida anidra

NCh – Niclosamida hidratada

NF – Nitrofurantoína

NLO – Materiais não-lineares ópticos, do inglês *Non-linear Optics*

ONIOM – Método híbrido de mecânica molecular e mecânica quântica, do inglês *Our N-Layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*

RH – Humidade relativa, do inglês *Relative Humidity*

RMN – Ressonância magnética nuclear

SCF – Campo autocoerente, do inglês *Self-Consistent Field*

SHG – Geração de 2ª harmónica, do inglês *Second Harmonic Generation*

STO – Orbitais de tipo Slater, do inglês *Slater Type Orbitals*

TGA – Análise termogravimétrica, do inglês *Thermogravimetric Analysis*

ZPVE – Energia vibracional do ponto zero, do inglês *Zero Point Vibrational Energy*

αCD – Ciclodextrina alfa constituída por seis unidades de glicose

βCD – Ciclodextrina beta constituída por sete unidades de glicose

γ CD – Ciclodextrina alfa constituída por oito unidades de glicose

5Flu – 5-Fluorouracilo

t-3OHCIA – ácido *trans*-3-Hidroxicinâmico

3MeOPh – 3-metoxifenol

2MeOPh – 2-metoxifenol

3MePh – 3-metilfenol

α_h – fracção de hidratação

α_d – fracção de desidratação

b – declive da recta

a – ponto de intersecção da recta no eixo do y

R^2 – coeficiente de correlação

δ - intensidade intrínseca

C – concentração

I – intensidade

t – tempo

$t_{1/2}$ – tempo de meia hidratação ou desidratação

t_h – tempo de hidratação

t_d – tempo de desidratação

k – constante de velocidade de reacção

χ - fracção molar

$\tilde{\nu}$ - número de onda

v - elongação

β - deformação no plano

γ - deformação fora do plano

v_s - deformação simétrica

v_{as} - deformação assimétrica

“Tantas cosas he aprendido de ustedes, los hombres... He aprendido que todo el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada.”

Poema La Marioneta, Gabriel García Márquez

Capítulo 1

Enquadramento Científico

CONTEÚDO

Resumo	3
1.1. Contextualização.....	4
1.2. Interações Intermoleculares	4
1.2.1. Ligação de Hidrogénio	5
DESCRICÃO.....	5
CLASSIFICAÇÃO.....	7
LIGAÇÃO DE HIDROGÉNIO FRACA	8
NATUREZA DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO	9
PARÂMETROS GEOMÉTRICOS E ENERGÉTICOS	10
CARACTERIZAÇÃO	12
1.3. Exemplos da ocorrência de ligações de hidrogénio	13
1.3.1. Sistemas orgânicos, bioquímicos e organometálicos.....	13
1.3.2. Materiais Funcionais Avançados	18
1.3.3. Polimorfos e Pseudopolimorfos.....	19
1.3.4. Sistemas hóspede-hospedeiro	22
1.3.5. Agregados de água em materiais funcionais.....	25
1.4. Objectivos da dissertação	27
1.5. Publicações científicas	30
1.6. Referências.....	31

RESUMO

As interacções intermoleculares desempenham um papel central em domínios como a Química Supramolecular, a Ciência dos Materiais e a Biologia. Neste contexto, a ligação de hidrogénio é considerada a mais versátil das interacções intermoleculares, revelando-se responsável por diversos fenómenos, entre os quais se destaca a agregação molecular. A presente dissertação reúne alguns tópicos de pesquisa sobre a relevância da ocorrência de ligações de hidrogénio em sistemas simples, supramoleculares e em materiais, com particular incidência no estudo da ligação de hidrogénio fraca do tipo C-H...O.

Por forma a contextualizar o trabalho de investigação realizado, neste Capítulo pretende-se relacionar os vários tópicos abordados – Ligações de hidrogénio C-H...O, polimorfismo e pseudopolimorfismo, compostos de inclusão em ciclodextrinas e agregados de água em materiais funcionais – e proporcionar uma visão global da pertinência dos estudos efectuados. Após enquadrar os diversos temas, são descritos os sistemas e métodos utilizados. Por último, são mencionadas as publicações resultantes do trabalho desenvolvido no âmbito do doutoramento.

1.1. Contextualização

O reconhecimento da importância do papel desempenhado pelas ligações de hidrogénio na estrutura e função de moléculas biológicas foi particularmente impulsionado pelo sucesso da teoria do emparelhamento de bases, proposta por *Watson* e *Crick* em 1953¹ e permitiu a interpretação da estrutura dos ácidos nucleicos. Anos mais tarde, *Watson* descreve no seu livro “*DNA: the secret of life*” a importância da teoria do emparelhamento de bases na compreensão da estrutura da molécula de ADN e refere-se a um episódio em particular: “*The next morning, February 28, 1953, the key features of the DNA model all fell into place. The two chains were held together by strong hydrogen bonds between adenine-thymine and guanine-cytokine base pairs. (...) It was quite a moment. We felt sure that this was it. Anything that simple, that elegant just had to be right*”.²

Contudo, não é apenas no campo da Biologia que as ligações de hidrogénio se manifestam. É possível encontrar exemplos da relevância destas interações em muitas áreas da Química (supramolecular, organometálica, bioquímica, orgânica, entre outras) assim como da Ciência de Materiais. A sua importância fundamental reside no papel determinante desempenhado em associação molecular, o que explica em grande medida o interesse e a investigação desenvolvida em torno deste tipo de interacção. De entre os vários tipos de ligações de hidrogénio, a interacção fraca do tipo *C-H...O* tem vindo a suscitar cada vez mais interesse. Considerada como um contributo significativo na formação e previsão de novas e variadas estruturas cristalinas, tem sido identificada em estruturas de cristais orgânicos e em compostos organometálicos.^{3,4}

Consequentemente, um bom conhecimento das interacções *C-H...O* é de considerável relevância para a engenharia de cristais. É neste contexto que se enquadra o trabalho de investigação desenvolvido e apresentado nesta dissertação. Este trabalho envolve essencialmente o estudo computacional e espectroscópico de ligações de hidrogénio intermoleculares, com especial destaque para as ligações *C-H...O* em alguns sistemas simples, compostos de inclusão e materiais funcionais.

1.2. Interações Intermoleculares

As interacções que se estabelecem entre moléculas (intermoleculares) são responsáveis pelas propriedades únicas de substâncias tão simples como a água e tão complexas como os polímeros. De uma forma geral, pode considerar-se a existência de três interacções intermoleculares fundamentais: electrostática, de indução e de dispersão. Numa interacção do tipo electrostática (mais energética), os momentos polares eléctricos em interacção podem ser *carga - carga*, *carga - dipolo* e *dipolo - dipolo*. Nas interacções de indução destacam-se as interacções entre *carga - dipolo induzido* e entre *dipolo -*

dipolo induzido, ambas de natureza atractiva. Por último, as interacções entre *dipolo induzido - dipolo induzido* designam-se por interacções de dispersão e são igualmente atractivas.

Na análise de processos biológicos, para além da especificidade, uma das características mais relevantes das interacções envolvidas é a reversibilidade, uma vez que interacções fracas podem ser estabelecidas e quebradas mais facilmente que as interacções mais fortes. É precisamente nas características de reversibilidade, selectividade e direccionalidade apresentadas pela ligação de hidrogénio que reside a sua relevância em áreas científicas tão diversas.^{4,5}

1.2.1. Ligação de Hidrogénio

O interesse suscitado à volta do estudo das ligações de hidrogénio deve-se à importância deste tipo de interacção para a estrutura, função e dinâmica de um grande número de sistemas químicos. Os ramos científicos envolvidos são muito diversificados e incluem mineralogia, ciência dos materiais, química orgânica e inorgânica, química supramolecular, bioquímica, medicina molecular e farmácia.

Este tipo de ligação tem uma influência tão omnipresente em química do estado sólido, líquido e gasoso que as suas consequências foram observadas muito antes de ter sido convenientemente identificada e classificada.⁶

DESCRIÇÃO

O termo ligação de hidrogénio emergiu lentamente no decurso do século XX e demorou algum tempo a ser completamente aceite. *Werner*⁷ parece ter sido o primeiro a descrever uma interacção que agora se classificaria como ligação de hidrogénio (em 1902 sugeriu que NH_4OH deveria antes ser escrito na forma $\text{H-O-H}\cdots\text{NH}_3$). Mais tarde, em 1910, *Hantzsch*⁸ descreveu a presença de uma ligação semelhante no acetoacetato de etilo, enquanto em 1912, *Moore* e *Winmill*⁹ descreveram uma união fraca para as aminas em água e *Pfeiffer* (1914)¹⁰ descobriu a estrutura de dímeros do ácido acético no estado gasoso (foi provavelmente o primeiro a identificar uma ligação de hidrogénio em química orgânica). Em 1920, *Latimer* e *Rodebush*¹¹ postularam que se um átomo de hidrogénio se encontra entre dois octetos electrónicos, aparece uma ligação fraca. Esta foi uma das primeiras falhas da, até então, sagrada *regra do octeto*, tendo sido durante este mesmo período que a ligação de hidrogénio foi reconhecida como responsável pelas propriedades anómalas da água líquida. O conceito em si e a denominação de “ligação de hidrogénio” foram desenvolvidos após 1930 e o famoso livro de *Pauling*¹² “*Nature of the chemical bond*” foi o primeiro a dar a conhecer o termo ligação de hidrogénio aos químicos.¹³ De acordo com a definição de Pauling, as ligações de hidrogénio são formadas quando a electronegatividade de *A*, relativamente a *H* numa ligação covalente *A-H*, é tal que remove os

electrões deixando o protão parcialmente desprotegido. Para interagir com este doador $A-H$, o aceitador B deve ter um par de electrões não partilhado ou electrões π polarizáveis, restringindo os átomos A e B a elementos como F, O, Cl, N, Br e I .

Todas estas ideias foram sendo refinadas, culminando na definição mais abrangente de ligação de hidrogénio dada por *Pimentel e McClellan* em 1960, na qual se considera que uma ligação de hidrogénio existe entre o grupo funcional $A-H$ e um átomo ou grupo de átomos B na mesma molécula ou em moléculas diferentes se **a)** houver evidência de formação de ligação e se **b)** existe evidência de que esta nova ligação que une $A-H$ e B envolve especificamente um átomo de hidrogénio previamente ligado a A .

O aperfeiçoamento da última descrição deu origem à classificação de *Steiner e Saenger*¹⁴ que consideraram uma ligação de hidrogénio como “*uma interacção coesiva $A-H\cdots B$ na qual o átomo de hidrogénio possui carga positiva, B uma carga negativa (parcial ou inteira) e a carga em A é mais negativa que no átomo de hidrogénio*”. Esta definição é incompleta uma vez que apenas dá ênfase ao carácter electrostático das ligações de hidrogénio e é restritiva no que diz respeito a casos limite. No entanto, continua a ser uma definição útil para muitos tipos de ligações de hidrogénio estudadas actualmente.¹⁵

As características atractivas e de direcionalidade da ligação de hidrogénio envolvendo um átomo de hidrogénio deficiente em electrões e uma região de elevada densidade electrónica têm sido revistas cuidadosamente na literatura da especialidade.^{5, 16} Em geral, a ligação de hidrogénio é definida como um sistema no qual o átomo de hidrogénio se encontra entre dois átomos A e B – idealmente na forma linear $A-H\cdots B$ – com a distância entre o núcleo de A e B consideravelmente mais pequena que a soma dos raios de *van der Waals* de A e B e o diâmetro do protão (isto é, a formação de uma ligação de hidrogénio leva à contracção do sistema $A-H\cdots B$).

Uma diferença fundamental entre as ligações de hidrogénio e as interacções de *van der Waals* reside nas características de direcionalidade. As ligações de hidrogénio são inerentemente direccionais, com as geometrias lineares ou muito próximo da linearidade a serem favorecidas energeticamente em detrimento das geometrias não lineares. Em contraste, os contactos de *van der Waals* são isotrópicos, com energias de interacção independentes do ângulo de contacto θ ¹⁷ (ângulo formado pelos átomos envolvidos na ligação $A-H\cdots B$).

As interacções que combinam força e direcionalidade permitem um melhor controlo do processo de agregação e são requisitos essenciais para formar estruturas supramoleculares estáveis. Força é sinónimo de coesão e estabilidade, enquanto direcionalidade implica controlo e selectividade topológica. A interacção intermolecular que melhor combina força e direcionalidade é a ligação de hidrogénio.¹⁸ Por este motivo, a ligação de hidrogénio é considerada a mais importante de todas as interacções intermoleculares direccionais, revelando-se fundamental na determinação da

conformação molecular, agregação molecular, e da função de um vasto número de sistemas químicos, desde os inorgânicos aos biológicos.

Para além das definições químicas gerais do termo ligação de hidrogénio, existem muitas outras definições mais específicas, normalmente baseadas num conjunto de propriedades que são estudadas através de uma determinada técnica. Por exemplo, as ligações de hidrogénio têm sido definidas com base em geometrias de interacção em estruturas cristalinas (distâncias pequenas, ângulos θ quase lineares), certos efeitos em espectros de absorção de infravermelho (desvio para o vermelho e intensificação do modo ν_{A-H} , etc.) ou mesmo algumas propriedades evidenciadas nas distribuições experimentais de densidade electrónica (existência de um “ponto crítico da ligação” entre H e A , com parâmetros numéricos dentro de certos limites).¹⁹

CLASSIFICAÇÃO

A natureza da ligação de hidrogénio depende da natureza dos grupos aceitadores e doadores nela envolvidos. Todos os tipos desta ligação podem ser intramoleculares quando os grupos doador e aceitador estão na mesma molécula e intermoleculares quando estão em moléculas diferentes. Quando A e B são iguais, são conhecidas como ligações de hidrogénio homonucleares.

As ligações de hidrogénio existem num espectro contínuo de energias. São conhecidas interacções muito fortes que se assemelham a ligações covalentes na maioria das suas propriedades, e também são conhecidas outras tão fracas que se torna difícil distingui-las das interacções de *van der Waals*. Dependendo de algumas propriedades (geométricas, energéticas, termodinâmicas e funcionais) as ligações de hidrogénio podem ser classificadas como muito fortes, fortes e fracas (ou, segundo outros autores, como fortes, moderadas e fracas). Algumas das características e exemplos decorrentes desta classificação encontram-se ilustrados na **Tabela 1.1**.

Embora as ligações de hidrogénio fracas possuam baixa energia de ligação, os efeitos que produzem na estrutura cristalina podem ser tão determinantes como os efeitos das ligações de hidrogénio mais fortes.²⁰

Tabela 1.1 – Classificação, energia, exemplos e algumas particularidades dos diversos tipos de ligações de hidrogénio.

Tipo de ligação	Energia (kJ/mol) ²¹	Exemplos	Observações
Muito forte	63-167	[F...H...F] ⁻ [N...H...N] ⁺	Ocorrem quando os doadores e aceitadores estão activados devido a factores intermoleculares (elevado carácter iónico, átomos muito electronegativos, entre outros).
Forte	17-63	O-H...O=C N-H...O=C O-H...O-H	Igualmente designadas de convencionais, são capazes de controlar efectivamente a estrutura supramolecular e cristalina e possuem geralmente grupos doadores e aceitadores neutros.
Fraca	< 17	doador fraco-aceitador forte C-H...O=C, P-H...O, C-H...N doador forte-aceitador fraco N-H...Ph, O-H...F-C, O-H...Se doador fraco-aceitador fraco C≡C-H...C=C, C-H...Pt, C-H...F-C	Possuem uma influência variável na estrutura cristalina e no empacotamento molecular.

LIGAÇÃO DE HIDROGÉNIO FRACA

É ao nível funcional e não geométrico, energético ou espectroscópico que todas as ligações de hidrogénio são semelhantes e, previsivelmente, é no campo da engenharia de cristais e da química supramolecular que a ligação de hidrogénio é claramente identificada como uma interacção sem fronteiras internas.

Uma ligação de hidrogénio fraca pode ser definida como uma interacção do tipo $A-H\cdots B$ em que o átomo de hidrogénio forma uma ligação entre duas entidades A e B , das quais uma ou mesmo as duas possuem electronegatividade moderada ou baixa.¹⁵ A mais antiga e certamente a interacção protótipo das ligações de hidrogénio fracas é a $C-H\cdots O$, mas também devem ser incluídas interacções tais como $P-H\cdots O$, $C-H\cdots N$ e $M-H\cdots O$ (em que M representa um metal).

Todas estas ligações envolvem um doador fraco que se associa a um aceitador forte. A situação alternativa é quando um doador forte se associa a um aceitador fraco, que é exemplificado pelas interações $O-H\cdots\pi$, $N-H\cdots\pi$, $O-H\cdots M$ e $O-H\cdots S$. Finalmente, e no limite do fenómeno, também é necessário considerar a associação de um doador fraco com um aceitador fraco. Nesta categoria os membros mais controversos são $C-H\cdots F-C$ e $C-H\cdots Cl-C$.

As ligações de hidrogénio fracas com o grupo $C-H$ como doador têm sido objecto de inúmeros estudos. Anteriormente consideradas de “não usuais” ou “não convencionais”, são agora bastante discutidas em muitos campos da química estrutural e da biologia. As energias de dissociação encontram-se no intervalo $1.7 - 16.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, com a maioria a apresentar valores inferiores a 8.4 kJ mol^{-1} .¹⁹ O potencial significado das ligações $C-H\cdots O$ em moléculas biológicas foi impulsionado pela descoberta de interações $C-H\cdots O$ específicas em nucleótidos ($C8-H\cdots O5'$ em purinas e $C6-H\cdots O5'$ em pirimidinas) que são responsáveis pela sua estereoquímica única.²²⁻²⁴ Diversos dados espectroscópicos e cristalográficos, conjugados com cálculos teóricos, apoiaram o conceito de ligações de hidrogénio do tipo $C-H\cdots O$.²⁵ Finalmente, a natureza electrostática e direccionada das interações $C-H\cdots O$ foi demonstrada conclusivamente por Taylor e Kennard²⁰ que analisaram 113 estruturas orgânicas determinadas por métodos de difracção de neutrões que forneceram coordenadas precisas para os átomos de hidrogénio.²⁶

NATUREZA DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO

A ligação de hidrogénio é considerada uma interacção complexa que não pode ser descrita apenas por factores electrostáticos ou de dispersão, sendo constituída por diversos componentes fundamentais, diferentes na sua natureza.²⁷ A separação nestes componentes tem sido amplamente investigada²⁸ sendo um dos modelos de partição mais popular o método de decomposição de Umeyama e Morokuma.²⁸ Este método decompõe a energia total da ligação de hidrogénio (E_{tot}) em várias componentes que representam interações individuais de magnitude similar: a energia electrostática (E_{el}), energia de polarização (E_{pol}), energia de troca (E_{ex}), energia de transferência de carga (E_{ct}), e energia de dispersão (E_{dis}). Todas as componentes são atractivas, à excepção da energia de troca que é uma interacção repulsiva.

As contribuições electrostáticas, de polarização e de transferência de carga são altamente variáveis entre diferentes tipos de ligações de hidrogénio, e definem as suas identidades específicas e direccionais sendo o termo electrostático dominante na maioria das ligações de hidrogénio.¹⁵ O termo correspondente à energia de troca contribui para manter as moléculas afastadas umas das outras e a componente de dispersão é a “cola” universal que conduz à formação de fases condensadas. É possível agrupar estas interações de uma forma global em termos direccionais e não direccionais

(isotrópicos). Os termos isotrópicos são a energia de troca e de dispersão, cuja soma é frequentemente denominada de “interacção de *van der Waals*” e os termos direccionais são a energia electrostática, de polarização e de transferência de carga.

Em alguns casos, é possível que a ligação de hidrogénio se transforme noutra de interacção, devido a variações químicas, quer do doador e/ou aceitador, quer do próprio ambiente circundante. No caso da transição para uma interacção de *van der Waals* pura, a polaridade do doador $A-H$ e do aceitador B ao ser reduzida, pela variação quer de A quer de B , provoca a redução da componente electrostática da interacção sendo a componente de *van der Waals* muito menos afectada, possibilitando desta forma a transição. Este comportamento foi demonstrado na direccionalidade da interacção $C-H\cdots O=C$,¹⁷ que diminui com a polarização do doador $C-H$, desaparecendo gradualmente quando o doador de protão varia ao longo da série $C\equiv C-H$, $C=CH_2$, $C-CH_3$.

PARÂMETROS GEOMÉTRICOS E ENERGÉTICOS

São necessárias três quantidades escalares para definir a geometria de uma ligação de hidrogénio. O comprimento da ligação covalente $A-H$ (r), o comprimento da ligação de hidrogénio $H\cdots B$ (d) e a distância $A\cdots B$ (D). Estas quantidades definem o ângulo $A-H\cdots B$ (θ) e estão representadas na **Figura 1.1**. Um parâmetro adicional que também poderá revelar-se útil na descrição do arranjo espacial das ligações de hidrogénio é o ângulo entre os átomos H , B e C (ϕ).

Para além de definirem a geometria de uma ligação de hidrogénio, os parâmetros d , r e θ (directamente relacionados com o átomo de hidrogénio), podem auxiliar na classificação das interacções em muito fortes, fortes e fracas. Assim sendo, nas ligações de hidrogénio muito fortes, r e d têm aproximadamente o mesmo valor e θ é normalmente próximo de 180° .²¹ No caso das ligações de hidrogénio fortes, $d > r$, e os valores de θ variam entre 130° e 180° .²¹ Por último, nas ligações de hidrogénio fracas, $d \gg r$, e θ assume valores entre 90° e 180° .²¹

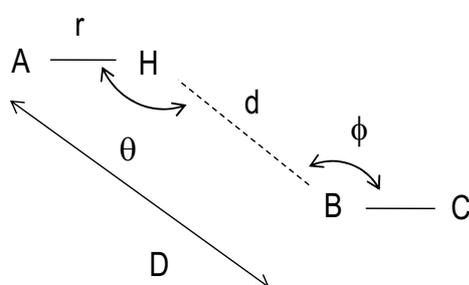


Figura 1.1 – Definição dos parâmetros geométricos d , D , r , θ e ϕ para uma ligação de hidrogénio.²¹

A distância D de uma ligação de hidrogénio é um dos atributos característicos mais importantes. Para ligações fortes, as distâncias $O\cdots O$ e $N\cdots O$ rondam os 275 e 285 pm, respectivamente. Estas distâncias entre átomos que não se encontram ligados são significativamente inferiores às separações convencionais de *van der Waals*. O valor de D é mais sensível ao ambiente químico do átomo de hidrogénio do que à natureza do aceitador: quanto mais ácido for o hidrogénio, mais curta será a ligação. Para ligações $C-H\cdots O$, a situação não é tão evidente. Pelo facto de serem interacções fracas, as ligações $C-H\cdots O$ podem ser distorcidas por outras forças do cristal e as distâncias $C\cdots O$ estão normalmente dentro do intervalo $300 < D < 400$ pm.²⁹ As características relativamente fixas dos ângulos das ligações $C-H\cdots O$ são impressionantes, uma vez que os ângulos intermoleculares são normalmente mais facilmente deformáveis que as distâncias.²⁹

A curva de energia potencial de uma ligação de hidrogénio em função da distância internuclear d , esquematizada na **Figura 1.2**, mostra que uma interacção estabilizante (com $E < 0$) está associada a uma força repulsiva se d for inferior à distância de equilíbrio d_0 .

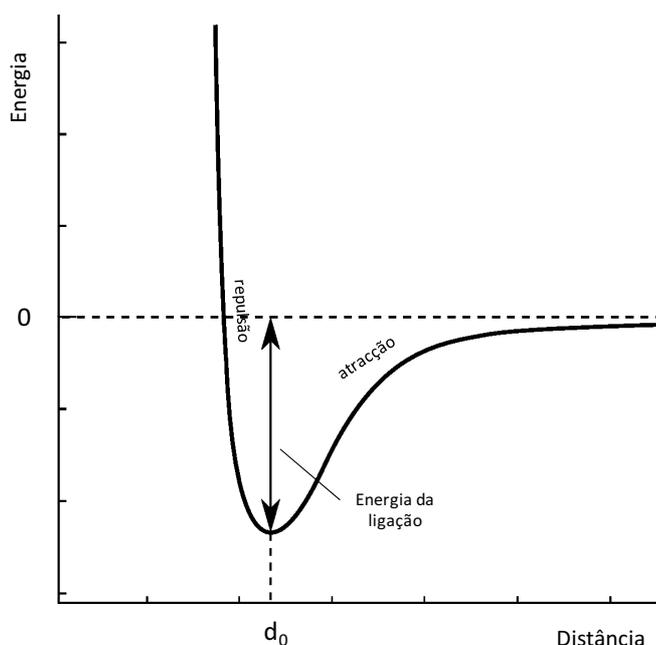


Figura 1.2 – Representação esquemática da energia potencial de uma ligação de hidrogénio em função da distância internuclear d .

Verifica-se que a energia é mínima no ponto da distância de equilíbrio d_0 , é negativa para todas as distâncias $d > d_0$ e também para distâncias pouco menores que d_0 , e é positiva apenas para distâncias muito pequenas. As regiões que apresentam energias positivas são consideradas destabilizantes e aquelas que possuem energias negativas são denominadas estabilizantes. Em relação às forças, verifica-se que na distância de equilíbrio a força é nula e para distâncias $d \neq d_0$, aparece uma

força que tenta estabelecer uma geometria óptima para o sistema. Para todas as distâncias $d > d_0$, esta força é atractiva e para todas as distâncias $d < d_0$ é repulsiva. A força atractiva mais forte ocorre no ponto de inflexão da curva. Por outro lado, a força repulsiva torna-se superior à medida que a distância d se torna mais pequena.

Nas ligações de hidrogénio, cada combinação de doador-aceitador apresenta a sua própria curva de energia potencial, uma vez que quanto mais estreito for o mínimo, maior será a constante de força. Ligações de hidrogénio fracas, tais como as $C-H\cdots O$, são caracterizadas por curvas de energia potencial pouco profundas e distâncias de equilíbrio d_0 elevadas. Por sua vez, para as ligações de hidrogénio fortes, como por exemplo as $O-H\cdots O$, a curva de energia potencial é bastante profunda e a distância de equilíbrio d_0 é reduzida.¹⁵

CARACTERIZAÇÃO

As ligações de hidrogénio $A-H\cdots B$ são interacções localizadas que podem ser detectadas de diversas formas, através de:³⁰

- Associação molecular em líquidos e soluções, dando origem a pesos moleculares e propriedades de transporte pouco normais;
- Determinação da estrutura cristalina, particularmente por difracção de neutrões, na qual um protão é encontrado perto dos átomos electronegativos A e B ;
- Calores de vaporização de sólidos e líquidos anormalmente elevados;
- Um desvio na frequência e um eventual alargamento da banda de alongação da ligação $A-H$;
- Um desvio para o azul no espectro electrónico associado a transições $\pi^* \leftarrow n$;
- Um desvio para maiores frequências (desvios químicos mais elevados) no espectro de ressonância magnética de protão.

Sendo assim, os métodos experimentais mais vulgarmente utilizados na caracterização das ligações de hidrogénio são:

- Difracção de raios-X ou de neutrões (em cristais);
- Espectroscopia de Infravermelho e Raman (pode fornecer informação relativa às deformações e alongações das ligações $A-H$ e dos grupos aceptadores);
- Espectroscopia electrónica de absorção e fluorescência na zona do ultravioleta;
- Espectroscopia RMN em líquidos e sólidos;
- Espectroscopia Fotoelectrónica de raios-X (em inglês, sigla XPS);

e ainda os métodos computacionais que permitem uma avaliação da energia, geometria e natureza das interacções em estudo.

1.3. Exemplos da ocorrência de ligações de hidrogénio

1.3.1. Sistemas orgânicos, bioquímicos e organometálicos

Nos últimos anos, tem sido dada muita atenção à natureza das ligações de hidrogénio e aos seus efeitos nas microestruturas e nas propriedades físicas de vários materiais.³¹⁻³⁴ O exemplo clássico é o da água. Outros exemplos de sistemas que possuem ligações de hidrogénio em biologia molecular envolvem a hibridação de duplexes do ADN³⁵ e as estruturas secundárias da α -hélice e da folha- β em polipeptídeos, que são estabilizados através de ligações de hidrogénio intra e intermoleculares, respectivamente.^{36, 37} Também nas propriedades físicas de misturas poliméricas as ligações de hidrogénio parecem ter um efeito profundo, incluindo nas temperaturas de fusão, transição vítrea, estrutura cristalina, solubilidade e miscibilidade.³⁸

As ligações de hidrogénio fracas do tipo $C-H\cdots O$ podem estar envolvidas na construção molecular de novos sistemas, à semelhança do que acontece com as ligações fortes como $O-H\cdots O$ e $N-H\cdots O$. Por exemplo, em engenharia de cristais a sua importância tem sido reconhecida^{29, 39} uma vez que os contactos $C-H\cdots O$ podem ter um efeito determinante no empacotamento cristalino.⁴⁰⁻⁴²

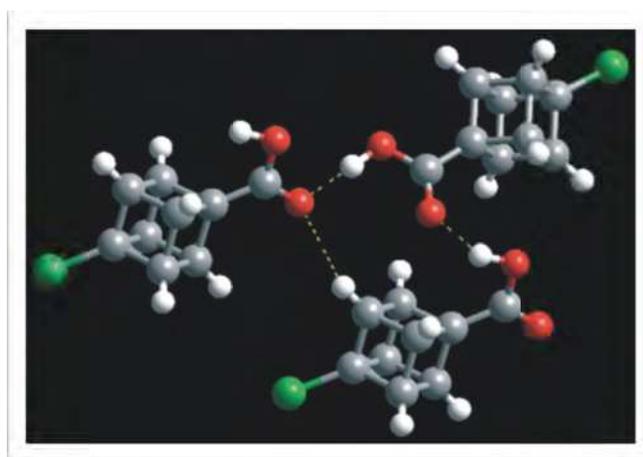


Figura 1.3 – Em muitos ácidos cubanocarboxílicos, os grupos carboxílicos (CO_2H) formam padrões baseados em ligações $O-H\cdots O$ e $C-H\cdots O$. No caso do ácido 4-bromocubanocarboxílico,⁴³ a ligação $C-H\cdots O$ fornece um suporte adicional à estrutura. Pensa-se que sem esta interacção a topologia invulgar destes compostos não poderia ser concretizada.⁴⁴

A determinação da estrutura cristalina de um composto nem sempre é evidente após a identificação de uma importante interação intermolecular, uma vez que a mesma interação pode ser usada na construção de padrões muito distintos. Como exemplo (**Figura 1.3**), geralmente o grupo carboxilo (-CO₂H) forma arquiteturas cristalinas baseadas em ligações *O-H...O*.⁴³ No entanto, em ácidos cubanocarboxílicos, os grupos carboxilo formam padrões que contêm os dois tipos de interação *O-H...O* e *C-H...O*.

Apesar de já ser conhecido há algum tempo que os grupos *C-H* podem formar ligações de hidrogénio fracas, as características deste tipo de interação foram apenas exploradas recentemente.^{5, 6, 29, 45} Como regra, a acidez do grupo doador *C-H* (e por consequência a sua potencial força como doador de ligações de hidrogénio) aumenta quando passamos de uma hibridação dos átomos de carbono de *sp*³ para *sp*² e *sp*. Esta acidez também aumenta quando o grupo doador está rodeado de átomos electrofílicos.^{29, 45} Depois de algumas propostas iniciais de contactos do tipo *C-H...O*,^{22, 23, 46} estes foram positivamente identificados em componentes como os açúcares.²⁰ Actualmente, sabe-se que estas ligações fracas ocorrem frequentemente em sistemas biológicos importantes, dos quais são exemplo os hidratos de carbono,^{14, 47} os ácidos nucleicos^{5, 48-51} e também as proteínas^{26, 52} podendo ser determinantes para a especificidade do emparelhamento de bases⁵³ ou enovelamento de proteínas de um modo geral.⁵⁴ Apesar de individualmente fracas (com energias entre 4.2-8.4 kJ mol⁻¹), a presença de um elevado número de ligações *C_α-H...O* exerce uma enorme influência na estrutura e função de uma proteína^{48, 50, 52} e pode ter efeitos estruturais muito relevantes.^{29, 55, 56} A ligação *C-H...O* desempenha um papel igualmente importante nas interações de ácidos nucleicos com proteínas^{57, 58} e com compostos farmacêuticos.⁵⁹⁻⁶¹

Representando cerca de ~20-25% do total de ligações de hidrogénio no contexto biológico, as interações do tipo *C-H...O* constituem o segundo grupo mais importante de ligações de hidrogénio⁶² e são actualmente consideradas como um componente essencial da estrutura e função de moléculas biológicas. As ligações de hidrogénio mais fortes não são tão abundantes neste tipo de sistemas por serem demasiado rígidas e difíceis de quebrar.

A participação de ligações intermoleculares *C-H...O* em vários processos biológicos, nomeadamente em conformação molecular,^{63, 64} em processos de reconhecimento molecular,⁶⁵⁻⁶⁷ na formação e estabilização de estruturas secundárias,⁶⁸ enovelamento de proteínas e estabilidade,^{69, 70} reacções enzimáticas envolvendo a transferência de protões segundo trajectórias muito específicas^{71, 72} e na estabilidade de sistemas biológicos,²⁶ tem sido assunto de discussão em vários trabalhos de investigação.^{26, 47-51, 73-80}

Grande parte da evidência experimental da presença de ligações *C-H...O* provém da observação de contactos próximos *C...O* em estruturas cristalinas,²⁰ tendo sido pioneiros os trabalhos de Sutor.^{81, 82} Embora estas interações tenham sido observadas com uma variedade de possíveis doadores *C-H* e

aceitadores oxigénio,^{20, 29, 47, 82} incluindo aminoácidos,⁸³ apenas recentemente foram observadas ligações $C-H\cdots O$ na estrutura cristalina de proteínas. A maioria dos contactos observados envolve átomos de hidrogénio ligados a *carbonos- α* na cadeia peptídica, o que é consistente com o carácter polarizável da ligação $C_{\alpha}-H$, que se encontra em posição adjacente a grupos electrofílicos do tipo $N-H$ e $C=O$. Os aceitadores de protão mais observados são os oxigénios carbonílicos existentes nos filamentos adjacentes de *folhas- β* .^{26, 74} Nestes casos, um dos pares de electrões não ligantes do oxigénio interage com o protão $C_{\alpha}-H$ e o outro par de electrões não ligantes interage com o protão $N-H$. Este padrão de ligações de hidrogénio bifurcadas foi igualmente observado em estruturas de proteínas helicoidais.⁷⁴ Adicionalmente, a presença de uma topologia de ligações de hidrogénio bifurcada diferente da referida anteriormente pode ser observada na tripla hélice do colagénio (**Figura 1.4**)⁷⁴ na qual a formação destas ligações pode mesmo representar um papel crítico na determinação da estrutura de enovelamento.⁷⁷ Nesta situação, verifica-se que os pares de electrões do oxigénio interagem com protões $C_{\alpha}-H$ e um dos átomos de hidrogénio é dividido entre dois oxigénios.

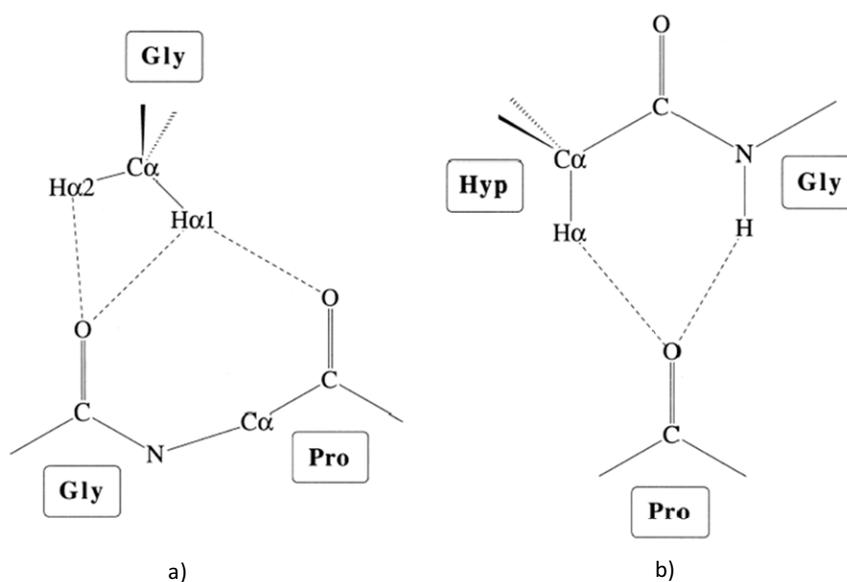


Figura 1.4 – Padrão de ligações de hidrogénio $C_{\alpha}-H\cdots O=C$ e $N-H\cdots O$ em cadeia, observado no modelo de *Fraser et al.*⁸⁴ na molécula de colagénio (Gly – glicina, Pro – prolina, Hyp – Hidroxiprolina).

Os dois átomos de hidrogénio $H_{\alpha 1}$ e $H_{\alpha 2}$ participam numa ligação de hidrogénio bifurcada com o oxigénio carbonílico da Glicina (**Figura 1.4a**). Adicionalmente, o hidrogénio $H_{\alpha 1}$ partilha a sua ligação de hidrogénio com os oxigénios carbonílicos da Prolina, estabelecendo, desta maneira, uma configuração de ligação de hidrogénio centrada em três átomos. Este padrão é observado em todos os resíduos de glicina na zona de colagénio da molécula.⁷⁴ Um segundo padrão de ligações de hidrogénio

$C_{\alpha}-H\cdots O=C$ aparece como uma interacção paralela a cada $N-H\cdots O=C$ (**Figura 1.4b**). As ligações de hidrogénio $C_{\alpha}-H\cdots O=C$ possuem força suficiente para contribuírem fortemente para a estabilização das estruturas secundárias e terciárias das proteínas.⁷⁷ A **Figura 1.5** – a) e b) – mostra exemplos representativos de interacções $C_{\alpha}-H\cdots O$ em *folhas- β* com orientação paralela e antiparalela.

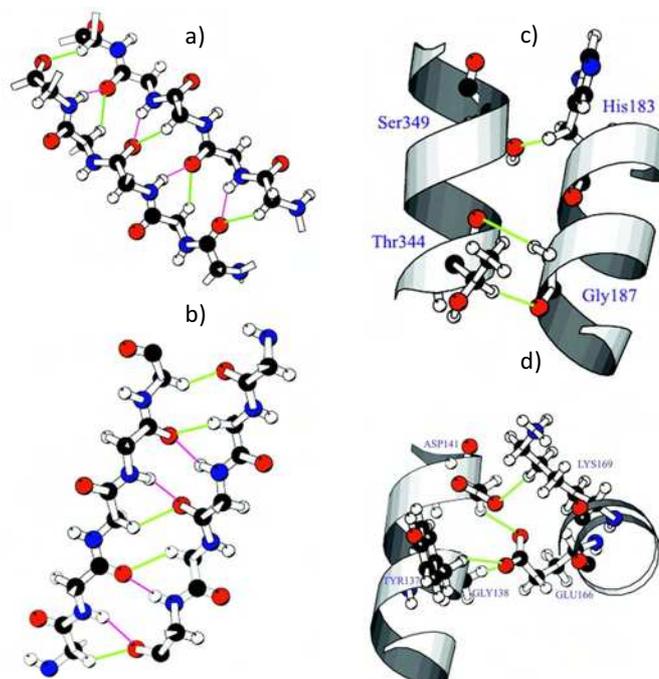


Figura 1.5 – Exemplos representativos de contactos $C-H\cdots O$ entre *folhas- β* adjacentes e α -*hélices*. As linhas a roxo representam ligações de hidrogénio convencionais $N-H\cdots O=C$ e as linhas a verde indicam contactos $C_{\alpha}-H\cdots O$ em **a)** folhas adjacentes com orientação paralela no dímero da cinesina e **b)** folhas adjacentes com orientação antiparalela no gene humano aspartilglucoaminidase (AGA). **c)** hélices adjacentes em orientação anti-paralela no complexo carboxipeptidase-serina e **d)** α -*hélices* de uma orientação quase-vertical na proteassoma (complexo de proteínas).

Na construção de novas estruturas supramoleculares (“*molecular design*”) que tenham como base ligações de hidrogénio fracas (tais como as ligações $C-H\cdots O$), a influência que estas exercem no empacotamento cristalino deve ser conhecida e compreendida antecipadamente.⁸⁵ Os papéis que estas interacções desempenham no empacotamento cristalino podem ser classificados como *inócuos*, de *suporte* e *intrusos*.¹⁵ Embora esta categorização possa ser útil, é também considerada um pouco subjectiva, porque depende do que se pensa que a estrutura cristalina deva ser.⁸⁶ As interacções *inócuas* são fracas e existem simplesmente numa estrutura que seja quase totalmente determinada por outras interacções. Ligações $C-H\cdots O$ de *suporte* não são tão fracas, mas as suas preferências direccionais são satisfeitas dentro das restrições geométricas de interacções mais fortes, tais como

ligações de hidrogénio $O-H\cdots O$ e $N-H\cdots O$. Por último, ligações de hidrogénio $C-H\cdots O$ que desempenham um papel *intrusivo* são eficazes o suficiente para perturbar os padrões e as topologias das interações mais fortes. Por outras palavras, é essencial que estas ligações sejam consideradas para uma correcta descrição do empacotamento cristalino de um sistema.^{29, 55, 86}

A **Figura 1.6** ilustra um exemplo da manifestação de ligações de hidrogénio fracas do tipo $C-H\cdots O$ num complexo de trinitrobenzeno e dibenzantraceno na proporção 1:1 que foi analisado por *Carrell e Glusker*.⁸⁷

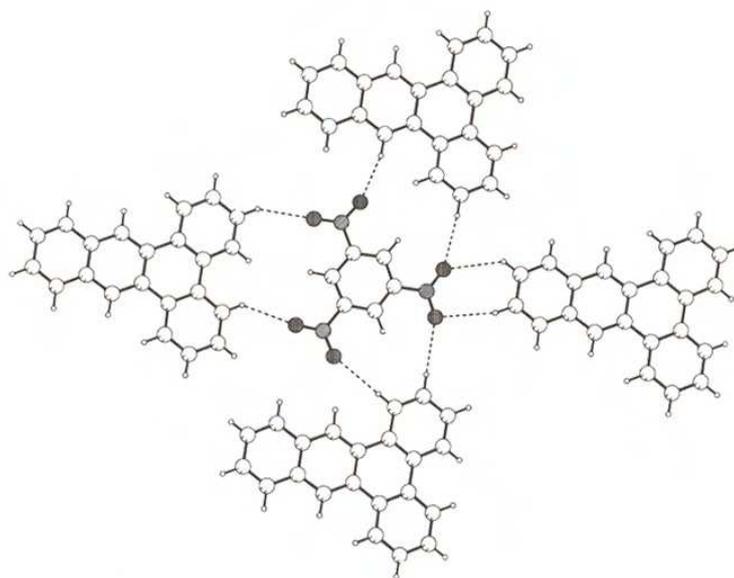


Figura 1.6 – Rede bidimensional de ligações de hidrogénio $C-H\cdots O$ no complexo 1:1 de trinitrobenzeno e dibenzantraceno.⁸⁷

As interações do tipo $C-H\cdots O$ estão também muito presentes em química organometálica, nomeadamente nas estruturas cristalinas de complexos com carbonilo contendo simultaneamente ciclopentadienil, benzeno, carbeno ou qualquer outro fragmento que contenha o grupo $C-H$.¹⁶ Na **Figura 1.7** encontra-se ilustrada a relevância de interações do tipo $C-H\cdots O$ em compostos organotelúricos associados a iões de halogénio (haletos de telúrio) e na auto-organização de unidades moleculares resultando na estrutura supramolecular.⁸⁸ De acordo com o padrão de empacotamento cristalino, observa-se que as moléculas de $(p\text{-MeOC}_6\text{H}_4\text{COCH}_2)_2\text{TeBr}_2$ são colocadas em pares de tal forma que os electrões não ligantes dos átomos de Te encontram-se em direcções opostas e o empacotamento dos anéis benzénicos torna-se possível. Desta forma, a formação de ligações atractivas do tipo $C-H\cdots O$ e interações $\pi\text{-}\pi$ é facilitada, resultando na estabilização da rede cristalina.

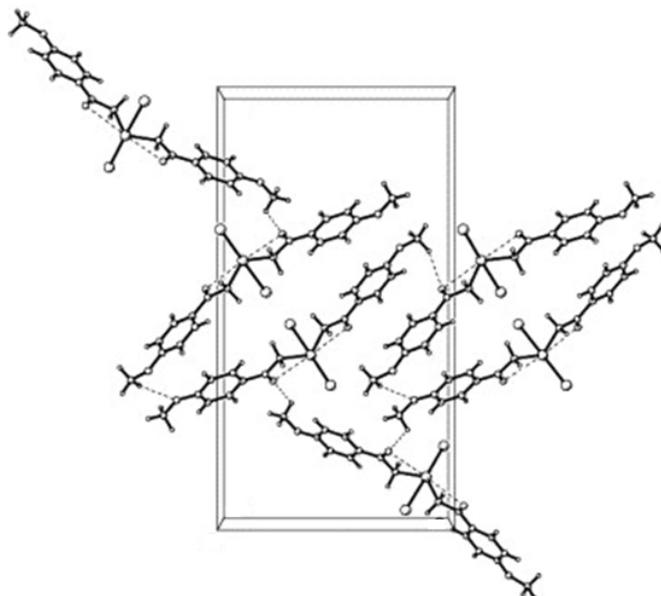


Figura 1.7 – Moléculas de $(p\text{-MeOC}_6\text{H}_4\text{COCH}_2)_2\text{TeBr}_2$ ligadas por intermédio de ligações de hidrogénio do tipo $\text{C-H}\cdots\text{O}$.⁸⁸

1.3.2. Materiais Funcionais Avançados

O desenvolvimento e aplicação de novos materiais tem um efeito significativo em muitas áreas do quotidiano: utilização de energia, tecnologias da comunicação, saúde e segurança. A área dos *materiais funcionais* é considerada representativa de materiais que possuem propriedades ópticas, electrónicas ou magnéticas e muitas são as indústrias que beneficiam das novas propriedades que os *materiais funcionais* podem fornecer, entre as quais a Biotecnologia, Construção e Comunicações. Os *materiais funcionais* possuem inúmeras aplicações e englobam um grande número de materiais orgânicos e inorgânicos sendo por isso muito importante procurar novos caminhos na preparação de materiais, assim como entender a relação entre a estrutura e as propriedades dos mesmos.

O que distingue um *material estrutural* de um *material funcional* é o facto de as suas propriedades químicas e físicas serem sensíveis a mudanças no ambiente, tais como a temperatura, pressão, campo eléctrico e magnético, comprimento de onda óptico, existência de moléculas de gás absorvidas e valores de pH. Como exemplos de *materiais funcionais* destacam-se: o composto ferroeléctrico BaTiO_3 ,⁸⁹ o sensor de campo magnético $\text{La}_{1-x}\text{Ca}_x\text{MnO}_3$, o sensor acústico LiNbO_3 ,⁹⁰ o sensor gasoso de petróleo líquido constituído por SnO_2 dopado com Pd, semicondutores detectores de luz (CdS, CdTe), materiais piezoeléctricos de alta temperatura Ta_2O_5 , o condutor iónico de $\text{Y}_2(\text{Sn}_y\text{Ti}_{1-y})_2\text{O}_7$ entre muitos outros.

Neste contexto da Ciência dos Materiais, a engenharia de cristais (desenho e concepção de novos materiais com propriedades pré-definidas⁹¹) pressupõe a arquitectura de materiais sólidos nos quais determinados arranjos supramoleculares são associados a propriedades físicas pré-estabelecidas. De particular relevância é a construção de materiais ópticos não-lineares (NLO - Non-linear Optics), que possuem aplicações baseadas no efeito da geração de 2ª harmónica (SHG – second harmonic generation) ou a modelação electro-óptica (EO – electro-optical). Um exemplo interessante neste contexto é o de um cromóforo bi-dimensional de transferência de carga hiperpolarizável 1,3-dibromo-2,4,6-trinitrobenzeno⁹² (**Figura 1.8**) que, pelo facto de cristalizar com um grupo não-centrossimétrico $C2$, num arranjo perfeitamente polar, proporciona o aumento de intensidade do sinal SHG.⁹² Este composto também ilustra a utilização de ligações $C-H\cdots O$ na engenharia de cristais. Através da análise da estrutura cristalina, observa-se a formação de camadas paralelas, dentro das quais o composto adopta um empacotamento hexagonal com um arranjo perfeitamente polar estabelecido por ligações de hidrogénio $C-H\cdots O$ bifurcadas e interacções $Br_2\cdots O_2N$.

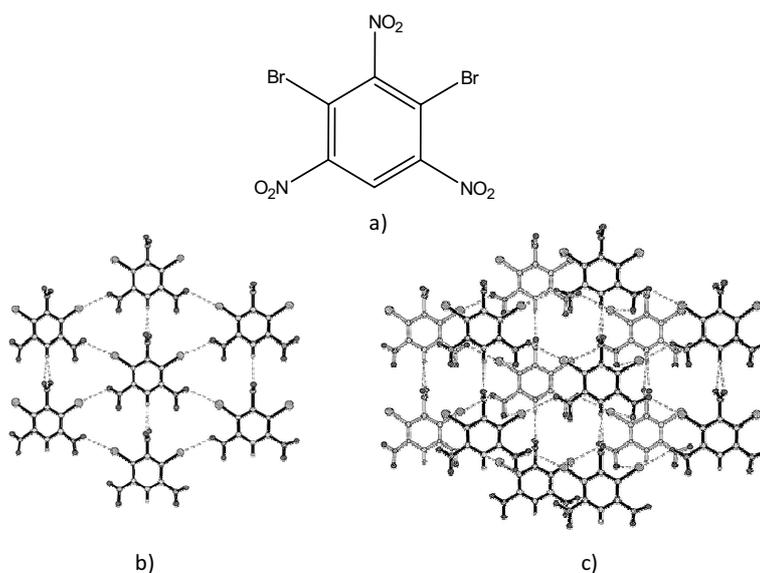


Figura 1.8 – a) Representação esquemática da estrutura molecular do 1,3-dibromo-2,4,6-trinitrobenzeno, b) rede hexagonal formada no interior das duas camadas paralelas observadas na c) estrutura cristalina do composto na qual se verifica a existência de ligações $C-H\cdots O$ ao longo dos eixos polares. As duas camadas são adicionalmente estabilizadas por uma interacção $Br_2\cdots O_2N$.⁹²

1.3.3. Polimorfos e Pseudopolimorfos

O estudo dos fenómenos de polimorfismo e pseudopolimorfismo enquadra-se no contexto desta tese, uma vez que estes dois conceitos têm por base a existência de diferentes interacções

intermoleculares, particularmente ligações de hidrogénio.

O polimorfismo^{93, 94} refere-se à situação em que uma determinada molécula existe com diferentes empacotamentos cristalinos e/ou diferentes conformações moleculares que são estáveis sob diferentes condições. Pseudopolimorfismo é um termo que se refere a formas cristalinas com moléculas de solvente como parte integrante da estrutura.⁹⁵ Sendo assim, os polimorfos podem ser entendidos como isómeros supramoleculares, espécies nas quais o posicionamento relativo das mesmas moléculas é distinto e os pseudopolimorfos como um tipo de cocrystal.

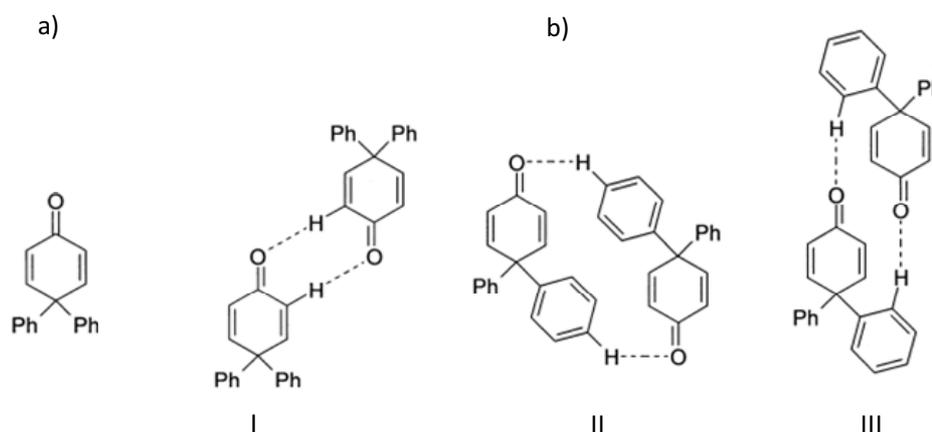


Figura 1.9 – a) Representação esquemática da estrutura molecular de 4,4-difenil-2,5-ciclohexadienona e b) três padrões distintos (I, II e III) de ligações de hidrogénio do tipo $C-H\cdots O$ utilizados na formação dos diferentes polimorfos.⁹⁶

Um exemplo interessante de polimorfismo baseado em ligações fracas do tipo $C-H\cdots O$ é o de um sistema que exhibe polimorfismo conformacional e concomitante, bem como isomorfismo conformacional. A ocorrência simultânea para a mesma molécula destes fenómenos é rara e foi descrita para o composto 4,4-difenil-2,5-ciclohexadienona (**Figura 1.9a**).⁹⁶

Neste estudo,⁹⁶ foram identificadas 19 moléculas cristalograficamente independentes em quatro estruturas cristalinas (A - D) que podem ser classificadas como polimorfos conformacionais. No entanto, as formas A, B e C são também consideradas polimorfos concomitantes uma vez que cristalizam a partir do mesmo recipiente. As formas B, C e D são ainda consideradas isomorfos conformacionais pois possuem múltiplas configurações de 4,4-difenilciclohexa-2,5-dienona no mesmo cristal. Os quatro polimorfos mencionados (A, B, C e D) estão representados nas **Figuras 1.10** e **1.11**, nas quais se encontram assinaladas as ligações de hidrogénio fracas do tipo $C-H\cdots O$ bem como os diferentes padrões de ligações identificados como I, II e III na **Figura 1.9b**.

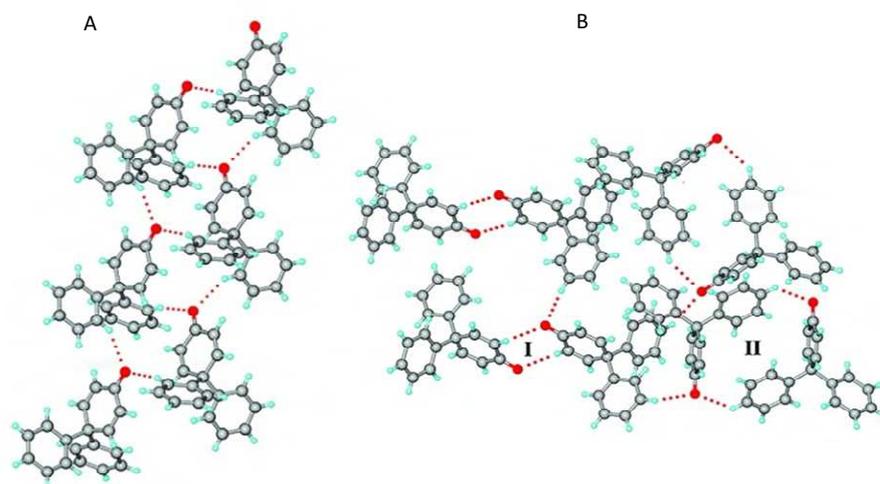


Figura 1.10 – Hélices de ligações de hidrogênio $C-H\cdots O$ entre moléculas da forma A (esquerda) e padrão centrossimétrico de ligações de hidrogênio $C-H\cdots O$ (I e II).⁹⁷

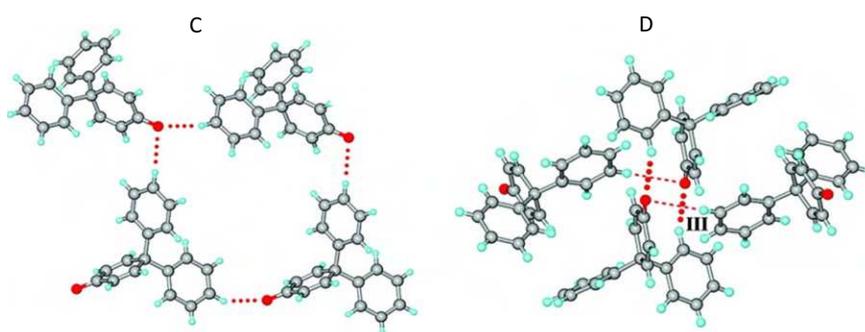


Figura 1.11 – Ligações de hidrogênio $C-H\cdots O$ nos polimorfos C e D de 4,4-difenil-2,5-ciclohexadienona.⁹⁷

Os conceitos de polimorfismo/pseudopolimorfismo assumem particular relevância na área Farmacêutica, uma vez que polimorfos de um composto com características terapêuticas podem ter propriedades bastante distintas. As suas solubilidades podem ser diferentes, bem como a sua actividade biológica, nomeadamente no que diz respeito à biodisponibilidade. Em alguns casos, a forma menos estável cristaliza primeiro e depois transforma-se lentamente, com o tempo, no cristal mais estável. Isto pode constituir um problema se a forma activa do medicamento é o polimorfo menos estável que se vai transformando na forma mais estável – possivelmente menos activa e/ou prejudicial à saúde – no decorrer do armazenamento. A carbamazepina é um bom exemplo neste contexto, uma vez que é um dos principais fármacos utilizados no tratamento da epilepsia, actuando como bloqueador dos canais de sódio das membranas dos neurónios. Para além do interesse do ponto de vista farmacológico, este composto tem sido utilizado como modelo no estudo do polimorfismo cristalino.

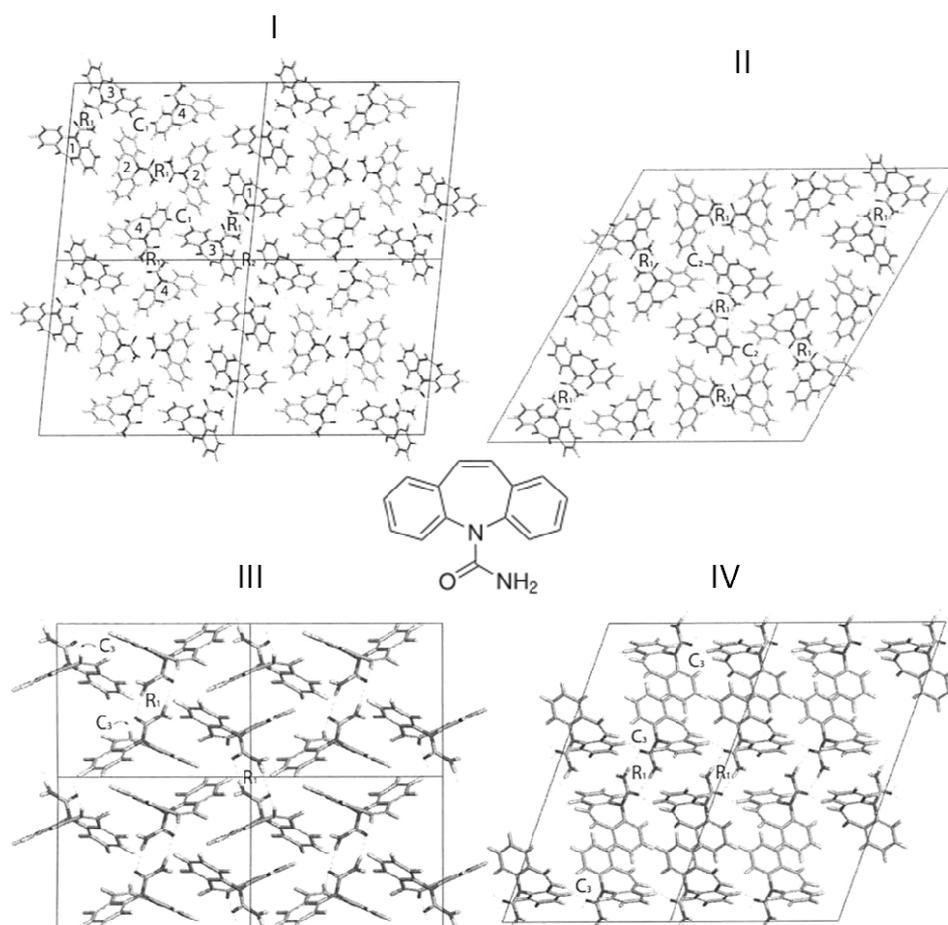


Figura 1.12 – Diagramas de empacotamento das quatro formas polimórficas da carbamazepina exibindo padrões de ligações de hidrogénio.⁹⁸

A carbamazepina cristaliza em quatro formas polimórficas anidras - designadas Forma I, II, III e IV – triclínica, trigonal, p-monoclínica e c-monoclínica, respectivamente (**Figura 1.12**). As diferenças entre as quatro formas cristalinas residem apenas no empacotamento das unidades diméricas do grupo carboxamida. Este pode ser descrito pelo padrão de interações fracas $C-H \cdots O$ que prevalece nas quatro formas polimórficas.⁹⁸

1.3.4. Sistemas hóspede-hospedeiro

A química supramolecular, tal como referido na **Secção 1.1.2**, é um domínio científico altamente interdisciplinar que cobre aspectos químicos, físicos e biológicos de espécies químicas de elevada complexidade, que são mantidas unidas e organizadas por intermédio de interações intermoleculares ligantes (não covalentes). As suas fundações foram lançadas há menos de 50 anos e,

em 1987, os pioneiros nesta área *Pedersen, Cram e Lehn* foram galardoados com o Prémio Nobel da Química. De acordo com uma definição proposta por *Lehn*, a Química supramolecular é “*a Química para além da molécula*”.⁹⁹ Ao serem colocadas em sistemas organizados, diferentes moléculas podem actuar de uma forma cooperativa, de tal modo que a sua função expande-se para além do plano individual. *Lehn* realça ainda o papel de interacções não covalentes em Química supramolecular em comparação com o papel desempenhado pelas interacções covalentes em química orgânica clássica.

As espécies supramoleculares são caracterizadas tanto pelo arranjo espacial dos seus componentes, a sua arquitectura ou super-estrutura, como pela natureza das ligações intermoleculares que se estabelecem. Vários tipos de interacções podem ser distinguidos, de acordo com diferentes graus de força, direcionalidade e dependência angular ou com a distância: coordenação metal-ião, forças electrostáticas, ligações de hidrogénio, interacções de *van der Waals*, interacções doador-aceitador, entre outras.¹⁰⁰

O campo da Química supramolecular tem-se diversificado enormemente incluindo complexos de transferência de carga, mono e policamadas, micelas, vesículas, cristais líquidos, cocristais e complexos de inclusão.¹⁰¹

Os compostos/complexos de inclusão são estruturas supramoleculares nas quais uma molécula hóspede, ou pelo menos parte dela, está inserida na cavidade da molécula hospedeiro. Frequentemente uma mistura entre interacções fracas e fortes determina as características da inclusão. O hóspede pode ser uma entidade química, atómica ou molecular, desde um simples anião orgânico até moléculas orgânicas complexas e de grandes dimensões. Por seu lado, o hospedeiro é frequentemente uma molécula de grandes dimensões ou um agregado molecular que possui uma abertura central ou cavidade de dimensões consideráveis. São exemplo de moléculas hospedeiras os calixerenos, fulerenos, esferandos, dendrímeros, zeólitos, éteres em coroa e ciclodextrinas.¹⁰¹

A entidade molecular resultante do processo de inclusão pode ser denominada complexo ou composto de inclusão, sendo que o termo complexo é mais apropriado para sistemas hóspede-hospedeiro em solução, uma vez que a característica mais importante deste sistema em solução é o equilíbrio dissociação-associação.¹⁰² Por sua vez, o sistema hóspede-hospedeiro no estado sólido é descrito por uma estrutura definida, pelo que o termo composto de inclusão é o mais adequado. Sendo assim, o enquadramento científico deste tema na presente dissertação será feito no âmbito de compostos de inclusão, uma vez que os sistemas hóspede-hospedeiro foram estudados no estado sólido.

As Ciclodextrinas (CDs) são uma classe importante de moléculas hospedeiras. Estes oligosacárideos são constituídos por unidades de D-glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas α -1,4. As ciclodextrinas mais vulgares possuem 6, 7 e 8 unidades de glicose e são normalmente designadas por α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente (**Figura 1.13**).

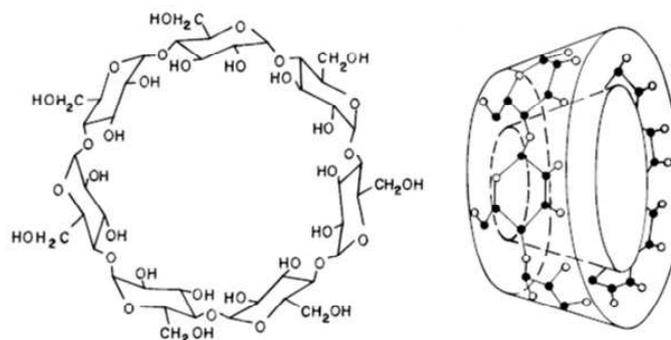


Figura 1.13 – Fórmula molecular (esquerda) e esquemática (direita) da β -Ciclodextrina.¹⁰³

Em consequência da ligação glicosídica α -1,4 estabelecida e da conformação adoptada, as CDs apresentam uma estrutura com a forma de um cone oco truncado (**Figura 1.13**). Os três grupos hidroxilo por molécula de glicose estão localizados na parte externa, tornando as ciclodextrinas solúveis em água. As suas estruturas cristalinas são dominadas por redes extensas de ligações de hidrogénio cooperativas $O-H\cdots O$. A cavidade molecular possui grupos $C-H$ e átomos de oxigénio glicosídicos que unem as unidades de glicose, o que torna a cavidade parcialmente hidrofóbica.¹⁵

É reconhecido que as ligações de hidrogénio entre o hóspede e as paredes da cavidade das ciclodextrinas desempenham um papel relevante na determinação da estrutura e propriedades dos compostos de inclusão.^{63, 104-111} Em particular, ligações de hidrogénio do tipo $C-H\cdots O$ têm sido observadas em vários compostos de inclusão em ciclodextrinas.^{14, 47, 56, 112-119}

Um caso interessante neste domínio é o do complexo β -CD-(2-Butin-1,4-diol) heptahidratado,¹¹⁴ no qual cada cavidade de β -CD contém uma molécula de 2-Butin-1,4-diol e duas moléculas de água que possuem posições ordenadas e bem definidas (**Figura 1.14**).

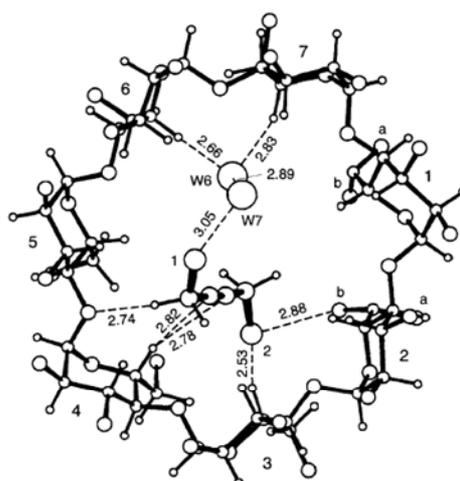


Figura 1.14 – Contactos estabelecidos pela molécula hóspede 2-Butin-1,4-diol com a β -CD. Para além dos contactos convencionais $O\cdots O$ existem algumas interações fracas: $C-H\cdots O$ e $C-H\cdots \pi$.¹¹⁴

1.3.5. Agregados de água em materiais funcionais

A água, base da vida, desempenha um papel importante em muitos sistemas químicos e biológicos.^{120, 121} Agregados de água e água em geometrias confinadas têm recebido cada vez mais atenção devido ao avanço nas técnicas de tratamento de sistemas que envolvam ligações de hidrogénio.¹²² A exploração das propriedades estruturais de pequenos agregados de água fornece a chave para entender a água como um todo (*“bulk water”*), nos seus estados líquido e sólido, bem como fenómenos de solvatação. Neste contexto, os poros e canais existentes em materiais como zeólitos microporosos constituem recipientes ideais para estudar a natureza e comportamento das nanogotas de água. É possível encontrar na literatura diversos exemplos de agregados de água formados no interior de arranjos supramoleculares de natureza orgânica, inorgânica ou híbrida. A estabilidade destas estruturas pouco usuais de agregados de água é justificada apenas pela existência de ligações de hidrogénio entre as moléculas de água e grupos pertencentes ao cristal. Nas **Figuras 1.15** e **1.16** encontram-se representados dois exemplos de agregados constituídos por oito moléculas de água encontrados no interior de um complexo supramolecular orgânico¹²³ e do composto $\text{Ce}(\text{dipic})_2(\text{H}_2\text{O})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (em que dipicH_2 é o ácido dipicolínico),¹²⁴ respectivamente.

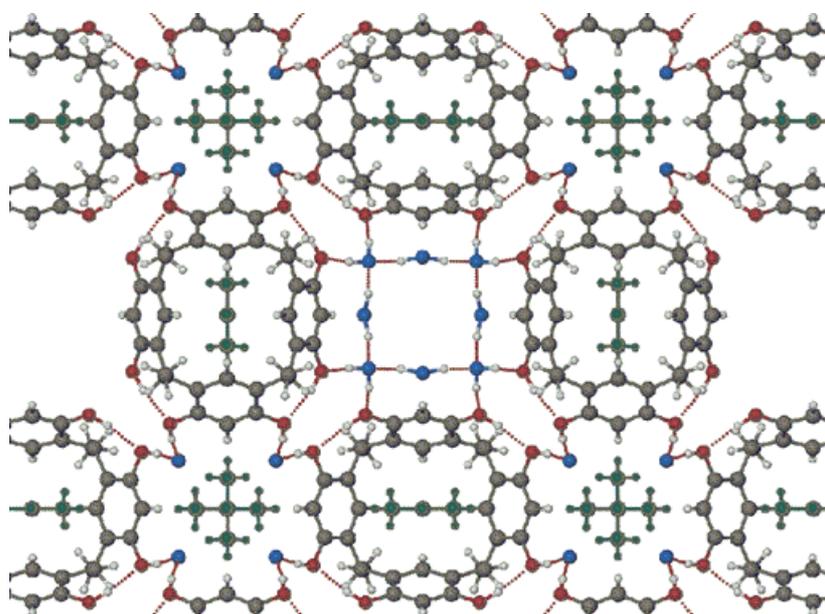


Figura 1.15 – Vista parcial segundo um eixo perpendicular às bicamadas de calix[4]resorcinareno. O agregado de água é mostrado ao centro, com as ligações de hidrogénio representadas a tracejado.¹²³ (cores: C – cinzento, O – vermelho, H – branco, acetona – verde, oxigénios da H_2O – azul)

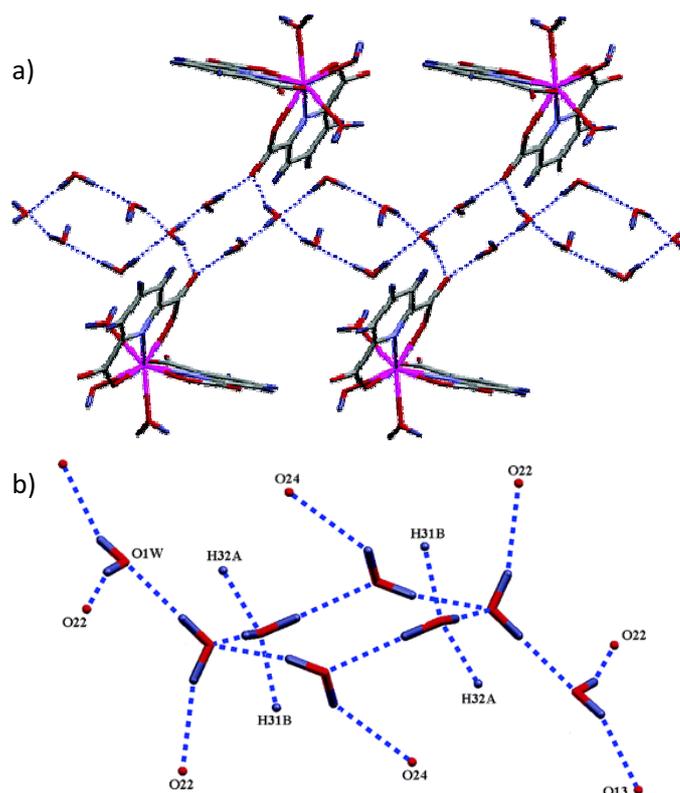


Figura 1.16 – a) rede unidimensional de “cadeiras” de água e b) octâmero centrossimétrico de água que inclui os contactos por ligações de hidrogénio com os átomos de oxigénio do grupo carboxilato.¹²⁴

A importância da modelação molecular no campo da química supramolecular é amplamente reconhecida. Tal como esperado, existem inúmeros trabalhos na literatura relacionados com as estruturas em fase gasosa de pequenos agregados de água $((\text{H}_2\text{O})_n$, geralmente com $n < 12$) estudados por intermédio de cálculos *ab initio*.¹²⁵⁻¹²⁷ No entanto, apenas alguns trabalhos tentam racionalizar a formação de agregados de água em hóspedes orgânicos/inorgânicos/organometálicos cristalinos e em espaços confinados,^{128, 129} deixando muito espaço a progresso.

Por seu lado, a espectroscopia vibracional constitui uma ferramenta poderosa no estudo das propriedades de moléculas de água em espaços confinados.¹³⁰⁻¹³² O confinamento (restrição espacial) permite que as moléculas de água estejam envolvidas num esquema de ligações supramolecular com um elevado grau de conectividade e a espectroscopia vibracional é particularmente sensível a alterações nas ligações de hidrogénio estabelecidas entre as moléculas de água. Os trabalhos de *Kim* e colaboradores ilustram bem a associação dos cálculos *ab initio* com a espectroscopia vibracional na determinação da estrutura de agregados de água – desde os trabalhos iniciais com dímeros¹³³ passando pelo decâmero¹³⁴ e mais recentemente para agregados protonados com 21 e 22 moléculas de água $[\text{H}(\text{H}_2\text{O})_n]^+$.¹³⁵ Ainda no âmbito deste tópico, de salientar um trabalho de *Byl et. al.* que avalia a

estrutura de nanogotas no interior de nanotubos de carbono,¹³⁶ evidenciando a importância de métodos espectroscópicos conjugados com modelação computacional no estudo da estrutura e características energéticas da água em espaços confinados.

1.4. Objectivos da dissertação

O trabalho apresentado pretende contribuir para o conhecimento e interpretação de interacções intermoleculares fracas existentes em diversos tipos de sistemas, desde os mais simples (compostos químicos com interesse farmacêutico), passando por compostos de inclusão em ciclodextrinas e também por agregados de água encontrados nas estruturas cristalinas de materiais funcionais. Dada a dificuldade em explorar detalhadamente este tipo de interacções em sistemas muito complexos, procurou-se estudar inicialmente sistemas mais simples e, progressivamente, evoluir para o estudo de sistemas que representam um maior grau de dificuldade no que diz respeito à investigação das interacções determinantes neles existentes.

Nos estudos realizados no âmbito desta dissertação, a espectroscopia vibracional foi utilizada como fonte privilegiada de informação, pela sua sensibilidade às interacções em estudo. A análise e interpretação dos resultados foram efectuadas com o auxílio da simulação computacional por intermédio de cálculos DFT, os quais permitem a determinação de diversas propriedades afectadas pela presença de ligações de hidrogénio *C-H...O*. Este tipo de cálculos tem desempenhado um papel muito importante no estudo das interacções intermoleculares, tendo-se revelado útil na previsão de geometrias de complexos moleculares anteriores à sua determinação experimental. Para além destas previsões geométricas, os cálculos DFT têm fornecido a dependência da distância e dos ângulos das superfícies de energia potencial das interacções.

Assim, esta dissertação reúne estudos envolvendo sistemas simples como a Niclosamida, Nitrofurantoína, misturas binárias de ácidos gordos (ácidos palmítico, mirístico, láurico, cáprico, caprílico e esteárico), ácido *trans*-3-Hidroxicinâmico e 5-Fluorouracilo. Relativamente a sistemas de maior complexidade, foram preparados diferentes compostos de inclusão em ciclodextrinas, utilizando derivados do fenol (3-Metoxifenol, 2-Metoxifenol e 3-Metilfenol) como hóspedes e α -, β - e γ -CD como moléculas hospedeiras. Por último, efectuaram-se alguns estudos, espectroscópicos e computacionais, envolvendo materiais híbridos orgânicos-inorgânicos com especial ênfase no estudo da natureza e comportamento de agregados de água existentes nos poros e canais destes materiais.

A presente dissertação consta de nove Capítulos, incluindo este enquadramento científico, no qual se pretende dar uma visão global do trabalho realizado, bem como descrever os objectivos mais relevantes.

Capítulo 2 – É de particular interesse para o enquadramento desta tese a relevância da utilização de métodos espectroscópicos (nomeadamente as técnicas de espectroscopia de Raman – convencional e SERS - e Infravermelho) e computacionais (particularmente cálculos DFT). Por um lado, a espectroscopia vibracional, nas suas várias vertentes, apresenta uma elevada sensibilidade no estudo de ligações de hidrogénio pela capacidade que possui para detectar a associação de moléculas. Complementarmente, a utilização de cálculos DFT permite obter informação relativa aos processos de auto-associação molecular por ligações de hidrogénio, em termos de energia e geometria.

Capítulo 3 – O sistema niclosamida é conhecido por apresentar transições pseudopolimórficas anidro-hidrato e, neste contexto, foram estudados os mecanismos de hidratação e desidratação destes sistemas em diferentes condições experimentais, nomeadamente de temperatura e humidade. Determinaram-se igualmente os valores de humidade relativa crítica para os processos de hidratação e desidratação.

Capítulo 4 – As duas formas anidras da Nitrofurantoína foram estudadas, do ponto de vista das interacções intermoleculares existentes e foi efectuada a atribuição completa dos seus espectros vibracionais (FT-IR e Raman) usando a metodologia PiMM – Pares em Materiais Moleculares (sigla do inglês *Pairs in Molecular Materials*). Adicionalmente, esta metodologia foi também parcialmente aplicada na investigação dos diagramas de fase sólido-líquido de misturas binárias de ácidos gordos diferindo em 4 e 2 átomos de carbono na cadeia principal.

Capítulo 5 – A utilização combinada da espectroscopia vibracional, análise termogravimétrica e cálculos DFT foi aplicada ao estudo dos compostos de inclusão de 3-Metoxifenol, 2-Metoxifenol e 3-Metilfenol com α -, β - e γ CDs. As estequiometrias de inclusão foram determinadas por análise combinada de TG e DSC e foram propostas possíveis geometrias de inclusão para os compostos em α CD com base em alterações espectroscópicas e em dados recolhidos da CSD (Cambridge Structural Database).

Capítulo 6 – Os compostos farmacêuticos 5-Fluorouracilo e ácido *trans*-3-Hidroxicinâmico foram analisados por espectroscopia de Raman intensificada à superfície (SERS). Foram utilizadas duas técnicas distintas, SERS em colóide e em eléctrodo, e os respectivos espectros analisados e interpretados com base em cálculos do tipo DFT. Na interpretação dos resultados, foi dado particular ênfase ao mecanismo de intensificação por transferência de carga e à forte intensificação da vibração 8a (ν_{ring}), característica dos espectros SERS de compostos aromáticos.

Capítulo 7 – Vários materiais porosos híbridos orgânicos-inorgânicos foram investigados por espectroscopia de Raman, com a realização de estudos de deuteração e de baixas temperaturas.

Adicionalmente, os agregados de água formados no interior do material $(\text{H}_2\text{pip})_3[\text{Ge}(\text{hedp})_2] \cdot 14(\text{H}_2\text{O})$ foram investigados por cálculos DFT, por forma a determinar as estruturas mais estáveis e justificar a invulgar conformação em cadeira centrossimétrica detectada neste composto.

Capítulo 8 – Neste Capítulo foi reunido o conjunto de considerações mais relevantes retiradas de cada um dos capítulos anteriormente referidos. Foram igualmente sugeridos estudos de aprofundamento de algumas questões e novas investigações suscitadas pelos trabalhos efectuados.

Capítulo 9 – A execução experimental foi descrita de forma pormenorizada, nomeadamente no que diz respeito aos compostos e técnicas utilizadas bem como alguns métodos de análise e tratamento dos dados obtidos.

1.5. Publicações científicas

O trabalho de investigação exposto nesta dissertação serviu de base à publicação dos seguintes artigos científicos:

Pseudopolymorphic transitions of Niclosamide monitored by Raman Spectroscopy

Mariana Sardo, Ana M. Amado e Paulo J. A. Ribeiro-Claro

Journal of Raman Spectroscopy **2008**, 39, 1915-1924

Surface enhanced Raman scattering of trans-3-Hydroxycinnamic acid adsorbed on silver nanoparticles

Mariana Sardo, Cristina Ruano, José Luis Castro, Isabel López-Tocón, Paulo J. A. Ribeiro-Claro e J.C. Otero

Chemical Physics Letters **2008**, 467, 101-104

Inclusion Compounds of Phenol derivatives with Cyclodextrins: a combined spectroscopic and thermal analysis

Mariana Sardo, Ana M. Amado, Paulo J. A. Ribeiro-Claro

Journal of Raman Spectroscopy **2009**, 40, 1624-1633.

Hydrogen-bonding in nitrofurantoin polymorphs: a computationally-assisted spectroscopic study

Mariana Sardo, Ana M. Amado, Paulo J. A. Ribeiro-Claro

Journal of Raman Spectroscopy **2009** (DOI: 10.1002/jrs.2346)

Surface-enhanced Raman scattering of 5-Fluorouracil adsorbed on silver nanostructures

Mariana Sardo, Cristina Ruano, José Luis Castro, Isabel López-Tocón, Juan Soto, Paulo Ribeiro-Claro e Juan Carlos Otero

Physical Chemistry Chemical Physics (PCCP) **2009**, 11, 1437-7443.

The solid-liquid phase diagrams of binary mixtures of consecutive, even saturated fatty acids: differing by four carbon atoms

Mariana C. Costa, **Mariana Sardo**, Marlus P. Rolemberg, Paulo Ribeiro-Claro, Antonio J. A. Meirelles, João A. P. Coutinho, M. A. Krähenbühl

Chemistry and Physics of Lipids **2009**, 157, 40-50

The solid-liquid phase diagrams of binary mixtures of consecutive, even saturated fatty acids

Mariana C. Costa, **Mariana Sardo**, Marlus P. Rolemberg, João A. P. Coutinho, Antonio J. A. Meirelles, Paulo Ribeiro-Claro, M. A. Krähenbühl

Chemistry and Physics of Lipids **2009**, 160, 85-97.

Water Framework Within Nanoporous Organic-Inorganic Hybrid $(H_2pip)_3[Ge(hedp)_2] \cdot 14(H_2O)$

João Rocha, Fa-Nian Shi, Filipe A. Almeida Paz, Luís Mafra, **Mariana Sardo**, Luís Cunha-Silva, James Chisholm, Paulo Ribeiro-Claro, Tito Trindade

Submetido

1.6. Referências

1. J. D. Watson, F. H. C. Crick, Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
2. J. D. Watson, *DNA: the secret of life*, Borzoi Books, New York, **2003**.
3. G. R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology*, Cap. 2, 29-121, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
4. D. Braga, F. Grepioni, Intermolecular interactions and supramolecular organization in organometallic solids, *Chem. Commun.* **1996**, 571-578.
5. G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, Berlin, **1991**.
6. G. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen bonding*, Oxford University Press, New York, **1997**.
7. A. Werner, Ueber Haupt- und Nebervalenzen und die Constitution der Ammoniumverbindungen, *Liebigs Ann.* **1902**, *322*, 261-296.
8. A. Hantzsch, Über die Isomerie-Gleichgewichte des Acetessigesters und die sogen. Isorrhopsis seiner Salze, *Berichte* **1910**, *43*, 3049-3076.
9. T. S. Moore, T. F. Winmill, The State of Amines in Aqueous Solution, *J. Chem. Soc.* **1912**, *101*, 1635-1676.
10. P. Pfeiffer, Zur Kenntnis der sauren Salze der Carbonsäuren, *Berichte* **1914**, *47*, 1580-1596.
11. W. M. Latimer, W. H. Rodebush, Polarity and ionization from the standpoint of the Lewis theory of valence, *J. Am. Chem. Soc.* **1920**, *42*, 1419-1433.
12. L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond*, University Press, Ithaca, NY, **1939**.
13. Y. Maréchal, *The Hydrogen bond and the water molecule*, Elsevier, Amsterdam, **2007**.
14. T. Steiner, W. Saenger, Role of C-H...O hydrogen bonds in the coordination of water molecules. Analysis of neutron diffraction data, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4540-4547.
15. G. R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology*, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
16. M. J. Calhorda, Weak hydrogen bonds: theoretical studies, *Chem. Commun.* **2000**, 801-809.
17. T. Steiner, G. R. Desiraju, Distinction between the weak hydrogen bond and the van der Waals interaction, *Chem. Commun.* **1998**, 891-892.
18. D. Braga, L. Maini, M. Polito, F. Grepioni, in *Supramolecular assembly via Hydrogen bonds II*, p. 1-32, (Ed.: D. M. P. Mingos), Springer, Berlin, **2004**.
19. T. Steiner, The Hydrogen Bond in the Solid State, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 48-76.
20. R. Taylor, O. Kennard, Crystallographic evidence for the existence of CH...O, CH...N and CH...Cl hydrogen bonds, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5063-5070.
21. G. R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology*, Cap. 1, 1-28, Oxford University Press, Oxford, **1999**.

22. J. L. Sussman, N. C. Seeman, S. H. Kim, H. M. Berman, Crystal-structure of a naturally occurring dinucleoside phosphate-uridylyl 3',5' adenosine phosphate model for RNA chain folding *J. Mol. Biol.* **1972**, *66*, 403-421.
23. J. Rubin, T. Brennan, M. Sundaralingam, Crystal and molecular structure of a naturally occurring dinucleoside monophosphate. Uridylyl-(3'-5')-adenosine hemihydrate. Conformational rigidity of the nucleotide unit and models for polynucleotide chain folding, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3112-3128.
24. J. M. Benevides, G. J. Thomas, A solution structure for poly(rA).poly(dT) with different furanose pucker and backbone geometry in rA and dT strands and intrastrand hydrogen bonding of adenine 8CH, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3868-3873.
25. P. Kollman, J. McKelvey, A. Johansson, S. Rothenberg, Theoretical studies of hydrogen-bonded dimers. Complexes involving HF, H₂O, NH₃, HCl, H₂S, PH₃, HCN, HNC, HCP, CH₂NH, H₂CS, H₂CO, CH₄, CF₃H, C₂H₂, C₂H₄, C₆H₆, F⁻ and H₃O⁺, *J. Am. Chem. Soc* **1975**, *97*, 955-965.
26. Z. S. Derewenda, L. Lee, U. Derewenda, The Occurrence of C-H...O Hydrogen Bonds in Proteins, *J. Mol. Biol.* **1995**, *252*, 248-262.
27. G. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen bonding*, Cap. 2, 11-32, Oxford University Press, New York, **1997**.
28. H. Umeyama, K. Morokuma, The origin of hydrogen bonding. An energy decomposition study, *J. Am. Chem. Soc* **1977**, *99*, 1316-1332.
29. G. R. Desiraju, The C-H...O hydrogen bond in crystals: what is it?, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 290-296.
30. S. Bratos, R. M. Pick, *Vibrational Spectroscopy of Molecular Liquids and Solids*, Plenum Press, California, **1979**.
31. M. Boero, T. Ikeshoji, C. C. Liew, K. Terakura, M. Parrinello, Hydrogen Bond Driven Chemical Reactions: Beckmann Rearrangement of Cyclohexanone Oxime into ϵ -Caprolactam in Supercritical Water, *J. Am. Chem. Soc* **2004**, *126*, 6280-6286.
32. T. Murata, Y. Morita, Y. Yakiyama, K. Fukui, H. Yamochi, G. Saito, K. Nakasuji, Hydrogen-Bond Interaction in Organic Conductors: Redox Activation, Molecular Recognition, Structural Regulation, and Proton Transfer in Donor-Acceptor Charge-Transfer Complexes of TTF-Imidazole, *J. Am. Chem. Soc* **2007**, *129*, 10837-10846.
33. S. Deechongkit, H. Nguyen, E. T. Powers, P. E. Dawson, M. Gruebele, J. W. Kelly, Context-dependent contributions of backbone hydrogen bonding to β -sheet folding energetics, *Nature* **2004**, *430*, 101-105.
34. J. D. Smith, C. D. Cappa, K. R. Wilson, B. M. Messer, R. C. Cohen, R. J. Saykally, Energetics of Hydrogen Bond Network Rearrangements in Liquid Water, *Science* **2004**, *306*, 851-853.
35. J. D. Watson, F. H. C. Crick, Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid, *Nature* **1953**, *171*, 964-967.
36. L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, *37*, 205-211.
37. L. Pauling, R. B. Corey, Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, *37*, 729-740.

38. S.-W. Kuo, Hydrogen-bonding in polymer blends, *J. Polym. Res.* **2008**, *15*, 459-486.
39. D. Braga, A. Angeloni, F. Grepioni, E. Tagliavini, Moulding a honeycomb framework around $[\text{Co}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2]^+$ via charge-assisted C–H \cdots O hydrogen bonds, *Chem. Commun.* **1997**, 1447-1448.
40. Z. Berkovitch-Yellin, L. Leiserowitz, The role played by C–H \cdots O and C–H \cdots N interactions in determining molecular packing and conformation, *Acta Crystallogr.* **1984**, *B40*, 159-165.
41. G. R. Desiraju, S. Kashino, M. M. Coombs, J. P. Glusker, C–H \cdots O packing motifs in some cyclopenta[a]phenanthrenes, *Acta Crystallogr.* **1993**, *B49*, 880-892.
42. J. A. R. P. Sarma, G. R. Desiraju, The role of Cl \cdots Cl and C–H \cdots O interactions in the crystal engineering of 4-Å short-axis structures, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 222-228.
43. S. S. Kuduva, D. C. Craig, A. Nangia, G. R. Desiraju, Cubanecarboxylic Acids. Crystal Engineering Considerations and the Role of C–H \cdots O Hydrogen Bonds in Determining O–H \cdots O Networks, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1936-1944.
44. G. R. Desiraju, Chemistry beyond the molecule, *Nature* **2001**, *412*, 397-340.
45. T. Steiner, B. Lutz, J. v. d. Maas, N. Veldman, A. M. M. Schreurs, J. Kroon, J. A. Kanterse, Spectroscopic evidence for cooperativity effects involving C–H \cdots O hydrogen bonds: crystalline mestranol, *Chem. Commun.* **1997**, 191-102.
46. W. Saenger, Structure and Function of Nucleosides and Nucleotides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1973**, *12*, 591-601.
47. T. Steiner, W. Saenger, Geometry of C–H \cdots O hydrogen bonds in carbohydrate crystal structures. Analysis of neutron diffraction data, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10146-10154.
48. M. C. Wahl, M. Sundaralingam, C–H \cdots O hydrogen bonding in biology, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 97-102.
49. M. Brandl, K. Lindauer, M. Meyer, J. Sühnel, C–H \cdots O and C–H \cdots N interactions in RNA structures, *Theor. Chem. Acc.* **1999**, *101*, 103-113.
50. S. Scheiner, T. Kar, Y. Gu, Strength of the C $^\alpha$ –H \cdots O Hydrogen Bond of Amino Acid Residues, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9832-9837.
51. Z. Shi, C. A. Olson, A. J. B. Jr, N. R. Kallenbach, Stabilization of α -helix structure by polar side-chain interactions: Complex salt bridges, cation- π interactions, and C–H \cdots O H-bonds, *Biopolymers (Peptide Science)* **2001**, *60*, 366-380.
52. R. A. Musah, G. M. Jensen, R. J. Rosenfeld, D. E. McRee, D. B. Goodin, S. W. Bunte, Variation in Strength of an Unconventional C–H to O Hydrogen Bond in an Engineered Protein Cavity, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9083-9084.
53. M. C. Wahl, S. T. Rao, M. Sundaralingam, The structure of r(UUCGCG) has a 5[prime]-UU-overhang exhibiting Hoogsteen-like trans U[\bullet]U base pairs, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1996**, *3*, 24-31.

54. I. Berger, M. Egli, A. Rich, Inter-strand C-H...O hydrogen bonds stabilizing four-stranded intercalated molecules: stereoelectronic effects of O4' in cytosine-rich DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 12116-12121.
55. G. R. Desiraju, The C-H...O Hydrogen Bond: Structural Implications and Supramolecular Design, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 441-449.
56. T. Steiner, G. Koellner, K. Gessler, W. Saenger, Isostructural Replacement of an N-H...O by a C-H...O Hydrogen Bond in Complex Stabilisation: Crystal Structures of P-Cyclodextrin Complexed with Diethanolamine and with Pentane-1,5-diol, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 511-512.
57. N. S. Gray, L. Wodicka, A.-M. W. Thunnissen, T. C. Norman, S. Kwon, F. H. Espinoza, D. O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S.-H. Kim, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, Exploiting Chemical Libraries, Structure, and Genomics in the Search for Kinase Inhibitors, *Science* **1998**, *281*, 533-538.
58. Y. Mandel-Gutfreund, H. Margalit, R. L. Jernigan, V. B. Zhurkin, A role for CH...O interactions in protein-DNA recognition, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 1129-1140.
59. P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, Crystal Structure of the Anticancer Drug Cisplatin Bound to Duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12309-12321.
60. J. Glusker, Intermolecular interactions around functional groups in crystals: data for modeling the binding of drugs to biological macromolecules, *Acta Crystallogr.* **1995**, *D51*, 418-427.
61. C. Pascard, Small-molecule crystal structures as a structural basis for drug design, *Acta Crystallogr.* **1995**, *D51*, 407-417.
62. M. S. Weiss, M. Brandl, J. Sühnel, D. Pal, R. Hilgenfeld, More hydrogen bonds for the (structural) biologist, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 521-523.
63. W. Saenger, T. Steiner, Cyclodextrin Inclusion Complexes: Host-Guest Interactions and Hydrogen-Bonding Networks, *Acta Crystallogr. A* **1998**, *54*, 798-805.
64. G. Muller, M. Lutz, S. Harder, Methyl group conformation-determining intermolecular C-H...O hydrogen bonds: structure of N-methyl-2-pyrrolidone, *Acta Crystallogr.* **1996**, *B52*, 1014-1022.
65. L. J. W. Shimon, M. Vaida, L. Addadi, M. Lahav, L. Leiserowitz, Molecular recognition at the solid-solution interface: a relay mechanism for the effect of solvent on crystal growth and dissolution, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6215-6220.
66. G. R. Desiraju, Supramolecular Synthons in Crystal Engineering - A New Organic Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2311-2327.
67. A. R. Fersht, J. P. Shi, J. Knilljones, D. M. Lowe, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Brick, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. Winter, Hydrogen-bonding and biological specificity analysed by protein engineering, *Nature* **1985**, *314*, 235-238.
68. D. Bordo, P. Argos, The role of side-chain hydrogen-bonds in the formation and stabilization of secondary structure in soluble-proteins, *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, 504-519.
69. A. R. Fersht, L. Serrano, Principles of protein stability derived from protein engineering experiments, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 75-83.

70. K. A. Dill, Dominant forces in protein folding, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133-7155.
71. P. A. Frey, S. A. Whitt, J. B. Tobin, A low-barrier hydrogen-bond in the catalytic triad of serine proteases *Science* **1994**, *264*, 1927-1930.
72. W. W. Cleland, M. M. Kreevoy, Low barrier hydrogen-bonds and enzymatic catalysis, *Science* **1994**, *264*, 1887-1890.
73. P. Auffinger, E. Westhof, Rules governing the orientation of the 2'-hydroxyl group in RNA, *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 54-63.
74. J. Bella, H. M. Berman, Crystallographic Evidence for C^α-H...O=C Hydrogen Bonds in a Collagen Triple Helix, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 734-742.
75. Z. S. Derewenda, U. Derewenda, P. M. Kobos, (His)C^ε-H...O=C Hydrogen Bond in the Active Sites of Serine Hydrolases, *J. Mol. Biol.* **1994**, *241*, 83-93.
76. T. Steiner, Water molecules which apparently accept no hydrogen bonds are systematically involved in C-H...O interactions, *Acta Crystallogr. D* **1995**, *51*, 93-97.
77. R. Vargas, J. Garza, D. A. Dixon, B. P. Hay, How Strong Is the C^α-H...O=C Hydrogen Bond?, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4750-4755.
78. Z. Shi, C. A. Olson, A. J. Bell, N. R. Kallenbach, Non-classical helix-stabilizing interactions: C-H...O H-bonding between Phe and Glu side chains in α-helical peptides, *Biophys. Chem.* **2002**, *101-102*, 267-279.
79. R. J. Petrella, M. Karplus, The role of carbon-donor hydrogen bonds in stabilizing tryptophan conformations, *Proteins* **2004**, *54*, 716-726.
80. A. K. Thakur, R. Kishore, Characterization of β-Turn and Asx-Turns Mimicry in a Model Peptide: Stabilization via C-H...O Interaction, *Biopolymers* **2006**, *81*, 440-449.
81. J. Sutor, Evidence for the Existence of C-H...O Hydrogen Bonds in Crystals, *J. Chem. Soc.* **1963**, 1105-1110.
82. D. J. Sutor, C-H...O Hydrogen bond in crystals, *Nature* **1962**, *195*, 68-69.
83. T. Steiner, Weak hydrogen bonding. Part 1. Neutron diffraction data of amino acid C^α-H suggest lengthening of the covalent C-H bond in C-H...O interactions, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1315-1319.
84. R. D. B. Fraser, T. P. MacRae, E. Suzuki, Chain conformation in the collagen molecule, *J. Mol. Biol.* **1979**, *129*, 463-481.
85. F. M. Raymo, M. D. Bartberger, K. N. Houk, J. F. Stoddart, The Magnitude of [C-H...O] Hydrogen Bonding in Molecular and Supramolecular Assemblies, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9264-9267.
86. G. R. Desiraju, C-H...O and other weak hydrogen bonds. From crystal engineering to virtual screening, *Chem. Commun.* **2005**, 2995-3001.
87. H. Carrell, J. Glusker, The molecular complex of dibenz[a,c]anthracene and trinitrobenzene, *Struct. Chem.* **1997**, *8*, 141-147.
88. A. K. S. Chauhan, A. Kumar, R. C. Srivastava, J. Beckmann, A. Duthie, R. J. Butcher, Synthesis and reactivity of para-substituted benzoylmethyltellurium(II and IV) compounds: observation of intermolecular

- C-H...O hydrogen bonding in the crystal structure of (p-MeOC₆H₄COCH₂)₂TeBr₂, *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 345-351.
- 89.** K. A. Rabe, M. Dawber, C. Lichtensteiger, C. H. Ahn, J. M. Triscone, in *Physics of Ferroelectrics: A Modern Perspective, Vol. 105*, p. 1-30, Springer-Verlag Berlin, Berlin, **2007**.
- 90.** D. Li, D. A. Bonnell, Controlled Patterning of Ferroelectric Domains: Fundamental Concepts and Applications, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2008**, *38*, 351-368.
- 91.** K. Biradha, Crystal engineering: from weak hydrogen bonds to co-ordination bonds, *Cryst. Eng. Comm.* **2003**, *5*, 374-384.
- 92.** P. K. Thallapally, G. R. Desiraju, M. Bagieu-Beucher, R. Masse, C. Bourgogne, J.-F. Nicoud, 1,3-Dibromo-2,4,6-trinitrobenzene (DBTNB). Crystal engineering and perfect polar alignment of two-dimensional hyperpolarizable chromophores, *Chem. Commun.* **2002**, 1052-1053.
- 93.** S. R. Vippagunta, H. G. Brittain, D. J. W. Grant, Crystalline solids, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, *48*, 3-26.
- 94.** J. Bernstein, R. J. Davey, J.-O. Henck, Concomitant Polymorphs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3440-3461.
- 95.** A. Nangia, G. R. Desiraju, Pseudopolymorphism: occurrences of hydrogen bonding organic solvents in molecular crystals, *Chem. Commun.* **1999**, 605-606.
- 96.** V. S. S. Kumar, A. Addlagatta, A. Nangia, W. T. Robinson, C. K. Broder, R. Mondal, I. R. Evans, J. A. K. Howard, F. H. Allen, 4,4-Diphenyl-2,5-cyclohexadienone: Four Polymorphs and Nineteen Crystallographically Independent Molecular Conformations, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3848-3851.
- 97.** A. Nangia, Conformational Polymorphism in Organic Crystals, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 595-604.
- 98.** A. L. Grzesiak, M. Lang, K. Kim, A. J. Matzger, Comparison of the Four Anhydrous Polymorphs of Carbamazepine and the Crystal Structure of Form I, *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*.
- 99.** L. Pauling, The nature of the chemical bond. Application of results obtained from the quantum mechanics and form a theory of paramagnetic susceptibility to the structure of molecules, *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, *53*, 1367-1400.
- 100.** J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.
- 101.** H. Dodziuk, *Introduction to Supramolecular Chemistry*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2002**.
- 102.** J. Szejtli, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3*, p. 189-203, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
- 103.** R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R. Khar, Cyclodextrins in drug delivery: An updated review, *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, E329-E357.
- 104.** G. R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology, Cap. 4*, 293-342, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
- 105.** T. Aree, J. Jacob, W. Saenger, H. Hoier, Crystal structure of α -cyclodextrin-acetonitrile-hexahydrate, *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 191-197.

106. L. Liu, Q.-X. Guo, The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *42*, 1-14.
107. M. Nishio, CH/ π hydrogen bonds in crystals, *Cryst. Eng. Comm.* **2004**, *6*, 130-158.
108. F. Tsorteki, K. Bethanis, D. Mentzafos, Structure of the inclusion complexes of heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin with indole-3-butyric acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 233-240.
109. P. D. Ross, M. V. Rekharsky, Thermodynamics of Hydrogen Bond and Hydrophobic Interactions in Cyclodextrin Complexes, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2144-2154.
110. M. D. Johnson, J. G. Bernard, Hydrogen bonding effects on the cyclodextrin encapsulation of transition metal complexes: 'molecular snaps', *Chem. Commun.* **1996**, 185-186.
111. M. V. Rekharsky, Y. Inoue, Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-1918.
112. P. J. A. Ribeiro-Claro, A. M. A. d. Costa, M. L. Vueba, M. E. Pina, A. M. Amado, Para-halogenated benzaldehyde molecules included in cyclodextrins: a combined spectroscopic and thermal analysis, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 472-479.
113. A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Selection of substituted benzaldehyde conformers by the cyclodextrin inclusion process: a Raman spectroscopic study, *J. Raman Spectrosc.* **2000**, *31*, 971-978
114. T. Steiner, W. Saenger, Weak Polar Host-Guest Interactions Stabilizing a Molecular Cluster in a Cyclodextrin Cavity: C-H \cdots O and C-H \cdots π Contacts in β -Cyclodextrin-But-2-yne-1,4-diol Hepta hydrate, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2087-2088.
115. T. J. Brett, J. M. Alexander, J. J. Stezowski, Chemical insight from crystallographic disorder-structural studies of supramolecular photochemical systems. Part 2.1 The β -cyclodextrin-4,7-dimethylcoumarin inclusion complex: a new β -cyclodextrin dimer packing type, unanticipated photoproduct formation, and an examination of guest influence on β -CD dimer packing, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, *2*, 1095-1103.
116. A. Kokkinou, S. Makedonopoulou, D. Mentzafos, The crystal structure of the 1:1 complex of β -cyclodextrin with trans-cinnamic acid, *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 135-140.
117. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, P. Ribeiro-Claro, A. D. Lopes, M. Pillinger, J. J. C. Teixeira-Dias, J. Rocha, C. C. Romão, Encapsulation of Cyano(cyclopentadienyl) Complexes of Iron with β -cyclodextrin, *Supramol. Chem.* **2002**, *14*, 359-366.
118. J. A. Fernandes, S. Lima, S. S. Braga, M. Pillinger, J. E. Rodríguez-Borges, P. Ribeiro-Claro, J. J. C. Teixeira-Dias, I. S. Gonçalves, Experimental and Theoretical Study of the Encapsulation of a Linear Oligo(ferrocenylsilane) Trimer with β -Cyclodextrin, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 4729-4734.
119. J. A. Fernandes, S. Lima, S. S. Braga, P. Ribeiro-Claro, J. E. Rodríguez-Borges, C. Teixeira, M. Pillinger, J. J. C. Teixeira-Dias, I. S. Gonçalves, Inclusion complex formation of diferrocenyldimethylsilane with β -cyclodextrin, *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 4801-4808.
120. *Water - a comprehensive treatise, Cap. 1-7*, Plenum, New York, **1972-1982**.

121. F. H. Stillinger, Water Revisited, *Science* **1980**, *209*, 451-457.
122. K. Liu, J. D. Cruzan, R. J. Saykally, Water Clusters, *Science* **1996**, *271*, 929-933.
123. J. L. Atwood, L. J. Barbour, T. J. Ness, C. L. Raston, P. L. Raston, A Well-Resolved Ice-like (H₂O)₈ Cluster in an Organic Supramolecular Complex, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7192-7193.
124. T. K. Prasad, M. V. Rajasekharan, A Novel Water Octamer in Ce(dipic)₂(H₂O)₃.4H₂O: Crystallographic, Thermal, and Theoretical Studies, *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 488-491.
125. F. Weinhold, Quantum cluster equilibrium theory of liquids: Illustrative application to water, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 373-384.
126. J. Kim, D. Majumdar, H. M. Lee, K. S. Kim, Structures and energetics of the water heptamer: Comparison with the water hexamer and octamer, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 9128-9134.
127. S. S. Xantheas, *Ab initio* studies of cyclic water clusters (H₂O)_n, n=1-6. II. Analysis of many-body interactions, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 7523-7534.
128. A. Datta, S. K. Pati, Stability of cyclic (H₂O)_n clusters within molecular solids: Role of aromaticity, *Int. J. Quantum Chem.* **2006**, *106*, 1697-1702.
129. C. Dellago, M. M. Naor, Dipole moment of water molecules in narrow pores, *Computer Phys. Commun.* **2005**, *169*, 36-39.
130. M. Schmitt, J. Popp, Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 20-28.
131. H. Cybulski, J. Sadlej, On the calculations of the nuclear shielding constants in small water clusters, *Chem. Phys.* **2006**, *323*, 218-230.
132. D. J. Anick, O-H Stretch Modes of Dodecahedral Water Clusters: A Statistical *Ab Initio* Study, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 5135-5143.
133. S. K. Kwang, M. Byung Jin, U. S. Choi, L. Kuntack, *Ab initio* studies of the water dimer using large basis sets: The structure and thermodynamic energies, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 6649-6662.
134. H. M. Lee, S. B. Suh, J. Y. Lee, P. Tarakeswar, K. S. Kim, Structures, energies, vibrational spectra, and electronic properties of water monomer to decamer, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 9759-9772.
135. N. J. Singh, M. Park, S. K. Min, S. B. Suh, K. S. Kim, Magic and Antimagic Protonated Water Clusters: Exotic Structures with Unusual Dynamic Effects, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3795-3800.
136. O. Byl, J.-C. Liu, Y. Wang, W.-L. Yim, J. K. Johnson, J. T. Yates, Unusual Hydrogen Bonding in Water-Filled Carbon Nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12090-12097.

Capítulo 2

**Estudos espectroscópicos e
computacionais**

CONTEÚDO

Resumo	41
2.1. Espectroscopia Vibracional.....	42
2.1.1. Técnicas de estudo	42
2.1.2. Aplicação ao estudo de Ligações de Hidrogénio	44
2.1.3. Propriedades vibracionais da ligação de Hidrogénio	47
BANDA DE ELONGAÇÃO A-H.....	47
PARÂMETROS ESTRUTURAIIS, ENERGÉTICOS E VIBRACIONAIS DA LIGAÇÃO A-H	47
2.1.4. Estudo de interacções hóspede-hospedeiro	49
2.2. Métodos Computacionais.....	50
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	51
2.2.1. Aplicação ao estudo de Ligações de Hidrogénio	53
2.3. Referências.....	56

RESUMO

As técnicas experimentais que mais contribuem para o estudo das ligações de hidrogénio são a espectroscopia vibracional, a difracção de raios-X e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A espectroscopia vibracional apresenta uma elevada sensibilidade no estudo deste tipo de interacção pela capacidade que possui para detectar a associação de moléculas. Numa perspectiva complementar, a utilização de cálculos DFT permite obter informação referente aos processos de auto-associação molecular por ligações de hidrogénio, em termos de energia e geometria, possibilitando assim uma caracterização completa da ligação em estudo.

A simulação computacional proporciona uma ligação estreita entre a teoria e a experiência. É no entanto essencial reconhecer que a simulação computacional não substitui nem a teoria (em termos de modelos interpretativos) nem a experiência laboratorial mas contribui em grande medida para o avanço de ambas.

A utilização combinada de espectroscopias vibracionais e química computacional permite a atribuição consistente das bandas que se observam no espectro dos compostos em estudo, uma vez que as frequências calculadas para os modos normais (e intensidades relativas Raman e IV) podem ser comparadas com os espectros experimentais. No estudo dos compostos de inclusão em ciclodextrinas, a comparação do espectro vibracional do hóspede puro com o obtido para o composto hóspede-hospedeiro permite obter informações sobre as interacções estabelecidas no processo de inclusão.

De entre os vários métodos aplicados à caracterização de ligações de hidrogénio, referidos na Secção 1.2.1 do Capítulo 1, pretendeu-se, neste estudo, evidenciar a aplicabilidade da utilização combinada de espectroscopia vibracional e cálculos DFT. Mais especificamente, foram utilizadas, no decorrer dos trabalhos de doutoramento que conduziram a esta dissertação, as técnicas de espectroscopia de difusão de Raman (Raman e SERS), de absorção no Infravermelho, bem como cálculos envolvendo a teoria do funcional de densidade (DFT).

2.1. Espectroscopia Vibracional

A espectroscopia vibracional permite obter informações detalhadas ao nível molecular e supramolecular, podendo ser considerada uma fonte de conhecimento fundamental acerca da estrutura das moléculas e materiais, bem como uma ferramenta analítica para a caracterização da composição de amostras desconhecidas. De uma forma simples, a espectroscopia vibracional é uma técnica de análise na qual se utiliza radiação electromagnética para avaliar o comportamento vibracional das moléculas, observando-se a absorção e/ou difusão da radiação incidente. Existem actualmente três técnicas distintas para obter informações relativas a vibrações moleculares dos sistemas em estudo: a espectroscopia de absorção no Infravermelho (vulgarmente designada por IR – *Infrared Spectroscopy*), a espectroscopia de difusão de Raman e a espectroscopia de difusão inelástica de neutrões (vulgarmente designada por INS – *Inelastic Neutron Scattering*), que apesar de se relacionarem com as vibrações moleculares, apresentam mecanismos básicos distintos. O espectro vibracional de uma determinada molécula é considerado como uma propriedade física única e por isso mesmo, característica de cada molécula.

Quase todos os tipos de ligações de hidrogénio foram descobertos usando a técnica de espectroscopia vibracional. A sua aplicabilidade varia desde as ligações mais fortes às mais fracas e tanto em solução como no estado sólido.¹

2.1.1. Técnicas de estudo

Apenas as técnicas de Infravermelho e Raman (mais especificamente FT-IR e FT-Raman, em que FT – Fourier transform) serão abordadas neste Capítulo, de forma a enquadrar os estudos realizados no decorrer dos trabalhos de doutoramento.

A espectroscopia de Infravermelho resulta da absorção de radiação (uma vez que a energia vibracional das moléculas pode variar até 60 kJ mol^{-1} ,² a absorção de radiação ocorre na zona do infravermelho) e é particularmente sensível a vibrações de grupos polares, como C=O, O-H, C-Cl e

menos sensível a vibrações envolvendo ligações homonucleares. É necessário que haja uma oscilação do momento dipolar eléctrico da molécula, como consequência do seu movimento vibracional, para que ocorra a absorção da radiação. Tendo em conta que em espectroscopia vibracional se consideram as transições entre estados vibracionais quantizados, é possível afirmar que o espectro de absorção no infravermelho é obtido quando a radiação incidente na amostra possui uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais. São várias as técnicas utilizadas em espectroscopia de Infravermelho, nomeadamente a espectroscopia de absorção (varrimento contínuo e FT) e a espectroscopia de Reflexão, na qual se incluem a Reflectância Difusa (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform*, DRIFT na sigla em inglês) e a Reflexão Total Atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR na sigla em inglês). Na espectroscopia de absorção, os fotões da radiação electromagnética são absorvidos pela molécula quando possuem energia correspondente à diferença entre o estado fundamental e um nível excitado. Após a absorção, a molécula volta para o estado fundamental, relaxando a energia para a rede. Por seu lado, a espectroscopia de Reflexão Interna ou Reflectância total atenuada (ATR) baseia-se no facto de ocorrer uma reflexão quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de diamante), para um meio menos denso, a amostra. A fracção de feixe que é reflectida aumenta com o aumento do ângulo de incidência, de tal modo que para um determinado ângulo crítico, a reflexão é total. Quando a amostra absorve o feixe (no ponto de reflexão), ocorre o enfraquecimento deste a comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção no infravermelho. Esta técnica é utilizada na obtenção de espectros de infravermelho de amostras que não possam ser analisadas por técnicas normais, nomeadamente por apresentarem problemas de saturação.

Por outro lado, a espectroscopia de Raman baseia-se no fenómeno da difusão de radiação, como resultado da colisão inelástica entre o fotão da radiação incidente e a molécula, usualmente na zona visível do espectro, sendo particularmente sensível a vibrações de grupos com nuvens electrónicas facilmente polarizáveis, como por exemplo nuvens π de ligações $C=C$ e $C\equiv C$. A espectroscopia de Raman é uma técnica muito mais recente que a espectroscopia de infravermelho, existindo igualmente diversas técnicas variantes, entre elas Ressonância Raman (*Raman Resonance*, RR na sigla em inglês), espectroscopia de Raman intensificada à superfície (*Surface-enhanced Raman Spectroscopy*, SERS na sigla em inglês) e espectroscopia de Raman coerente anti-Stokes (*Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy*, CARS na sigla em inglês). Na base desta técnica está o efeito previsto teoricamente pelo físico austríaco *Adolf Smekal* (1895-1959) e demonstrado experimentalmente pelo físico indiano *C. V. Raman* em 1928 e que mereceu a este último a atribuição do prémio Nobel da Física em 1930. Quando se faz incidir radiação monocromática numa amostra, a maior parte da luz difundida possui a mesma frequência que a radiação incidente na amostra. Este efeito, denominado “efeito de Rayleigh”, pode ser explicado com base numa colisão elástica entre o fotão incidente e a

molécula, com a consequente obtenção de um fóton difundido com frequência igual à do incidente. No entanto, *Raman* observou que para uma pequena fracção da luz difundida (cerca de 1 em cada 10^7 fótons) verificava-se uma alteração da frequência, processo que actualmente se designa de “efeito de Raman”. Esta diferença nas frequências pode ser explicada por uma colisão inelástica entre o fóton e a molécula, com a obtenção de um fóton difundido com frequência diferente da do fóton incidente. São precisamente estes processos de colisão inelástica entre o fóton e a amostra que dão origem às bandas de Raman. A probabilidade de colisão inelástica é proporcional à polarizabilidade das moléculas (para que um determinado modo vibracional seja activo em Raman, a polarizabilidade da molécula deve variar no decorrer da vibração) e a radiação difundida de forma inelástica sai com energia inferior ou superior (consoante seja difusão Stokes ou anti-Stokes) à da radiação incidente. Tendo em conta que cada molécula tem uma estrutura de ligação única, a radiação difundida exhibe um padrão único de desvios de energia no espectro de cada tipo de molécula. Assim sendo, ao analisar o espectro vibracional podemos extrair informação relativa à composição química da amostra em estudo.

O efeito de Raman de um composto adsorvido ou mesmo nas proximidades (poucos Å) de uma superfície metálica estruturada pode ser maior do que o mesmo efeito em solução, num factor que pode variar entre 10^3 - 10^6 e está na origem da espectroscopia de Raman intensificada à superfície (SERS). Este efeito de Raman intensificado à superfície é mais forte na prata, mas é igualmente observado em átomos de ouro e cobre. Existem dois mecanismos principais que explicam esta intensificação do sinal de Raman: o mecanismo electromagnético (*Electromagnetic mechanism*, sigla em inglês EM) e o mecanismo químico ou de transferência de carga (*Charge transfer*, sigla em inglês CT). O mecanismo EM baseia-se na proximidade entre a molécula e uma superfície metálica que actua como uma estrutura que absorve fótons, armazenando e localizando a sua energia na superfície, aumentando desta forma a intensidade do campo electromagnético nas proximidades. Por seu lado, o mecanismo CT explica a intensificação com base na formação de complexos de transferência de carga entre o metal e o adsorbato. As vantagens da espectroscopia SERS em relação à espectroscopia Raman são a sua elevada selectividade superficial e sensibilidade, revelando-se apropriada para estudo de superfícies.

2.1.2. Aplicação ao estudo de Ligações de Hidrogénio

Tendo em conta que as vibrações moleculares são muito sensíveis à força e ao tipo de ligação química existente, as técnicas de espectroscopia vibracional são úteis não apenas para identificar moléculas mas também para estudar interações intra- e intermoleculares e fornecer algumas informações quanto a possíveis estruturas moleculares.

O tempo tem demonstrado que apenas definições gerais e flexíveis do termo “ligação de hidrogénio” podem fazer justiça à complexidade e variabilidade química do fenómeno observado, que inclui interacções fortes e fracas, assim como inter- ou intramoleculares. Para além das definições químicas gerais do termo ligação de hidrogénio, existem muitas outras definições mais específicas, normalmente baseadas em propriedades estudadas por uma determinada técnica. Além da espectroscopia vibracional, outras técnicas experimentais, tais como Difracção de raios-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), podem ser utilizadas para verificar a ocorrência de interacções intermoleculares em fase condensada pela capacidade que também possuem para detectar a associação de moléculas. Estas técnicas utilizam a radiação electromagnética como perturbação e simultaneamente como sonda das alterações produzidas de forma a extrair informações precisas sobre a estrutura molecular. No entanto, é de referir que a espectroscopia vibracional é a técnica experimental de eleição quando se pretende detectar a presença de ligações de hidrogénio,¹ particularmente em sistemas em fase líquida, podendo-se obter informações estruturais e/ou energéticas de vários complexos em ligação de hidrogénio.

Embora uma vibração normal envolva, em geral, todos os átomos de uma molécula, alguns modos vibracionais como a alongação da ligação *O-H*, a alongação de grupos CH_2 ou a alongação da ligação *C-N* aparecem sempre aproximadamente na mesma região no espectro vibracional de compostos diferentes. Estes modos vibracionais característicos - vibrações com a contribuição dominante de apenas uma ligação ou grupo de ligações que apresentam frequências de vibração específicas, denominadas frequências de grupo - são portanto utilizados na identificação de grupos funcionais específicos presentes na molécula, bem como na detecção e interpretação de qualquer alteração que ocorra nas ligações ou no ambiente químico destes grupos. A existência deste tipo de vibrações revela-se conveniente no estudo de ligações de hidrogénio, uma vez que ao ser estabelecida uma interacção por ligações de hidrogénio, as vibrações dos fragmentos envolvidos na interacção *A-H...B* são perturbadas, o que significa que o perfil, posição e intensidade das bandas dos modos vibracionais que incluem os átomos directamente envolvidos - *A*, *H* e *B* - podem alterar-se. Esta é a base que justifica o uso generalizado da espectroscopia vibracional no estudo e caracterização de ligações de hidrogénio e por isso não é de surpreender que tenha surgido uma classificação baseada nesta técnica. O espectro de um sistema com ligações de hidrogénio pode ser reconhecido pelos seus picos na região do infravermelho: são largos, intensos e deslocados relativamente ao sistema que não possui ligações de hidrogénio.

A técnica de espectroscopia vibracional é reconhecida como uma ferramenta extremamente sensível na observação dos efeitos mais característicos da presença de uma ligação de hidrogénio desde 1933,³ através da observação de desvios de frequência da banda de alongação *A-H* (ν_{A-H}), registados nos trabalhos de *Liddel*,⁴ *Hendricks*⁵ e colaboradores. Tendo em conta que é a ligação

existente entre dois átomos que funciona como sonda, a observação de desvios em relação às frequências de vibração do grupo isolado *A-H* evidenciava a presença de ligações de hidrogénio. No entanto, à medida que a técnica e a experiência evoluíram, alterações na banda de deformação angular *R-A-H* (embora menos evidentes que as verificadas na correspondente banda de alongação) bem como o aparecimento na região do infravermelho distante ($200-10\text{ cm}^{-1}$)³ de novas bandas de baixa frequência que envolvem a alongação *H...B* e as deformações angulares *A-H...B-C*, passaram também a ser considerados indícios da presença de ligações de hidrogénio.

À semelhança das alterações verificadas nas vibrações que envolvem o grupo doador de protão (*A-H*), também as vibrações que envolvem o grupo aceitador de protão (*B*) podem sofrer alterações, uma vez que a densidade electrónica à volta desse grupo é alterado como resultado da formação da ligação de hidrogénio. No caso de ligações de hidrogénio fracas que envolvam aceitadores do tipo carbonilo, determinadas alterações no modo de alongação desse grupo são consideradas indícios da presença de ligação de hidrogénio com consequente atribuição a grupos carbonilo livres e em ligação de hidrogénio.

Diferentes tipos de ligações de hidrogénio afectam os modos vibracionais dos grupos envolvidos de maneiras distintas, sendo que a aplicabilidade da espectroscopia vibracional estende-se desde as ligações de hidrogénio fortes até às mais fracas. No caso de ligações de hidrogénio fortes, a sua formação perturba vários modos vibracionais, particularmente a alongação *A-H* e deformação angular *R-A-H*. Por outro lado, as ligações de hidrogénio fracas são normalmente detectadas pela banda de alongação *A-H*, uma vez que os efeitos da sua presença nos outros modos de vibração são frequentemente imperceptíveis ou podem ser confundidos com outros efeitos.⁶ A detecção dos efeitos que as ligações de hidrogénio fracas provocam no espectro vibracional nem sempre é tão evidente como no caso das ligações de hidrogénio fortes e estes podem mesmo ser diferentes consoante os tipos de doadores e aceitadores envolvidos nas ligações de hidrogénio fracas. Como exemplo, a frequência de alongação do oscilador *C-H* quando envolvido em ligações de hidrogénio do tipo *C-H...O* pode ser desviada para menores ou maiores frequências, dependendo da natureza do doador *C-H*. Outro aspecto a considerar é a dificuldade que por vezes existe em distinguir entre efeitos intra- e intermoleculares com base no espectro vibracional, como ilustrado no caso dos alcoóis⁷ nos quais a frequência de alongação do *O-H* “livre” varia mais de 10 cm^{-1} entre os diferentes conformeros devido ao ambiente intramolecular distinto sentido pelas moléculas.

2.1.3. Propriedades vibracionais da ligação de Hidrogénio

BANDA DE ELONGAÇÃO A-H

A formação de uma ligação de hidrogénio afecta os modos vibracionais dos grupos envolvidos de diversas formas. As propriedades da banda de elongação *A-H* de sistemas que envolvam ligações de hidrogénio têm sido amplamente estudadas nos últimos anos,⁸ uma vez que apresentam as características mais facilmente associadas à presença deste tipo de ligação, observáveis quer por espectroscopia de infravermelho quer por espectroscopia de Raman. O desvio da frequência de elongação *A-H* para menores ou maiores valores, dependendo da natureza da ligação de hidrogénio que se forma, é tanto mais acentuado quanto mais forte for a ligação estabelecida. Para ligações do tipo *O-H...O*, verificam-se desvios absolutos de 100 a 150 cm^{-1} em relação à frequência de vibração do grupo *O-H*,⁹ enquanto no caso das ligações *C-H...O* os desvios poderão ser de apenas 20 cm^{-1} ou até inferiores¹⁰ em relação à frequência de vibração do grupo *C-H*, dependendo da força estabelecida nesse contacto.

Comportamentos caracterizados pelo aumento da largura bem como da intensidade da banda de elongação *A-H* (efeitos interdependentes em certos casos¹¹), são igualmente importantes no estudo da formação de uma ligação de hidrogénio. Estas características podem mesmo ser consideradas como melhores indicadores que o desvio da banda de elongação *A-H*. Por exemplo, existem casos de ligações de hidrogénio do tipo *C-H...O* nos quais o desvio da banda de elongação *A-H* é de difícil detecção enquanto a intensidade da banda aumenta consideravelmente.¹² Comportamento semelhante e bem documentado é exibido pelo clorofórmio em alguns sistemas clorofórmio-solventes, nos quais se verificou que a banda de elongação *C-D* (*D* – deutério) alarga e intensifica-se mas não sofre desvios. *Huggins* e *Pimentel* estabeleceram que a frequência da banda de elongação *C-D* do clorofórmio deuterado é a mesma em CCl_4 (solvente de *van der Waals* ou solvente neutro) e em acetona (solvente aceitador de protão)¹³ mas a área integrada aumenta mais de 10 vezes no segundo caso.¹⁴ Neste estudo recorreu-se à utilização da banda de elongação *C-D* do doador de protão, uma vez que a frequência de elongação *C-D* apresenta valores inferiores ao da frequência de elongação *C-H*, tornando-se possível diferenciar esta banda de outras bandas *C-H*.

PARÂMETROS ESTRUTURAIS, ENERGÉTICOS E VIBRACIONAIS DA LIGAÇÃO A-H

O movimento dos átomos de hidrogénio é maior que o movimento dos átomos mais pesados aos quais está covalentemente ligado. A formação de uma ligação de hidrogénio restringe o grau de movimento vibracional, uma vez que o átomo de hidrogénio estabelece duas ligações em vez de uma.

Sendo assim, a medida da vibração da ligação $A-H$ é um critério sensível de formação e força de ligações de hidrogénio.

É possível estabelecer dois tipos de correlações com os parâmetros observados num espectro vibracional, nomeadamente a correlação entre parâmetros vibracionais e estruturais e entre parâmetros vibracionais e energéticos, estabelecidos para vários tipos de ligações de hidrogénio.³ Correlações entre o valor da frequência de alongação da ligação $A-H$ e as distâncias $A\cdots B$ são muito comuns. Por exemplo, para as ligações de hidrogénio fortes, $O-H\cdots O$, *Gilli et al.*¹⁵ estabeleceram uma correlação entre a distância $O\cdots O$ e $\tilde{\nu}_{O-H}$. Também é possível encontrar na literatura relações idênticas para o caso das ligações de hidrogénio mais fracas, por exemplo entre o doador $C\equiv C-H$ e os aceitadores O ,¹⁶ N ,¹⁷ e $C=C$.¹⁸ No entanto, dependendo dos grupos envolvidos, a frequência de alongação $A-H$ é diferente e por isso gera a sua própria correlação sendo, deste modo, mais relevante correlacionar a diferença entre o valor da $\tilde{\nu}_{A-H}$ quando o grupo $A-H$ está livre e quando está ligado ($\Delta\tilde{\nu}_{A-H}$) com a distância $H\cdots B$. A grandeza $\Delta\tilde{\nu}_{A-H}$ aumenta sistematicamente com a diminuição da distância $H\cdots B$ (ou $A\cdots B$), tendo sido proposta uma correlação ($\Delta\tilde{\nu}_{A-H}=f(H\cdots B)$) aproximadamente válida para diferentes tipos de ligações de hidrogénio. Com base num determinado conjunto de diferentes estruturas orgânicas e inorgânicas, estabeleceu-se que

$$\Delta\tilde{\nu}_{A-H} = 0.011d_{H-B}^{-6.1} \quad (2.1)$$

em que a frequência de alongação $\tilde{\nu}_{A-H}$ é expressa em cm^{-1} e a distância d em nm .¹⁹ Do mesmo modo, foi igualmente estabelecida uma correlação entre parâmetros espectrais e entalpia de formação (ΔH) para a ligação de hidrogénio $O-H\cdots O$.¹⁹

No que diz respeito às correlações estabelecidas entre parâmetros espectrais e energéticos, estas foram inicialmente propostas por *Badger e Bauer* em 1937²⁰ e têm sido continuamente revistas por vários autores.⁶ A largura e a intensidade da banda aumentam fortemente aquando da formação de uma ligação de hidrogénio, e este efeito é normalmente considerado como mais fiável que o desvio para o vermelho da banda ν_{A-H} . Em alguns casos de ligações do tipo $C-H\cdots O$ a grandeza $\Delta\tilde{\nu}_{A-H}$ é difícil de determinar, enquanto o aumento de $I(\nu_{A-H})$ é facilmente detectado.¹² *logansen*²¹ estabeleceu em 1999 a correlação entre o aumento da intensidade (I) da banda de alongação ν_{A-H} e a entalpia de formação de ligações de hidrogénio, considerando como medida da intensificação da banda a quantidade ($\Delta I^{1/2}$), tendo obtido a seguinte relação: $H=12.2\Delta I^{1/2}$, que considera ser aplicável a diferentes tipos de ligações de hidrogénio. No entanto, outros autores²² sugerem que não existe uma explicação teórica razoável para esta relação. Todas estas correlações representam apenas tendências e não devem ser encaradas como leis restritivas, existindo diversos exemplos que demonstram precisamente o carácter não limitativo destas relações.²³

De uma forma resumida, quando comparamos o espectro de IV ou de Raman de um grupo $R-A-H$ “livre” e $R-A-H\cdots B$ em ligação de hidrogénio, a formação da ligação de hidrogénio pode ter várias manifestações, entre elas:

- 1) A frequência de alongação da ligação $A-H$ (ν_{A-H}) é reduzida;
- 2) A largura da banda ν_{A-H} aumenta;
- 3) A intensidade da banda ν_{A-H} aumenta;
- 4) A frequência da vibração da deformação do grupo $R-A-H$ aumenta.

Para ligações de hidrogénio fortes, pode surgir uma nova banda na região do infravermelho longínquo para a alongação $H\cdots B$. Os desvios batocrómicos (ou desvio para o vermelho) da vibração ν_{A-H} são geralmente aceites como um critério para a formação de ligações de hidrogénio. Embora este tipo de desvios seja observado frequentemente em ligações convencionais, no caso das ligações fracas, estes desvios são apenas observados para sistemas $C-H\cdots O$ devidamente activados. Para as ligações fracas, os desvios espectroscópicos observados são considerados indicadores mais fidedignos da formação de ligações de hidrogénio do que alterações na distância de separação $H\cdots B$. No entanto, a ausência de um desvio no espectro vibracional não indica, por si só, a ausência de ligações de hidrogénio.

2.1.4. Estudo de interacções hóspede-hospedeiro

A espectroscopia vibracional é uma importante ferramenta complementar da difracção de raios-X na caracterização estrutural de materiais, incluindo compostos supramoleculares, revelando-se útil na identificação de compostos de inclusão no estado sólido.^{24, 25}

Desvios ou variações de intensidade em determinadas bandas do espectro vibracional do hóspede podem ser indicativas da presença de interacções hóspede-hospedeiro e de determinadas características estruturais resultantes da inclusão, uma vez que o processo de inclusão molecular implica modificações estruturais da ciclodextrina e do hóspede. Consequentemente, as espectroscopias vibracionais de infravermelho e de Raman constituem métodos experimentais que podem ser aplicados com sucesso ao estudo de compostos de inclusão no estado sólido.²⁴⁻²⁶

Na maioria dos casos, a proporção hospedeiro/hóspede é muito elevada e, consequentemente, as bandas características das CDs nos espectros de infravermelho (especialmente envolvendo grupos hidroxilo) são dificilmente influenciadas pela interacção com o hóspede. Por outro lado, algumas bandas do hóspede que poderão ser afectadas pela inclusão a um nível molecular (tanto nos valores de número de onda como nas intensidades relativamente à molécula não complexada²⁷⁻³⁰) estão

disfarçadas pela presença de bandas intensas atribuídas às ciclodextrinas.³¹ Sendo assim, os estudos de espectroscopia de infravermelho de compostos de inclusão envolvem, na sua maioria, apenas moléculas hóspede que contêm o grupo carbonilo, uma vez que este grupo possui uma banda de elongação de elevada intensidade, que é bastante sensível a ligações de hidrogénio.²⁵

Quando uma molécula é incluída na cavidade de uma ciclodextrina, é fixada por ligações de hidrogénio e forças de *van der Waals*. A espectroscopia de Raman é extremamente útil na detecção deste tipo de interacções e uma boa técnica de análise dos efeitos do processo de inclusão nas moléculas hóspede. A formação de compostos de inclusão pode ser detectada através da monitorização de desvios de determinados modos vibracionais relevantes, tais como ligações C=C, C=O e C-H aromáticas.^{24, 27, 30, 32-39} Existem diversas regiões no espectro de Raman das ciclodextrinas que se encontram livres de bandas. Ao seleccionar moléculas hóspede com bandas relevantes nestas “janelas” espectrais, é possível estudar as vibrações da molécula hóspede sem interferência da ciclodextrina.

2.2. Métodos Computacionais

*“Today we live in a world where everything from the chairs we sit in, to the cars we drive are firstly designed by computer simulation and then built. There is no reason why chemistry should not be part of such a world, and why it should not be seen to be part of such a world by chemistry undergraduates.”*⁴⁰

Alan Hinchliffe

Os cálculos de orbitais moleculares do tipo *ab initio* (“por primeiros princípios”) têm desempenhado um papel importante no estudo das interacções intermoleculares. Estes cálculos têm tido sucesso na previsão de geometrias de complexos moleculares antes mesmo das suas determinações experimentais. Para além destas previsões geométricas, os cálculos *ab initio* têm também fornecido a dependência angular e com a distância das superfícies de energia potencial da interacção, energias de activação, análise conformacional, propriedades espectroscópicas, entre outros. Apresentam no entanto algumas desvantagens, tais como o facto da qualidade dos resultados ser dependente da escolha do método (normalmente referido como o nível de teoria) e da base de cálculo, de considerarem apenas moléculas isoladas - não incluindo deste modo efeitos devido ao ambiente - e de serem muito exigentes em termos computacionais.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

No campo da química computacional desenvolveram-se duas abordagens conceptualmente diferentes relacionadas com a estrutura e associações de moléculas. A abordagem mais simples é a denominada *mecânica molecular* (baseada em princípios da Mecânica Clássica) na qual se considera cada átomo como uma esfera rígida e cada ligação química como um oscilador harmónico. Em todos os métodos de mecânica molecular, os parâmetros associados aos osciladores são determinados experimentalmente para cada tipo de átomo e cada tipo de ligação (parametrização). Esta abordagem apresenta algumas limitações, uma vez que todos os resultados estão condicionados pela parametrização e portanto não é possível a obtenção de resultados que não estejam previstos e nem sempre é possível obter um conjunto consistente de dados experimentais que permitam a parametrização mais correcta.

Os problemas evidenciados pela mecânica molecular podem ser ultrapassados através da segunda abordagem, composta por cálculos de *mecânica quântica*, também denominados cálculos de estrutura electrónica, dos quais são parte integrante os cálculos *ab initio*. Neste caso, não há necessidade de conhecer previamente as propriedades do sistema em estudo, já que o método assume uma abordagem que tem por base a equação de Schrödinger para o sistema em estudo. A equação de Schrödinger descreve qualquer sistema atómico/molecular a partir das posições dos átomos e constantes fundamentais (como a carga e a massa dos electrões). Os cálculos *ab initio* permitem obter uma configuração geométrica de equilíbrio a partir da geometria inicial, através da variação sistematizada de parâmetros estruturais, tais como o comprimento e ângulos de ligação e diedros. Os cálculos mecânico-quânticos que utilizam esta abordagem podem dividir-se em dois grupos, os métodos da Teoria do Funcional da Densidade (*Density Functional Theory*, sigla em inglês DFT) e os métodos do *Campo Autocoerente* (*Self-consistent Field*, sigla em inglês SCF).⁴¹ A principal diferença entre estas duas teorias consiste no modo de descrever as propriedades electrónicas. Enquanto os métodos de SCF optimizam uma função de onda, os de DFT optimizam uma densidade electrónica.

Um método de *Campo Autocoerente*, no qual todos os outros se baseiam, é o método de Hartree-Fock (HF), que considera que cada electrão se move num campo definido pela densidade electrónica média dos restantes, permitindo o cálculo das orbitais moleculares de uma forma mais rápida. Esta aproximação ignora a interacção entre os electrões que ocupam a mesma orbital, designada por correlação electrónica (podendo dar origem à previsão de distâncias de ligação demasiado curtas e ângulos demasiado fechados). Embora seja impossível determinar com exactidão a correlação electrónica, existem métodos pós-HF, para os quais os efeitos de correlação electrónica são incluídos. Entre os vários métodos destacam-se os métodos Møller-Plesset de ordem n (MP n),

baseados na teoria das perturbações. Uma boa estimativa com um custo computacional aceitável é fornecida pela perturbação de segunda ordem, MP2.⁴¹

Os métodos de DFT representam uma alternativa viável à resolução da equação de Schrödinger através da função de onda, baseando-se na determinação da energia como funcional da densidade electrónica, assumindo que o conhecimento da densidade electrónica é suficiente para determinar todas as propriedades moleculares. Quando a energia de troca e correlação é parcialmente tratada ao nível Hartree-Fock, surgem os chamados métodos híbridos que têm vindo a tornar-se cada vez mais populares. Um dos funcionais híbridos mais frequentemente utilizado actualmente é o B3LYP (utilização do potencial de permuta de *Becke*⁴² com três parâmetros e o funcional de correlação de *Lee, Yang e Parr*).⁴³ A vantagem deste método reside no facto de, em certos casos, não se revelar necessária a utilização de bases muito exigentes, reduzindo substancialmente o custo computacional envolvido.

A descrição matemática das orbitais atómicas, base de cálculo, condiciona fortemente a qualidade dos resultados obtidos com os cálculos mecânico-quânticos. As funções que melhor descrevem o sistema atómico são as funções de Slater, embora dêem origem a integrais de difícil computação. As funções gaussianas permitem um tratamento matemático mais rápido mas não descrevem bem a densidade electrónica na região do núcleo e para grandes distâncias. Deste modo, a solução mais frequente é a utilização de um conjunto de bases padrão que descrevem as funções de Slater em termos de combinações lineares de funções gaussianas (por exemplo: STO-3G - orbital do tipo Slater construída com três gaussianas).

Os métodos teóricos modernos são bastante diversos e por isso, na selecção de um determinado método, é necessário ter em conta muitos factores, que incluem as características moleculares em estudo e a precisão desejada, bem como o tempo e o custo computacional envolvido. Os factores mais importantes que influenciam a precisão de um cálculo são o nível de teoria e a escolha de uma base adequada. A dimensão de um conjunto de bases padrão pode ser aumentada pelo desdobramento das orbitais de valência. Por exemplo, no conjunto de base 6-31G são utilizados três conjuntos de funções gaussianas para descrever a estrutura dos átomos. A primeira é uma contracção de 6 gaussianas primitivas que descrevem as camadas internas; a segunda função é obtida pela contracção de 3 gaussianas primitivas e a terceira é uma função gaussiana não contraída (o número 6 indica o número de gaussianas para as camadas internas e o termo 31 a composição da camada de valência). As bases com desdobramento de orbitais de valência permitem a variação do tamanho da orbital mas não permitem a variação da forma. Uma maneira de ultrapassar esta limitação é a inclusão de funções de polarização⁴⁴ que permitem melhorar a descrição das distribuições electrónicas em torno de um átomo (exemplos: 6-31G* na qual funções *d* são adicionadas aos átomos mais pesados e 6-31G** na qual funções *p* são também adicionadas aos

átomos de hidrogénio). Por outro lado, também é possível a inclusão de funções difusas, particularmente importantes na descrição de sistemas com excesso de electrões, moléculas em estados electrónicos excitados e em estados ionizados ($6-31+G^*$, função difusa adicionada aos átomos mais pesados e $6-31++G^*$, função difusa também adicionada aos átomos de hidrogénio).

Para cálculos que envolvam duas ou mais moléculas é necessário ter em conta o erro de sobreposição de bases (*Basis Set Superposition Error*, sigla em inglês BSSE) que advém do facto de o conjunto de bases utilizado nunca ser um conjunto completo. Deste modo, as funções de base de uma molécula contribuem para a descrição electrónica de outra e vice-versa. Uma das formas mais comuns de corrigir este erro é através da utilização do método de contra-peso, no qual se compara a energia das moléculas isoladas com e sem as funções de base da molécula vizinha.

De entre as várias aproximações desenvolvidas no sentido de reduzir o tempo de cálculo sem perda de qualidade de resultados, salienta-se o método dos “potenciais eficazes do cerne”, também designado por “pseudo-potenciais”. Neste método, os electrões das camadas internas são substituídos por um potencial que simula a sua influência sobre os electrões de valência. Este método é particularmente importante para átomos de elevado número atómico, pois além de permitir uma redução significativa do tempo de cálculo (reduz o número de electrões), fornece uma forma elegante de incluir os efeitos relativísticos, muito importantes nestes átomos. As bases LanL2MB e LanL2DZ, por exemplo, utilizam “pseudo-potenciais” para simular o cerne de átomos com número atómico igual ou superior ao do sódio.

Têm sido continuamente desenvolvidas tentativas, por parte de alguns autores, de desenvolver métodos híbridos de mecânica molecular e mecânica quântica como forma de ultrapassar as dificuldades inerentes à dimensão dos sistemas. Nesta aproximação, são estabelecidas duas ou mais camadas de átomos com diferentes níveis de cálculo, na qual os fragmentos relevantes de um sistema em estudo são descritos em termos de mecânica quântica enquanto os restantes são descritos por mecânica molecular. O método de camadas de *Morokuma*,⁴⁵⁻⁴⁷ designado por ONIOM (*Our own n-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics*) é dos mais populares de entre os métodos híbridos, apresentando, no entanto, algumas limitações relacionadas com a convergência na optimização da geometria.

2.2.1. Aplicação ao estudo de Ligações de Hidrogénio

Os cálculos *ab initio* das propriedades de complexos formados por ligações de hidrogénio complementam e muitas vezes são uma extensão dos resultados experimentais obtidos no laboratório. Uma vez que as curvas de energia potencial dos complexos formados por ligações de hidrogénio são pouco profundas, pequenas alterações de energia correspondem a grandes alterações

nas distâncias e ângulos de ligação. De forma a alcançar geometrias de equilíbrio exactas, são necessários métodos e conjuntos de bases de nível superior aos necessários para sistemas de tamanho semelhante que apenas apresentem ligações covalentes. As propriedades moleculares calculadas por métodos *ab initio* incluem geometria, energias electrónicas e frequências vibracionais.

A interpretação do espectro vibracional baseada unicamente em dados experimentais pode ser problemática, uma vez que a atribuição das bandas observadas experimentalmente a vibrações específicas não é directa e muitas vezes torna-se ambígua. Uma atribuição consistente das bandas observadas experimentalmente e um consequente conhecimento detalhado da estrutura geométrica e electrónica do sistema, apenas podem ser efectuados através de uma comparação minuciosa com os espectros calculados. Nos últimos 20 anos, os métodos de química quântica têm sido desenvolvidos de forma bastante satisfatória. Recentemente foi demonstrado que os métodos de DFT constituem uma poderosa alternativa computacional aos métodos de química quântica convencionais, uma vez que exigem muito menos esforço computacional e têm em consideração correlações electrónicas adicionais, tal como mencionado anteriormente.

Os cálculos teóricos do tipo *ab initio* fornecem informações relevantes acerca das alterações energéticas e variações estruturais que ocorrem aquando da formação de uma ligação de hidrogénio. Este tipo de cálculos permite a determinação de propriedades moleculares importantes tais como as frequências e intensidades vibracionais.²² Através da análise das orbitais de ligações naturais^{48, 49} é possível obter parâmetros relacionados com a distribuição de populações, tais como carga atómica e variações da distribuição de carga, energias de interacção e respectivas ordens de ligação de Wiberg, que assumem também um papel importante no estudo de ligações de hidrogénio.

Os métodos DFT e MPn (descritos na Secção 2.2) são os mais indicados no estudo das ligações de hidrogénio, uma vez que, sendo consideradas interacções fracas, é necessário contabilizar a correlação electrónica. Actualmente, os métodos híbridos B3LYP são os mais utilizados, produzindo resultados mais vantajosos tanto do ponto de vista da qualidade, como em termos de exigência computacional, comprovado num estudo efectuado sobre a formação de complexos de pequenas moléculas com a água, através de ligações de hidrogénio.⁵⁰

Os cálculos *ab initio* podem também ser utilizados na modelação molecular de compostos de inclusão em ciclodextrinas,⁵¹⁻⁵³ possibilitando-se assim a determinação de parâmetros energéticos e geométricos associados ao processo de inclusão. A investigação do perfil energético dos modos preferenciais de inclusão,⁵³⁻⁶⁰ bem como das possíveis interacções hóspede-hospedeiro, específicas e não específicas^{27, 32, 36, 61-65} são alguns dos exemplos da aplicabilidade dos cálculos *ab initio* na área das ciclodextrinas.

Actualmente, uma das aplicações mais frequentes dos cálculos *ab initio* é o cálculo teórico de frequências de vibração. Esta aplicação permite que os cálculos sejam utilizados como uma ferramenta

de análise e interpretação dos espectros vibracionais, por comparação do espectro vibracional previsto teoricamente com o obtido experimentalmente. Erros nas constantes de força calculadas (e consequentemente nas frequências) surgem devido a imprecisões no cálculo da energia electrónica. Uma segunda fonte de erro está relacionada com a anarmonicidade dos osciladores reais. Apesar dos cálculos *ab initio* das forças entre monómeros em função da distância “imitarem” uma curva de energia potencial anarmónica, as frequências calculadas são harmónicas. Uma vez que as constantes de anarmonicidade para a maioria dos complexos formados por ligações de hidrogénio são desconhecidas, uma estratégia de resolução consiste em aplicar um factor de compensação (obtido por cálculos adicionais do complexo ou por comparação entre valores teóricos e experimentais) aplicado às frequências harmónicas da molécula em estudo. Assume-se que estes factores de escala podem ser transferidos entre compostos e são aplicados uniformemente ao longo de todo o espectro.

Como já referido anteriormente, os cálculos *ab initio* consideram apenas moléculas isoladas e portanto não incluem efeitos devido ao ambiente químico. Deste modo, as frequências vibracionais calculadas para a molécula isolada não descrevem adequadamente os espectros vibracionais de sistemas sólidos, principalmente se na estrutura cristalina destes existirem interacções intermoleculares fortes. Neste contexto será discutida a implementação da metodologia PiMM (Pares em materiais moleculares), proposta pelo grupo de investigação do Professor Paulo Ribeiro Claro.⁶⁶

2.3. Referências

1. G. R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology*, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
2. J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, *Handbook of vibrational spectroscopy, Cap. 3*, Wiley, Chichester, **2002**.
3. G. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen bonding*, Oxford University Press, New York, **1997**.
4. U. Liddel, O. R. Wulf, The Character of the Absorption of Some Amines in the Near Infra-red, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 3574-3583.
5. S. B. Hendricks, O. R. Wulf, G. E. Hilbert, U. Liddel, Hydrogen Bond Formation between Hydroxyl Groups and Nitrogen Atoms in Some Organic Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1991-1996.
6. M. Nishio, M. Hirota, Y. Umezawa, *The CH/ π interaction: evidence, nature and consequences*, Wiley-VCH, New York, **1998**.
7. B. T. G. Lutz, J. H. van der Maas, The sensorial potentials of the OH stretching mode, *J. Mol. Struct.* **1997**, *436-437*, 213-231.
8. S. Bratos, R. M. Pick, *Vibrational Spectroscopy of Molecular Liquids and Solids*, Plenum Press, California, **1979**.
9. A. D. Buckingham, in *Theoretical treatments of H bonding*, p. 2-12, (Ed.: D. Hadzi), John Wiley & Sons, Chichester, **1997**.
10. G. R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology, Cap. 1*, 1-28, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
11. G. C. Pimentel, A. L. McClellan, *The hydrogen bond*, Freeman WH, San Francisco, **1960**.
12. B. T. G. Lutz, J. Jacob, J. H. van der Maas, Vibrational spectroscopic characteristics of =C-H \cdots O and N-H \cdots π interaction in crystalline N-(2,6-dimethylphenyl)-5-methylisoxazole-3-carboxamide, *Vib. Spectrosc.* **1996**, *12*, 197-206.
13. C. M. Huggins, G. C. Pimentel, Infrared Intensity of the C-D Stretch of Chloroform-d in Various Solvents, *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 896-898.
14. R. C. Lord, B. Nolin, H. D. Stidham, Quantitative Study of the Bonding of Chloroform-d in Various Solvents by Infrared Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1365-1368.
15. G. Gilli, P. Gilli, Towards an unified hydrogen-bond theory, *J. Mol. Struct.* **2000**, *552*, 1-15.
16. B. Lutz, J. van der Maas, J. A. Kanters, Spectroscopic evidence for \equiv C-H \cdots interaction in crystalline steroids and reference compounds, *J. Mol. Struct.* **1994**, *325*, 203-214.
17. S. Boryczka, M. S. Rozenberg, A. M. M. Schreurs, J. Kroon, E. B. Starikov, T. Steiner, A short C-H \cdots N hydrogen bond with a very strong IR spectroscopic effect, *New J. Chem.* **2001**, *25*, 1111-1113.
18. B. Lutz, J. A. Kanters, J. van der Maas, J. Kroon, T. Steiner, Spectroscopic and structural evidence for the hydrogen bond nature of C \equiv C-H \cdots C=C contacts in ethynyl steroids, *J. Mol. Struct.* **1998**, *440*, 81-87.

19. M. Rozenberg, A. Loewenschuss, Y. Marcus, An empirical correlation between stretching vibration redshift and hydrogen bond length, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 2699-2702.
20. R. M. Badger, S. H. Bauer, Spectroscopic Studies of the Hydrogen Bond. II. The Shift of the O-H Vibrational Frequency in the Formation of the Hydrogen Bond, *J. Chem. Phys.* **1937**, *5*, 839-851.
21. A. V. Iogansen, Direct proportionality of the hydrogen bonding energy and the intensification of the stretching $\nu(\text{XH})$ vibration in infrared spectra, *Spectrochim. Acta A* **1999**, *55*, 1585-1612.
22. W. O. George, R. Lewis, in *Handbook of vibrational spectroscopy, Vol. 3*, p. 1919-1934, (Eds.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), John Wiley & Sons, Chichester, **2002**.
23. T. Steiner, B. Lutz, J. v. d. Maas, N. Veldman, A. M. M. Schreurs, J. Kroon, J. A. Kanterse, Spectroscopic evidence for cooperativity effects involving C-H...O hydrogen bonds: crystalline mestranol, *Chem. Commun.* **1997**, 191-102.
24. E. Lamcharfi, G. Kunesch, C. Meyer, B. Robert, Investigation of cyclodextrin inclusion compounds using FT-IR and Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta A* **1995**, *51*, 1861-1870.
25. Í. X. García-Zubiri, G. González-Gaitano, M. Sánchez, J. R. Isasi, FTIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β -cyclodextrin, *Vib. Spectrosc.* **2003**, *33*, 205-213.
26. B. Rossi, P. Verrocchio, G. Viliani, G. Scarduelli, G. Guella, I. Mancini, Vibrational properties of inclusion complexes: The case of indomethacin-cyclodextrin, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 044511.
27. A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Selection of substituted benzaldehyde conformers by the cyclodextrin inclusion process: a Raman spectroscopic study, *J. Raman Spectrosc.* **2000**, *31*, 971-978
28. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, E. Herdtweck, J. J. C. Teixeira-Dias, Solid state inclusion compound of S-ibuprofen in β -cyclodextrin: structure and characterisation, *New J. Chem.* **2003**, *27*, 597-601.
29. S. S. Braga, T. Aree, K. Imamura, P. Vertut, I. Boal-Palheiros, W. Saenger, J. J. C. Teixeira-Dias, Structure of the β -Cyclodextrin-p-Hydroxybenzaldehyde Inclusion Complex in Aqueous Solution and in the Crystalline State, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *43*, 115-125.
30. R. Spivey, R. L. Swofford, Inclusion Complexes of N-Benzoyl-D-leucine and N-Benzoyl-L-leucine with β -cyclodextrin by Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 435-438.
31. L. Szente, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3*, p. 253-278, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
32. P. J. A. Ribeiro-Claro, A. M. A. d. Costa, M. L. Vueba, M. E. Pina, A. M. Amado, Para-halogenated benzaldehyde molecules included in cyclodextrins: a combined spectroscopic and thermal analysis, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 472-479.
33. A. M. Amado, A. M. M. d. Silva, P. J. A. Ribeiro-Claro, J. J. C. Teixeira-Dias, Meta-Substituted styrene molecules included in cyclodextrins: a Raman Spectroscopic study, *J. Raman Spectrosc.* **1994**, *25*, 599-605.
34. T. Iliescu, M. Baia, V. Miclaus, A Raman spectroscopic study of the diclofenac sodium- β -cyclodextrin interaction, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *22*, 487-495.

35. P. J. A. Ribeiro-Claro, A. M. Amado, J. J. C. Teixeira-Dias, Substituted Styrene Molecules Included in Cyclodextrins: a Raman Spectroscopic Study. Part II, *J. Raman Spectrosc.* **1996**, *27*, 155-161.
36. A. M. M. d. Silva, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, J. Empis, J. J. C. Teixeira-Dias, β -Cyclodextrin Complexes of Benzaldehyde, Vanillin and Cinnamaldehyde: A Raman Spectroscopic Study, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 677-684.
37. S.-H. Choi, E.-N. Ryu, J. J. Ryoo, K.-P. Lee, FT-Raman Spectra of o-, m-, and p-Nitrophenol Included in Cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2001**, *40*, 271-274.
38. F. Veiga, J. J. C. Teixeira-Dias, F. Kedzierewicz, A. Sousa, P. Maincent, Inclusion complexation of tolbutamide with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* **1996**, *129*, 63-71.
39. E. Redenti, M. Zanol, P. Ventura, G. Fronza, n. Comotti, P. Taddei, A. Bertoluzza, Raman and solid state ^{13}C -NMR investigation of the structure of the 1:1 amorphous piroxicam: β -cyclodextrin inclusion compound, *Biospectroscopy* **1999**, *5*, 243-251.
40. A. Hinchliffe, *Modelling molecular structures*, Wiley, Chichester, **1996**.
41. C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry. Theories and models*, Wiley, Chichester, **2002**.
42. A. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
43. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
44. P. C. Hariharan, J. A. Pople, The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies, *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213-222.
45. M. Svensson, S. Humbel, R. D. J. Froese, T. Matsubara, S. Sieber, K. Morokuma, ONIOM: A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimizations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels-Alder Reactions and $\text{Pt}(\text{t-Bu})_3 + \text{H}_2$ Oxidative Addition, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19357-19363.
46. T. Matsubara, S. S. K. Morokuma, A test of the new integrated MO + MM method (IMOMM) method for the conformational energy of ethane and n-butane, *Int. J. Quantum Chem.* **1996**, *60*, 1101-1109.
47. S. Humbel, S. Sieber, K. Morokuma, The IMOMO method: Integration of different levels of molecular orbital approximations for geometry optimization of large systems: Test for n-butane conformation and $\text{S}_{\text{N}}2$ reaction: $\text{RCl} + \text{Cl}^-$, *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 1959-1967.
48. F. Weinhold, Nature of H-bonding in clusters, liquids, and enzymes: an ab initio, natural bond orbital perspective, *J. Mol. Struct. Theochem* **1997**, *398-399*, 181-197.
49. A. E. Reed, L. A. Curtiss, F. Weinhold, Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 899-926.
50. P. R. Rablen, J. W. Lockman, W. L. Jorgensen, Ab Initio Study of Hydrogen-Bonded Complexes of Small Organic Molecules with Water, *J. Phys. Chem A* **1998**, *102*, 3782-3797.
51. K. B. Lipkowitz, Applications of Computational Chemistry to the Study of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1829-1873.

52. V. Rudyak, V. Avakyan, V. Nazarov, N. Voronezheva, DFT calculation of α -cyclodextrin dimers. contribution of hydrogen bonds to the energy of formation, *Russ. Chem. Bull.* **2006**, *55*, 1337-1345.
53. S. S. Braga, P. Ribeiro-Claro, M. Pillinger, I. S. Gonçalves, A. C. Fernandes, F. Pereira, C. C. Romão, P. B. Correia, J. J. C. Teixeira-Dias, Interactions of Omeprazole and Precursors with β -Cyclodextrin Host Molecules, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2003**, *47*, 47-52.
54. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, P. Ribeiro-Claro, A. D. Lopes, M. Pillinger, J. J. C. Teixeira-Dias, J. Rocha, C. C. Romão, Encapsulation of Cyano(cyclopentadienyl) Complexes of Iron with β -cyclodextrin, *Supramol. Chem.* **2002**, *14*, 359-366.
55. J. A. Fernandes, S. Lima, S. S. Braga, M. Pillinger, J. E. Rodríguez-Borges, P. Ribeiro-Claro, J. J. C. Teixeira-Dias, I. S. Gonçalves, Experimental and Theoretical Study of the Encapsulation of a Linear Oligo(ferrocenylsilane) Trimer with β -Cyclodextrin, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 4729-4734.
56. J. A. Fernandes, S. Lima, S. S. Braga, P. Ribeiro-Claro, J. E. Rodriguez-Borges, C. Teixeira, M. Pillinger, J. J. C. Teixeira-Dias, I. S. Gonçalves, Inclusion complex formation of diferrocenyldimethylsilane with β -cyclodextrin, *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 4801-4808.
57. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, M. Pillinger, P. Ribeiro-Claro, J. J. C. Teixeira-Dias, Experimental and theoretical study of the interaction of molybdenocene dichloride (Cp_2MoCl_2) with β -cyclodextrin, *J. Organomet. Chem.* **2001**, *632*, 11-16.
58. S. Lima, I. S. Goncalves, P. Ribeiro-Claro, M. Pillinger, A. D. Lopes, P. Ferreira, J. J. C. Teixeira-Dias, J. Rocha, C. C. Romao, Interactions of Cationic and Neutral Molybdenum Complexes with β -Cyclodextrin Host Molecules, *Organometallics* **2001**, *20*, 2191-2197.
59. S. S. Braga, R. A. Sá Ferreira, I. S. Gonçalves, P. Ribeiro-Claro, M. Pillinger, J. Rocha, J. J. C. Teixeira-Dias, L. D. Carlos, Study of the Inclusion Compound Formed between a Luminescent Europium(III) β -Diketonate Complex and γ -Cyclodextrin, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *44*, 261-266.
60. S. S. Braga, P. Ribeiro-Claro, M. Pillinger, I. S. Gonçalves, F. Pereira, A. C. Fernandes, C. C. Romão, P. B. Correia, J. J. C. Teixeira-Dias, Encapsulation of sodium nimesulide and precursors in β -cyclodextrin, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 873-878.
61. T.-W. Mu, L. Liu, X.-S. Li, Q.-X. Guo, A theoretical study on the inclusion complexation of cyclodextrins with radical cations and anions, *J. Phys. Org. Chem.* **2001**, *14*, 559-565.
62. M. R. Guzzo, M. Uemi, P. M. Donate, S. Nikolaou, A. E. H. Machado, L. T. Okano, Study of the Complexation of Fisetin with Cyclodextrins, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 10545-10551.
63. R. V. Pinjari, K. A. Joshi, S. P. Gejji, Molecular Electrostatic Potentials and Hydrogen Bonding in α -, β - and γ -Cyclodextrins, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13073-13080.
64. Y. Fu, L. Liu, Q.-X. Guo, A Theoretical Study on the Inclusion Complexation of Cyclodextrins with Inorganic Cations and Anions, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *43*, 223-229.
65. P. Zhang, P. L. Polavarapu, Spectroscopic Investigation of the Structures of Dialkyl Tartrates and Their Cyclodextrin Complexes, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 858-871.

66. M. M. Nolasco, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Computationally-Assisted Approach to the Vibrational Spectra of Molecular Crystals: Study of Hydrogen-bonding and Pseudo-Polymorphism, *ChemPhysChem* **2006**, 7, 2150-2161.

Capítulo 3

**Análise espectroscópica de transições
anidro - hidrato em sólidos farmacêuticos**

CONTEÚDO

Resumo	63
3.1. Introdução	64
TRANSIÇÕES POLIMÓRFICAS E PSEUDOPOLIMÓRFICAS	64
NICLOSAMIDA	65
3.2. Metodologia aplicada à monitorização de transições pseudopolimórficas.....	68
3.3. Resultados e discussão	71
3.3.1. Regiões espectrais mais sensíveis às transições pseudopolimórficas	71
3.3.2. Calibração	73
3.3.3. Determinação dos mecanismos associados às transições anidro↔hidrato	76
HIDRATAÇÃO DA NICLOSAMIDA ANIDRA	76
DESIDRATAÇÃO DA NICLOSAMIDA HIDRATADA	78
3.3.4. Determinação do valor de RH crítica nos processos de hidratação e desidratação.....	81
3.4. Conclusões	83
3.5. Referências.....	85

RESUMO

A espectroscopia de Raman é considerada uma técnica com elevado potencial na quantificação de formas polimórficas e pseudopolimórficas em amostras cristalinas, particularmente relevante na área das ciências farmacêuticas. Neste contexto, foram estudadas as transformações pseudopolimórficas anidro \leftrightarrow hidrato do sistema Niclosamida (NC), quando exposto a diferentes condições experimentais.

A espectroscopia FT-Raman foi aplicada para quantificar as formas anidra e hidratada dos cristais de NC, principalmente devido à sua elevada sensibilidade na detecção das interações intermoleculares fortes presentes neste sistema. As amostras foram expostas a condições de humidade relativa bem definidas durante diferentes períodos de tempo e, tanto a difusão de água como as alterações polimórficas, foram monitorizadas pelas correspondentes mudanças observadas no espectro vibracional. Ambos os processos de hidratação e desidratação ocorrem num só passo, com tempos de meia vida de *ca.* 144 h e 63 h, respectivamente, a 24 °C. Adicionalmente, os valores de humidade relativa crítica para os processos NCa \leftrightarrow NCh no decorrer de duas semanas foram também determinados, resultando que o valor de humidade relativa crítica para o processo de hidratação é *ca.* 90% e para a desidratação é de *ca.* 6%.

Os processos de hidratação e desidratação de um sólido farmacêutico durante o processo de formulação ou na dosagem final, podem inadvertidamente afectar o desempenho químico, físico e/ou biológico do produto.¹ Neste contexto, descreve-se neste Capítulo a aplicação de uma metodologia experimental que possibilita a avaliação quantitativa de processos de hidratação e desidratação no estado sólido, utilizando como ferramenta a espectroscopia FT-Raman. Todos os passos necessários para uma avaliação fidedigna do processo hidratação-desidratação são ilustrados para o sistema niclosamida, através das correspondentes variações observadas nos espectros vibracionais das duas formas pseudopolimórficas em estudo (anidra e hidratada).

O presente Capítulo encontra-se organizado da seguinte forma: na primeira parte é evidenciada a importância do conhecimento das transições polimórficas e pseudopolimórficas no desenvolvimento de formulações estáveis, no processamento e armazenamento de fármacos e é apresentado o sistema em estudo: niclosamida. De seguida, é descrita a metodologia aplicada e são indicados os resultados obtidos para a NC que são posteriormente discutidos em termos de: **a)** selecção das regiões espectrais mais sensíveis a alterações pseudopolimórficas, **b)** calibração (determinação de intensidades intrínsecas), **c)** mecanismos e **d)** condições de humidade relativa crítica para ambos os processos de hidratação e desidratação das duas formas da NC consideradas.

3.1. Introdução

TRANSIÇÕES POLIMÓRFICAS E PSEUDOPOLIMÓRFICAS

Os fenómenos de polimorfismo e pseudopolimorfismo são muito comuns em compostos farmacêuticos e têm sido largamente referidos na literatura.²⁻⁷ Para além de polimorfos,^{8, 9} outros exemplos de possíveis estados sólidos são os solvatos e hidratos (recentemente designados de solvatomorfos¹⁰ para evitar a confusão, referida por alguns autores, com a expressão pseudopolimorfos^{11, 12}).

O polimorfismo/pseudopolimorfismo evidenciado por um composto tem-se tornado um tema importante em farmácia, uma vez que é amplamente conhecido que diferentes estruturas cristalinas de um determinado composto podem exibir propriedades biofarmacêuticas distintas, tais como solubilidade, estabilidade e/ou biodisponibilidade.^{1, 13-17} A ocorrência inesperada de transições polimórficas ou pseudopolimórficas pode conduzir a consequências relevantes, que podem resultar num atraso no desenvolvimento do produto e paragem na distribuição comercial, como no caso do Norvir®, uma marca comercial de cápsulas semi-sólidas de ritonavir (fármaco anti-retroviral que age como inibidor de protease, utilizado no tratamento de infecções do vírus HIV).^{18, 19} Durante o armazenamento, o fármaco em questão converteu-se num polimorfo, até então desconhecido,

termodinamicamente mais estável mas menos solúvel, provocando assim uma perda da sua bioactividade.^{18, 20}

A formação de ligações de hidrogénio está directamente relacionada com a capacidade que alguns sólidos farmacêuticos apresentam para formar espécies hidratadas. A presença de diversos grupos doadores e/ou aceptadores da ligação de hidrogénio torna mais provável a ocorrência de pseudopolimorfismo sendo que aproximadamente um terço dos sólidos farmacêuticos possui a capacidade de formar espécies hidratadas, dependendo das condições de temperatura e humidade.²¹ As moléculas de solvente podem incorporar a rede cristalina, resultando na formação de estruturas solvatadas (hidratos no caso da água) que diferem da estrutura dos seus análogos anidros.^{1, 22} A molécula de água, pela sua pequena dimensão e pela capacidade de actuar como doador ou aceitador em ligações de hidrogénio, estabiliza as estruturas do hidrato por intermédio de ligações de hidrogénio com outras moléculas de água ou com moléculas do composto.¹ Como consequência, existem alterações na força, número e tipo de interações intermoleculares existentes na estrutura cristalina. Estas alterações estruturais têm um efeito distinto no espectro vibracional (tanto na posição como na intensidade relativa das bandas), o que torna a espectroscopia vibracional uma escolha de elevado valor para a análise qualitativa e quantitativa do comportamento da amostra.

A espectroscopia vibracional contém informação relativa ao movimento dos grupos funcionais no sólido e é normalmente específica quanto ao local, fornecendo algumas pistas quanto às origens das variações estruturais.¹⁴ De facto, nos últimos anos, a espectroscopia vibracional tem encontrado cada vez mais aplicações no campo da análise farmacêutica, tornando-se uma ferramenta cada vez mais aceite para caracterizar as formas no estado sólido e as suas transições de fase.^{13, 23, 24} Adicionalmente, apresenta um número de vantagens em relação a outras técnicas de caracterização que inclui a preparação mínima da amostra, a monitorização das alterações de um modo não destrutivo (permitindo a manutenção da integridade da amostra) e a capacidade de obter informações a um nível molecular. A versatilidade da espectroscopia de Raman permite a identificação de formas polimórficas nos processos de cristalização, secagem, moagem e granulação mesmo na presença de excipientes, por trás de vidro ou em água.²⁵⁻²⁷ Mais ainda, a espectroscopia de Raman revela alterações nas vibrações da molécula durante a formação do hidrato e fornece um método excelente para investigar ligações de hidrogénio entre as moléculas no estado sólido, incluindo polimorfos e solvatos.^{13, 25-35}

NICLOSAMIDA

A Niclosamida (5-cloro-N(2-cloro-4-nitrofenil)-2-hidroxibenzamida, NC, **Figura 3.1**) é um fármaco utilizado como anti-helmíntico, maioritariamente aplicado no tratamento de infestações com

germes em humanos e animais ruminantes, cães, gatos, avestruzes e aves domésticas.³⁶ Adicionalmente também foi encontrada uma significativa actividade anti-tuberculosa para a NC, com uma concentração mínima inibitória de 0.5 a 1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$.³⁷

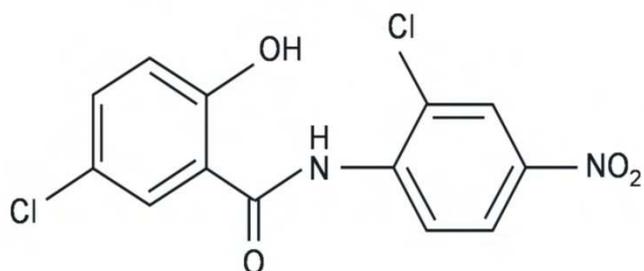


Figura 3.1 – Representação esquemática na Niclosamida (NC).

Muitos estudos indicam que a NC cristaliza em diversas formas solvatadas, dois monohidratos (normalmente designados por H_A e H_B) e uma forma anidra.^{36, 38} É frequente encontrar na literatura da especialidade, referências à sensibilidade exibida pela NC a transformações polimórficas e pseudopolimórficas reversíveis anidro (NCa) \leftrightarrow hidrato (NCh) que afectam os perfis de dissolução e consequentemente a biodisponibilidade das amostras.^{36, 38, 39} O estudo da interconversão anidro \leftrightarrow hidrato, verificada para o sistema NC, é de particular interesse quer no desenvolvimento de formulações estáveis de fármacos que envolvam este sistema (uma vez que as propriedades físico-químicas, biológicas e mecânicas dos hidratos podem diferir significativamente das apresentadas pelos anidros), quer no processamento e armazenamento dos mesmos.

Alterações na humidade relativa (RH, sigla em inglês) promovem conversão reversível entre a forma anidra (NCa) e o monohidrato H_A (NCh).^{36, 38} Outros polimorfos/pseudopolimorfos possíveis descritos na literatura (como o monohidrato H_B) não são parte deste caminho de conversão. Espera-se que a forma hidratada apresente redes de ligações de hidrogénio envolvendo as moléculas de água, que estão ausentes na forma anidra NCa. Estas diferenças estruturais têm um efeito directo no espectro vibracional (tanto na posição como na intensidade relativa das bandas), tal como confirmado pelos dados espectroscópicos disponíveis.³⁶

De forma a identificar os modos envolvidos na análise dos processos de hidratação e desidratação da NC, foi efectuada a atribuição do espectro vibracional, com base em cálculos DFT. A atribuição dos modos vibracionais da NC é dificultada pelo elevado grau de conjugação entre os modos vibracionais atribuídos às diferentes unidades estruturais, dois anéis aromáticos e um grupo amida. De forma a estabelecer a atribuição vibracional, procedeu-se inicialmente à optimização completa da estrutura molecular do monómero, ao nível padrão B3LYP/6-31G*. As frequências

vibracionais com respectivas intensidades foram seguidamente calculadas ao mesmo nível de cálculo, não se verificando a existência de valores imaginários, indicando tratar-se de mínimos reais. Para efeitos de comparação com os valores experimentais, os valores de frequência calculados foram multiplicados por um factor de 0.9614, indicado como o valor óptimo para o nível de cálculo utilizado.⁴⁰

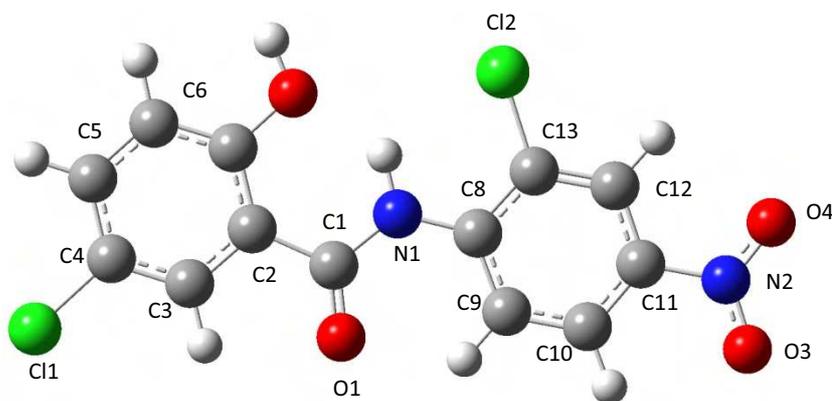


Figura 3.2 – Estrutura otimizada ao nível B3LYP/6-31G* do monómero da NC, com respectiva numeração dos átomos indicada.

Na **Tabela 3.1** é apresentada a atribuição parcial dos espectros de Raman das formas NCa e NCh, estabelecida com base nos valores de frequência calculados para os modos normais do monómero.

Tendo em conta que o estado de hidratação poderá afectar as propriedades físicas e químicas de um produto farmacêutico,^{1, 16} é importante conhecer a resposta dos sólidos farmacêuticos ao ambiente de armazenamento, nomeadamente às condições de temperatura e humidade, avaliando desta forma, a interconversão no estado sólido destes hidratos com as suas formas anidras. Por forma a alcançar este objectivo, uma metodologia baseada na espectroscopia de Raman é apresentada e aplicada à NC – usada como composto modelo. Em trabalhos anteriores foi considerado que esta metodologia fornece parâmetros cinéticos reproduzíveis para sistemas que apresentam grandes alterações espectrais entre as formas anidra e hidratada, como a Teofilina.²⁷ A aplicabilidade desta metodologia a sistemas com alterações espectroscópicas menos evidentes também é bem ilustrada pelo caso da Cafeína.⁴¹ Atendendo a algumas discrepâncias encontradas relativamente a estudos de hidratação e desidratação efectuados para outros compostos,⁴²⁻⁴⁵ torna-se particularmente importante estudar ambas as transições pseudopolimórficas (hidratação e desidratação) usando a mesma metodologia experimental (grau de moagem, temperatura, humidade e técnica de análise) que será seguidamente descrita.

Tabela 3.1 – Bandas mais relevantes no espectro de Raman que apresentam diferentes números de onda para as formas NCa e NCh e respectiva atribuição proposta.

Calc. ^[a]	NCa (cm ⁻¹)	NCh (cm ⁻¹)	Atribuição aproximada ^[b]
351	339	333	γ anel
645	631	635	γ N-H
826	820	824	β CCN
1204	1218	1226	ν C-O + β C-O-H
1273	1283	1289	β HN-C + ν N-C*
1317	1327	1340	β C-O-H + ν C-O
1339	1348	1328	ν_s NO ₂
1566	1517	1504	ν_{as} NO ₂
1526	1568	1559	β HN-C + ν N-C*
1695	1650	1680	ν C=O

[a] baseado em frequências de grupo de Raman e IV e cálculos DFT ao nível B3LYP/6-31G* para a molécula isolada; [b] ν - alongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano; s - simétrico; as-anti-simétrico; * combinações em fase e fora de fase da deformação no plano de HNC e da alongação NC

3.2. Metodologia aplicada à monitorização de transições pseudopolimórficas

As diferentes componentes observadas (posição de bandas e respectiva intensidade) nos espectros de diversas formas no estado sólido são factores chave que permitem a monitorização do processo de hidratação/desidratação durante a transição de fase. Por este motivo, a metodologia aplicada ao estudo das transições anidro \leftrightarrow hidrato do sistema NC, é baseada em espectroscopia de Raman, mais concretamente nas diferenças vibracionais observadas na maioria dos sistemas anidro-hidrato como resultado das alterações nos contactos intermoleculares. No âmbito deste trabalho, a espectroscopia de difusão de Raman apresenta algumas vantagens em relação à espectroscopia de absorção no infravermelho, nomeadamente a fraca actividade de Raman exibida pelas vibrações da água, as quais, sendo fortemente activas em infravermelho, ocultam uma ampla região do espectro de infravermelho. Deste modo, a espectroscopia de Raman tem sido aplicada à monitorização de processos de hidratação e desidratação de vários sistemas incluindo ciclodextrinas⁴⁶⁻⁵¹ e sólidos farmacêuticos.^{16, 29, 52, 53}

Um composto farmacêutico anidro (**A**), que facilmente se converte na forma hidratada (**H**) por absorção de humidade por parte da forma sólida, estabelecendo um equilíbrio com o ambiente,

origina diferentes bandas de Raman. A intensidade observada (I_A e I_H) da banda associada a cada forma pseudopolimórfica (**A** e **H**) é directamente proporcional à intensidade intrínseca do correspondente modo vibracional (δ_A e δ_H) e à concentração relativa dessa forma pseudopolimórfica na amostra (C_A e C_H):

$$I_A = \delta_A \times C_A \quad (3.1)$$

$$I_H = \delta_H \times C_H \quad (3.2)$$

É possível, monitorizando a quantidade de **A** e **H** a diferentes condições de RH e temperatura, investigar a cinética de hidratação e desidratação de compostos farmacêuticos sob diversas condições ambientais. Adicionalmente, os mecanismos de hidratação e desidratação bem como as condições de RH crítica de ambos os processos podem igualmente ser determinados.

A *fracção de conversão* (α , a variar entre 0 a 1) representa uma medida do progresso da reacção em termos da transferência de intensidade de uma banda para outra em função do tempo. Pode ser determinada através dos dados normalizados obtidos por espectros de Raman e permite determinar as proporções relativas da forma anidra e hidratada na amostra, no decorrer de um determinado tempo t . Assim sendo, os valores da fracção de conversão podem ser determinados usando a relação de intensidades das bandas de Raman associadas a cada forma, N_{Ca} e N_{Ch} . Ou seja, os valores da fracção de hidratação (α_h) e de desidratação (α_d) num determinado instante da reacção (tempo de exposição a condições de RH bem definidas ou tempo de armazenamento a uma determinada temperatura) podem ser determinados, respectivamente por:

$$\alpha_h(t) = I_{NCh} / [I_{NCh} + (\delta_{NCh} / \delta_{Nca}) I_{Nca}] \quad (3.3)$$

$$\alpha_d(t) = I_{Nca} / [I_{Nca} + (\delta_{Nca} / \delta_{Nch}) I_{Nch}] \quad (3.4)$$

onde I representa a intensidade das bandas atribuídas às formas N_{Ca} e N_{Ch} num instante t da reacção e δ representa a intensidade intrínseca do modo vibracional considerado. Por definição $\alpha_h + \alpha_d = 1$.

Um passo fundamental em qualquer estudo cinético é encontrar o mecanismo que fornece a melhor descrição do processo em estudo e que permite o cálculo de parâmetros cinéticos relevantes. Neste contexto, após a determinação da fracção de conversão (α_h e α_d), é possível obter um conjunto de parâmetros relativos aos processos de hidratação e desidratação por intermédio do ajuste de diferentes modelos aos dados experimentais, permitindo a identificação do mecanismo que está na base de ambas as conversões $N_{Ca} \rightarrow N_{Ch}$ e $N_{Ch} \rightarrow N_{Ca}$. Diferentes modelos cinéticos [$f(\alpha) = kt$]⁵⁴⁻⁵⁶ foram definidos para caracterizar os mecanismos de reacções no estado sólido (das quais são exemplo as transições pseudopolimórficas descritas neste trabalho).

Tabela 3.2 – Mecanismos de reacções no estado sólido⁵⁴⁻⁵⁶ e respectivas equações.

Modelo	$f(\alpha)=kt^{[a]}$	Mecanismo controlo – velocidade de conversão	Classificação ^[b]
M1	$\alpha^{1/4}$	Lei de Potência	Nucleação
M2	$\alpha^{1/3}$	Lei de Potência	Nucleação
M3	$\alpha^{1/2}$	Lei de Potência	Nucleação
M4	$\alpha^{3/2}$	Lei de Potência	Nucleação
M5	$1-\alpha$	Reacção de fronteira de fase a uma dimensão (ordem zero)	Contração geométrica
M6	$1-(1-\alpha)^{1/2}$	Reacção de fronteira de fase a duas dimensões (simetria cilíndrica)	Contração geométrica
M7	$1-(1-\alpha)^{1/3}$	Reacção de fronteira de fase a três dimensões (simetria esférica)	Contração geométrica
M8	$-\ln(1-\alpha)$	Equação de Mampel	Ordem de Reacção
M9	$(-\ln(1-\alpha))^{1/2}$	Equação de Avrami-Erofeev, $n = 1/2$	Nucleação
M10	$(-\ln(1-\alpha))^{1/3}$	Equação de Avrami-Erofeev, $n = 1/3$	Nucleação
M11	$(-\ln(1-\alpha))^{1/4}$	Equação de Avrami-Erofeev, $n = 1/4$	Nucleação
M12	$(-\ln(1-\alpha))^{2/3}$	Equação de Avrami-Erofeev, $n = 2/3$	Nucleação
M13	α	Mecanismo de ordem zero (Polany-Wigner)	Ordem de Reacção
M14	α^2	Difusão a uma dimensão	Difusão
M15	$(1-\alpha)\ln(1-\alpha)+\alpha$	Difusão a duas dimensões	Difusão
M16	$(1-(1-\alpha)^{1/3})^2$	Difusão a três dimensões (equação de Jander)	Difusão
M17	$1-(2\alpha/3)-(1-\alpha)^{2/3}$	Difusão a três dimensões (Ginstling-Brounshtein)	Difusão

[a] α - fracção de conversão $NCa \rightarrow NCh$ ou $NCh \rightarrow NCa$; k - constante de velocidade de reacção; t - tempo de exposição a condições de RH ou tempo de armazenamento a uma determinada temperatura. [b] De acordo com a Tabela 1⁵⁷

Os modelos cinéticos utilizados neste estudo têm sido desenvolvidos com base em alguns princípios mecanísticos e são classificados genericamente por nucleação, contração geométrica, difusão e ordem de reacção (ver Tabela 3.2).

Os dados experimentais são ajustados aos diferentes modelos (através da representação de $f(\alpha)$ em função do tempo t) e aqueles que proporcionarem um melhor ajuste estatístico (ver secção 9.13

do **Capítulo 9**) são escolhidos como modelos a partir dos quais são estabelecidos alguns parâmetros cinéticos. Como exemplo, o declive da recta obtida corresponde à constante de velocidade de reacção do processo.

Para o estudo do processo de hidratação da NC, o composto na forma comercial anidra, foi exposto a condições de RH100%, durante duas semanas à temperatura de 24 °C. No processo de desidratação, as amostras de NC foram cristalizadas em água e de seguida: **i)** armazenadas a diferentes temperaturas durante diferentes períodos de tempo e também **ii)** expostas a condições de RH0% durante uma semana à temperatura de 24 °C. Na determinação da humidade relativa crítica para ambas as formas NCa e NCh, as amostras foram expostas a diferentes condições de humidade relativa (RH a variar na gama 0-100%, secção **9.3, Capítulo 9**) durante duas semanas e à temperatura ambiente de 24 °C. Nos diferentes tipos de experiências, foram registados os espectros de FT-Raman das várias amostras, tendo em consideração alguns cuidados experimentais (ver secção **9.11.1 do Capítulo 9**).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Regiões espectrais mais sensíveis às transições pseudopolimórficas

A **Figura 3.3** mostra a comparação entre o espectro de Raman das formas puras NCa (**a**) e NCh (**b**) nas regiões espectrais 50-1000, 1200-1700 e 3000-3200 cm^{-1} . Os dois espectros apresentam diferenças que estão distribuídas ao longo de quase toda a gama espectral. A atribuição proposta para as bandas mais relevantes destas regiões encontra-se indicada na **Tabela 3.1**.

Alguns grupos funcionais são mais afectados que outros pelas diferenças estruturais que caracterizam a formação anidro/hidrato, dependendo da sensibilidade demonstrada às condições ambientais. Consequentemente, as bandas correspondentes podem ser utilizadas na monitorização das alterações pseudopolimórficas verificadas durante o processo de hidratação/desidratação. Algumas diferenças entre os espectros das formas NCa e NCh podem ser associadas a alterações estruturais promovidas pelo processo de hidratação. Por exemplo, o modo $\nu_{\text{C=O}}$ desloca-se de 1650 cm^{-1} na NCa para 1679 cm^{-1} na NCh, indicando que o oxigénio carbonílico está mais fortemente envolvido em ligações de hidrogénio na forma anidra. Por outro lado, as elongações simétrica e anti-simétrica do grupo NO_2 (ν_{NO_2}) deslocam-se para menores valores de número de onda, de 1348 para 1328 cm^{-1} e de 1517 para 1504 cm^{-1} , respectivamente. Estas observações sugerem que a molécula de água está provavelmente localizada próximo do grupo NO_2 e não ligada ao grupo carbonilo. Os modos que combinam elongação e deformação no plano dos grupos *C-O-H* e *C-N-H* (elongação *C-X* e deformação no plano *C-X-H*) são também afectados pelo processo de hidratação, mas o significado estrutural destas alterações não é directo.

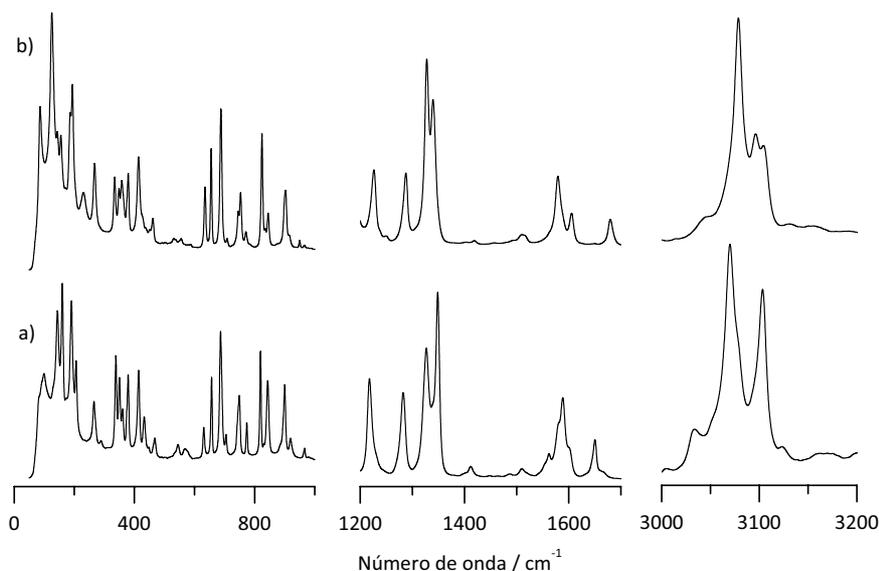


Figura 3.3 – Espectro FT-Raman da niclosamida anidra (NcA, a) e da niclosamida hidratada (NcH, b) nas regiões espectrais 50-1000, 1200-1700 e 3000-3200 cm^{-1} .

Cálculos DFT usando uma abordagem de pares moleculares²⁸ podem ser utilizados para prever os desvios associados a contactos intermoleculares entre pares e auxiliar na atribuição vibracional completa de diferentes formas cristalinas. Embora essa atribuição esteja fora do âmbito deste trabalho, cálculos com alguns pares sugerem que os desvios observados podem resultar de um aumento de ligações de hidrogénio do grupo OH (por exemplo, devido a associação niclosamida \cdots H₂O) e o decréscimo de ligações de hidrogénio com o grupo C=O.

De forma a utilizar a espectroscopia de Raman na avaliação dos parâmetros cinéticos, é necessário em primeiro lugar identificar as bandas associadas a cada forma polimórfica ou pseudopolimórfica que intervém na reacção, e depois seleccionar as bandas que mais se adequam para a caracterização da amostra. Todas as regiões espectrais que apresentam diferenças entre as formas NcA e NcH (**Figura 3.3**) foram avaliadas quanto à adequação para serem utilizadas na quantificação das duas formas pseudopolimórficas, pela consideração de misturas físicas com composição molar NcA/NcH conhecida. Nesta avaliação, foram tidos em conta dois critérios. Em primeiro lugar, a existência de um ponto pseudo-isosbético é necessária (geralmente aceite como um indicativo que existem apenas duas espécies em equilíbrio e que se interconvertem directamente).^{58, 59} Em segundo lugar, também foi tido em consideração o número de bandas que são exigidas para o processo de ajuste (uma vez que as regiões espectrais que podem ser descritas usando apenas duas bandas no processo de ajuste são menos propensas a erros de excesso de parametrização).

O espectro de Raman da NcA e NcH nas regiões 620-646 cm^{-1} e 1620-1710 cm^{-1} , consideradas as regiões mais adequadas para o presente estudo, está ilustrado na **Figura 3.4**. As bandas observadas

nestas regiões estão provavelmente relacionadas com a elongação do oscilador C=O ($1650/1679\text{ cm}^{-1}$) e com a deformação fora do plano do oscilador N-H ($631/635\text{ cm}^{-1}$) de acordo com os dados da **Tabela 3.1**.

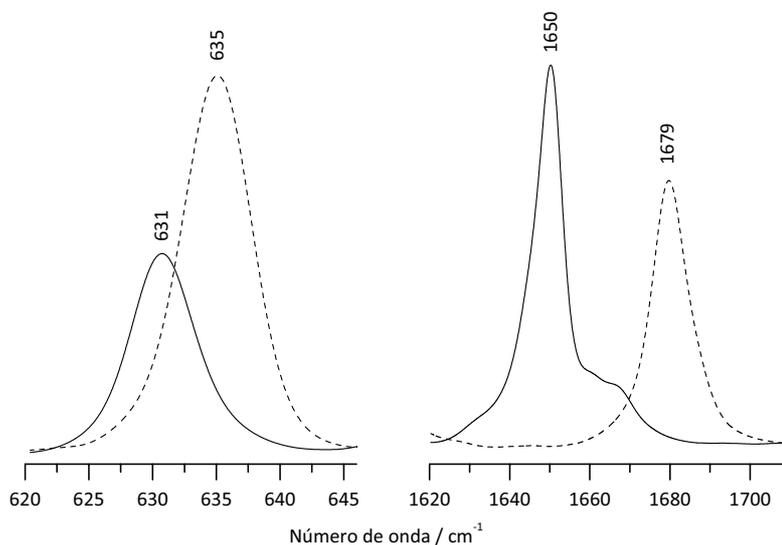


Figura 3.4 – Comparação dos espectros FT-Raman da niclosamida anidra (NCa, linha a cheio) e da niclosamida hidratada (NCh, linha a tracejado) nas regiões espectrais $620\text{-}646$ e $1620\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$. (intensidades normalizadas pela banda mais intensa do espectro de cada forma polimórfica)

3.3.2. Calibração

Tendo em conta que a intensidade intrínseca relativa de um determinado modo vibracional pode diferir significativamente dependendo da forma pseudopolimórfica considerada, as intensidades intrínsecas relativas (δ_h/δ_a e δ_a/δ_h) correspondentes ao modo vibracional em análise devem ser calculadas previamente, por intermédio de curvas de calibração, estabelecidas com misturas físicas de ambas as formas (**A** e **H**) e com composição conhecida. Assim sendo, as relações δ_h/δ_a e δ_a/δ_h correspondentes aos modos vibracionais em análise são determinadas por ajuste linear das intensidades relativas previstas (obtidas por ajuste de bandas, ver secção **9.12**, do **Capítulo 9**) em função das fracções molares conhecidas. O estudo de calibração (misturas físicas com diferentes fracções molares de NCh - Secção **9.4**, **Capítulo 9**) efectuado para o sistema NC, na região espectral $1620\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C=O}$) encontra-se representado na **Figura 3.5**.

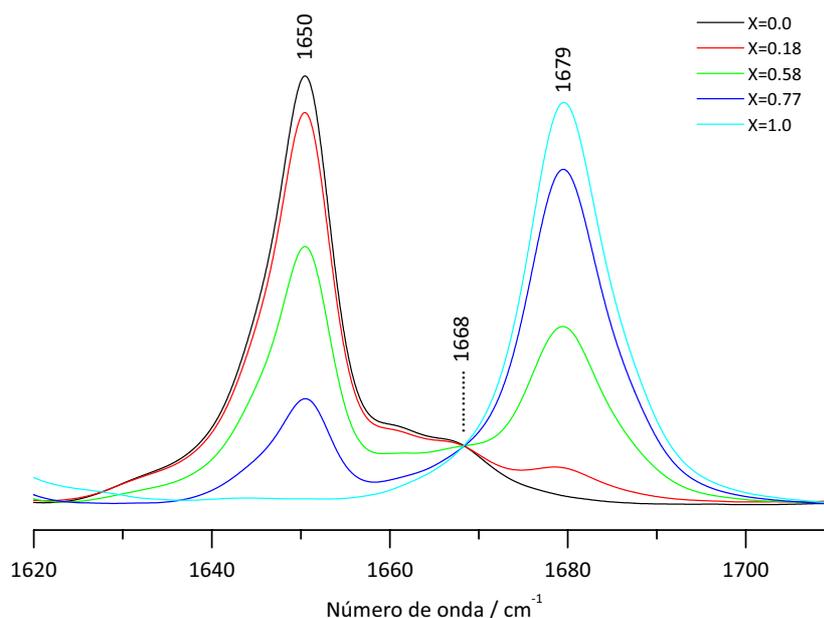


Figura 3.5 – Espectros de Raman, na região 1610-1720 cm^{-1} de misturas físicas com fracções molares de NCh iguais a 0.0, 0.18, 0.58, 0.77 e 1.0. Verifica-se a presença de um ponto pseudo-isobéstico aproximadamente a 1668 cm^{-1} .

Tal como referido anteriormente, a intensidade intrínseca relativa de um determinado modo pode diferir significativamente dependendo da forma pseudopolimórfica considerada. Através da preparação de misturas físicas com fracções molares bem conhecidas, as intensidades intrínsecas relativas (δ_h/δ_a e δ_a/δ_h) dos modos vibracionais considerados podem ser determinadas por ajuste linear das intensidades relativas previstas (obtidas por processos de desconvolução de bandas) como função das fracções molares através da expressão:

$$\frac{I_A}{I_H} = \frac{\delta_A}{\delta_H} \times \frac{\chi_A}{\chi_H} \quad (3.5)$$

onde χ_A e χ_H representam as fracções molares das forma anidra e hidratada, respectivamente. A **Figura 3.6** ilustra o processo de calibração para o modo vibracional $\nu\text{C=O}$ (1620-1710 cm^{-1}), através da representação gráfica de I_A/I_H em função de χ_A / χ_H utilizada para avaliar a proporção $\delta_{\text{Nca}}/\delta_{\text{NCh}}$.

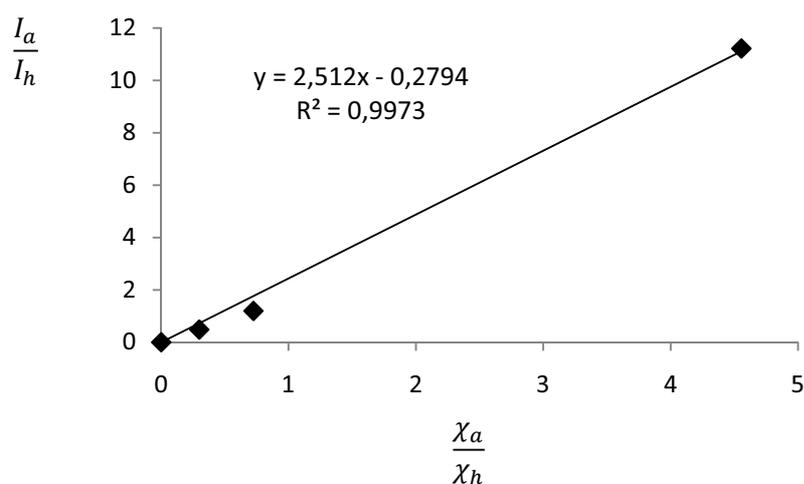


Figura 3.6 – Procedimento de calibração, realizado na região espectral $1620-1710\text{ cm}^{-1}$, de misturas físicas com frações molares de NCh iguais a 0,0, 0,18, 0,58, 0,77 e 1,0.

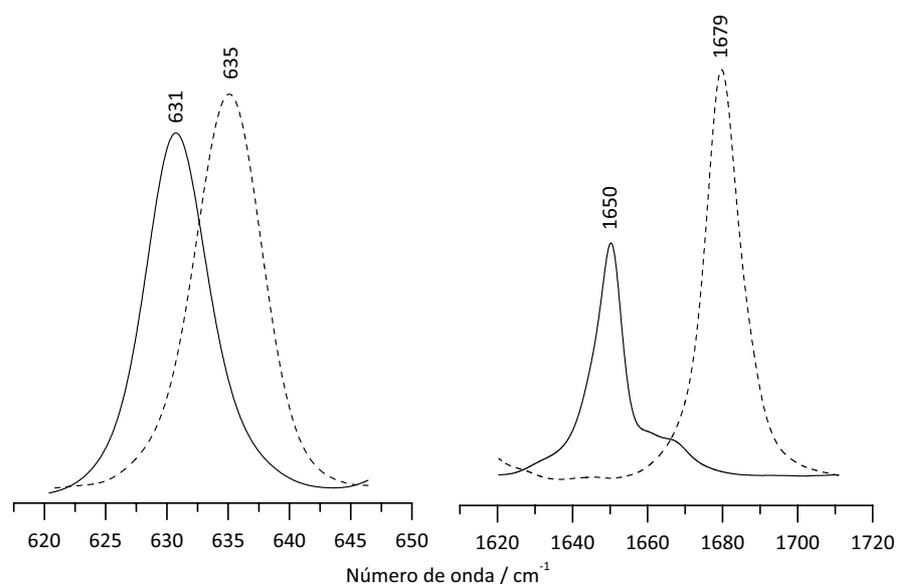


Figura 3.7 – Comparação entre o espectro de Raman das formas NCa e NCh nas regiões espectrais $620-646$ e $1620-1710\text{ cm}^{-1}$ depois de aplicar o factor de escala de forma a reflectir as intensidades intrínsecas relativas de cada banda.

Este procedimento de calibração foi também realizado para a outra região espectral considerada ($620-646\text{ cm}^{-1}$) e os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Tabela 3.3**. Na **Figura 3.7** estão representadas as regiões espectrais em análise, depois da aplicação do factor de escala determinado pelo método de calibração.

Tabela 3.3 – Resultados obtidos na calibração das várias misturas físicas (Nca + NCh) com fracções molares conhecidas.

Região espectral (cm ⁻¹)	Modo vibracional ^[a]	Centro da banda (cm ⁻¹)		b ^[b]	S _b ^[b]	a ^[b]	R ² ^[b]	$\frac{\delta_{Nca}}{\delta_{NCh}}$ ^[b]
		Nca	NCh					
1620-1710	vC=O	1650	1679	2.5120	0.18512	-0.2794	0.9973	2.51
620-646	γ N-H	631	635	0.5829	0.0529	0.09643	0.9965	0.58

[a] Atribuições de acordo com a **Tabela 3.1**. (ν - elongação, γ - deformação fora do plano); **[b]** b - declive; S_b – desvio padrão do declive; a – intersecção da recta de regressão linear no eixo do y; R² – coeficiente de correlação; δ_{Nca} – intensidade intrínseca do modo vibracional em análise considerando a forma anidra; δ_{NCh} – intensidade intrínseca do modo vibracional em análise considerando a forma hidratada.

3.3.3. Determinação dos mecanismos associados às transições anidro↔hidrato

Os estudos cinéticos envolvendo a NC, efectuados de modo a estudar o mecanismo envolvido no processo de hidratação da forma anidra, Nca e de desidratação da forma hidratada, NCh, são de seguida apresentados.

HIDRATAÇÃO DA NICLOSAMIDA ANIDRA

A **Figura 3.8** apresenta as variações sequenciais do espectro de Raman observadas na região atribuída ao modo de elongação do oscilador C=O (1620-1710 cm⁻¹) de amostras de Nca expostas a humidade relativa de 100% durante diferentes intervalos de tempo e à temperatura ambiente de 24 °C (**Figura 3.8a**). As intensidades dependentes do tempo de exposição observadas na região 620-646 cm⁻¹ apresentam comportamentos semelhantes. Na **Figura 3.8b** encontra-se representada a fracção de hidratação (α_h) em função do tempo de exposição a condições de RH100% (expresso em horas).

As primeiras evidências de transformação pseudopolimórfica são detectadas após 96 h de exposição. Por outro lado, ao fim de 240 h de exposição, a banda atribuída à forma Nca é fraca e desaparece depois de mais de 264 h. Tempos de exposição mais longos não deram origem a qualquer alteração espectroscópica observável.

Adicionalmente, deve ser referido que todos os espectros registados no decorrer da conversão $\text{NCa} \rightarrow \text{NCh}$ podem ser descritos pela soma dos espectros puros NCa e NCh , devidamente escalados, sem quaisquer bandas adicionais ou componentes em falta. A ausência de componentes atribuídas a formas metaestáveis ou espécies intermediárias é consistente com o mecanismo de um só passo indicado pelo ajuste dos dados experimentais (**Figura 3.8b**).

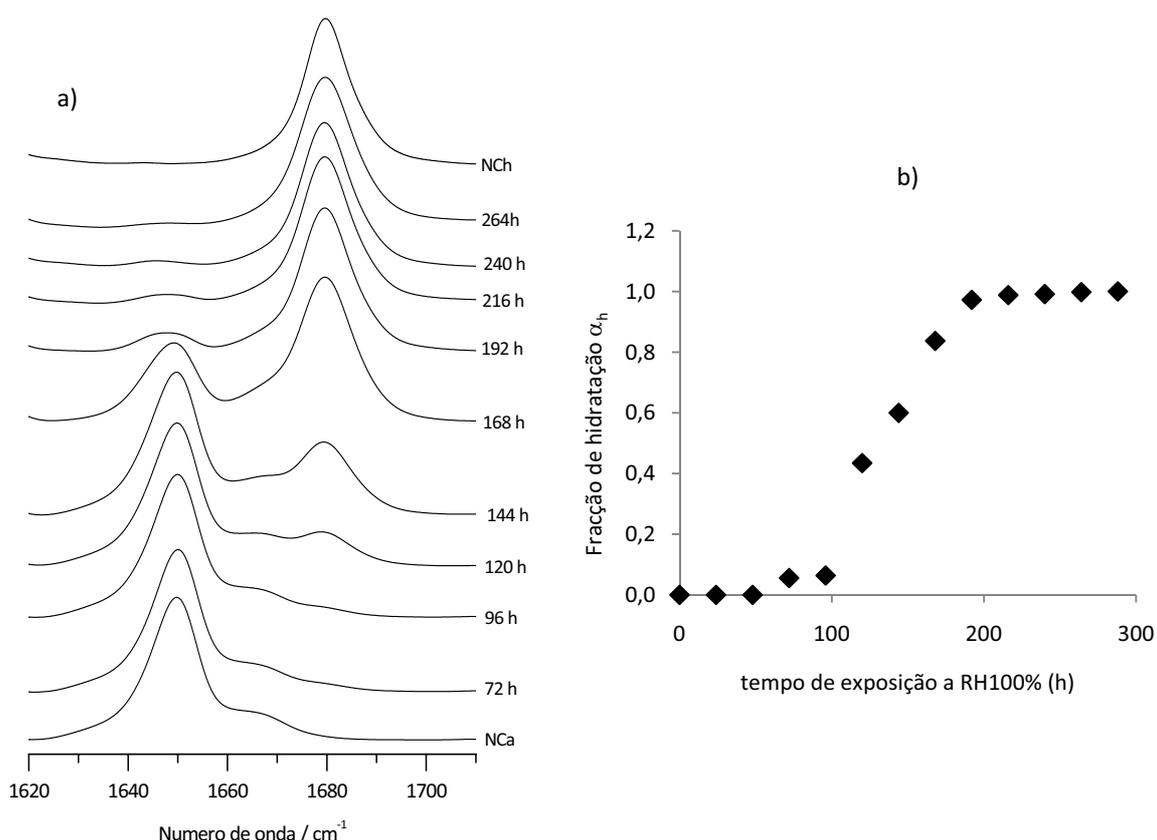


Figura 3.8 – a) Espectros FT-Raman, na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} , de amostras de NCa armazenadas a 24 °C e RH100% no decorrer de duas semanas e b) representação da fracção de hidratação (α_h) em função do tempo de exposição a um ambiente de RH100%.

Na determinação da fracção de hidratação é necessário proceder-se ao ajuste das bandas, de forma a quantificar as formas NCa e NCh . O procedimento seguido para o referido ajuste encontra-se descrito e devidamente exemplificado na Secção 9.12 do **Capítulo 9**.

No estudo da natureza do mecanismo envolvido no processo de hidratação da NCa , os valores da fracção de hidratação α_h , calculados para as duas regiões espectrais consideradas, foram ajustados aos diferentes modelos cinéticos representados na **Tabela 3.2**. Tendo em conta as considerações descritas na Secção 9.13 do **Capítulo 9**, a qualidade do ajuste linear foi, neste trabalho, determinada pela utilização conjunta dos valores de R^2 e S_b . Verificou-se que, para as duas regiões em estudo, o

mecanismo que melhor descreve os resultados do processo de hidratação da NCa é o mecanismo de um só passo de nucleação Avrami-Erofeev (Modelo 10, $n=1/3$) com uma constante de velocidade de 0.007 h^{-1} . Os resultados exibidos na **Tabela 3.4** indicam que a hidratação da NCa ocorre com tempos de meia-hidratação e de hidratação completa de aproximadamente 144 h e 343 h, respectivamente.

Tabela 3.4 – Valores da constante de velocidade de hidratação (k), desvio padrão do declive (S_b), coeficiente de correlação (R^2) e tempos de meia hidratação ($t_{1/2}$) e de hidratação completa (t_h), obtidos com os melhores ajustes lineares ($f(\alpha)$) estabelecidos para a NCa nas duas regiões espectrais consideradas.

Região espectral (cm^{-1})	Modelo cinético ^[a]	$f(\alpha)$	$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$	S_b	R^2	$t_{1/2}$ ^[b]	t_h ^[c]
1620-1710	M10	$0.0076t - 0.1068$	0.0076	0.00057	0.9680	130	311
	M11	$0.0063t + 0.0379$	0.0063	0.00045	0.9700	139	286
620-646	M9	$0.0071t - 0.2084$	0.0071	0.00056	0.9582	147	507
	M10	$0.0063t - 0.1061$	0.0063	0.00046	0.9651	157	375

[a] Modelo cinético descrito na **Tabela 3.2**. **[b]** Tempo de meia hidratação [$f(\alpha)=0.83, 0.88$ e 0.91 para os modelos M9, M10 e M11, respectivamente, usando $\alpha=0.5$]. **[c]** Tempo de hidratação total [$f(\alpha)=3.39, 2.26$ e 1.84 para os modelos M9, M10 e M11, respectivamente, usando $\alpha=0.99999$].

DESIDRATAÇÃO DA NICLOSAMIDA HIDRATADA

Tal como observado para o processo de hidratação, o espectro de Raman das amostras no decorrer do processo de desidratação não revela a presença de qualquer forma intermédia, isto é, de componentes vibracionais adicionais ou ausentes relativamente às componentes pertencentes às formas NCa e NCh. A presença de uma forma intermédia (metaestável) durante o processo de desidratação é observada por espectroscopia de Raman no caso da teofilina, para a qual um mecanismo em dois passos foi proposto: só depois da perda de uma quantidade significativa de água (cerca de 17%), a estrutura “tipo-hidrato” reorganiza-se para a estrutura “tipo-anidro”.²⁷ No caso da NC, a reorganização da estrutura de NCh para NCa parece ser concomitante com a perda de água.

Tal como representado na **Figura 3.9**, as primeiras evidências de desidratação aparecem após mais de 24 h de exposição a condições de RH=0%, a 24 °C. Por outro lado, após 120 h de exposição a banda atribuída à forma NCh representa apenas um pequeno ombro, que desaparece completamente

ao fim de 144 h de exposição (6 dias). Tempos de exposição mais elevados não deram origem a alterações adicionais observáveis.

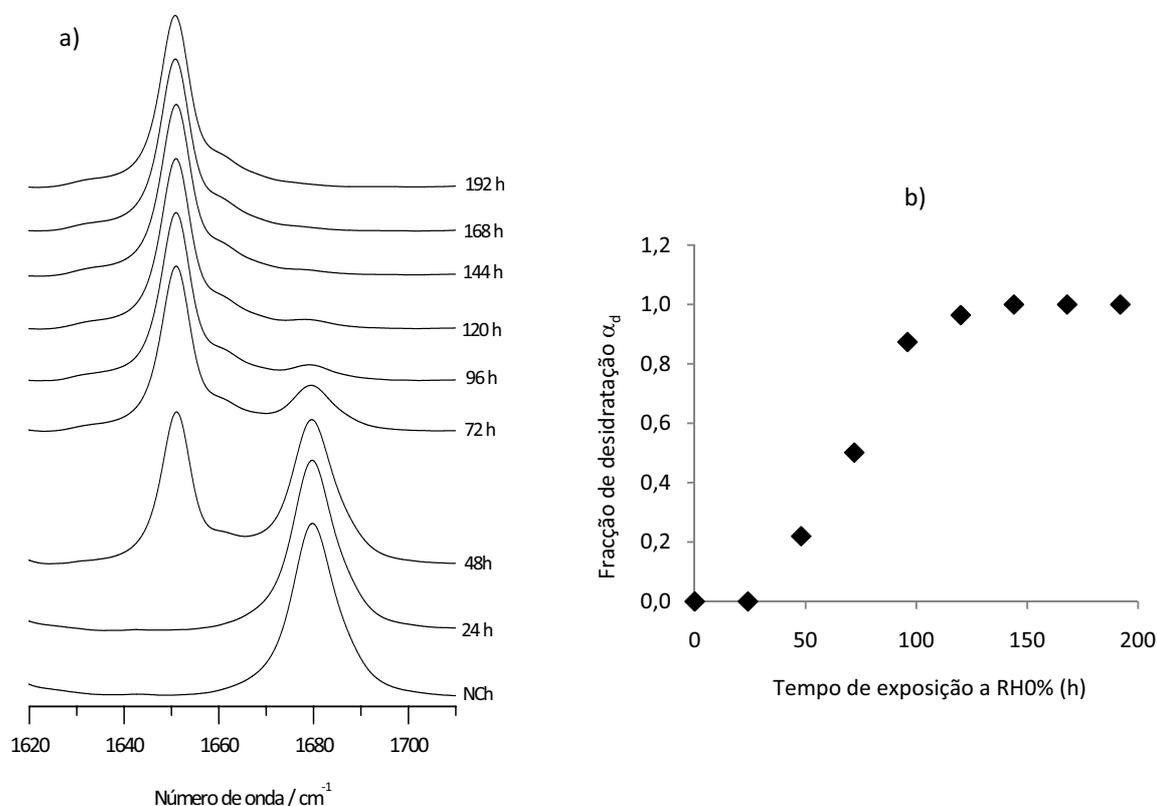


Figura 3.9 – a) Espectros FT-Raman, na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} , de amostras de NCh armazenadas a 24 °C e RH0% no decorrer de uma semana e b) representação da fracção de desidratação (α_d) em função do tempo de exposição a um ambiente de RH0%.

Depois de ajustar os valores de α_h aos diferentes modelos da **Tabela 3.2**, de acordo com o referido na secção anterior relativamente ao processo de hidratação, pode concluir-se que para ambas as regiões espectrais (620-646 e 1620-1710 cm^{-1}) a desidratação da NCh é descrita de forma mais completa pelo mecanismo de nucleação aleatória de Avrami-Erofeev. Na **Tabela 3.5** estão sumariados os melhores resultados cinéticos obtidos para o processo de desidratação da NCh, usando medições de Raman. De acordo com os resultados experimentais, assume-se que o processo de desidratação ocorre num só passo, descrito pela equação de Avrami-Erofeev com expoente $\frac{1}{2}$, com uma constante de velocidade de *ca.* 0.0157 h^{-1} o que corresponde a um tempo de meia-desidratação de *ca.* 63 h.

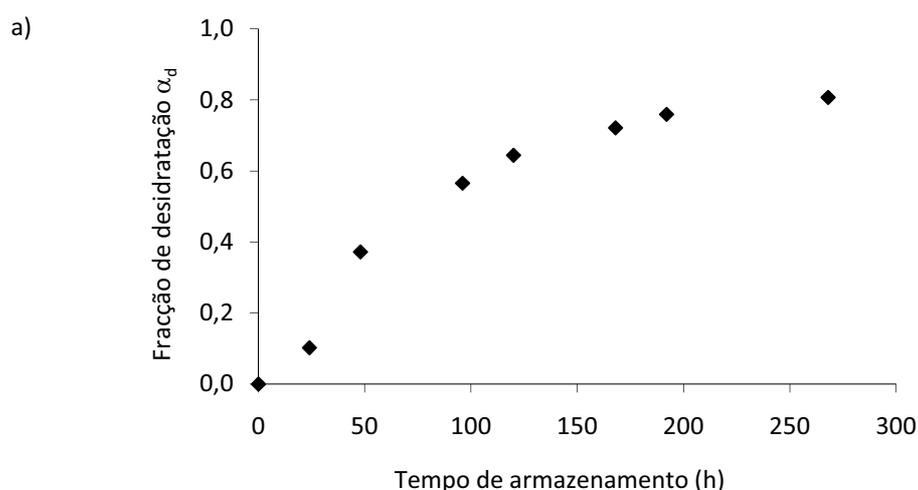
O limite de desidratação dependente-da-temperatura da NCh situa-se acima dos 35 °C. A 35 °C não são encontradas quaisquer evidências de desidratação após uma semana de exposição – e esta é uma informação importante para o armazenamento da NC. Por outro lado, a 45 °C a desidratação da

NCh inicia-se após 24 h de exposição mas só está concluída depois de mais de 10 dias (**Figura 3.10**). A 60 °C, a desidratação da NCh está concluída ao fim de apenas 8 h. Tal como esperado, o tempo necessário para a completa desidratação da NCh aumenta à medida que a temperatura diminui, sendo da ordem de *ca.* 8 h e mais de 264 h a 60 °C e 45 °C, respectivamente.

Tabela 3.5 – Valores da constante de velocidade de desidratação (*k*), desvio padrão do declive (*S_b*), coeficiente de correlação (*R*²) e tempos de meia desidratação (*t*_{1/2}) e de desidratação completa (*t_d*), obtidos com os melhores ajustes lineares (*f*(*α*)) estabelecidos para a NCh nas duas regiões espectrais consideradas.

Região espectral (cm ⁻¹)	Modelo cinético ^[a]	<i>f</i> (<i>α</i>)	<i>k</i> (h ⁻¹)	<i>S_b</i>	<i>R</i> ²	<i>t</i> _{1/2} ^[b]	<i>t_d</i> ^[c]
1620-1710	M9	0.0164 <i>t</i> – 0.2182	0.0164	0.00232	0.9602	64	220
	M10	0.0137 <i>t</i> - 0.1112	0.0137	0.00187	0.9631	72	172
620-646	M9	0.0150 <i>t</i> – 0.0891	0.0150	0.00254	0.9448	62	232
	M12	0.0175 <i>t</i> – 0.1626	0.0175	0.00242	0.9618	54	301

[a] Modelo cinético descrito na **Tabela 3.2**. **[b]** Tempo de meia desidratação [*f*(*α*)=0.83, 0.88 e 0.78 para os modelos M9, M10 e M12, respectivamente, usando *α*=0.5]. **[c]** Tempo de desidratação total [*f*(*α*)=3.39, 2.26 e 5.10 para os modelos M9, M10 e M12, respectivamente, usando *α*=0.99999].



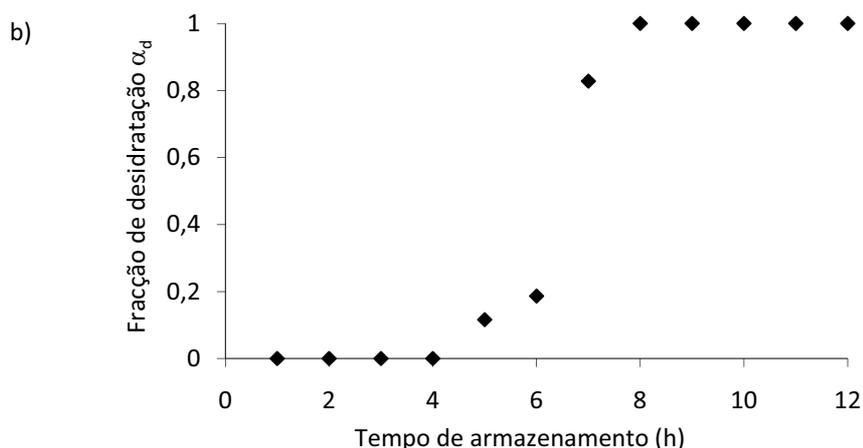


Figura 3.10 – Resultados obtidos para a desidratação da NCh a diferentes temperaturas. Representação da fracção de desidratação (α_d) em função do tempo de armazenamento a **a)** 45 °C e **b)** 60 °C. Valores obtidos a partir da região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} .

3.3.4. Determinação do valor de RH crítica nos processos de hidratação e desidratação

No decorrer de processos como cristalização, liofilização, granulação húmida e filme aquoso ou secagem em spray, os sólidos farmacêuticos podem entrar em contacto com água. Mais ainda, as substâncias activas ou os produtos farmacêuticos são submetidos a diferentes temperaturas e humidades relativas no decorrer do armazenamento (nomeadamente devido às condições climáticas), dando origem a fenómenos inesperados de hidratação ou desidratação que são conhecidos por afectarem diversas propriedades dos compostos, tais como solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade.^{1, 60}

Um parâmetro importante a ter em conta no processamento, formulação e armazenamento de um composto farmacêutico é a humidade relativa crítica, uma vez que uma determinada forma anidra pode ser estável abaixo de um certo valor de RH mas a valores superiores é possível que se converta na espécie hidratada. De forma a estudar este processo, foram realizados ensaios com amostras de NCa expostas a diferentes condições de RH (na gama 0-100%) e o valor da humidade relativa crítica foi determinado.

Tal como referido anteriormente, a exposição a valores de RH extremos (0 e 100%) resulta na interconversão completa $\text{NCh} \leftrightarrow \text{NCh}$ em menos de duas semanas. No entanto, a valores de RH intermédios, foi determinado que os mesmos processos (conversão completa) ocorrem numa escala temporal mais alargada. De facto, para períodos de armazenamento de mais de um mês não foi

possível identificar o valor de RH crítica termodinâmica. Os resultados obtidos após um período de armazenamento de duas semanas encontram-se representados na **Figura 3.11**.

A presença de uma componente da forma NCh no espectro de Raman das amostras de NCa armazenadas a diferentes valores de RH, é detectada para valores de RH>90% e a banda atribuída à NCa permanece até RH=97%. Para o processo inverso (NCh→NCa) os primeiros indícios de desidratação são visíveis apenas no espectro de Raman de amostras armazenadas a RH≤6% (**Figura 3.12**).

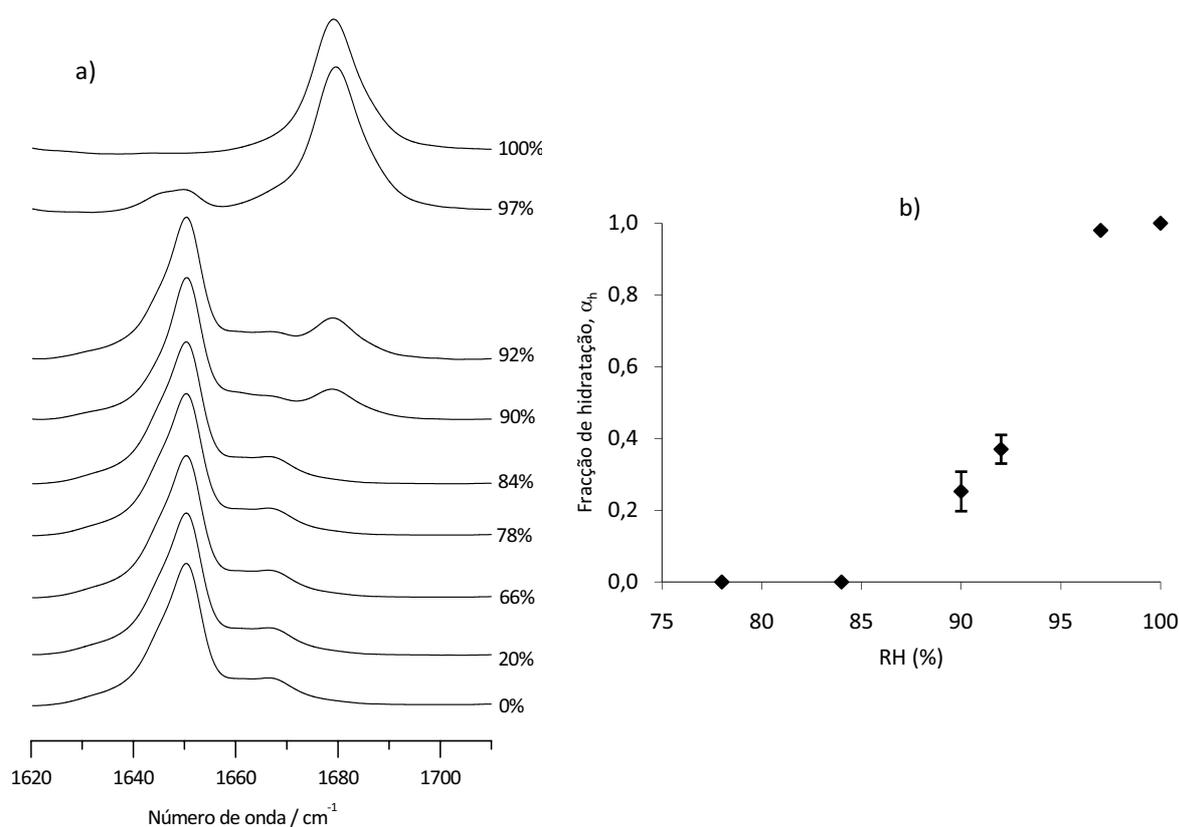


Figura 3.11 – a) Espectros FT-Raman, na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} , de amostras de NCa armazenadas a diferentes valores de RH, no decorrer de duas semanas e b) representação da fracção de hidratação (α_h) em função de diferentes valores de RH e à temperatura de 24 °C. A fracção α_h toma os valores de 0.25, 0.37 e 0.98 para as amostras expostas a RH=90, 92 e 97% respectivamente.

A **Figura 3.11** apresenta os espectros FT-Raman, na região 1620-1710 cm^{-1} , obtidos com amostras de NCa expostas, durante duas semanas, a ambientes com diferentes humidades relativas (%RH), à temperatura de 24 °C, conforme descrito na Secção 9.3 do **Capítulo 9**. O comportamento observado nesta região verifica-se também na região compreendida entre 620-646 cm^{-1} . Também se

encontra incluída na **Figura 3.11**, a representação da fração de hidratação (α_h) em função dos diferentes valores de RH. Estes resultados indicam que a NCa apresenta uma baixa higroscopicidade ao longo de um amplo intervalo de valores de RH, verificando-se a conversão NCa→NCh numa gama muito restrita de valores de RH.

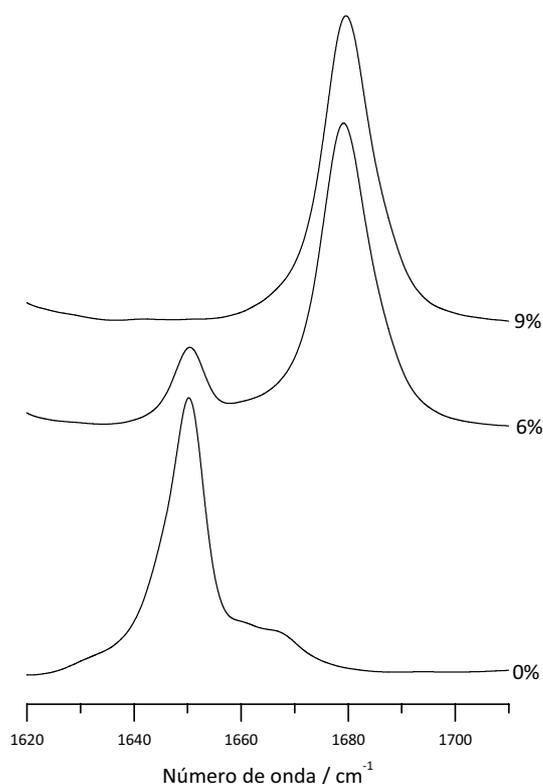


Figura 3.12 – Espectros FT-Raman, na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} , de amostras de NCh armazenadas a diferentes valores de RH, no decorrer de duas semanas.

3.4. Conclusões

A espectroscopia de Raman foi utilizada de forma apropriada para quantificar as formas anidra e hidratada de cristais de NC, principalmente devido à elevada sensibilidade demonstrada às interações intermoleculares fortes presentes nestes sistemas. No sistema NC, existem várias regiões espectrais que podem ser usadas na quantificação de transformações de fase anidro-hidrato, nomeadamente as bandas atribuídas a modos vibracionais de alongação do oscilador C=O (1620-1710 cm^{-1}) e de deformação fora do plano do oscilador N-H (620-646 cm^{-1}). Estas regiões apresentaram os requisitos necessários para a aplicação da metodologia descrita neste Capítulo e foram utilizadas na monitorização quantitativa das transições NCa↔NCh.

As alterações espectrais observadas sugerem que no decorrer da hidratação, o grupo carbonilo não participa ou está fracamente ligado por interações de hidrogénio, e que a molécula de água está provavelmente localizada perto dos grupos NO_2 e OH de duas moléculas vizinhas. De entre os diversos componentes espectrais sensíveis ao grau de hidratação/desidratação, as bandas atribuídas a $\nu\text{C}=\text{O}$ ($1650/1679\text{ cm}^{-1}$) e $\gamma\text{N-H}$ ($631/635\text{ cm}^{-1}$) apresentam condições optimizadas para a caracterização das amostras.

Ambos os processos de hidratação e desidratação foram determinados como mecanismos de um só passo de nucleação aleatória de Avrami-Erofeev. A ausência de componentes espectrais que não estão associados às formas NCa e NCh puras, no decorrer dos processos de hidratação e desidratação, indica a ausência de formas intermediárias e é consistente com o mecanismo de um só passo. A $\text{RH}=100\%$ e $24\text{ }^\circ\text{C}$, a hidratação da NCa é descrita pela equação de Avrami-Erofeev com expoente $\frac{1}{3}$. A constante de velocidade é *ca.* 0.007 h^{-1} , o que corresponde a um tempo de meia-hidratação de *ca.* 144 h. Por outro lado, a desidratação da NCh a $\text{RH}=0\%$ e $24\text{ }^\circ\text{C}$ é descrita pela equação de Avrami-Erofeev com expoente $\frac{1}{2}$, com uma constante de velocidade de *ca.* 0.0157 h^{-1} , o que corresponde a um tempo de meia-desidratação de *ca.* 63 h. Adicionalmente, o início da desidratação dependente da temperatura situa-se entre os $35\text{ }^\circ\text{C}$ e os $45\text{ }^\circ\text{C}$.

Os valores de humidade relativa crítica para os processos $\text{NCa}\leftrightarrow\text{NCh}$ no decorrer de duas semanas foram também determinados. Para a hidratação, o valor é de *ca.* 90% enquanto para a desidratação é de 6%. De notar que, para um período de duas semanas, não ocorre qualquer conversão $\text{NCa}\leftrightarrow\text{NCh}$ para uma vasta gama de valores de RH .

3.5. Referências

1. R. K. Khankari, D. J. W. Grant, Pharmaceutical hydrates, *Thermochim. Acta* **1995**, *248*, 61-79.
2. A. Burger, The Relevance of Polymorphism, *Pharmacy International* **1983**, *4*, 186.
3. M. R. Caira, in *Design of Organic Solids, Vol. 198*, p. 163-208, (Ed.: W. E), Springer-Verlag, Berlin, **1998**.
4. J. Halebian, W. McCrone, Pharmaceutical Applications of Polymorphism, *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 911.
5. J. D. Dunitz, J. Bernstein, Disappearing Polymorphs, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 193-200.
6. N. V. Phadnis, R. Suryanarayanan, Polymorphism in anhydrous theophylline - Implications on the dissolution rate of theophylline tablets, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1256-1263.
7. F. Giordano, A. Gazzaniga, J. R. Moyano, P. Ventura, M. Zanol, T. Peveri, L. Carima, Crystal forms of piroxicam pivalate: Preparation and characterization of two polymorphs, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 333-337.
8. S. R. Vippagunta, H. G. Brittain, D. J. W. Grant, Crystalline solids, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, *48*, 3-26.
9. J. Bernstein, R. J. Davey, J.-O. Henck, Concomitant Polymorphs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3440-3461.
10. H. G. Brittain, Polymorphism and solvatomorphism 2005, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 705-728.
11. K. R. Seddon, Pseudopolymorph: A Polemic, *Cryst. Growth Des.* **2004**, *4*, 1087-1087.
12. J. Bernstein, ...And Another Comment on Pseudopolymorphism, *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 1661-1662.
13. G. Fini, Applications of Raman spectroscopy to pharmacy, *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35*, 335-337.
14. H. G. Brittain, Spectral Methods for the Characterization of Polymorphs and Solvates, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 405-412.
15. D. A. Snider, W. Addicks, W. Owens, Polymorphism in generic drug product development, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 391-395.
16. T.-C. Hu, S.-L. Wang, T.-F. Chen, S.-Y. Lin, Hydration-induced proton transfer in the solid state of norfloxacin, *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1351-1357.
17. L.-F. Huang, W.-Q. T. Tong, Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 321-334.
18. J. Bauer, S. Spanton, R. Henry, J. Quick, W. Dziki, W. Porter, J. Morris, Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism, *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 859-866.
19. L. X. Yu, M. S. Furness, A. Raw, K. P. W. Outlaw, N. E. Nashed, E. Ramos, S. P. F. Miller, R. C. Adams, F. Fang, R. M. Patel, F. O. H. Jr., Y.-y. Chiu, A. S. Hussain, Scientific Considerations of Pharmaceutical Solid Polymorphism in Abbreviated New Drug Applications, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 531-536.
20. S. R. Chemburkar, J. Bauer, K. Deming, H. Spiwek, K. Patel, J. Morris, R. Henry, S. Spanton, W. Dziki, W. Porter, J. Quick, P. Bauer, J. Donaubaue, B. A. Narayanan, M. Soldani, D. Riley, K. McFarland, Dealing with the Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development, *Org. Proc. Res. Dev.* **2000**, *4*, 413-417.

21. H. P. Stahl, *The Problem of Drug Interactions with Excipients in Towards Better Safety of Drugs and Pharmaceutical Products*, Elsevier, New York, **1980**.
22. A. Nangia, G. R. Desiraju, Pseudopolymorphism: occurrences of hydrogen bonding organic solvents in molecular crystals, *Chem. Commun.* **1999**, 605-606.
23. S. C. Pinzaru, I. Pavel, N. Leopold, W. Kiefer, Identification and characterization of pharmaceuticals using Raman and surface-enhanced Raman scattering, *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35*, 338-346.
24. T. Vankeirsbilck, A. Vercauteren, W. Baeyens, G. Van der Weken, F. Verpoort, G. Vergote, J. P. Remon, Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 869-877.
25. B. Rodríguez-Spong, C. P. Price, A. Jayasankar, A. J. Matzger, N. Rodríguez-Hornedo, General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 271-274.
26. M. Szelagiewicz, C. Marcolli, S. Cianferani, A. P. Hard, A. Vit, A. Burkhard, M. v. Raumer, U. C. Hofmeier, A. Zilian, E. Francotte, R. Schenker, In situ characterization of polymorphic forms: The potential of Raman techniques, *J. Therm. Anal. Calorim.* **1999**, *57*, 23-43.
27. A. M. Amado, M. M. Nolasco, J. A. Ribeiro-Claro, Probing Pseudopolymorphic Transitions in Pharmaceutical Solids using Raman Spectroscopy: Hydration and Dehydration of Theophylline, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 1366-1379.
28. M. M. Nolasco, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Computationally-Assisted Approach to the Vibrational Spectra of Molecular Crystals: Study of Hydrogen-bonding and Pseudo-Polymorphism, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 2150-2161.
29. A. Jørgensen, J. Rantanen, M. Karjalainen, L. Khriachtchev, E. Räsänen, J. Yliruusi, Hydrate Formation during Wet Granulation Studied by Spectroscopic Methods and Multivariate Analysis, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1285-1291.
30. L. E. O'Brien, P. Timmins, A. C. Williams, P. York, Use of in situ FT-Raman spectroscopy to study the kinetics of the transformation of carbamazepine polymorphs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 335-340.
31. D. E. Bugay, Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, *48*, 43-65.
32. D. S. Hausman, R. T. Cambron, A. Sakr, Application of on-line Raman spectroscopy for characterizing relationships between drug hydration state and tablet physical stability, *Int. J. Pharm.* **2005**, *299*, 19-33.
33. D. Pratiwi, J. P. Fawcett, K. C. Gordon, T. Rades, Quantitative analysis of polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride by Raman spectroscopy and principal components analysis, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54*, 337-341.
34. M. C. Gamberini, C. Baraldi, A. Tinti, C. Rustichelli, V. Ferioli, G. Gamberini, Solid state characterization of chloramphenicol palmitate. Raman spectroscopy applied to pharmaceutical polymorphs, *J. Mol. Struct.* **2006**, *785*, 216-224.

35. C. Starbuck, A. Spartalis, L. Wai, J. Wang, P. Fernandez, C. M. Lindemann, G. X. Zhou, Z. Ge, Process Optimization of a Complex Pharmaceutical Polymorphic System via In Situ Raman Spectroscopy, *Cryst. Growth Des.* **2002**, *2*, 515-522.
36. E. C. v. Tonder, T. S. P. Maleka, W. Liebenberg, M. Song, D. E. Wurster, M. M. d. Villiers, Preparation and physicochemical properties of niclosamide anhydrate and two monohydrates, *Int. J. Pharm.* **2004**, *269*, 417-432.
37. Z. Sun, Y. Zhang, Antituberculosis activity of certain antifungal and antihelminthic drugs, *Tuber. Lung Dis.* **1999**, *79*, 319-320.
38. M. M. d. Villiers, M. D. Mahlatji, E. C. v. Tonder, S. F. Malan, A. P. Lötter, W. Liebenberg, Comparison of the Physical and Chemical Stability of Niclosamide Crystal Forms in Aqueous Versus Nonaqueous Suspensions, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2004**, *30*, 581-592.
39. M. R. Caira, E. C. V. Tonder, M. M. D. Villiers, A. P. Lötter, Diverse Modes of Solvent Inclusion in Crystalline Pseudopolymorphs of the Anthelmintic Drug Niclosamide, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, *31*, 1-16.
40. A. P. Scott, L. Radom, Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation of Hartree-Fock, Møller-Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, and Semiempirical Scale Factors, *J. Phys. Chem. B* **1996**, *100*, 16502-16513.
41. M. M. Nolasco, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Insights into phase stability of anhydrous-hydrate systems: a methodology, *J. Raman Spectrosc.* **2009**, DOI: 10.1002/jrs.2453.
42. C. O. Agbada, P. York, Dehydration of theophylline monohydrate powder - effects of particle size and sample weight, *Int. J. Pharm.* **1994**, *106*, 33-40.
43. M. T. Ledwidge, O. I. Corrigan, Effects of environmental factors on the dehydration of diclofenac HEP dihydrate and theophylline monohydrate, *Int. J. Pharm.* **1997**, *147*, 41-49.
44. E. Suihko, V.-P. Lehto, J. Ketolainen, E. Laine, P. Paronen, Dynamic solid-state and tableting properties of four theophylline forms, *Int. J. Pharm.* **2001**, *217*, 225-236.
45. M. Otsuka, N. Kaneniwa, K. Otsuka, K. Kawakami, O. Umezawa, Y. Matsuda, Effect of geometric factors on hydration kinetics of theophylline anhydrate tablets, *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 1189-1193.
46. M. U. A. Ahlqvist, L. S. Taylor, Water Diffusion in Hydrated Crystalline and Amorphous Sugars Monitored Using H/D Exchange, *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*.
47. A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, H/D and D/H exchange rates in α -cyclodextrin and α -cyclodextrin inclusion compounds. Raman spectroscopic study, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1997**, *93*, 2387-2390.
48. T. Steiner, A. M. M. d. Silva, J. J. C. Teixeira-Dias, J. Müller, W. Saenger, Rapid Water Diffusion in a Cage-Type Crystal Lattice: beta-Cyclodextrin Dodecahydrate, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1452-1453.
49. A. M. d. Silva, T. Steiner, W. Saenger, J. Empis, J. J. C. Teixeira-Dias, Dynamics of hydration and dehydration processes of β -cyclodextrin monitored in real time by Raman spectroscopy, *Chem. Commun.* **1996**, 1871-1872.

50. A. M. d. Silva, T. Steiner, W. Saenger, J. Empis, J. J. C. Teixeira-Dias, Dynamics of H/D and D/H exchanges in β -cyclodextrin dodecahydrate observed in real time: effects from zero-point vibrational energy, *Chem. Commun.* **1997**, 465-466.
51. A. M. M. d. Silva, J. M. A. Empis, J. J. C. Teixeira-Dias, Inclusion of carvone enantiomers in cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin): thermal behaviour and H-D and D-H exchange, *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 2501-2504.
52. L. S. Taylor, F. W. Langkilde, Evaluation of Solid-State Forms Present in Tablets by Raman Spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* **2000**, 89.
53. D. K. Salameh, L. S. Taylor, Physical Stability of Crystal Hydrates and their Anhydrates in the Presence of Excipients, *J. Pharm. Sci.* **2006**, 95.
54. M. E. Brown, A. K. Galwey, The distinguishability of selected kinetic models for isothermal solid-state reactions, *Thermochim. Acta* **1979**, 29, 129-146.
55. S. Vyazovkin, Evaluation of Activation Energy of Thermally Stimulated Solid-State Reactions under Arbitrary Variation of Temperature, *J. Comput. Chem.* **1997**, 18, 393-402.
56. A. Ortega, The Kinetics of Solid-State Reactions Toward Consensus, Part 3. Searching for Consistent Kinetic Results: SCTA vs. Conventional Thermal Analysis, *Int. J. Chem. Kinet.* **2002**, 34, 223-236.
57. A. Khawam, D. R. Flanagan, Basics and Applications of Solid-State Kinetics: A Pharmaceutical Perspective, *J. Pharm. Sci.* **2006**, 95.
58. R. B. Girling, H. F. Shurvell, A Raman spectroscopic study of complex formation between *o*-cresol and propionitrile, *Vib. Spectrosc.* **1998**, 18, 77-82.
59. R. S. Pemberton, H. F. Shurvell, Raman spectroscopic study of complex formation between *p*-cresol and propionitrile, *J. Raman Spectrosc.* **1995**, 26, 373-380.
60. D. Giron, C. Goldbronn, S. P. M. Mutz, P. Piechon, P. Schwab, Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2002**, 68, 453-465.

Capítulo 4

Pares em Materiais Moleculares: PiMM

CONTEÚDO

Resumo	91
4.1. Metodologia PiMM: descrição	92
CASOS DE ESTUDO	93
4.2. Polimorfismo de sólidos farmacêuticos: Nitrofurantoína	93
4.2.1. Pares moleculares mais relevantes existentes nas estruturas cristalinas	94
4.2.2. Atribuição vibracional baseada na aplicação da metodologia PiMM	101
4.2.3. Estatística da aplicação da metodologia PiMM em sólidos farmacêuticos	110
4.2.4. Discussão	112
4.3. Diagramas de fase sólido-líquido de misturas binárias de ácidos gordos.....	113
4.3.1. Sistemas em estudo	114
4.3.2. Resultados e discussão.....	116
4.3.3. Conclusões	124
4.4. Referências.....	125

RESUMO

De acordo com a abordagem utilizada neste Capítulo (PiMM – Pares em Materiais Moleculares), a atribuição completa ou parcial dos espectros de infravermelho e de Raman das amostras em estudo (polimorfos anidros da nitrofurantoína e diversos ácidos gordos) foi concretizada tendo em conta os efeitos das interações intermoleculares existentes na estrutura cristalina das amostras. Os desvios nas frequências vibracionais devido ao empacotamento cristalino foram avaliados por cálculos DFT para um conjunto apropriado de pares moleculares, utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31G*. Neste Capítulo é descrita a utilização da abordagem PiMM no estudo de:

- i) Transformações polimórficas e interações intermoleculares existentes na estrutura cristalina de um composto farmacêutico: nitrofurantoína;
- ii) Regiões de equilíbrio sólido-líquido em diagramas de fases de misturas binárias de ácidos gordos, identificadas pela correspondente monitorização de modos sensíveis no espectro vibracional das misturas.

No primeiro caso, os resultados obtidos indicam que os modos vibracionais relacionados com osciladores do tipo C=O, N-H e C-H são fortemente afectados pela formação de ligações de hidrogénio intermoleculares e que as interações fracas do tipo *C-H...O* desempenham um papel importante no aumento da estabilidade de associações moleculares em sistemas biológicos.

No caso das misturas binárias de ácidos gordos, a espectroscopia de Raman e a metodologia PiMM foram utilizadas como técnicas complementares na identificação de reacções peritéticas, eutécticas, metatéticas e regiões de completa miscibilidade entre ácidos gordos.

4.1. Metodologia PiMM: descrição

A atribuição completa do espectro vibracional de moléculas relativamente grandes no estado cristalino é uma tarefa complexa, sendo a associação de bandas observadas experimentalmente a modos vibracionais específicos normalmente incerta. De forma a ultrapassar esta dificuldade, os cálculos DFT são utilizados frequentemente para apoiar a atribuição do espectro vibracional, através da comparação entre espectros calculados e experimentais. No entanto, uma das maiores limitações da utilização de cálculos DFT na previsão de espectros vibracionais resulta da complexidade computacional do método, que impõe restrições à dimensão do sistema em estudo. Apesar do constante desenvolvimento computacional, é ainda difícil trabalhar com sistemas que possuam mais de algumas dezenas de átomos. Deste modo, a maioria dos cálculos são efectuados para a situação de “molécula isolada”. As propriedades espectroscópicas calculadas desta forma (molécula isolada) descrevem adequadamente o espectro de fase gasosa e podem ser usadas com reservas para a interpretação de espectros de líquidos e soluções, mas falham na descrição apropriada do espectro de sólidos. O erro será tanto maior quanto mais importantes forem as interações intermoleculares no sólido em estudo.

A aproximação recentemente proposta¹ (PiMM – Pares em Materiais Moleculares) permite ultrapassar esta limitação ao assumir as interações intermoleculares no sólido cristalino como perturbações às características espectroscópicas da molécula isolada. A ideia base do conceito é a possibilidade de descrever em termos aditivos as perturbações provocadas à molécula isolada pelas interações intermoleculares no sólido. Esta metodologia utiliza cálculos DFT para descrever o espectro de arranjos moleculares em termos da soma dos efeitos de interações relevantes entre pares de moléculas, reduzindo o custo computacional de métodos convencionais de *cluster*. Adicionalmente, pode também permitir a previsão de contactos intermoleculares em estruturas no estado sólido desconhecidas, ao fornecer a identificação de motivos relevantes nas paisagens de energia potencial da molécula. Para além da abordagem relativamente a desvios de números de onda, também a análise de desvios nas intensidades das bandas provou ser útil na atribuição do espectro vibracional do ácido *trans*-cinâmico.²

No âmbito desta aproximação, o observável espectroscópico σ_i de um sólido molecular (frequência vibracional, desvio químico ou transição electrónica) é obtido a partir do seu valor calculado para a molécula isolada, corrigido pelas perturbações resultantes dos contactos com as moléculas vizinhas no cristal, $\Delta\sigma_i$. Assumindo que apenas os vizinhos da primeira esfera afectam significativamente os observáveis espectroscópicos da molécula isolada, cada observável pode ser calculado através da **Equação 4.1**:

$$\sigma_i(\text{cristal}) = \sigma_i(\text{isolado}) + \sum_{j=1}^M \Delta\sigma_{i,j}(\text{directo}) + \sum_{j=1}^M \Delta\sigma_{i,j}(\text{indirecto}) \quad (4.1)$$

O termo “directo” refere-se ao efeito dos contactos intermoleculares nos osciladores directamente envolvidos no contacto, enquanto o termo “indirecto” refere-se ao efeito do mesmo contacto nos restantes modos da molécula. Neste trabalho a grandeza σ_i é representada pelo número de onda, o somatório aplica-se para todos os contactos possíveis e as correcções $\Delta\nu_i$ são obtidas por cálculos DFT para os pares moleculares que apresentam os contactos intermoleculares mais relevantes.

Ao utilizar apenas as moléculas vizinhas da primeira camada, negligenciam-se os efeitos de interacções de longo alcance e a cooperatividade entre as várias interacções. Embora seja difícil quantificar inteiramente a importância destes efeitos, pode ser estimada comparando os resultados para pares moleculares com os resultados obtidos para associações maiores de moléculas. Para um conjunto de cálculos efectuados para associações de 3 e 4 moléculas, estima-se que estes efeitos afectem os modos vibracionais, em média, menos de $\sim 5 \text{ cm}^{-1}$. No entanto, diferenças de $\sim 25\text{-}30 \text{ cm}^{-1}$ são observadas nos modos mais sensíveis.

Como cada par molecular é calculado independentemente, o tempo de computação requerido por esta metodologia para o estudo de um agregado de M moléculas cresce com $2^4 \times (M-1)$, enquanto nos métodos de estudo do agregado completo o tempo de computação cresce com M^4 . Num caso típico de um agregado de uma molécula com 6 vizinhos próximos ($M=7$), a aproximação proposta é pelo menos 25 vezes mais rápida que o método convencional.

CASOS DE ESTUDO

4.2. Polimorfismo de sólidos farmacêuticos: Nitrofurantoína

O conhecimento das características estruturais de um composto do ponto de vista molecular é relevante para uma compreensão racional da relação estrutural que influencia os seus efeitos bioquímicos. Tal como discutido na Secção 1.3.3. do Capítulo 1, o comportamento polimórfico/pseudopolimórfico de compostos farmacêuticos tem vindo a revelar-se uma preocupação central da indústria farmacêutica, uma vez que é reconhecido que diferentes arranjos cristalinos da mesma espécie molecular (polimorfismo)³ podem exibir propriedades biofarmacêuticas diferentes, tais como solubilidade, estabilidade e/ou biodisponibilidade.⁴⁻¹¹ De acordo com trabalhos anteriores,^{1, 2} a metodologia PiMM foi aplicada ao estudo de um composto farmacêutico, tendo em conta o

problema de polimorfismo e formação de ligações de hidrogénio no campo da investigação farmacêutica.

A Nitrofurantoína (1-[[[(5-nitro-2-furanil)metileno]amino]-2,4-imidazolidinediona; NF, **Figura 4.1**) é habitualmente utilizada em fármacos anti-bacterianos para o tratamento de infecções do sistema urinário (bexiga e rins). Esta substância interfere no metabolismo bacteriano dos hidratos de carbono, impedindo a formação da parede bacteriana e alterando a produção de nutrientes vitais.

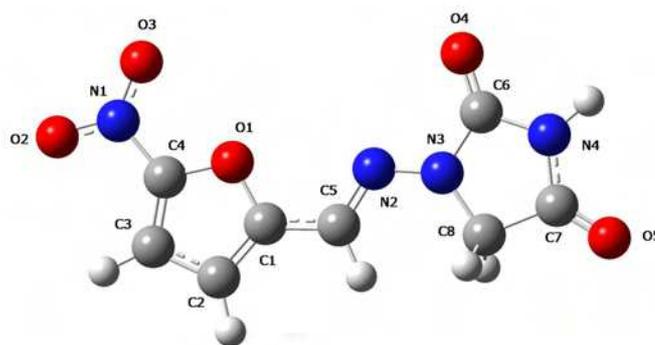


Figura 4.1 – Representação esquemática da Nitrofurantoína (NF) e numeração atômica utilizada no texto, tabelas e figuras.

A NF possui baixa solubilidade em água (174 e 374 mg/L a pH 1.1 e pH 7.2, respectivamente a 37 °C¹²) e a sua dissolução em água é, por esse motivo, o passo limitante da absorção no trato gastrointestinal.¹³ É possível encontrar na literatura diversas referências às transformações polimórficas e pseudopolimórficas da NF que afectam os perfis de dissolução e, conseqüentemente a biodisponibilidade. A NF cristaliza em diferentes estados (dois anidros e dois hidratados) e é um bom composto modelo para a caracterização exacta de ambas as formas polimórficas e dos estados hidratados. A NF apresenta alguns problemas de biodisponibilidade que estão estritamente relacionados com o tamanho do cristal e com as duas formas cristalinas anidras e monohidratadas.¹⁴⁻¹⁶ No âmbito deste trabalho, apenas foram consideradas as duas formas anidras da NF, nomeadamente a forma anidra α (NFa- α) e a forma anidra β (NFa- β).

4.2.1. Pares moleculares mais relevantes existentes nas estruturas cristalinas

A estrutura cristalina da NF apresenta redes de ligações de hidrogénio que se prevê tenham um efeito significativo no espectro vibracional correspondente.^{13, 16, 17} A aplicação da metodologia descrita requer cálculos DFT dos pares moleculares que melhor simulam as associações moleculares

encontradas na estrutura do sólido. Para este fim, todos os possíveis pares entre uma molécula central de referência e os seus vizinhos foram considerados. Apenas os pares que produzem desvios relevantes (dos números de onda) são posteriormente descritos, correspondendo normalmente a pares que apresentam contactos por ligações de hidrogénio. De referir que foi recentemente proposta¹⁸⁻²³ uma abordagem sistemática para a identificação dos pares mais relevantes em estruturas cristalinas, realçando a importância de ligações de hidrogénio fortes mas minimizando o papel desempenhado por interações mais fracas, como $C-H\cdots O$, no empacotamento cristalino de compostos orgânicos. No entanto, os resultados deste trabalho indicam que os contactos $C-H\cdots O$ têm um efeito significativo no espectro vibracional que justifica o método aplicado na selecção de pares moleculares.

Na **Figura 4.2** estão representados os contactos mais importantes encontrados na estrutura cristalina dos dois polimorfos de NFa considerados. Cada interacção é descrita por um dos pares moleculares numerados de I-VI (por exemplo, o par molecular I da forma α é descrito por duas moléculas de NF em contacto por intermédio de duas ligações de hidrogénio fracas: $C_{(5)}-H\cdots O_{(4)}$ e $C_{(3)}-H\cdots O_{(3)}$).

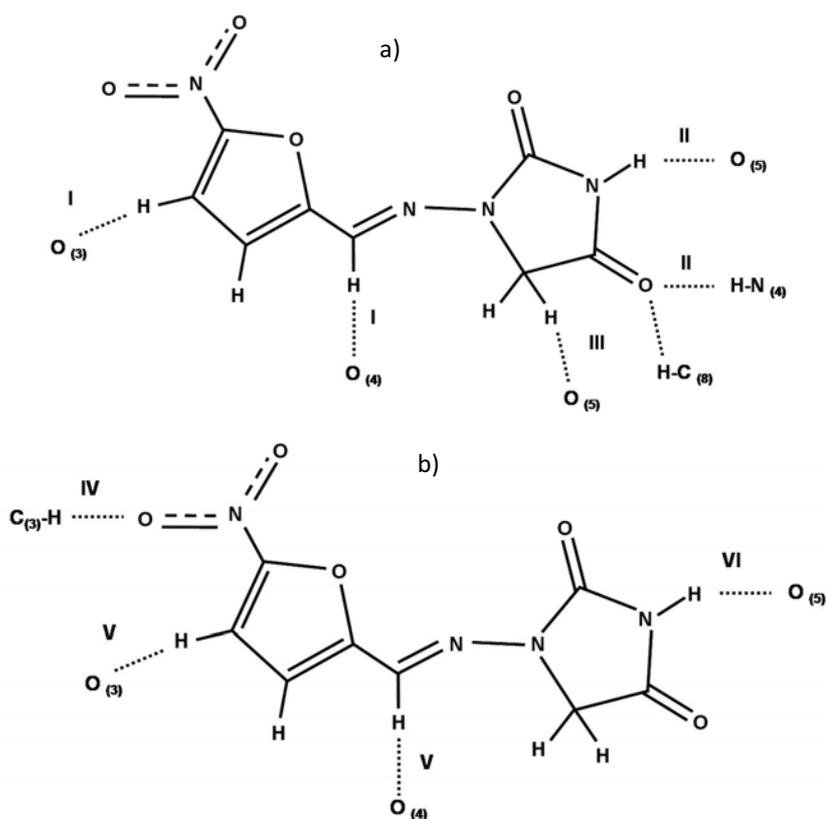
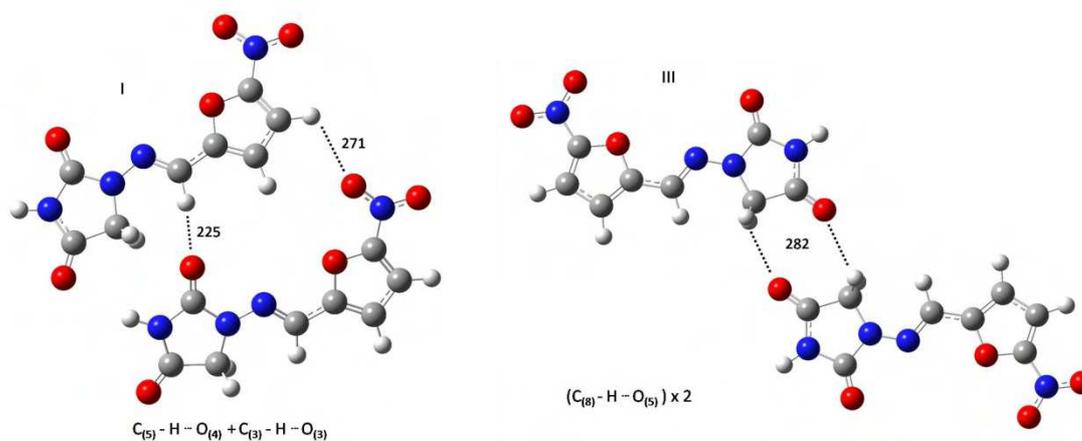


Figura 4.2 – Representação esquemática dos pares moleculares com contactos intermoleculares relevantes observados na estrutura cristalina obtida na CSD: **a)** NFa- α (ref. LABJON01) e **b)** NFa- β (ref. LABJON02).

Nas duas formas polimórficas, as moléculas de NF empacotam em camadas que são mantidas por interações de hidrogénio e formam fitas infinitas através de interações $N_{(4)}-H\cdots O_{(5)}$.¹⁶ Devido à falta de doadores para a ligação de hidrogénio, em comparação com aceptadores, o empacotamento é concluído com duas interações do tipo $C-H\cdots O$, $C_{(5)}-H\cdots O_{(4)}$ e $C_{(3)}-H\cdots O_{(3)}$ que são consideradas ligações de hidrogénio fracas. Embora estas interações $C-H\cdots O$ sejam mais fracas que as $N-H\cdots O$, a sua presença é importante para conferir estabilidade adicional a associações moleculares em sistemas biológicos^{16, 24, 25} tal como no caso da NF. Adicionalmente, um critério para averiguar a importância das interações $C-H\cdots O$ na análise do empacotamento molecular é avaliar se o padrão que envolve as interações $C-H\cdots O$ se repete num número significativo de estruturas. Este critério é satisfeito no caso dos dois polimorfos anidros da NF, bem como nas duas formas hidratadas, permitindo concluir que a ligação de hidrogénio $C-H\cdots O$ desempenha um papel significativo na determinação dos arranjos moleculares observados, afectando o correspondente espectro vibracional. A análise das estruturas cristalinas das duas formas - α e β - bem como os estudos computacionais necessários para descrever os contactos intermoleculares presentes em cada caso, serão discutidos em detalhe nas secções seguintes.

POLIMORFO α

Na forma α , as moléculas de NF estão associadas num arranjo “cabeça com cabeça” formando dímeros centrossimétricos através de duas ligações de hidrogénio intermoleculares $N_{(4)}-H\cdots O_{(5)}$. Cada dímero está ligado aos seus vizinhos por ligações mais fracas $C_{(5)}-H\cdots O_{(4)}$. Na **Figura 4.3** estão representadas as estruturas optimizadas dos diferentes pares moleculares que simulam as interações presentes na estrutura cristalina da forma α . Em todos os casos, a distância calculada é indicada em pm.



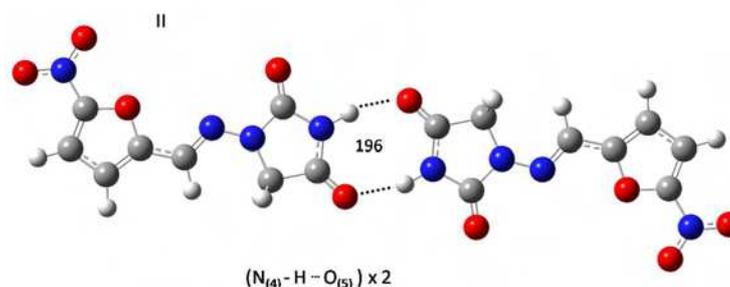


Figura 4.3 – Geometrias optimizadas para os pares moleculares seleccionados de forma a descrever os contactos intermoleculares na estrutura cristalina de NFa- α . As distâncias calculadas O...H estão indicadas em pm.

Os pares moleculares I, II e III representam três associações moleculares que são evidentes da estrutura cristalina de NFa - α (associações moleculares constituídas por C₍₅₎-H...O₍₄₎, C₍₃₎-H...O₍₃₎, N₍₄₎-H...O₍₅₎ e C₍₈₎-H...O₍₅₎). O par molecular II, que apresenta duas interações fortes N₍₄₎-H...O₍₅₎ corresponde ao mínimo de energia. Por outro lado, o par molecular III, composto por ligações mais fracas (C₍₈₎-H...O₍₅₎) corresponde ao dímero menos estável, não diferindo muito do par molecular I que também exhibe interações fracas (C₍₅₎-H...O₍₄₎ e C₍₃₎-H...O₍₃₎). Embora fracas, as ligações de hidrogénio C-H...O são conhecidas por desempenharem um papel relevante no empacotamento cristalino e têm efeitos consideráveis no espectro vibracional de sistemas moleculares, tal como se encontra descrito na literatura.²⁴⁻²⁸

Na **Tabela 4.1** estão representados os valores de número de onda calculados para o monómero e os desvios promovidos pelos contactos descritos nos pares moleculares I a III, ilustrados na **Figura 4.3** (apenas os modos significativamente alterados pelos contactos intermoleculares são apresentados). Tal como esperado, os maiores desvios são observados para o par II, que apresenta dois contactos fortes N-H...O. No entanto, os contactos C-H...O do par I também influenciam significativamente o espectro vibracional. Por outro lado, as contribuições do par III são desprezáveis na maioria das vibrações (exceptuando algumas vibrações envolvendo os osciladores directamente envolvidos na ligação C-H...O).

Tabela 4.1 - Números de onda (cm⁻¹) calculados para o monómero de NF e três associações moleculares construídas com base na estrutura de raios-X de NFa - α . Apenas desvios > 10 cm⁻¹ são representados.

Monómero	Desvios de $\tilde{\nu}$ /cm ⁻¹				Descrição aproximada ^[a]
	NFa - α				
	I	II	III	Σ (I-III)	
51	13	26	-4	35	β C ₍₅₎ -Fur + β N ₍₂₎ -Pyr (em fase)
81	1	9	0	10	Modos torcionais

126	4	8	0	12	Modos torcionais
137	6	18	7	31	β C ₍₅₎ -Fur + β N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
143	7	15	-6	16	δ (Pyr)
299	-1	-2	-7	-10	γ C ₍₅₎ -Fur + γ N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
442	6	5	-1	10	ν N ₍₁₎ -Fur
537	-5	25	-3	17	γ C ₍₇₎ =O ₍₅₎ (Pyr)
587	2	198	3	203	γ N-H (Pyr)
757	11	3	0	14	ν N-C (Pyr)
782	50	1	1	52	γ C-H (Fur; em fase)
860	6	22	-2	26	ν C-C (Pyr)
865	40	1	1	42	γ C-H (Fur; fora de fase)
888	57	0	-2	55	γ C ₍₅₎ -H
989	-2	2	-11	-11	ρ CH ₂ (Pyr)
1084	0	14	-1	13	ν N-C (Pyr)
1175	15	5	-5	15	ω CH ₂ (Pyr)
1216	-11	1	-4	-14	ν_{as} C-O (Fur)
1236	-7	0	-3	-10	ν N ₍₂₎ -Pyr
1284	6	45	2	53	ν N-C (Pyr)
1307	11	71	0	82	β N-H (Pyr)
1330	12	-25	-2	-15	β C ₍₅₎ -H
1454	-3	-1	-12	-16	tesoura CH ₂ (Pyr)
1614	12	0	2	14	ν C ₍₅₎ =N ₍₂₎
1796	-21	-39	-14	-74	ν C=O (Pyr; fora de fase)
1831	-16	0	-3	-19	ν C=O (Pyr; em fase)
2937	2	-2	18	18	ν_s CH ₂ (Pyr)
2978	0	-2	17	15	ν_{as} CH ₂ (Pyr)
3000	62	0	16	78	ν C ₍₅₎ -H
3499	-6	-212	1	-217	ν N-H (Pyr)

[a] ν =elongação; β =deformação no plano; γ =deformação fora do plano; ω =oscilação longitudinal²⁹ (*wagging*); τ =oscilação de binário²⁹ (*twisting*); ρ =oscilação transversal²⁹ (*rocking*); α =deformação no plano do anel; δ =deformação fora do plano do anel; pyr=pirazol, fur=nitrofurano.

POLIMORFO β

Para NFa- β , a interacção principal é uma ligação N₍₄₎-H \cdots O₍₅₎, mas neste caso esta interacção une as moléculas de NF relacionadas com um eixo de rotação de ordem 2. Uma ligação intermolecular C₍₅₎-H \cdots O₍₄₎ entre as moléculas contribui para a coesão da camada. Na **Figura 4.4** estão representados

os pares moleculares que caracterizam a estrutura cristalina da forma β , bem como a distância para cada interação em pm. Os pares moleculares IV, V e VI representam três associações moleculares distintas que são evidentes através da análise da estrutura cristalina de NFa- β (associações moleculares construídas com base em interações $C_{(3)}-H\cdots O_{(2)}$, $C_{(5)}-H\cdots O_{(4)}$, $C_{(3)}-H\cdots O_{(3)}$ e $N_{(4)}-H\cdots O_{(5)}$).

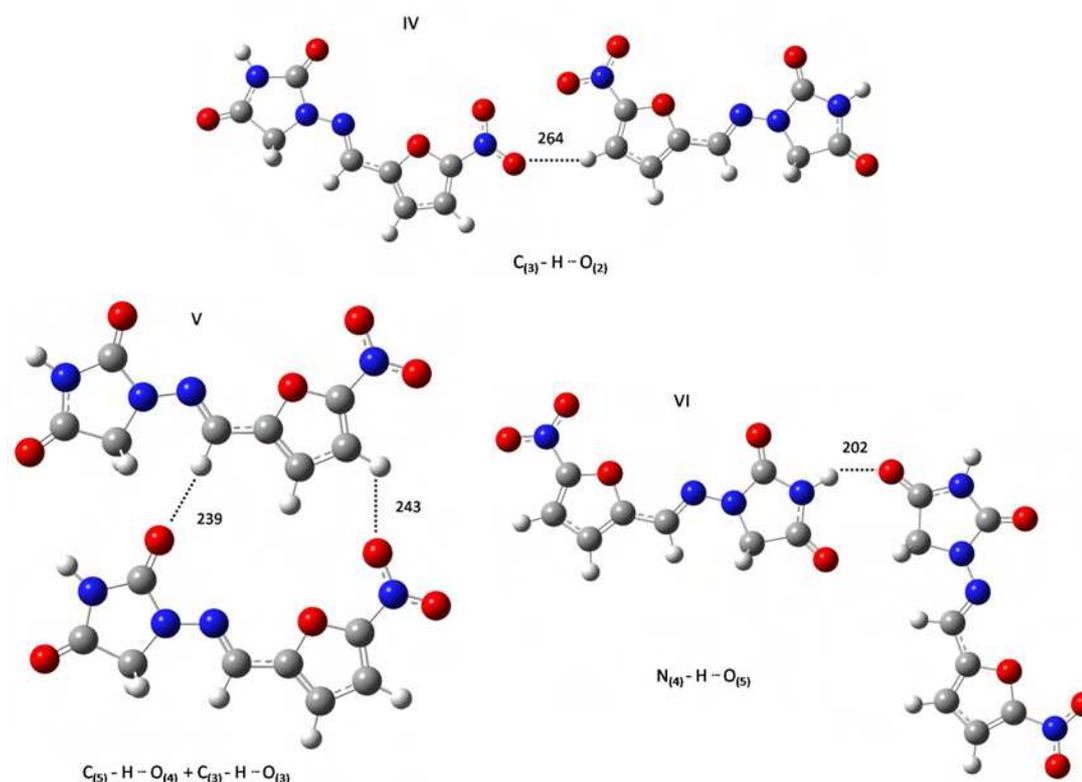


Figura 4.4 – Geometrias otimizadas para os pares moleculares seleccionados de forma a descrever os contactos intermoleculares na estrutura cristalina de NFa- β . As distâncias calculadas $O\cdots H$ estão indicadas em pm.

O par molecular VI, que apresenta uma interação forte $N_{(4)}-H\cdots O_{(5)}$ corresponde ao mínimo de energia. Por outro lado, o par molecular IV, que é constituído por uma interação mais fraca ($C_{(3)}-H\cdots O_{(2)}$) é o dímero menos estável. Na **Tabela 4.2** estão representados os valores de número de onda calculados para o monómero e os desvios promovidos pelos contactos descritos nos pares moleculares IV a VI, ilustrados na **Figura 4.4** (apenas os modos significativamente alterados pelos contactos intermoleculares são incluídos).

Devido ao contacto forte $N-H\cdots O$, o par VI origina os maiores desvios de frequência. Os desvios promovidos pelos dois contactos $C-H\cdots O$ no par V são comparáveis aos desvios observados para os contactos duplos $C-H\cdots O$ do par I (forma α). Novamente, o par com os contactos mais fracos (par IV)

apresenta desvios muito pequenos (com a exceção da vibração fora do plano da correspondente ligação C-H).

Tabela 4.2 - Números de onda (cm^{-1}) calculados para o monómero de NF e três associações moleculares construídas com base na estrutura de raios-X de NFa - β . Apenas desvios $> 10 \text{ cm}^{-1}$ são representados.

Monómero	Desvios de $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$				Descrição aproximada ^[a]
	NFa - β				
	IV	V	VI	Σ (IV-VI)	
51	5	15	41	61	β C ₍₅₎ -Fur + β N ₍₂₎ -Pyr (em fase)
126	2	9	8	19	Modos torcionais
137	3	11	21	35	β C ₍₅₎ -Fur + β N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
143	0	16	24	40	δ (Pyr)
183	0	9	1	10	δ (Pyr)
222	3	6	5	14	β N ₍₁₎ -Fur
399	0	2	11	13	β C=O (Pyr; em fase)
442	0	5	5	10	ν N ₍₁₎ -Fur
537	-5	12	26	33	γ C ₍₇₎ =O ₍₅₎ (Pyr)
587	-3	33	174	204	γ N-H (Pyr)
757	2	11	4	17	ν N-C (Pyr)
782	6	43	1	50	γ C-H (Fur; em fase)
860	1	12	24	37	ν C-C (Pyr)
865	21	47	2	70	γ C-H (Fur; fora de fase)
888	6	51	12	69	γ C ₍₅₎ -H
989	0	-11	-10	-21	ρ CH ₂ (Pyr)
1009	7	7	2	16	β C-H (Fur; fora de fase)
1152	2	24	8	34	τ CH ₂ (Pyr)
1175	2	21	14	37	ω CH ₂ (Pyr)
1284	1	4	28	33	ν N-C (Pyr)
1307	0	19	18	37	β N-H (Pyr)
1330	-1	14	11	24	β C ₍₅₎ -H
1338	-3	7	13	17	ν_s NO ₂
1365	0	12	7	19	ν N-C (Pyr)
1454	0	-20	-24	-44	tesoura CH ₂ (Pyr)
1576	-1	-9	0	-10	ν_{as} NO ₂
1796	-2	-27	-54	-83	ν C=O (Pyr; fora de fase)
1831	-1	-16	-3	-20	ν C=O (Pyr; em fase)
2937	-3	29	22	48	ν_s CH ₂ (Pyr)

2978	-3	30	20	47	$\nu_{as} \text{CH}_2$ (Pyr)
3000	-2	36	5	39	$\nu \text{C}_{(5)}\text{-H}$
3147	-1	11	3	13	$\nu \text{C-H}$ (Fur; fora de fase)
3499	0	-37	-144	-181	$\nu \text{N-H}$ (Pyr)

[a] ν =elongação; β =deformação no plano; γ =deformação fora do plano; ω =oscilação longitudinal²⁹ (*wagging*); τ =oscilação de binário²⁹ (*twisting*); ρ =oscilação transversal²⁹ (*rocking*); α =deformação no plano do anel; δ =deformação fora do plano do anel; pyr=pirazol, fur=nitrofurano.

4.2.2. Atribuição vibracional baseada na aplicação da metodologia PiMM

Nesta secção, a atribuição completa dos espectros de FT-Raman e FT-IR das duas formas polimórficas da NF é apresentada com base nas características estruturais discutidas na secção anterior, nomeadamente o efeito das interacções intermoleculares presentes em cada sistema, através da aplicação da **Equação 4.1**. De referir que, devido ao forte acoplamento dos osciladores, a determinação de uma contribuição dominante para cada modo vibracional não é possível em todas as situações. Em alguns casos, o incontornável carácter híbrido do modo vibracional é indicado na descrição aproximada pela utilização do sinal mais (por exemplo ωCH_2 (Pyr) + $\nu\text{N-C}$ (Pyr)).

A aplicação da **Equação 4.1** ao sistema NF é directa para os modos referidos nas **Tabelas 4.1** e **4.2**, uma vez que os números de onda previstos para cada modo normal são obtidos simplesmente pela soma dos desvios previstos e do valor calculado para o monómero. Por exemplo, considerando o modo δ (Pyr), o número de onda previsto é de $143+16=159 \text{ cm}^{-1}$ e $143+40=183 \text{ cm}^{-1}$ para NF α - α e NF α - β , respectivamente. Este modo é atribuído às bandas observadas a 159 e 188 cm^{-1} nos espectros de Raman das formas α e β , respectivamente. O mesmo procedimento é aplicado aos modos que apresentam desvios mais pequenos que não estão ilustrados nas **Tabelas 4.1** e **4.2**.

As vibrações intermoleculares de um composto farmacêutico podem ser afectadas por alterações na conformação molecular e nas ligações estabelecidas e conseqüentemente, os espectros vibracionais das duas formas polimórficas da NF são diferentes. Na **Figura 4.5** é possível observar uma comparação entre os espectros de Raman das duas formas α (**a**) e β (**b**) nas regiões espectrais compreendidas entre $50\text{-}350$, $500\text{-}650$ e $1125\text{-}1275 \text{ cm}^{-1}$. Estas são as regiões que exibem as diferenças mais pronunciadas entre as duas formas polimórficas, embora estas estejam presentes em toda a gama espectral. Algumas das diferenças entre os dois polimorfos podem ser associadas às distintas redes de ligações de hidrogénio existentes. Por exemplo, o polimorfo α apresenta duas ligações $\text{N-H}\cdots\text{O}$ fortes, representadas pelo par II, enquanto o polimorfo β apresenta apenas uma ligação forte $\text{N-H}\cdots\text{O}$ na sua estrutura (par molecular VI). Embora o tipo de ligações estabelecidas seja

semelhante ($N-H\cdots O$ e $C-H\cdots O$), o número e distribuição espacial destes contactos é diferente nos dois polimorfos, o que explica os desvios de número de onda e de intensidade observados nos espectros experimentais.

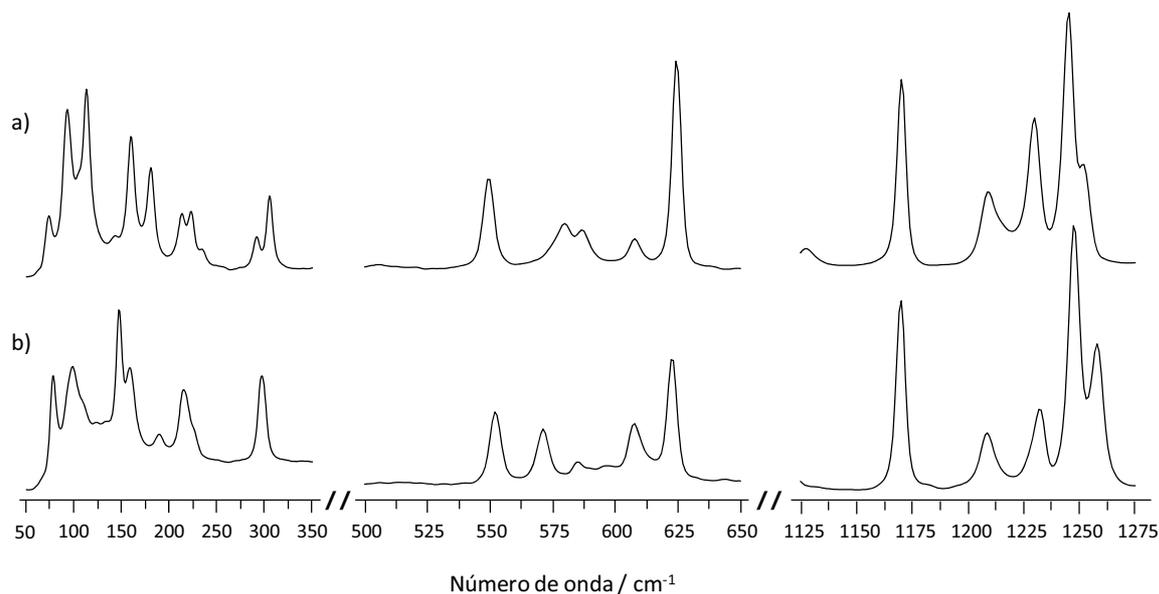


Figura 4.5 – Espectro de Raman de **a)** polimorfo α e **b)** polimorfo β nas regiões $50\text{-}350\text{ cm}^{-1}$, $500\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ e $1125\text{-}1275\text{ cm}^{-1}$.

POLIMORFO α

Na **Figura 4.6** é possível observar a comparação entre os espectros de infravermelho: experimental e obtidos por cálculos DFT, de NF α - α na região $350\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ (para a molécula de NF isolada e para as diferentes contribuições de cada par molecular considerado). As linhas horizontais representam os desvios previstos pelo par correspondente (tal como apresentado na **Tabela 4.1**). Como pode ser observado na **Figura 4.6**, existem diferenças entre o espectro calculado para o monómero (**a**) e para os pares moleculares I (**b**) e II (**c**). Os modos mais sensíveis nesta região são a deformação fora do plano da ligação $N-H$ (γ_{N-H}) – com um desvio previsto de 587 cm^{-1} (monómero isolado) para 777 cm^{-1} (no cristal). Outros modos sensíveis neste intervalo são, tal como indicado na **Tabela 4.1**, $\gamma_{C(7)=O(5)}$, $\nu_{N(1)-F}$ e $\beta_{C=O}$.

Para esta região espectral, os pares moleculares mais relevantes, que prevêm os desvios mais significativos, são os pares I e II. Estes dímeros apresentam interações $C-H\cdots O$ e $N-H\cdots O$, respectivamente, prevendo desta forma desvios para os modos vibracionais contendo osciladores C-H, N-H e C=O (ver **Figura 4.6** e **Tabela 4.1**).

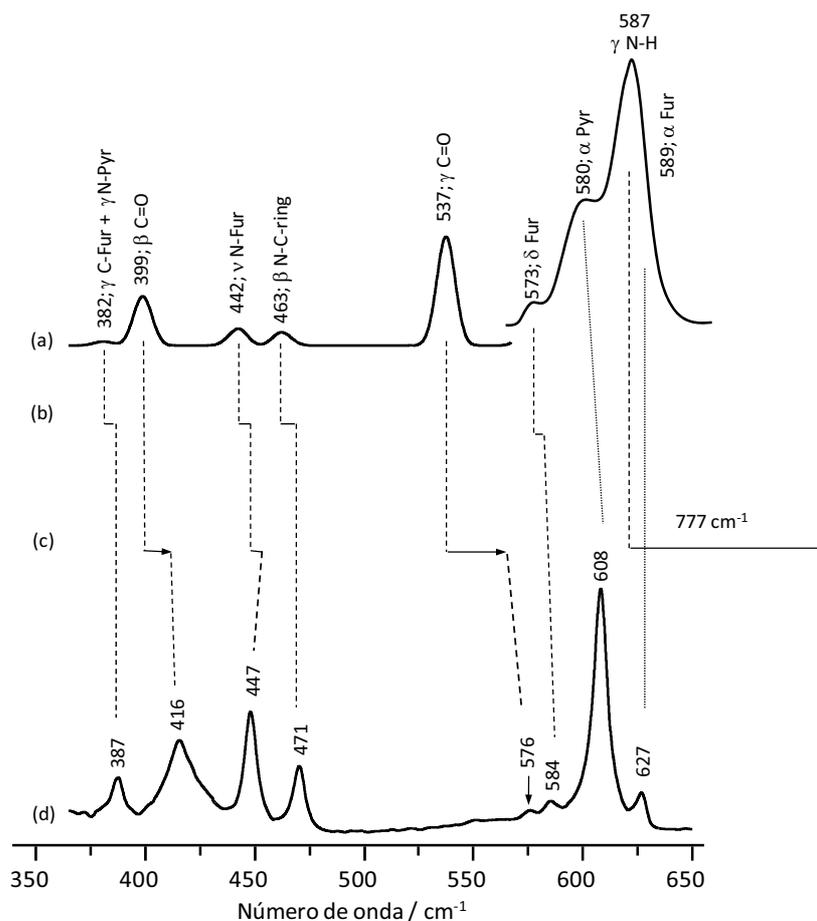


Figura 4.6 – Espectro de FT-IR de NFa- α na região espectral compreendida entre 350-650 cm^{-1} para **a)** monómero calculado, contribuições calculadas para **b)** par I, **c)** par II e **d)** espectro experimental. As linhas horizontais indicam os desvios previstos para cada par molecular e são proporcionais à escala.

Na **Figura 4.7** encontram-se representados os espectros de Raman calculado e experimental na região 1280-1460 cm^{-1} . Nesta região, todos os pares moleculares calculados prevêem desvios pequenos para cada vibração. No entanto, considerando a abordagem PiMM, é possível relacionar a banda 1365 cm^{-1} (monómero) à banda 1384 cm^{-1} (experimental) bem como a banda 1387 cm^{-1} (monómero) à banda 1396 cm^{-1} (experimental). Estas bandas são atribuídas aos modos $\nu\text{N-C}$ (Pyr) e $\nu\text{C-C}$ (Fur), respectivamente. Sem a presença dos desvios (fornecidos pelos cálculos PiMM) esta correlação seria difícil de atingir. O par molecular III envolve ligações $\text{C-H}\cdots\text{O}$ nas quais o aceitador C-H é o grupo CH_2 , e por isso um dos maiores desvios representados na **Figura 4.7** corresponde ao movimento de tesoura do grupo CH_2 , atribuído à banda 1432 cm^{-1} no espectro experimental.

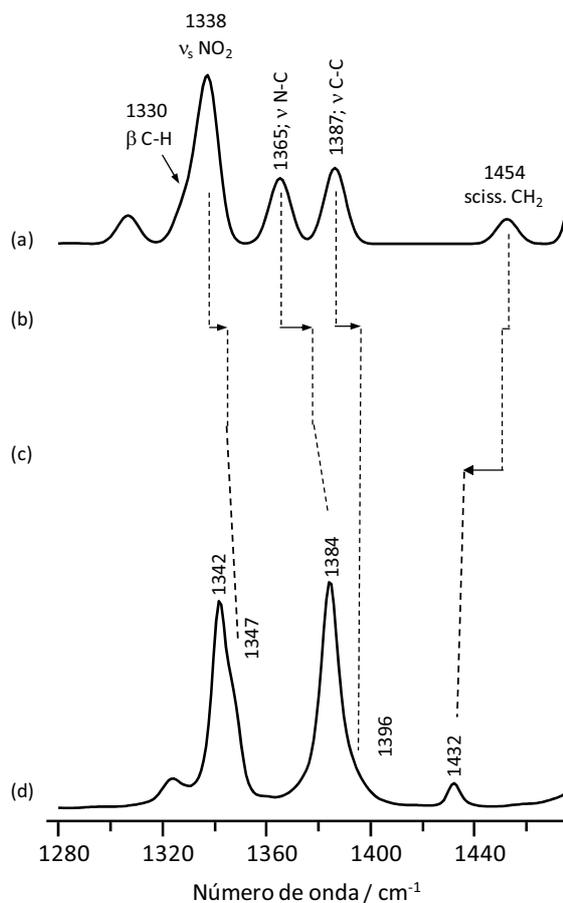


Figura 4.7 – Espectro de FT-Raman de NFa- α na região espectral compreendida entre 1280-1460 cm^{-1} para **a)** monómero calculado, contribuições calculadas para **b)** par I, **c)** par III e **d)** espectro experimental. As linhas horizontais indicam os desvios previstos para cada par molecular e são proporcionais à escala.

Tabela 4.3 – Atribuição completa do espectro de FT-Raman e FT-IR do polimorfo α da NF, aplicando a metodologia com apoio computacional PiMM.

Calc ^[a]	FT-Raman	FTIR	Descrição aproximada ^[b]
35	-	-	Modos torcionais
44	75	-	Modos torcionais
86	113	-	β C ₍₅₎ -Fur + β N ₍₂₎ -Pyr (em fase)
91	93	-	Modos torcionais
138	142	-	Modos torcionais
159	159	-	δ (Pyr)
168	181	-	β C ₍₅₎ -Fur + β N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
191	-	-	δ (Pyr)
202	213	-	γ N ₍₁₎ -Fur

228	223	-	β N ₍₁₎ -Fur
289	292	-	γ C ₍₅₎ -Fur + γ N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
296	305	-	β C=O (Pyr)
386	389	387	γ C ₍₅₎ -Fur + γ N ₍₂₎ -Pyr (em fase)
408	414	416	β C=O (Pyr; em fase)
452	445	447	ν N ₍₁₎ -Fur
467	470	471	β N ₍₂₎ -C ₍₅₎ -Fur + β C ₍₅₎ -N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
533	550	552	ρ NO ₂
554	580	576	γ C ₍₇₎ =O ₍₅₎ (Pyr)
576	587	585	δ (Fur)
583	608	608	α (Pyr)
596	624	627	α (Fur)
663	673	670	δ (Fur)
667	687	687	α (Pyr)
702	741	742	γ C ₍₆₎ =O ₍₄₎ (Pyr)
716	744	745	ω NO ₂
771	789	786	ν N-C (Pyr)
790	809	807	tesoura NO ₂
790	773	777	γ N-H (Pyr)
834	835	834	γ C-H (Fur; em fase)
851	873	873	β N ₍₂₎ -C ₍₅₎ -Fur + β C ₍₅₎ -N ₍₂₎ -Pyr (em fase)
886	901	904	ν C-C (Pyr)
907	907	-	γ C-H (Fur; fora de fase)
943	963	963	γ C ₍₅₎ -H
950	934	934	ν_s C-O (Fur)
969	980	980	α (Fur)
978	-	995	ρ CH ₂ (Pyr)
1018	1016	1016	β C-H (Fur; fora de fase)
1097	1128	1130	ν N-C (Pyr)
1150	-	-	τ CH ₂ (Pyr)
1160	1170	1168	β C-H (Fur; em fase)
1190 ^a	1208	1204	ω CH ₂ (Pyr) + ν N-C (Pyr)
1203 ^a	1208	1204	ν_{as} C-O (Fur)
1226	1230	1231	ν N ₍₂₎ -Pyr
1265 ^b	1246/1252	1243/1252	ν C ₍₅₎ -Fur
1315	1342	1342	β C ₍₅₎ -H
1337	1358	-	ω CH ₂ (Pyr) + ν C-C (Pyr) + ν N-C (Pyr)

1343	1347	1347	ν_s NO ₂
1374	1384	1375	ν N-C (Pyr)
1389	1325	1322	β N-H (Pyr)
1395	1396	1394/1410	ν C-C (Fur)
1438	1432	1431	tesoura CH ₂ (Pyr)
1479	1494	1491	ν C=C (Fur; em fase)
1545	1532	1522	ν C=C (Fur; fora de fase)
1574	1563	1564	ν_{as} NO ₂
1628 ²	1604/1611	1603/1612	ν C ₍₅₎ =N ₍₂₎
1722	1724	1725	ν C=O (Pyr; fora de fase)
1812	1777	1782	ν C=O (Pyr; em fase)
2955	2919	2915	ν_s CH ₂ (Pyr)
2993	2953	2951	ν_{as} CH ₂ (Pyr)
3078	3030	3030	ν C ₍₅₎ -H
3146	3110	3108	ν C-H (Fur; fora de fase)
3186	3140	3139	ν C-H (Fur; em fase)
3282	3170 ^c	3170	ν N-H (Pyr)

[a] Valores calculados aplicando a Equação 4.1 (monómero + desvios previstos) [b] ν =elongação; β =deformação no plano; γ =deformação fora do plano; α =deformação no plano do anel; δ =deformação fora do plano do anel; ω =oscilação longitudinal²⁹ (*wagging*); τ =oscilação de binário²⁹ (*twisting*); ρ =oscilação transversal²⁹ (*rocking*); pyr=pirazol, fur=nitrofurano. ^a bandas sobrepostas no espectro experimental ^b desdobradas por ressonância de Fermi ^c banda oculta por sobreposição.

A atribuição completa dos espectros de FT-Raman e FT-IR da forma α , resultante de toda a informação recolhida das considerações anteriores, é apresentada na **Tabela 4.3**. Tal como esperado, o número de bandas experimentais excede o número de modos fundamentais, devido à presença de sobretons e modos de combinação. Em cada região, os modos fundamentais (**Tabela 4.3**) foram atribuídos às bandas mais intensas mais próximas do número de onda previsto pela metodologia PiMM.

POLIMORFO β

Na **Figura 4.8** estão ilustrados os espectros de infravermelho calculados (para a molécula de NF isolada e para os diferentes pares moleculares considerados) na região 625-850 cm⁻¹ de NF α - β .

Todas as vibrações assinaladas na **Figura 4.8** não são significativamente afectadas pelo par molecular IV (devido às interacções fracas C-H...O envolvidas neste dímero) mas são claramente

afectadas pelos pares V e VI. Todas as previsões feitas pela metodologia PiMM representadas na **Figura 4.8**, estão de acordo com as atribuições experimentais propostas (sendo o erro inferior a 6 cm^{-1} entre o número de onda previsto pelo PiMM e o valor experimental atribuído).

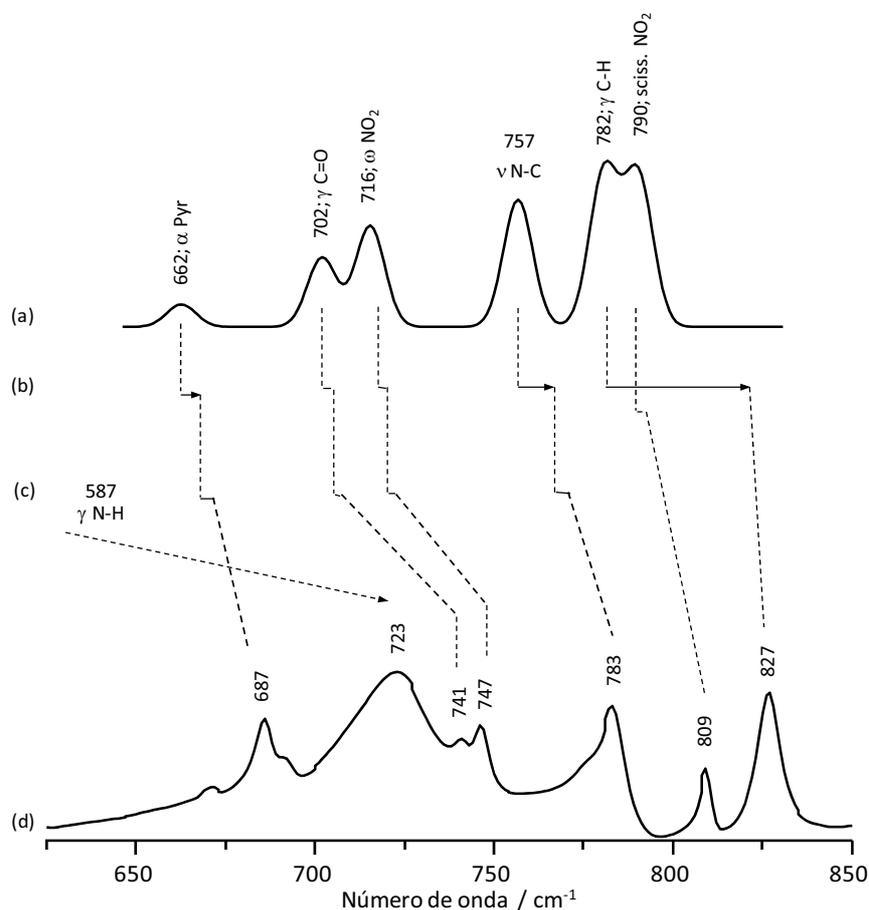


Figura 4.8 – Espectro de FT-IR de NFA- β na região espectral compreendida entre $625\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ para **a)** monómero calculado, contribuições calculadas para **b)** par V, **c)** VI e **d)** espectro experimental. As linhas horizontais indicam os desvios previstos para cada par molecular e são proporcionais à escala.

O modo vibracional $\nu\text{N-H}$ é significativamente afectado pelo par VI, que apresenta uma ligação forte $\text{N-H}\cdots\text{O}$, afectando desta forma todos os osciladores envolvidos neste contacto.

Embora a metodologia PiMM forneça uma previsão correcta da localização deste modo no espectro experimental, o número de onda previsto está 68 cm^{-1} acima do valor atribuído no espectro experimental. A discrepância entre estes dois valores revela uma das limitações da abordagem PiMM. Adicionalmente, pode ser observado que os modos mais sensíveis estão relacionados com os grupos doadores e aceptadores de cada ligação de hidrogénio intermolecular estabelecida em cada polimorfo. A importância das interacções intermoleculares é revelada na posição relativa dos modos $\gamma\text{C-H}$ e no movimento de tesoura do grupo NO_2 : tal como observado na **Figura 4.8**, a ordem prevista para o

monómero (γ C-H a menores valores de número de onda) não é compatível com o espectro experimental. Na **Figura 4.9** estão representados os espectros de Raman calculados e experimental na região 1300-1525 cm^{-1} . Tal como é evidente, a abordagem PiMM revela-se mais útil na atribuição do modo 1378 cm^{-1} no espectro experimental, principalmente devido à intensidade relativa das bandas observadas.

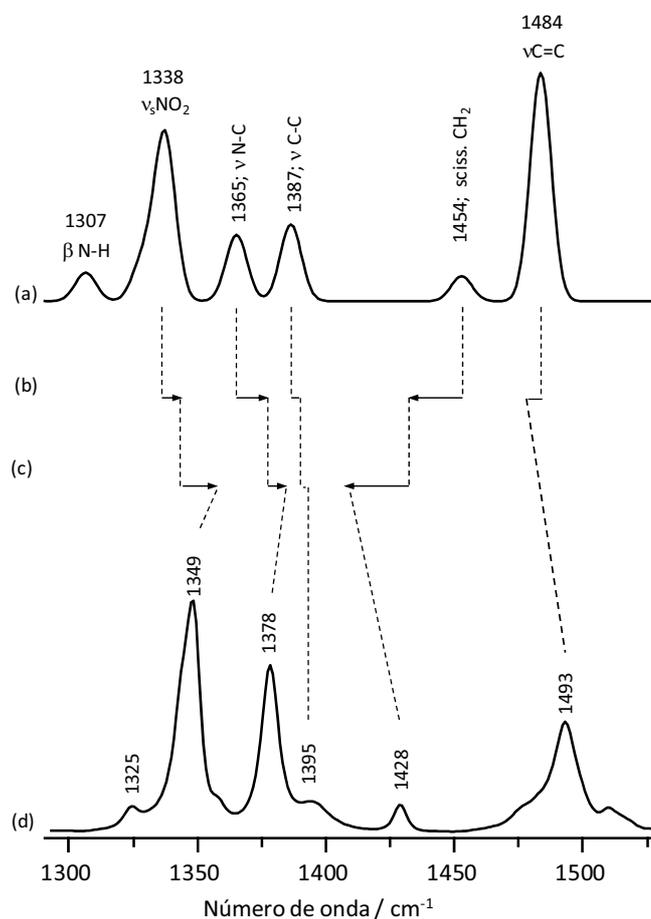


Figura 4.9 – Espectro de FT-Raman de Nfa- β na região espectral compreendida entre 1280-1460 cm^{-1} para **a)** monómero calculado, contribuições calculadas para **b)** par V, **c)** par VI e **d)** espectro experimental. As linhas horizontais indicam os desvios previstos para cada par molecular e são proporcionais à escala.

A atribuição completa dos espectros experimentais de FT-Raman e FT-IR da forma β é apresentada na **Tabela 4.4**. Tal como esperado e comentado para o caso da forma α , os espectros experimentais revelam a presença de bandas adicionais que não são atribuídas a modos fundamentais (não incluídas na **Tabela 4.4**) e por isso devem resultar de sobretons e ressonâncias de Fermi.

Tabela 4.4 – Atribuição completa do espectro de FT-Raman e FT-IR do polimorfo β da NF, aplicando a metodologia com apoio computacional PiMM.

Calc ^[a]	FT-Raman	FTIR	Descrição aproximada ^[b]
46	-	-	Modos torcionais
48	77	-	Modos torcionais
86	98	-	Modos torcionais
112	109	-	β C ₍₅₎ -Fur + β N ₍₂₎ -Pyr (em fase)
145	147	-	Modos torcionais
172	159	-	β C ₍₅₎ -Fur + β N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
183	188	-	δ (Pyr)
193	-	-	δ (Pyr)
203	215	-	γ N ₍₁₎ -Fur
236	226	-	β N(1)-Fur
299	298	-	β C=O (Pyr)
304	-	-	γ C ₍₅₎ -Fur + γ N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
386	387	390	γ C ₍₅₎ -Fur + γ N ₍₂₎ -Pyr (em fase)
412	404	406	β C=O (Pyr; em fase)
452	446	445	ν N ₍₁₎ -Fur
469	468	467	β N ₍₂₎ -C ₍₅₎ -Fur + β C ₍₅₎ -N ₍₂₎ -Pyr (fora de fase)
537	552	552	ρ NO ₂
570	571	571	γ C ₍₇₎ =O ₍₅₎ (Pyr)
577	585	584	δ (Fur)
587	608	608	α (Pyr)
598	622	622	α (Fur)
665	672	671	δ (Fur)
672	686	687	α (Pyr)
704	742	741	γ C ₍₆₎ =O ₍₄₎ (Pyr)
719	746	747	ω NO ₂
774	784	783	ν N-C (Pyr)
789	810	809	tesoura NO ₂
791	711	723	γ N-H (Pyr)
832	830	827	γ C-H (Fur; em fase)
855	869	871	β N ₍₂₎ -C ₍₅₎ -Fur + β C ₍₅₎ -N ₍₂₎ -Pyr (em fase)
897	902	901	ν C-C (Pyr)
935	908	906	γ C-H (Fur; fora de fase)
948	931	929	ν_s C-O (Fur)
957	964	963	γ C ₍₅₎ -H
968	-	987	ρ CH ₂ (Pyr)

969	978	977	α (Fur)
1025	1018	1018	β C-H (Fur; fora de fase)
1088	1122	1111	ν N-C (Pyr)
1165	1170	1169	β C-H (Fur; em fase)
1186	1182	-	τ CH ₂ (Pyr)
1211 ^a	1208	1209	ν_{as} C-O (Fur)
1212 ^a	1208	1209	ω CH ₂ (Pyr) + ν N-C (Pyr)
1228	1232	1234	ν N ₍₂₎ -Pyr
1266 ^b	1247/1258	1245/1255	ν C ₍₅₎ -Fur
1317	1358	-	ω CH ₂ (Pyr) + ν C-C (Pyr) + ν N-C (Pyr)
1344	1325	1323	β N-H (Pyr)
1354	1343	1346	β C ₍₅₎ -H
1355	1349	1343	ν_s NO ₂
1384	1378	1381	ν N-C (Pyr)
1391	1395	1402	ν C-C (Fur)
1410	1428	1429	tesoura CH ₂ (Pyr)
1477	1493	1490	ν C=C (Fur; em fase)
1541	1528	1520	ν C=C (Fur; fora de fase)
1566	1564	1564	ν_{as} NO ₂
1618 ^b	1601/1609	1601/1609	ν C ₍₅₎ =N ₍₂₎
1713	-	1729	ν C=O (Pyr; fora de fase)
1811	1774	1781	ν C=O (Pyr; em fase)
2985	2918	2916	ν_s CH ₂ (Pyr)
3025	2950	2950	ν_{as} CH ₂ (Pyr)
3039	3015	3015	ν C ₍₅₎ -H
3160	3112	3110	ν C-H (Fur; fora de fase)
3186	3150	3150	ν C-H (Fur; em fase)
3318	3284	3286	ν N-H (Pyr)

[a] Valores calculados aplicando a Equação 4.1 (monómero + desvios previstos) [b] ν =elongação; β =deformação no plano; γ =deformação fora do plano; α =deformação no plano do anel; δ =deformação fora do plano do anel; ω =oscilação longitudinal²⁹ (*wagging*); τ =oscilação de binário²⁹ (*twisting*); ρ =oscilação transversal²⁹ (*rocking*). ^a bandas sobrepostas no espectro experimental ^b desdobradas por ressonância de Fermi.

4.2.3. Estatística da aplicação da metodologia PiMM em sólidos farmacêuticos

De forma a efectuar uma análise crítica do trabalho realizado, procedeu-se ao estudo estatístico relativo à aplicação da metodologia com apoio computacional PiMM ao estudo do espectro vibracional da Nitrofurantoína (NFa- α e NFa- β), Teobromina (anidra TBa),¹ Teofilina (anidra TPa, hidratada TPh)¹ e

Cafeína (anidra CAa, hidratada CAh)¹. No caso da NF, para um total de 63 modos vibracionais, a metodologia aplicada revela bons resultados na previsão da tendência geral de cada modo relativamente ao número de onda calculado para o monómero. Os resultados obtidos para as formas α e β são muito semelhantes, com resultados positivos para cerca de 80% do número total de vibrações. Considerando o total de previsões correctas, esta abordagem apresenta um erro inferior a 10 cm^{-1} para 40% dos modos normais. No entanto, se considerarmos um intervalo de erro mais alargado, o método PiMM acerta em cerca de 50% dos casos com um erro inferior a 15 cm^{-1} .

Tabela 4.5 – Análise estatística dos resultados obtidos neste trabalho e em trabalhos anteriores relativa à aplicação da metodologia PiMM na atribuição completa de espectros vibracionais de compostos farmacêuticos que exibem polimorfismo e pseudopolimorfismo.

	NFa – α	NFa – β	TBa	CAa	CAh	TPa	TPh
Previsão correcta ✓	79%	82%	67%	54%	61%	76%	71%
Previsão errada ✗	16%	13%	31%	46%	39%	24%	25%
Não obs. Exp.	5%	5%	2%	0%	0%	0%	4%
$ \Delta ^1 \leq 10\text{ cm}^{-1}$	35%	43%	31%	41%	37%	40%	31%
$ \Delta ^1 \leq 15\text{ cm}^{-1}$	49%	54%	51%	61%	50%	49%	42%
$ \Delta ^1 \geq 30\text{ cm}^{-1}$	17%	16%	9%	4%	7%	18%	22%

¹ $|\Delta| = |v_{\text{PiMM}} - v_{\text{experimental Raman}}|$ (previsão correcta: por exemplo se o número de onda calculado para o monómero é 860 cm^{-1} , a previsão PiMM é de 897 cm^{-1} e a banda experimental associada é 902 cm^{-1})

De uma forma geral, é possível concluir que esta metodologia ajuda a uma correcta atribuição dos modos vibracionais, fornecendo bons resultados no que diz respeito à previsão da tendência para maiores ou menores valores de números de onda relativamente aos espectros calculados para a molécula isolada. Quanto ao valor exacto do número de onda de cada vibração, também fornece resultados razoáveis, tendo em consideração o custo computacional envolvido. Esta abordagem falha em cerca de 16% do total de vibrações. Adicionalmente, mesmo para algumas previsões correctas relativamente à tendência de variação, o valor experimental encontra-se deslocado para maiores ou menores valores de número de onda mais de 30 cm^{-1} em 16% do número total de vibrações. Analisando comparativamente os dados obtidos para os quatro sistemas investigados até ao momento pela metodologia PiMM (NF, TB, TP e CA), os resultados apresentados neste trabalho são bastante satisfatórios, com valores estatísticos ligeiramente superiores aos outros sistemas.

4.2.4. Discussão

Este estudo envolveu a aplicação da metodologia PiMM (Pares em Materiais Moleculares) à atribuição completa do espectro vibracional das duas formas anidras da NF, baseada na avaliação teórica dos desvios vibracionais resultantes dos contactos intermoleculares presentes na estrutura cristalina. A metodologia aplicada neste trabalho é simples, pouco exigente do ponto de vista computacional e produz bons resultados, uma vez que pode ser particularmente útil na detecção e caracterização estrutural de transformações sólido-sólido que afectam significativamente a actividade de um composto farmacêutico.

Os principais erros associados a esta abordagem provêm de negligenciar interacções de longo alcance e efeitos de cooperatividade. Estes erros são claramente superiores aos erros que resultam das limitações da base utilizada. No entanto, o número de inconsistências ou previsões erradas (discutidas ao longo da apresentação de resultados e mostradas nas **Tabelas 4.3 e 4.4**) é bastante pequeno, considerando a simplicidade do método e a complexidade dos sistemas.

Uma investigação sistemática das interacções intermoleculares que ocorrem nos polimorfos anidros da NF, bem como uma atribuição correcta e consistente dos seus espectros vibracionais foi efectuada. Este estudo mostra de forma clara a aplicação da espectroscopia vibracional associada a cálculos DFT, para o estudo de compostos relevantes do ponto de vista farmacêutico. Uma vez que o movimento vibracional é potencialmente diferente dependendo do empacotamento cristalino e conformacional, a presença de ligações de hidrogénio distintas nas duas formas da NF afecta directamente os números de onda vibracionais, as intensidades e formas de algumas bandas características.

Foi ainda evidenciado, tal como esperado, que os modos mais sensíveis ao polimorfismo estão relacionados com os grupos doadores e aceptadores envolvidos em cada ligação de hidrogénio intermolecular. De facto, considerando os resultados globais, os modos vibracionais relacionados com os grupos *C=O*, *N-H* e *C-H*, nomeadamente $\nu_{C=O}$, ν_{N-H} , ν_{C-H} , β_{C-H} , β_{N-H} , γ_{N-H} e γ_{C-H} são os mais fortemente afectados pela presença de ligações de hidrogénio.

4.3. Diagramas de fase sólido-líquido de misturas binárias de ácidos gordos

Na primeira parte deste Capítulo foi apresentada e descrita a metodologia PiMM, utilizada na atribuição completa de espectros vibracionais de compostos farmacêuticos. Nesta segunda parte, pretende-se ilustrar a aplicação parcial da mesma metodologia a um caso de estudo diferente: construção de diagramas de fases de misturas binárias de ácidos gordos saturados. Neste contexto, a espectroscopia de Raman e os cálculos DFT (de acordo com a abordagem PiMM) foram aplicados, como métodos complementares das técnicas de DSC, difracção de raios-X e microscopia de luz polarizada, na construção de diagramas de fases completos de misturas binárias de ácidos gordos saturados com uma diferença de 2 e 4 átomos de carbono entre as cadeias. Deste modo, foram monitorizados modos vibracionais sensíveis de forma a identificar fases sólidas e líquidas em misturas com composições químicas distintas e a diferentes valores de temperatura.

DIAGRAMA DE FASES

Um diagrama de fases pode ser definido como um tipo de gráfico que mostra as condições de equilíbrio entre fases termodinamicamente distintas. Pode ser entendido como um “mapa” que fornece a microestrutura de uma determinada mistura a qualquer valor de temperatura e composição. Os componentes comuns de um diagrama de fases são as linhas de equilíbrio e as fronteiras de fase, que se referem a linhas que delimitam condições nas quais múltiplas fases podem coexistir em equilíbrio. As transições de fase ocorrem ao longo das linhas de equilíbrio. A linha *solidus* representa a temperatura abaixo da qual a substância é estável no estado sólido e a linha *liquidus* representa a temperatura acima da qual a substância é estável no estado líquido.

Outros conceitos a ter em consideração na análise de um diagrama de fases incluem os termos **eutético** e **peritético**. Uma mistura eutética é uma mistura com proporções tais que o ponto de fusão é o mais baixo possível, e todos os constituintes cristalizam simultaneamente a esta temperatura. Esta cristalização simultânea é conhecida como reacção eutética, a temperatura à qual se observa é a temperatura eutética e a composição e temperatura à qual ocorre designa-se por ponto eutético. As transformações peritéticas são semelhantes às reacções eutéticas mas muito mais lentas. Neste caso, uma fase sólida e uma líquida de proporções fixas reagem a uma temperatura definida de forma a obter uma fase sólida única.

ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

A espectroscopia vibracional tem sido utilizada para investigar as estruturas químicas, o comportamento de fase e a organização de lípidos.³⁰ Os lípidos podem existir em numerosas formas polimórficas e as interconversões entre essas fases (transições de fase) podem ser induzidas por diversos meios. A detecção e caracterização de transições de fase em lípidos por espectroscopia de IV e Raman envolve a identificação das alterações espectroscópicas que acompanham estas transições e a sua correlação com as alterações estruturais que ocorrem durante esses processos.

As transições de fase no decorrer da fusão de cadeias carbonadas de lípidos aumentam a mobilidade conformacional, rotacional e translacional³⁰ o que provoca um alargamento das bandas activas em IV e Raman e um decréscimo de intensidade. Tendo em conta que as propriedades das bandas IV e Raman que provêm das vibrações fundamentais de grupos CH₂ são determinadas em última análise pelo conteúdo *trans/gauche* da cadeia carbonada, estas bandas são sensíveis às transições de fase no decorrer da fusão. Estes parâmetros estruturais são altamente específicos e podem ser utilizados para obter informação estrutural acerca de transições de fase na fusão de lípidos. A desordem conformacional de cadeias polimetiladas *trans* é acompanhada por um aumento no número de onda das vibrações $\nu_s\text{CH}_2$ e $\nu_{as}\text{CH}_2$ de cerca de 2-3 cm⁻¹ e 5-7 cm⁻¹, respectivamente e por um alargamento significativo do perfil geral da banda.³⁰ A alteração mais interessante é observada na intensidade da banda $\nu_{as}\text{CH}_2$, situada aproximadamente a 2885 cm⁻¹, muito útil para a monitorização por espectroscopia de Raman. As alterações na intensidade desta banda de Raman são razoavelmente precisas e têm sido utilizadas na caracterização quantitativa de transições de fase na fusão de lípidos.³⁰

4.3.1. Sistemas em estudo

Os ácidos gordos são os componentes maioritários de óleos e gorduras³¹ e possuem aplicações na produção de revestimentos, plásticos e produtos de limpeza,³² materiais para armazenamento de energia^{33, 34} e biodiesel.^{35, 36} Tendo em conta as aplicações dos ácidos gordos na indústria química, farmacêutica e alimentar,^{37, 38} o conhecimento das suas propriedades e comportamento de fase pode induzir inovações em muitas áreas, especialmente na indústria alimentar, devido à influência do comportamento de fase das misturas de ácidos gordos nas características dos produtos levados ao consumidor.

O polimorfismo de triglicéridos e ácidos gordos é conhecido desde há muito tempo, mas o estudo das formas cristalinas dos ácidos gordos puros iniciou-se em 1950 e até aos dias de hoje permanece um desafio.³⁹⁻⁴⁵ Os trabalhos nesta área têm focado o estudo das propriedades e

comportamento de gorduras e glicéridos em fase sólida⁴⁶⁻⁵⁰ e os diagramas de fases das gorduras⁴⁸⁻⁵² e ácidos gordos.⁵³⁻⁵⁶

A existência de pontos invariáveis, tais como pontos eutéticos e peritéticos, em misturas de ácidos gordos saturados já se encontra descrita na literatura.^{51, 52} No entanto, em trabalhos recentes,^{56, 57} a presença destes pontos invariáveis foi também observada em misturas para as quais a diferença de átomos de carbono entre as cadeias é inferior a 6. Durante muito tempo considerou-se que os diagramas de fases para misturas binárias de ácidos gordos eram eutéticos para sistemas com comprimentos de cadeia a diferir em 6 ou mais átomos de carbono, enquanto para os outros sistemas a presença de um composto intermediário, instável no ponto de fusão, originava um ponto peritético.^{52, 58} Resultados recentes relativos a diagramas de fases de sistemas binários de ácidos dicarboxílicos mostraram a complexidade destes sistemas abaixo da linha *liquidus*.^{59, 60} Os diagramas de fase revelaram a presença de pontos eutéticos, peritéticos e metatéticos bem como regiões monofásicas, bifásicas líquido-líquido e sólido-líquido. A complexidade dos digramas de fases dos ácidos dicarboxílicos sugeriu que os diagramas de fases dos ácidos gordos devem também ser complexos.

No âmbito deste trabalho, foram analisados os seguintes ácidos gordos: caprílico (C_{8:0}), cáprico (C_{10:0}), láurico (C_{12:0}, **Figura 4.10**), mirístico (C_{14:0}), palmítico (C_{16:0}) e esteárico (C_{18:0}). Foram registados a diferentes temperaturas, espectros de Raman das várias misturas binárias com composições variadas dos ácidos supra mencionados associados da seguinte forma:

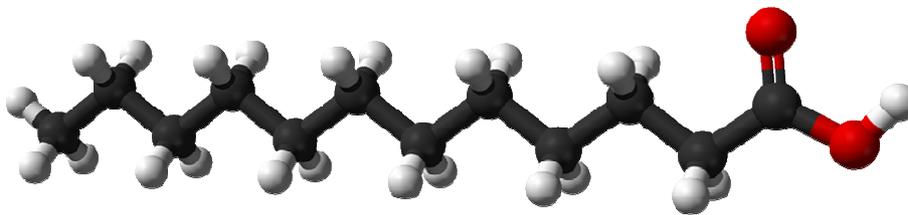
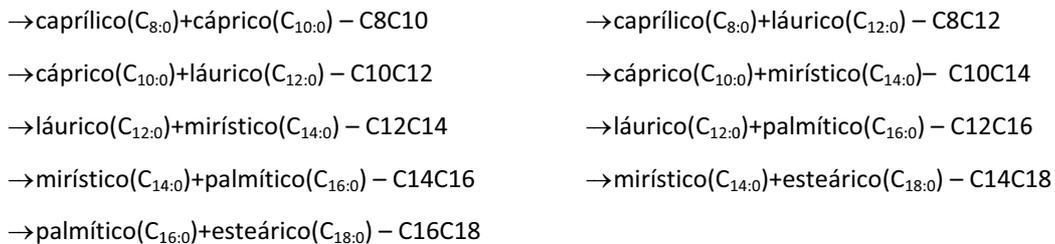


Figura 4.10 – Representação esquemática do ácido láurico (C₁₂H₂₄O₂) – C_{12:0}.

Na secção de resultados e discussão, apenas serão apresentados os dados relativos aos sistemas C12C14 e C14C18, uma vez que o procedimento aplicado e a interpretação efectuada são semelhantes para as restantes misturas. Os dados analisados para as amostras referidas, permitiram a construção de diagramas de fases completos para todas as misturas de ácidos gordos, que poderão ser consultados na literatura.^{61, 62}

4.3.2. Resultados e discussão

Detalhes relativos à execução experimental e métodos computacionais aplicados neste estudo encontram-se descritos nas Secções 9.6, 9.11.1 e 9.14 do **Capítulo 9**. Os valores escolhidos para a temperatura e composição de misturas de cada espectro tiveram como base pontos específicos do diagrama de fases que se pretendia investigar ou confirmar quanto à presença das fases sólida e líquida.

De forma a permitir uma interpretação correcta dos espectros de Raman, a atribuição das bandas relacionadas com os ácidos gordos puros foi baseada em cálculos DFT para os monómeros e dímeros, de acordo com a metodologia PIMM descrita anteriormente neste Capítulo. Os espectros de Raman dos ácidos gordos puros são maioritariamente descritos pelo espectro calculado para o respectivo monómero (**Figura 4.12c**). Excepções relevantes são as bandas relativas ao grupo carboxilo (que podem ser qualitativamente descritas pelo espectro do dímero – estrutura otimizada representada na **Figura 4.11**) e as bandas resultantes de ressonância de Fermi. As atribuições finais estão de acordo com atribuições empíricas anteriores.⁶³ Na **Tabela 4.6** encontram-se sumariadas as bandas mais relevantes para este estudo, que foram monitorizadas quanto à composição de fase líquida e sólida, e a correspondente atribuição vibracional proposta com base nos cálculos anteriormente referidos.

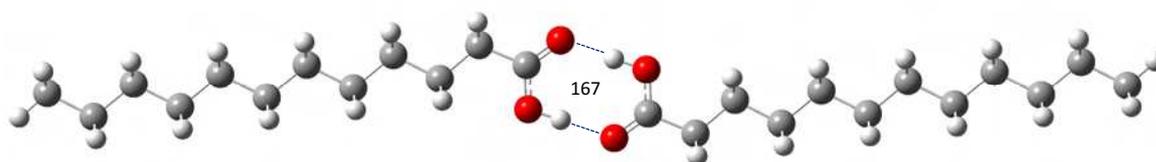


Figura 4.11 – Geometria otimizada para o par molecular seleccionado de forma a descrever os contactos intermoleculares na estrutura cristalina do ácido láurico. As distâncias calculadas $O\cdots H$ estão indicadas em pm.

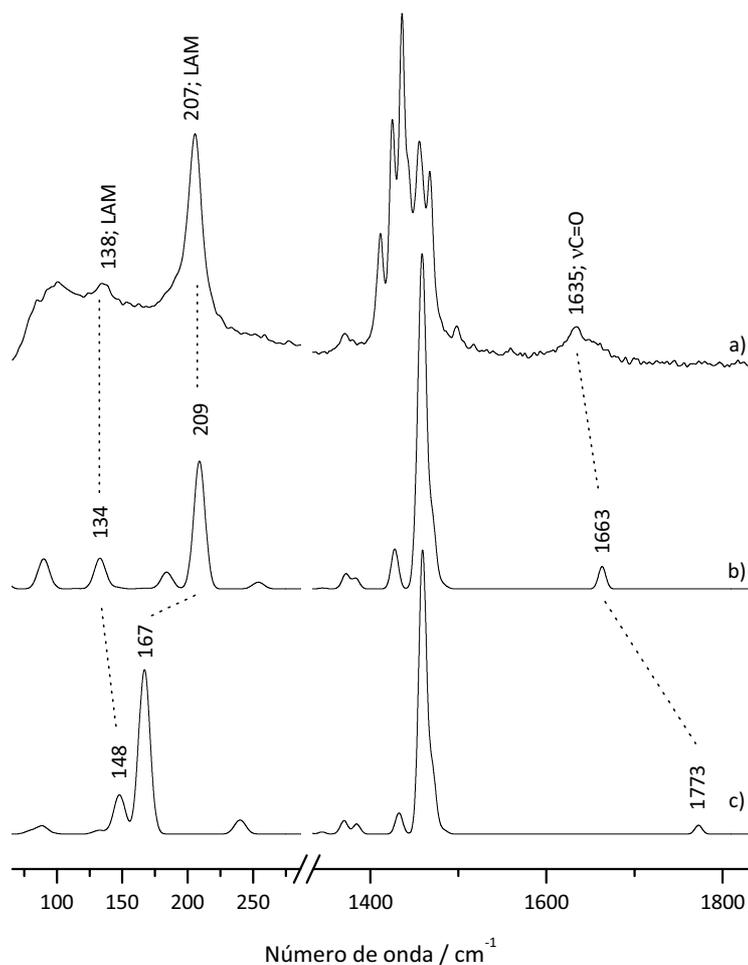


Figura 4.12 – Espectro de Raman a) experimental, calculado ao nível B3LYP/6-31G* para o b) dímero (representado na **Figura 4.11**) e para o c) monômero.

Tabela 4.6 – Atribuições vibracionais propostas para as bandas mais relevantes no âmbito deste estudo, presentes no espectro de Raman do ácido láurico.

FT-Raman / cm^{-1}	Descrição aproximada
138	LAM (harmónico CCC)
207	LAM (harmónico CCC)
1411	β CH ₂
1425	β CH ₂
1455	β CH ₃
1467	β CH ₃
2845	ν_s CH ₂
2882	ν_{as} CH ₂

LAM – *longitudinal acoustic mode*; ν_s =elongação simétrica; ν_{as} =elongação assimétrica

Os espectros vibracionais destas amostras mostram diferentes modos vibracionais para as diferentes formas cristalinas^{46, 63, 64} e, embora as alterações na composição e temperatura das amostras possam ser observadas em todo o espectro, este estudo incidiu em três regiões espectrais: 50-300, 1350-1520 e 2800-3050 cm^{-1} , como se mostra na **Figura 4.13** para o sistema C12C14 e na **Figura 4.14** para o sistema C14C18.

Os espectros de Raman fornecem informações quanto ao arranjo conformacional das moléculas em ambas as formas líquida e sólida, especialmente no que diz respeito ao espectro da forma cristalina, na qual a primeira região (**Figura 4.13a e 4.14a**) é dominada por duas bandas fortes atribuídas ao modo vibracional LAM-3 (modo acústico longitudinal – deformação angular CCC). Esta banda não foi observada nas amostras fundidas, e por essa razão constitui uma sonda na monitorização da transição de fase sólido-líquido.

A região 1350-1520 cm^{-1} , **Figura 4.13b e 4.14b**, é atribuída a modos de deformação no plano de grupos CH_2 e CH_3 . Esta região mostrou-se sensível a variações de temperatura e transições de fase. Em particular, ambos os componentes *ca.* 1460 cm^{-1} – atribuído a uma deformação no plano de um grupo CH_3 – e *ca.* 1410 e 1425 cm^{-1} – atribuídos a deformações no plano do CH_2 – perdem intensidade à medida que a temperatura aumenta. No espectro da fase líquida, estas bandas foram observadas apenas como ombros da banda central.

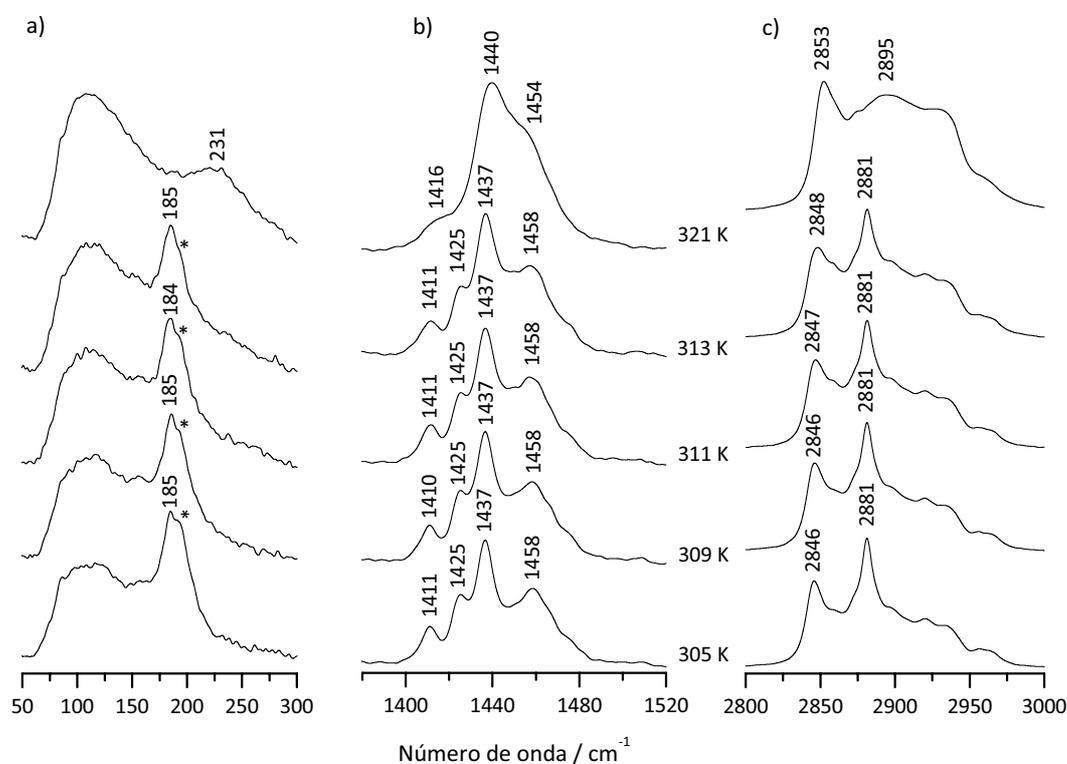


Figura 4.13 – Espectros de Raman do sistema C12C14 com $\chi_{\text{C12}}=0.30$ dependente da temperatura nas regiões **a)** 50-300 cm^{-1} , **b)** 1350-1520 cm^{-1} e **c)** 2800-3000 cm^{-1} . (* - 190 cm^{-1})

Na terceira região, **Figura 4.13c** e **4.14c**, $2800-3000\text{ cm}^{-1}$, apenas as bandas atribuídas a elongações C-H ($\nu_{\text{C-H}}$) são esperadas. No entanto, estes modos são fortemente perturbados por diversas ressonâncias de Fermi,³⁰ conduzindo a um perfil de banda complexo. Todo o perfil de bandas se revelou sensível a variações de temperatura e transições de fase. A relação de intensidade das duas bandas principais na fase cristalina a *ca.* 2845 cm^{-1} - relacionada com uma elongação simétrica CH_2 ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$) - e a *ca.* 2881 cm^{-1} - atribuída à elongação assimétrica CH_2 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$) - tem sido utilizada para avaliar a proporção conformacional *trans/gauche* dentro das cadeias carbonadas.³⁰ Adicionalmente, os componentes em ressonância de Fermi localizados a números de onda mais elevados são fortemente intensificados na fase líquida, fornecendo uma distinção clara entre os perfis de banda na fase cristalina e na fase líquida.

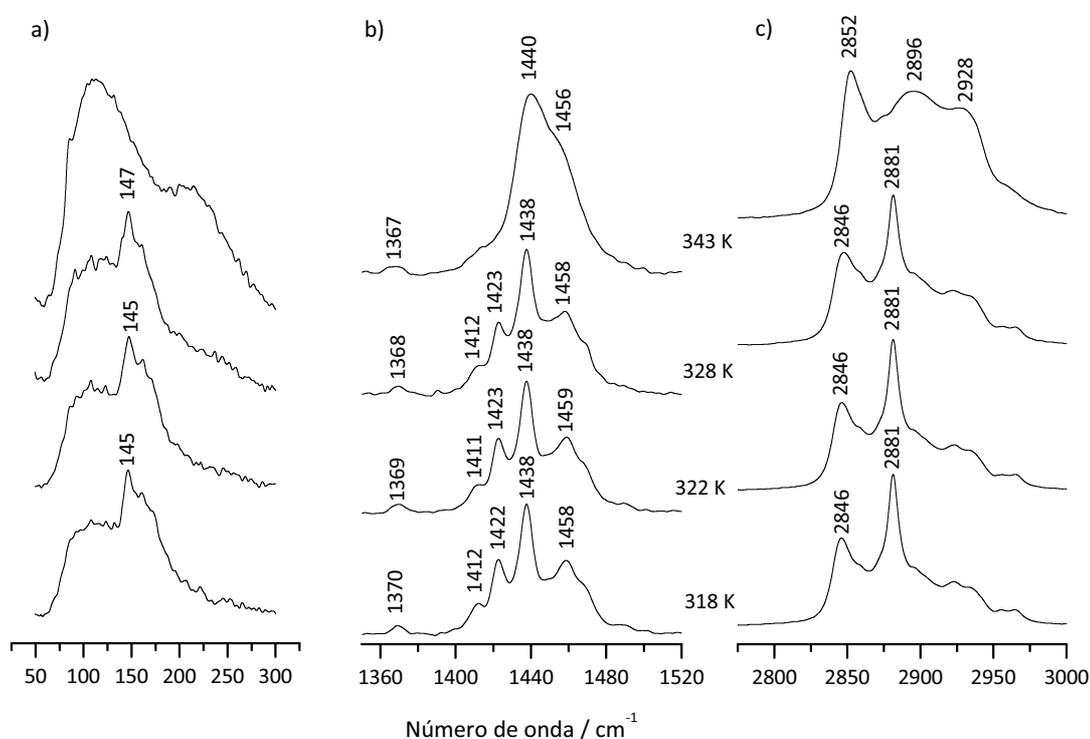


Figura 4.14 – Variação com a temperatura dos espectros de Raman do sistema C14C18 com $\chi_{\text{C14}} \approx 0.25$ nas regiões **a)** $50-300\text{ cm}^{-1}$, **b)** $1350-1520\text{ cm}^{-1}$ e **c)** $2800-3000\text{ cm}^{-1}$.

Por forma a avaliar se a região de fase sólida do diagrama de fases é composta pelos ácidos gordos puros mais um composto intermediário, tal como sugerido por alguns autores,^{51, 52} misturas físicas de compostos puros foram preparadas e os seus espectros de Raman adquiridos antes da fusão da amostra e comparados com os espectros recolhidos depois da fusão e recristalização da amostra. A **Figura 4.15** mostra os espectros de Raman para o sistema C12C14 a 305 K antes (mistura física a tracejado) e após (linha a cheio) a fusão da amostra, nas três regiões espectrais consideradas. Na

Figura 4.16, informações semelhantes são ilustradas para o sistema C14C18 a 313 K.

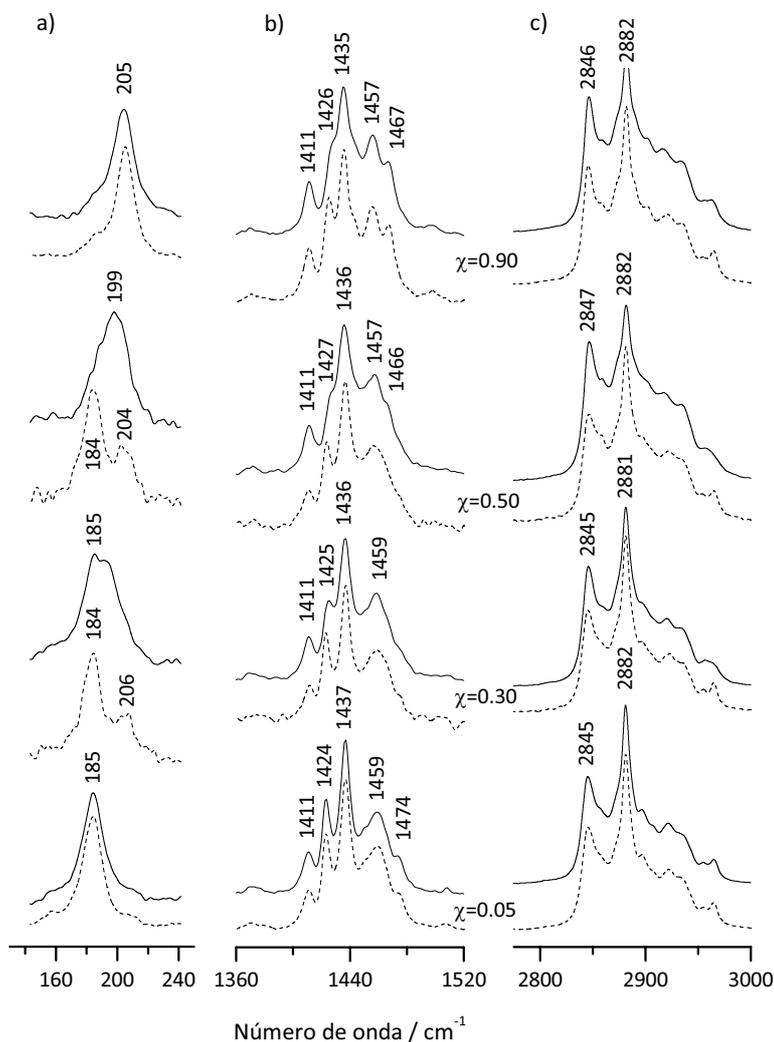


Figura 4.15 – Espectros de Raman do sistema C12C14 a 305 K. As linhas a tracejado representam os espectros das amostras antes da fusão e as linhas a cheio depois da fusão. Valores de χ relativos ao ácido láurico (C_{12}).

Na Figura 4.15 estão representados os espectros de Raman para o sistema C12C14 a 305 K, com concentrações progressivamente maiores de ácido láurico. Tal como pode ser observado na Figura 4.15a, as duas bandas LAM-3 pertencentes ao ácido mirístico ($\cong 185 \text{ cm}^{-1}$) e ao ácido láurico ($\cong 205 \text{ cm}^{-1}$) podem ser observadas nos espectros das misturas físicas (antes da fusão) para todas as composições (devido a concentrações baixas, apenas bandas fracas são observadas para $\chi_{C_{12}}=0.05$ e $\chi_{C_{12}}=0.90$). No entanto, após a fusão e recristalização à mesma temperatura, apenas uma banda com o máximo localizado a um valor intermédio entre os valores dos ácidos puros é observado, indicando claramente que a mistura após a fusão não é apenas a mistura física dos dois sólidos puros. Se o sistema em estudo fosse puramente eutético, como previamente admitido para estes sistemas, os dois espectros

deveriam ser idênticos, o que não se observa, indicando que a estrutura dos diagramas de fases anteriormente proposta não é correcta.

De forma análoga, na **Figura 4.16**, as duas bandas associadas ao modo LAM-3 correspondentes ao ácido mirístico ($\cong 185 \text{ cm}^{-1}$) e ácido esteárico ($\cong 147 \text{ cm}^{-1}$) são observadas no espectro das misturas físicas (antes da fusão) para todas as composições (devido a valores baixos de concentração, apenas bandas fracas são observadas nos casos de $\chi_{C14}=0.30$ e $\chi_{C14}=0.95$).

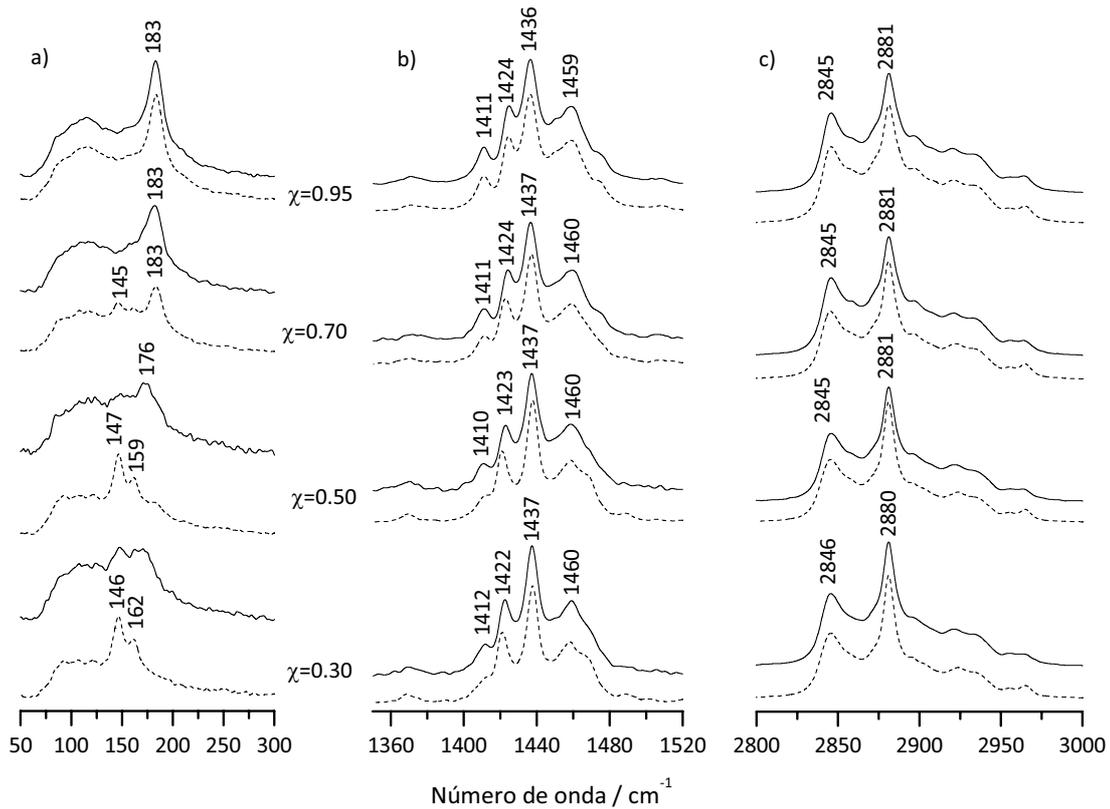


Figura 4.16 – Espectros de Raman do sistema C14C18 a 313 K. As linhas a tracejado representam as amostras antes da fusão e as linhas a cheio após a fusão das amostras. Valores de χ relativos ao ácido mirístico (C_{14}).

O mesmo comportamento foi observado para a região $1360\text{-}1520 \text{ cm}^{-1}$ (**Figura 4.15b** e **4.16b**). Enquanto a banda a 1410 cm^{-1} permaneceu quase inalterada, a banda a *ca.* 1425 cm^{-1} sofreu um desvio para números de onda mais elevados e perdeu intensidade após a fusão da amostra e posterior recristalização. Este efeito não é claro para $\chi_{C12}=0.05$, mas tornou-se mais evidente para composições superiores de χ_{C12} . A região de vC-H (**Figura 4.15c** e **4.16c**) fornece informação adicional relativa à natureza das amostras após a fusão. Em comparação com as misturas físicas, os espectros das amostras após a fusão apresentam uma diminuição na proporção de intensidades (2881 cm^{-1}) / (2845 cm^{-1}) e um aumento moderado de intensidade do componente com maior frequência (*ca.* $2900\text{-}2950 \text{ cm}^{-1}$).

cm^{-1}). Estes efeitos parecem ter início a $\chi_{C_{12}} > 0.05$, apresentando um máximo a $\chi_{C_{12}} \cong 0.45$ (C12C14) e $\chi_{C_{14}} \cong 0.50$ (C14C18) e parecem estar associados a um aumento da desordem conformacional. Em particular, o decréscimo da relação de intensidades (2881 cm^{-1}) / (2845 cm^{-1}) indica um aumento das conformações *gauche* na cadeia carbonada provavelmente associado a defeitos na interface lamelar da fase C_i , tal como discutido por Dorset.⁶⁵ O efeito revelou-se ainda mais pronunciado a temperaturas mais elevadas.

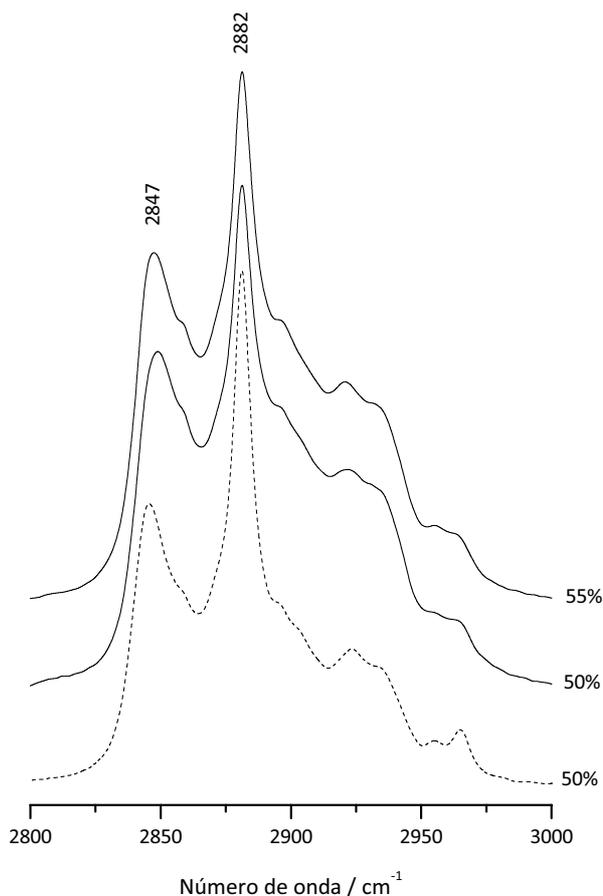


Figura 4.17 – Espectros de Raman do sistema C14C18 a 322 K na região 2800-3050 cm^{-1} . A linha a tracejado representa a amostra ($\chi_{C_{14}} \cong 0.50$) antes da fusão. De cima para baixo: $\chi_{C_{14}} \cong 0.55$, $\chi_{C_{14}} \cong 0.50$.

A **Figura 4.17** apresenta os espectros de Raman na região 2800-3050 cm^{-1} para composições de $\chi_{C_{14}} \cong 0.50$ e $\chi_{C_{14}} \cong 0.55$ a 322 K para o sistema C14C18. A comparação dos espectros revela poucas diferenças indicando que se encontram ambos na fase sólida não existindo líquido. A ausência de líquido na amostra de $\chi_{C_{14}} \cong 0.50$, à temperatura considerada, não é compatível com a interpretação clássica deste diagrama de fases, segundo o qual a mistura nestas condições deveria estar parcialmente no estado líquido. Por outro lado, a ausência de líquido a esta temperatura e

concentração está de acordo com o diagrama de fases global proposto por Costa e colaboradores⁶¹ para este sistema.

Por último, os espectros de Raman para o sistema C14C18 ($\chi_{C14} \approx 0.30$) com variação de temperatura estão representados na **Figura 4.18**. De acordo com a interpretação clássica, a região entre 328 K e 333 K para este sistema, é uma região de equilíbrio sólido-líquido. No entanto, os espectros da **Figura 4.18** mostram claramente a ausência de líquido nesta região. Esta observação não é compatível com o diagrama de fases clássico do tipo 2-1b2 e a existência de líquido, observada na **Figura 4.18** para 335 K confirma a existência de uma região de equilíbrio sólido-líquido, corroborando o diagrama de fases proposto no trabalho de Costa e colaboradores.⁶¹

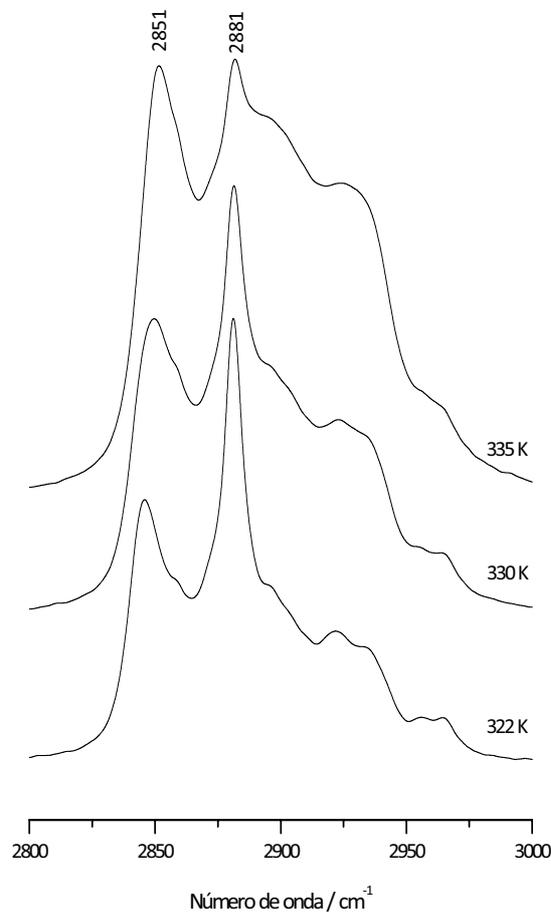


Figura 4.18 – Espectros de Raman do sistema C14C18 para $\chi_{C14} \approx 0.30$ na região 2800-3050 cm⁻¹.

4.3.3. Conclusões

A espectroscopia de Raman serviu de técnica complementar para demonstrar que a interpretação dos diagramas de fases existente na literatura não era a mais correcta e ajudou a identificar, para além de reacções peritéticas e eutéticas, a ocorrência de reacções metatéticas e regiões de completa miscibilidade entre os ácidos gordos nos extremos dos diagramas de fases e em pontos de concentração intermédia. Foi demonstrado que, ao contrário do previamente admitido, os diagramas de fases destes sistemas são bastante complexos, com implicações relevantes na concepção de processos de separação e purificação para ácidos gordos, e também no desenvolvimento de produtos baseados nestes compostos. Os cálculos DFT foram aplicados à atribuição parcial do espectro das misturas de ácidos gordos recorrendo à abordagem PiMM, na qual a atribuição é feita com base em pares de moléculas cuja soma reproduz o empacotamento cristalino.

4.4. Referências

1. M. M. Nolasco, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Computationally-Assisted Approach to the Vibrational Spectra of Molecular Crystals: Study of Hydrogen-bonding and Pseudo-Polymorphism, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 2150-2161.
2. M. M. Nolasco, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Effect of Hydrogen bonding in the vibrational spectra of *trans*-cinnamic acid, *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40*, 394-400.
3. J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, Oxford University Press, Oxford, **2002**.
4. G. Fini, Applications of Raman spectroscopy to pharmacy, *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35*, 335-337.
5. H. G. Brittain, Spectral Methods for the Characterization of Polymorphs and Solvates, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 405-412.
6. A. Burger, The Relevance of Polymorphism, *Pharmacy International* **1983**, *4*, 186.
7. M. R. Caira, in *Design of Organic Solids, Vol. 198*, p. 163-208, (Ed.: W. E), Springer-Verlag, Berlin, **1998**.
8. J. Halebian, W. McCrone, Pharmaceutical Applications of Polymorphism, *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 911.
9. J. D. Dunitz, J. Bernstein, Disappearing Polymorphs, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 193-200.
10. N. V. Phadnis, R. Suryanarayanan, Polymorphism in anhydrous theophylline - Implications on the dissolution rate of theophylline tablets, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1256-1263.
11. F. Giordano, A. Gazzaniga, J. R. Moyano, P. Ventura, M. Zanol, T. Peveri, L. Carima, Crystal forms of piroxicam pivalate: Preparation and characterization of two polymorphs, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 333-337.
12. R. Eyjolfsson, Nitrofurantoin: Particle Size and Dissolution, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 105-106.
13. E. W. Pienaar, M. R. Caira, A. P. Lötter, Polymorphs of nitrofurantoin. 2. Preparation and X-ray crystal structures of the two anhydrous forms of nitrofurantoin, *J. Crystall. Spectr. Res.* **1993**, *23*, 785-790.
14. P. V. Marshall, P. York, Crystallisation solvent induced solid-state and particulate modifications of nitrofurantoin, *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, 257-263.
15. M. R. Caira, E. W. Pienaar, A. P. Lötter, Polymorphism and pseudopolymorphism of the antibacterial nitrofurantoin, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1996**, *279*, 241-264.
16. V. Bertolasi, P. Gilli, V. Ferretti, G. Gilli, Structure and crystal packing of the antibacterial drug 1-[(5-Nitro-2-furanyl)methylene]amino}-2,4-imidazolidinedione (Nitrofurantoin), *Acta Cryst.* **1993**, *C49*, 741-744.
17. G. Bandoli, A. Ongaro, F. Lotto, M. Rossi, Crystal data of Nitrofurantoin C₈H₆N₄O₅, *Powder Diffr.* **1993**, *8*, 107-108.
18. A. Gavezzotti, Calculation of Intermolecular Interaction Energies by Direct Numerical Integration over Electron Densities. I. Electrostatic and Polarization Energies in Molecular Crystals, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 4145-4154.
19. A. Gavezzotti, Calculation of Intermolecular Interaction Energies by Direct Numerical Integration over Electron Densities. 2. An Improved Polarization Model and the Evaluation of Dispersion and Repulsion Energies, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 2344-2353.

20. J. D. Dunitz, A. Gavezzotti, Molecular Recognition in Organic Crystals: Directed Intermolecular Bonds or Nonlocalized Bonding?, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1766-1787.
21. J. D. Dunitz, A. Gavezzotti, Toward a Quantitative Description of Crystal Packing in Terms of Molecular Pairs: Application to the Hexamorphic Crystal System, 5-Methyl-2-[(2-nitrophenyl)amino]-3-thiophenecarbonitrile, *Cryst. Growth & Design* **2005**, *5*, 2180-2189.
22. A. Gavezzotti, Quantitative Ranking of Crystal Packing Modes by Systematic Calculations on Potential Energies and Vibrational Amplitudes of Molecular Dimers, *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 834-840.
23. A. Gavezzotti, A Solid-State Chemist's View of the Crystal Polymorphism of Organic Compounds, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2232-2241.
24. G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, Berlin, **1991**.
25. V. Bertolasi, V. Ferretti, G. Gilli, P. A. Borea, Stereochemistry of Benzodiazepine Receptor Ligands. Possible Role of C-H...X Interactions in Drug-Receptor Binding and Crystal Structures of CL218-872, Zopiclone and DMCM, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 283-289.
26. M. M. Nolasco, P. J. A. Ribeiro-Claro, CH...O Hydrogen Bonds in Cyclohexenone Reveal the Spectroscopic Behavior of Csp³H and Csp²H Donors, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 496-502.
27. P. J. A. Ribeiro-Claro, M. P. M. Marques, A. M. Amado, Experimental and Theoretical Evidence of C-H...O Hydrogen Bonding in Liquid 4-Fluorobenzaldehyde, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 599-606.
28. P. J. A. Ribeiro-Claro, M. G. B. Drew, V. Félix, C-H...O bonded dimers in 2-methoxy-benzaldehyde studied by X-ray crystallography, vibrational spectroscopy, and ab initio calculations, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *356*, 318-324.
29. J. J. C. Teixeira-Dias, *Espectroscopia Molecular: fundamentos, métodos e aplicações*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, **1986**.
30. R. Lewis, R. McElhane, in *Handbook of vibrational spectroscopy, Vol. 5*, p. 3447-3464, (Eds.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), John Wiley & Sons, Chichester, **2002**.
31. A. Karleskind, *Oils & fats manual: a comprehensive treatise, properties, production, applications*, Lavoisier Publishing, Paris, **1996**.
32. R. W. Johnson, E. Fritz, *Fatty acids in industry: processes, properties, production, applications*, Marcel Dekker, New York, **1989**.
33. J.-J. Zhang, J.-L. Zhang, S.-M. He, K.-Z. Wu, X.-D. Liu, Thermal studies on the solid-liquid phase transition in binary systems of fatty acids, *Thermochim. Acta* **2001**, *369*, 157-160.
34. L. Shilei, Z. Neng, F. Guohui, Eutectic mixtures of capric acid and lauric acid applied in building wallboards for heat energy storage, *Energy and Buildings* **2006**, *38*, 708-711.
35. L. C. Meher, D. Vidya Sagar, S. N. Naik, Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2006**, *10*, 248-268.
36. O. Falk, R. Meyer-Pittroff, The effect of fatty acid composition on biodiesel oxidative stability, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 837-843.

37. I. S. Carvalho, I. Miranda, H. Pereira, Evaluation of oil composition of some crops suitable for human nutrition, *Ind. Crops Prod.* **2006**, *24*, 75-78.
38. A. Kogan, N. Garti, Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *123-126*, 369-385.
39. V. Vand, W. M. Morley, T. R. Lomer, The crystal structure of lauric acid, *Acta Crystallogr.* **1951**, *4*, 324-329.
40. R. F. Holland, J. R. Nielsen, A new crystal form of fatty acids, *Acta Crystallogr.* **1963**, *16*, 902-906.
41. T. Lomer, The crystal and molecular structure of lauric acid (form A), *Acta Crystallogr.* **1963**, *16*, 984-988.
42. M. Goto, E. Asada, The crystal structure of the A-super form of lauric acid, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 70-74.
43. M. Goto, E. Asada, The crystal structure of the B-form of stearic acid, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 2456-2459.
44. F. Kaneko, M. Kobayashi, Y. Kitagawa, Y. Matsuura, Structure of stearic acid E form, *Acta Crystallogr. C* **1990**, *46*, 1490-1492.
45. E. Moreno, R. Cordobilla, T. Calvet, M. A. Cuevas-Diarte, G. Gbabode, P. Negrier, D. Mondieig, H. A. J. Oonk, Polymorphism of even saturated carboxylic acids from *n*-decanoic to *n*-eicosanoic acid, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 947-957.
46. N. Garti, K. Sato, *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*, Marcel Dekker, New York, **1989**.
47. D. Chapman, The Polymorphism of Glycerides, *Chem. Rev.* **1962**, *62*, 433-456.
48. R. E. Timms, Phase behaviour of fats and their mixtures, *Prog. Lipid Res.* **1984**, *23*, 1-38.
49. K. Sato, S. Ueno, J. Yano, Molecular interactions and kinetic properties of fats, *Prog. Lipid Res.* **1999**, *38*, 91-116.
50. K. Sato, Crystallization behaviour of fats and lipids -- a review, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 2255-2265.
51. A. E. Bailey, *Melting and solidification of fats*, Interscience publishers, New York, **1950**.
52. D. M. Small, *Physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids*, Plenum Press, New York, **1986**.
53. T. Inoue, Y. Hisatsugu, R. Yamamoto, M. Suzuki, Solid-liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures: 1. Oleic acid/stearic acid and oleic acid/behenic acid mixtures, *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *127*, 143-152.
54. T. Inoue, Y. Hisatsugu, R. Ishikawa, M. Suzuki, Solid-liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures: 2. Mixtures of oleic acid with lauric acid, myristic acid, and palmitic acid, *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *127*, 161-173.
55. T. Inoue, Y. Hisatsugu, M. Suzuki, Z. Wang, L. Zheng, Solid-liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures: 3. Mixtures of oleic acid with capric acid (decanoic acid) and caprylic acid (octanoic acid), *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *132*, 225-234.
56. M. C. Costa, M. P. Rolemberg, L. A. D. Boros, M. A. Krahenbuhl, M. G. de Oliveira, A. J. A. Meirelles, Solid-Liquid Equilibrium of Binary Fatty Acid Mixtures, *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52*, 30-36.

57. M. C. Costa, M. A. Krähenbühl, A. J. A. Meirelles, J. L. Daridon, J. Pauly, J. A. P. Coutinho, High pressure solid-liquid equilibria of fatty acids, *Fluid Phase Equilibria* **2007**, *253*, 118-123.
58. M. Iwahashi, S. Takebayashi, M. Taguchi, Y. Kasahara, H. Minami, H. Matsuzawa, Dynamical dimer structure and liquid structure of fatty acids in their binary liquid mixture: decanoic/octadecanoic acid and decanoic/dodecanoic acid systems, *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *133*, 113-124.
59. L. Ventolà, V. Metivaud, L. Bayés, R. Benages, Miquel Á. Cuevas-Diarte, T. C. D. Mondieig, The Binary System Tetradecanedioic Acid-Hexadecanedioic Acid: Polymorphism of the Components and Experimental Phase Diagram, *Helvetica Chimica Acta* **2006**, *89*, 2027-2039.
60. L. Ventolà, L. Bayés, R. Benages, Francisco J. Novegil-Anleo, Miquel Á. Cuevas-Diarte, T. Calvet, D. Mondieig, Decanedioic Acid (C₁₀H₁₈O₄)/Dodecanedioic Acid (C₁₂H₂₂O₄) System: Polymorphism of the Components and Experimental Phase Diagram, *Helvetica Chimica Acta* **2008**, *91*, 1286-1298.
61. M. C. Costa, M. Sardo, M. P. Rolemberg, P. Ribeiro-Claro, A. J. A. Meirelles, J. A. P. Coutinho, M. A. Krähenbühl, The solid-liquid phase diagrams of binary mixtures of consecutive, even saturated fatty acids: differing by four carbon atoms, *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *157*, 40-50.
62. M. C. Costa, M. Sardo, M. P. Rolemberg, J. A. P. Coutinho, A. J. A. Meirelles, P. Ribeiro-Claro, M. A. Krähenbühl, The solid-liquid phase diagrams of binary mixtures of consecutive, even saturated fatty acids, *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *160*, 85-97.
63. K. G. Brown, E. Bicknell-Brown, M. Ladjadj, Raman-active bands sensitive to motion and conformation at the chain termini and backbones of alkanes and lipids, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3436-3442.
64. P. Tandon, G. Förster, R. Neubert, S. Wartewig, Phase transitions in oleic acid as studied by X-ray diffraction and FT-Raman spectroscopy, *J. Mol. Struct.* **2000**, *524*, 201-215.
65. D. L. Dorset, *Crystallography of the polymethylene chain: an inquiry into the structure of waxes*, Oxford University Press, **2004**.

Capítulo 5

**Inclusão de compostos aromáticos em
ciclodextrinas**

CONTEÚDO

Resumo	131
5.1. Introdução	132
5.2. Caracterização de compostos de inclusão de alguns derivados do fenol	133
5.2.1. Moléculas hóspede	133
5.2.2. Resultados e discussão	140
ESTUDOS TÉRMICOS (TG E DSC)	140
ESPECTROSCOPIA DE RAMAN	142
GEOMETRIAS DE INCLUSÃO	151
5.3. Conclusões	155
5.4. Referências.....	157

RESUMO

Compostos de inclusão de alguns derivados fenólicos - 3-Metoxifenol (3MeOPh), 2-Metoxifenol (2MeOPh) e 3-Metilfenol (3MePh) em ciclodextrinas naturais α -, β - e γ CD foram investigados por utilização combinada de espectroscopia vibracional, cálculos DFT e análise térmica. Os efeitos do processo de inclusão nas moléculas hóspede bem como nas interações por ligações de hidrogénio, foram estudados por intermédio da monitorização de modos sensíveis, dos quais são exemplo as elongações C-C e C-H dos anéis aromáticos.

Com base no uso combinado de resultados analisados por espectroscopia de Raman, métodos computacionais e estruturas de raios-X de compostos semelhantes (obtidas através de acesso à Cambridge Structural Database – CSD), foram propostas estruturas prováveis para os compostos de inclusão nas ciclodextrinas α .

Os compostos de inclusão formados com os hóspedes substituídos na posição *meta* apresentam estequiometrias pouco habituais de 1:2 e 2:3. O espectro de Raman destes compostos de inclusão em α CD revela o desdobramento de vários modos vibracionais, distribuído por toda a gama espectral, o que poderá indicar a presença de moléculas hóspede no interior e no exterior da cavidade da ciclodextrina.

5.1. Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são sistemas macromoleculares, largamente reconhecidos pela sua capacidade de incluir outras moléculas, formando compostos de inclusão.^{1, 2} Muitos tipos de moléculas (compostos orgânicos³⁻¹⁰ ou organometálicos^{1, 11-18}) ou parte dessas moléculas, são incluídas desde que as suas dimensões moleculares se ajustem à cavidade. Os compostos de inclusão são em geral relativamente estáveis e separam-se rapidamente da solução como um pó cristalino. Esta propriedade das CDs, aliada à baixa toxicidade demonstrada, tem sido referida como potenciadora da aplicabilidade dos compostos de inclusão em diversas áreas,^{2, 19-21} variando desde processos de separação²¹⁻²⁶ e biotecnológicos,^{21, 23, 27, 28} passando pela indústria: farmacêutica,^{8, 23, 29-34} alimentar,^{28, 35, 36} cosmética,^{23, 37-39} agroquímica, ambiental^{21, 23, 28} e polímeros.⁴⁰

Por forma a analisar a estrutura molecular e as interacções estabelecidas entre o hóspede e o hospedeiro, assim como determinar se o produto final é de facto um composto de inclusão, têm sido usadas diferentes técnicas analíticas.^{4, 5, 29, 30, 41-44} A espectroscopia de Raman e os métodos termoanalíticos têm sido aplicados de forma bem sucedida ao estudo de compostos de inclusão em CDs.^{5, 29, 30, 41, 43, 45, 46} Mais ainda, os efeitos do processo de inclusão nas moléculas hóspede, em particular a selectividade conformacional, têm sido o objecto de estudo em inúmeros trabalhos utilizando a espectroscopia de Raman.^{41, 45, 47} No estudo da formação de compostos de inclusão, a espectroscopia de Raman já provou ser uma ferramenta de grande utilidade, uma vez que o espectro de Raman das CDs exhibe regiões livres de bandas que podem ser utilizadas para monitorizar modos relevantes ($\nu\text{C}=\text{C}$, $\nu\text{C}=\text{O}$, $\nu\text{C}-\text{H}_{\text{anel}}$, etc).

Neste trabalho, foram realizados estudos para avaliar os efeitos do processo de inclusão em ciclodextrinas naturais (α -, β - e γ CD) de três derivados do fenol: 3-Metoxifenol (3MeOPh), 2-Metoxifenol (2-MeOPh) e 3-Metilfenol (3MePh) – estruturas representadas na **Figura 5.1**.

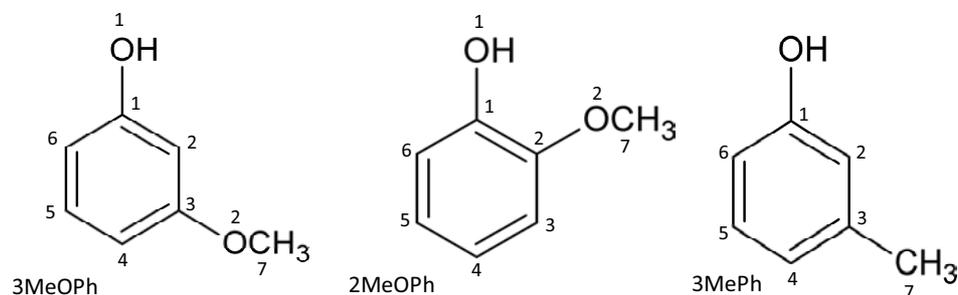


Figura 5.1 – Representação esquemática dos compostos 3-Metoxifenol, 2-Metoxifenol e 3-Metilfenol evidenciando a numeração dos átomos utilizada ao longo do texto.

Estes derivados fenólicos apresentam algumas aplicações farmacêuticas interessantes (ver Secção 5.2.1) e foram seleccionados para este estudo com base nas suas características estruturais. De facto estes compostos podem estar envolvidos em ligações de hidrogénio, devido à presença do grupo hidroxilo, mas não apresentam os osciladores locais tipicamente sensíveis como C=O e C=C, normalmente utilizados para investigar as interações hóspede-hospedeiro. Tal ausência constitui um novo desafio e permite simultaneamente a exploração das capacidades da espectroscopia de Raman na caracterização estrutural dos compostos hóspede-hospedeiro.^{41, 43, 45, 48}

A espectroscopia de Raman foi utilizada para caracterizar os compostos de inclusão e racionalizar as preferências da orientação do hóspede aquando da inclusão. As estequiometrias hospedeiro/hóspede/H₂O foram deduzidas a partir de dados recolhidos em análises por DSC (*Differential Scanning Calorimetry*, sigla DSC) e TGA (*Thermogravimetric Analysis*, sigla TGA). Tal como em trabalhos anteriores,^{41, 43, 45, 48} não foi utilizada espectroscopia FT-IR uma vez que a maioria das bandas do hóspede ou é muito fraca ou fortemente sobreposta por bandas pertencentes às moléculas de CD. Adicionalmente, cálculos DFT ao nível 6-31G* foram realizados para as estruturas monoméricas e diméricas dos três compostos, de forma a fornecer informação complementar relativamente a possíveis interações por ligações de hidrogénio e quais os seus efeitos nos modos vibracionais.

5.2. Caracterização de compostos de inclusão de alguns derivados do fenol

5.2.1. Moléculas hóspede

Características como a geometria e a polaridade de uma molécula condicionam a possibilidade de inclusão em ciclodextrinas e consequentemente, a adaptação da molécula hóspede às propriedades da cavidade. Em particular, alguma atenção tem sido dedicada na literatura à inclusão de compostos aromáticos com substituintes pouco volumosos,^{3, 4, 41, 45, 48, 49} principalmente devido às dimensões adequadas e hidrofobicidade exibidas pelo anel aromático.⁵⁰ Nomeadamente, a existência de um substituinte hidroxilo (elevado carácter hidrofílico) constitui um ponto adicional de interesse numa molécula hóspede, uma vez que, em primeira análise este grupo deveria ser desfavorável ao processo de inclusão.⁵⁰ Contudo, encontram-se citados na literatura exemplos indicando que a inclusão deste tipo de compostos é possível, através da formação de ligações de hidrogénio entre o grupo hidroxilo do hóspede e os grupos hidroxilo das ciclodextrinas.^{51, 52}

Relativamente às moléculas hóspede consideradas neste estudo, o 2MeOPh é um composto natural, resultante da pirólise da lignina, apresentando algumas propriedades que são usadas em medicamentos como expectorantes, anti-sépticos e anestésicos. Devido à sua capacidade de alteração

de cor, por vezes é utilizado como solução indicadora em várias experiências realizadas com enzimas. No geral, os metoxifenóis constituem uma família muito importante com implicações nas propriedades antioxidantes e de preservação exibidas pelo fumo. Por seu lado, o 3MePh ocorre com abundância na natureza, detectado em muitos alimentos, no fumo da madeira e do tabaco, entre outros, possuindo um odor característico a “medicamento”. É utilizado para dissolver outros químicos, como desinfetante e desodorizante.

Por forma a avaliar a possível existência de diversos conformémeros para cada molécula hóspede, foram efectuados cálculos do tipo DFT para as moléculas 3MeOPh, 2MeOPh e 3MePh. A **Figura 5.2** apresenta as geometrias optimizadas dos diferentes conformémeros encontrados para cada uma das três moléculas hóspede consideradas neste estudo, bem como os valores da respectiva energia relativa em kJ mol^{-1} (os conformémeros que são o resultado de rotações internas do grupo metilo são omitidos, devido às pequenas diferenças de energia envolvidas).

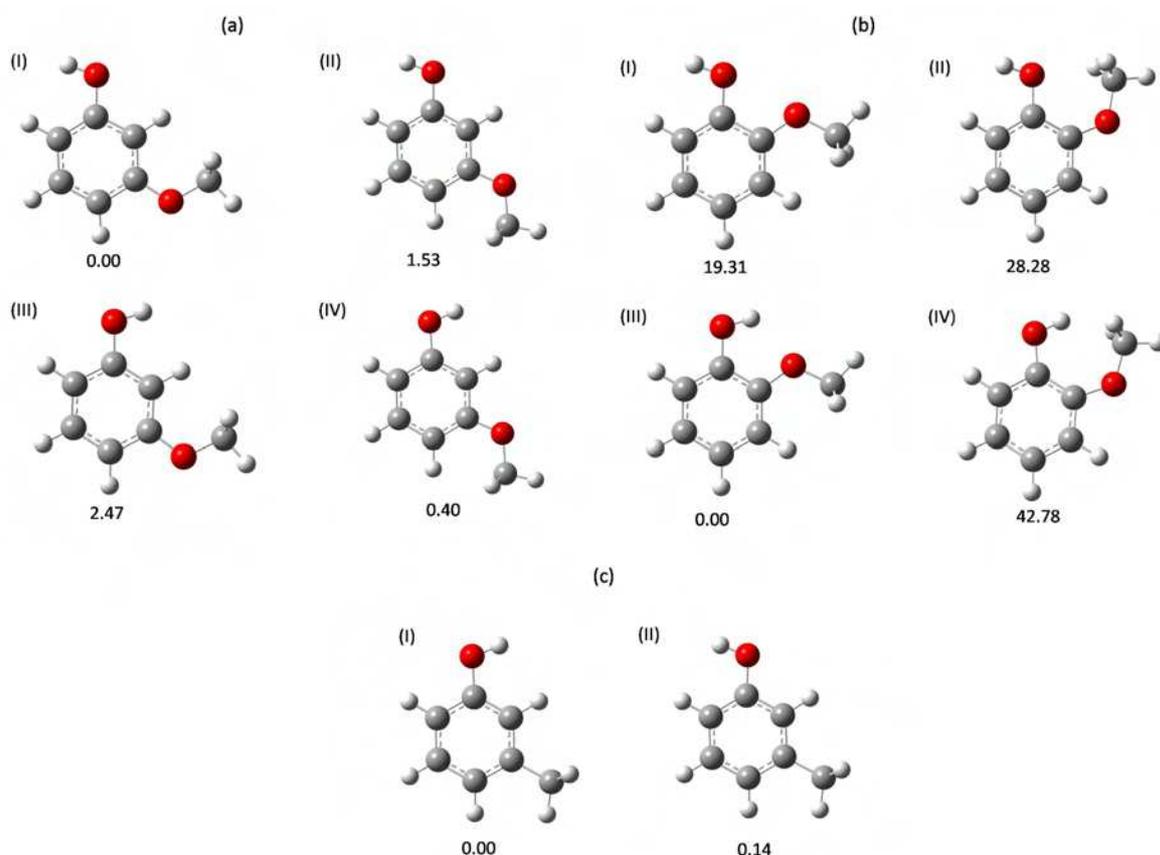


Figura 5.2 – Geometrias optimizadas ao nível B3LYP/6-31G* para os diferentes conformémeros de **a)** 3MeOPh, **b)** 2MeOPh e **c)** 3MePh. Os valores de energia relativa, em kJ mol^{-1} estão representados (após consideração da energia vibracional do ponto zero - ZPVE, sigla em inglês).

No caso do 3MeOPh (**Figura 5.2a**), as energias calculadas para os quatro confórmeros são muito semelhantes, o que poderá indicar a existência, no líquido puro, de uma mistura dos quatro confórmeros, com uma ligeira predominância das estruturas I e IV. No que diz respeito ao 2MeOPh (**Figura 5.2b**), as energias calculadas para os confórmeros são muito diferentes, indicando que a estrutura III deve ser dominante ou mesmo a única presente na fase líquida do composto puro. Finalmente, é esperada uma mistura dos dois confórmeros ilustrados na **Figura 5.2c** na fase líquida do composto 3MePh.

Nas **Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3** apresentam-se propostas de atribuição completa dos espectros de Raman e IV do 3MeOPh, 2MeOPh e 3MePh, respectivamente, estabelecidas com base nos valores de frequência calculados para os modos normais do monómero. A intensidade das bandas é descrita tendo em conta a seguinte nomenclatura: *vs* – *muito forte* (iniciais do inglês: very strong), *s* – *forte* (inicial do inglês: strong), *m* – *média* (inicial do inglês: medium), *w* – *fraca* (inicial do inglês: weak), *vw* – *muito fraca* (iniciais do inglês: very weak) e *sh* – *ombro* (inicial do inglês: shoulder).

Adicionalmente, encontram-se ilustrados na **Figura 5.3** os vários dímeros calculados para cada uma das moléculas hóspede, tendo-se procedido à optimização completa da geometria, seguida do cálculo de frequências e intensidades para cada estrutura (ver detalhes na Secção 9.14 do **Capítulo 9**). Embora a metodologia PiMM, descrita no **Capítulo 4**, não tenha sido aplicada a estes sistemas (que na sua forma pura são líquidos) por se afastar do âmbito deste trabalho, os cálculos envolvendo os dímeros foram úteis na atribuição de alguns modos (particularmente o de maior número de onda). Assim, uma aplicação da metodologia PiMM adaptada, poderia vir a ser utilizada no estudo do espectro vibracional destes compostos, com vista à obtenção de uma atribuição dos modos vibracionais com um grau mais elevado de fundamentação teórica.

As estruturas dos dímeros para o 3MeOPh e 2MeOPh foram construídas com base nos contactos mais prováveis ($O-H\cdots O-H$ e $O-H\cdots O-CH_3$). Por outro lado, os dímeros do 3MePh foram obtidos tendo como base os contactos existentes na estrutura de raios-X (referência MCRSOL⁵³) retirada da CSD.

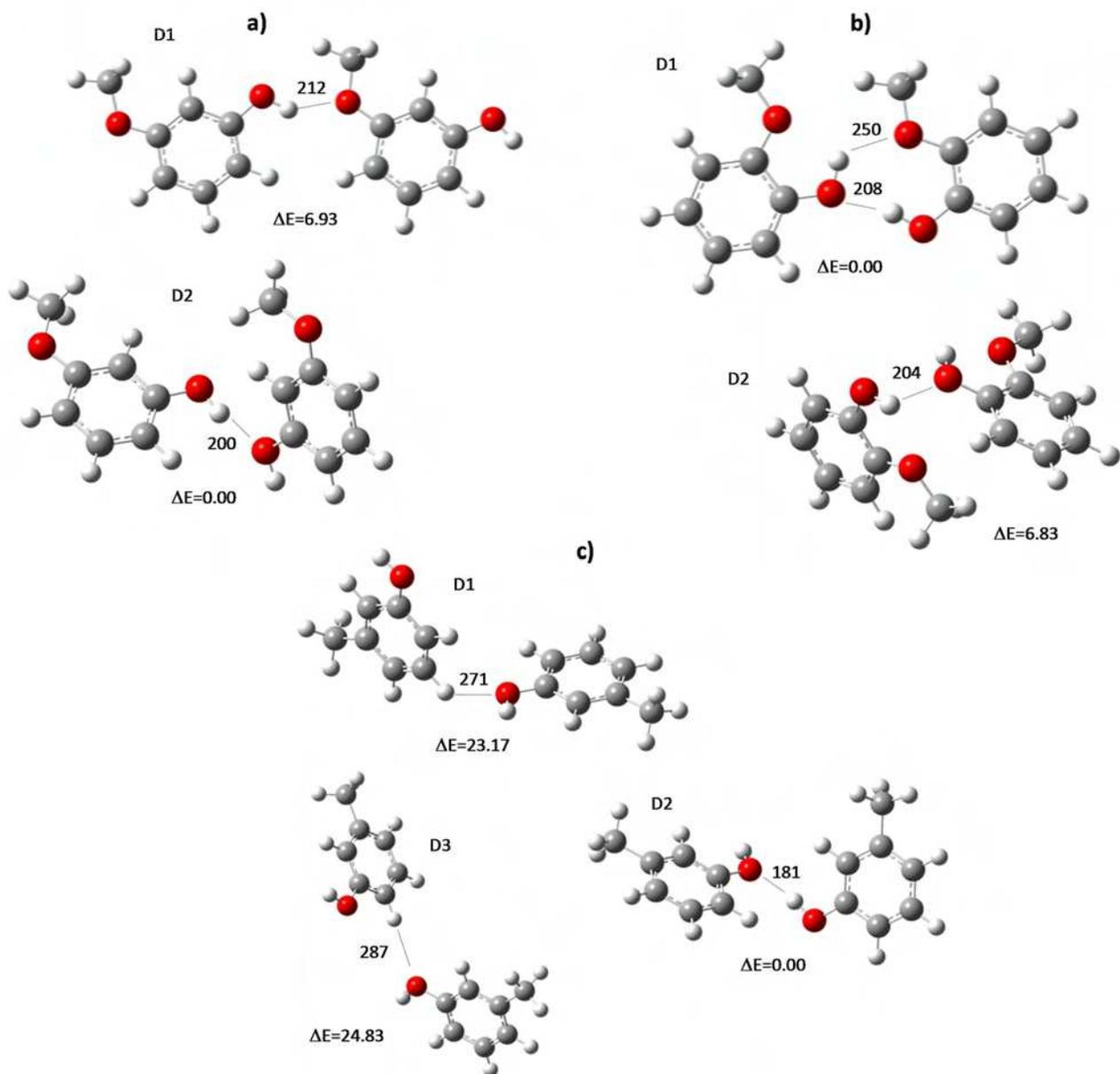


Figura 5.3 – Geometrias otimizadas ao nível B3LYP/6-31G* para dímeros de a) 3MeOPh, b) 2MeOPh e c) 3MePh. Estão representados os valores de energia relativa, em kJ mol⁻¹ e as distâncias calculadas para O...H (em pm).

Tabela 5.1 – Proposta de atribuição completa dos espectros vibracionais de FT-Raman e FT-IR do 3MeOPh.

Calc. ^[a]	FT-Raman	FT-IR	Descrição aproximada ^[b]	Calc. ^[a]	FT-Raman	FT-IR	Descrição aproximada ^[b]
3608	-	3377 ^[c] (m)	vO-H	1069	1080 (m)	1078 (m)	βC-H
3117	3091 (sh)	-	vC-H	1038	1041 (w)	1035 (vs)	vO ₂ - Me
3100	3075 (sh)	-	vC-H	972	997 (vs)	994 (m)	βC-C (12)
3074	3064 (s)	-	vC-H	934	-	943 (s)	ρMe
3052	3033 (vw)	-	vC-H	916	924 (vw)	922 (m)	γC-H
3034	3008 (w)	-	v _{as} C-H (Me)	814	-	839 (m)	γC-H
2966	2943 (m)	-	v _{as} C-H (Me)	810	-	830 (m)	γC-H
2909	2839 (m)	-	v _s C-H (Me)	732	765 (w)	761 (s)	γC-H
1611	1613 (m)	1613 (sh)	vC-C (8a)	714	734 (s)	734 (m)	vC-C
1588	1599 (m)	1594 (s)	vC-C (8b)	666	689 (vw)	683 (s)	γC-C
1487	1507 (vw)	1502 (sh)	vC-C	606	579 (vw)	578 (m)	γC-C
1478	1491 (vw)	1490 (s)	vC-C	540	555 (vw)	554 (w)	βC-C
1470	1468 (vw)	1467 (m)	β _{as} C-H (Me)	516	530 (m)	526 (m)	βC-C
1461	1455 (w)	1454 (m)	β _{as} C-H (Me)	477	477 (m)	473 (w)	βC ₁ -O + βC ₃ -O
1437	1442 (w)	1439 (m)	β _s C-H (Me)	466	458 (vw)	456 (m)	γC-C
1333	1330 (w)	1330 (w)	vC-C	403	421 (w)	410 (vw)	βC ₁ -O + βC ₃ -O
1297	1309 (vw)	1310 (w)	βC-H	360	386 (w)	-	γO-H
1285	1290 (m)	1284 (s)	vC ₁ -O + vC ₃ -O	277	265 (vw)	-	γC ₃ -O
1205	1209 (vw)	1208 (sh)	vC ₁ -O + vC ₃ -O	240	244 (m)	-	γC ₁ -O
1174	1196 (w)	1195 (s)	βO-H	223	236 (sh)	-	βMe-O
1154	1191 (w)	-	βC-H	204	212 (vw)	-	τMe-O
1142	1168 (w)	1165 (sh)	βC-H	96 ^[d]	-	-	τMe
1139	1154 (w)	1145 (vs)	ρMe				

[a] Valores calculados para o monómero ao nível B3LYP (factor de correcção: 0.9614). [b] v - elongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano; ρ - deformação do grupo CH₃; τ - torção; s - simétrica; as - assimétrica; Me - metilo. [c] Cálculos com os pares representados na **Figura 5.3a**, prevêem o deslocamento deste modo para menores valores de número de onda, para 3508 e 3488 cm⁻¹ nos dímeros D1 e D2, respectivamente. [d] As bandas que aparecem a $\bar{\nu} < 100$ cm⁻¹ não se vêem no espectro de Raman devido à presença da banda de Rayleigh.

Tabela 5.2 – Proposta de atribuição completa dos espectros vibracionais de FT-Raman e FT-IR do 2MeOPh.

Calc. ^[a]	FT-Raman	FT-IR	Descrição aproximada ^[b]	Calc. ^[a]	FT-Raman	FT-IR	Descrição aproximada ^[b]
3562	-	3463 (m)	vO-H	1098	-	1077 (vw)	βC-H
3099	3074 (vs)	-	vC-H	1036	1039 (vs)	1038 (s)	vO ₂ - Me
3092	3052 (sh)	-	vC-H	1018	1027 (sh)	1020 (vs)	βC-H
3080	3026 (m)	-	vC-H	920	962 (vw)	-	γC-H
3067	3010 (m)	-	vC-H	876	915 (vw)	916 (w)	γC-H
3038	2949 (m)	-	v _{as} C-H (Me)	816+817	834 (m)	832 (m)	γC-H+βC-C
2972	2934 (m)	-	v _{as} C-H (Me)	746	759 (vs)	755 (sh)	
2913	2843 (s)	-	v _s C-H (Me)	727	727 (sh)	739 (s)	γC-H
1607	1614 (m)	1614 (w)	vC-C (8a)	676	-	-	γC-C
1593	1598 (s)	1596 (m)	vC-C (8b)	573	584 (m)	583 (w)	βC-C
1497	1504 (m)	1499 (s)	vC-C	547	569 (sh)	571 (sh)	γC-C
1476	1463 (m)	1468 (m)	β _{as} C-H (Me)	518	534 (m)	531 (m)	βC ₁ -O + βC ₂ -O
1460	1456 (m)	1457 (sh)	vC-C	489	503 (w)	496 (w)	βC-C
1458	1446 (sh)	1444 (m)	β _{as} C-H (Me)	470	-	478 (w)	γC-C
1444	-	1409 (vw)	β _s C-H (Me)	445	456 (w)	439 (m)	γO-H
1367	1358 (w)	1360 (m)	vC-C	345	347 (m)	-	βC ₁ -O + βC ₂ -O
1296	1303 (m)	1303 (w)	βC-H	311	310 (m)	-	γC ₁ -O + γC ₂ -O
1260	1265 (s)	1255 (s)	vC ₁ -O + vC ₂ -O	237	236 (w)	-	γC ₁ -O + γC ₂ -O
1223	1223 (vw)	1220 (m)	vC ₁ -O + vC ₂ -O	225	-	-	βMe-O
1196	1206 (w)	1203 (m)	βO-H	178	188 (m)	-	τMe-O
1163	1172 (w)	1171 (m)	ρMe	70 ^[c]	-	-	τMe
1145	1156 (s)	1154 (w)	βC-H				
1141	1111 (w)	1107 (s)	ρMe				

[a] Valores calculados para o monómero ao nível B3LYP (factor de correcção: 0.9614). [b] v - elongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano; ρ - deformação do grupo CH₃; τ - torção; s - simétrica; as - assimétrica; Me - metilo. [c] As bandas que aparecem a $\bar{\nu} < 100 \text{ cm}^{-1}$ não se vêem no espectro de Raman devido à presença da banda de Rayleigh.

Tabela 5.3 – Proposta de atribuição completa dos espectros vibracionais de FT-Raman e FT-IR do 3MePh.

Calc. ^[a]	FT-Raman	FT-IR	Descrição aproximada ^[b]	Calc. ^[a]	FT-Raman	FT-IR	Descrição aproximada ^[b]
3603	-	3313 ^[c] (m)	vO-H	1073	1087 (m)	1084 (m)	βC-H
3096	3088 (vw)	-	vC-H	1034	-	1036 (m)	ρMe
3076	3075 (sh)	-	vC-H	997	1000 (vs)	1009 (sh)	ρMe
3060	3054 (m)	-	vC-H	975	991 (sh)	1000 (m)	βC-C
3030	3022 (sh)	-	vC-H	931	930 (vw)	927 (s)	γC-H
3005	2921 (m)	-	v _{as} C-H (Me)	914	879 (vw)	880 (m)	vC ₁ -O + vC ₃ -O
2973	2861 (w)	-	v _{as} C-H (Me)	850	856 (vw)	852 (m)	γC-H
2924	2735 (w)	-	v _s C-H (Me)	811	842 (vw)	-	γC-H
1604	1615 (m)	1614 (m)	vC-C (8a)	760	778 (w)	773 (vs)	γC-H
1597	1591/98 (m)	1589 (s)	vC-C (8b)	720	735 (s)	733 (m)	vC-C
1497	-	1517 (w)	vC-C	673	690 (vw)	687 (vs)	γC-C
1472	1502 (vw)	1491 (m)	β _{as} C-H (Me)	556	565 (w)	574 (w)	γC-C
1457	1462 (vw)	1462 (m)	β _{as} C-H (Me)	524	541 (m)	539 (m)	βC-C
1435	1444 (w)	1440 (m)	vC-C	504	518 (m)	518 (w)	βC-C
1387	1380 (m)	1379 (sh)	β _s C-H (Me)	452	465 (vw)	472 (w)	γC-C
1318	-	1336 (m)	vC-C	448	445 (vw)	441 (s)	βC ₁ -O + βC ₃ -O
1309	1306 (vw)	1309 (sh)	βC-H	368	322 (vw)	-	γO-H
1275	1282 (m)	1278 (m)	vC ₁ -O + vC ₃ -O	296	306 (w)	-	βC ₁ -O + βC ₃ -O
1169	1162 (m)	1152 (vs)	βO-H	239	244 (m)	-	γC ₁ -O
1155	-	-	βC-H	207	216 (m)	-	γC ₃ -O
1149	1133 (vw)	-	βC-H	31 ^[d]	-	-	τMe

[a] Valores calculados para o monómero ao nível B3LYP (factor de correcção: 0.9614). **[b]** v - elongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano; ρ - deformação do grupo CH₃; τ - torção; s - simétrica; as - assimétrica; Me - metilo. **[c]** O cálculo para o par D2 representado na **Figura 5.3c** prevê o deslocamento deste modo para menores valores de número de onda, 3495 cm⁻¹, quando se estabelece um contacto O-H...O, em relação ao valor calculado para o monómero. **[d]** As bandas que aparecem a $\bar{\nu} < 100$ cm⁻¹ não se vêem no espectro de Raman devido à presença da banda de Rayleigh.

5.2.2. Resultados e discussão

ESTUDOS TÉRMICOS (TG E DSC)

A utilização combinada de análise DSC e TG constitui uma ferramenta analítica de primeira escolha para uma avaliação precisa da estequiometria dos compostos de inclusão.⁵⁴⁻⁵⁶ Quando as moléculas do hóspede são incluídas nas cavidades das CDs ou na estrutura cristalina, os seus pontos de fusão, ebulição e sublimação normalmente mudam para valores de temperatura diferentes. Adicionalmente, tendo em conta que os compostos de inclusão em CDs são geralmente preparados em solução aquosa, devem ser considerados como sistemas ternários: $CD \cdot x(\text{hóspede}) \cdot y(\text{H}_2\text{O})$, nos quais x e y representam o número de moléculas de hóspede e de H_2O por cada molécula de CD, respectivamente.

As estequiometrias dos compostos de inclusão em CDs com os hóspedes 3MeOPh, 2MeOPh e 3MePh foram obtidas através da quantificação das diferentes perdas de massa identificadas pelas curvas TG à medida que a temperatura aumenta. As curvas TG e DSC do composto $\alpha\text{CD} \cdot 2\text{MeOPh}$ estão representadas na **Figura 5.4**. Tal como se pode observar na **Figura 5.4**, o termograma do composto de inclusão é bastante diferente dos termogramas dos componentes isolados, indicando a formação de um composto de inclusão verdadeiro.

O hóspede puro (2MeOPh) evapora entre *ca.* 50 °C e 150 °C (**Figura 5.4**, ----). Por outro lado, o hidrato de αCD (**Figura 5.4**,), é conhecido por apresentar uma perda gradual de moléculas de água desde a temperatura ambiente até aproximadamente 90 °C, sem variações adicionais de massa até *ca.* 280 °C, quando se inicia a decomposição.⁵⁷

Considerando o processo de inclusão como uma permuta de algumas moléculas de água de hidratação por moléculas de hóspede, o termograma do composto de inclusão $\alpha\text{CD} \cdot 2\text{MeOPh}$ (**Figura 5.4**, —), exibe uma perda inicial de 11% em massa devido à libertação de moléculas de água de hidratação. Após o processo de desidratação estar completo, ocorre uma perda adicional de 7% em massa, provavelmente correspondente à libertação do hóspede, 2MeOPh, antes da decomposição da ciclodextrina. Esta relação de massa 82% / 7% / 11%, representa uma fracção molar de 2/1/7, correspondendo a uma estequiometria de $2\text{CD} \cdot 1(\text{hóspede}) \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$.

As curvas termogravimétricas dos restantes compostos de inclusão não são aqui representadas, uma vez que apresentam o mesmo perfil genérico e características exibidas pelo composto $\alpha\text{CD} \cdot 2\text{MeOPh}$. Os resultados estequiométricos para todos os compostos de inclusão considerados neste estudo, estão sumariados na **Tabela 5.4**.

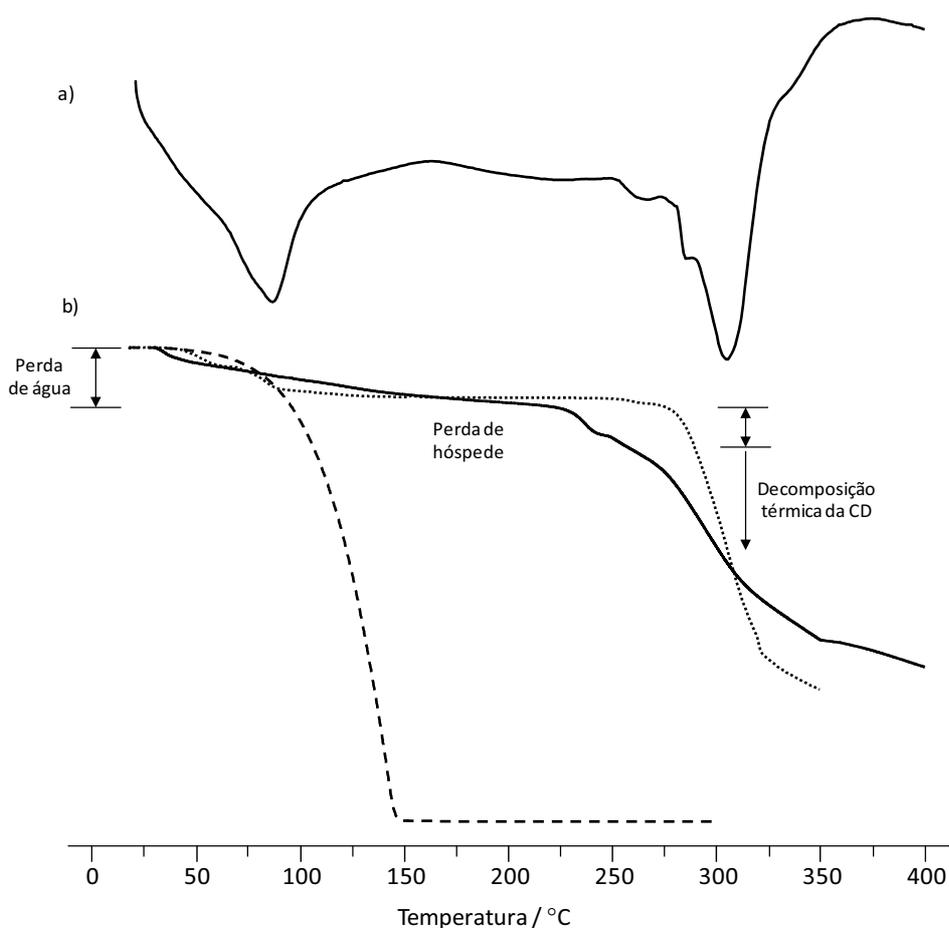


Figura 5.4 – Análise térmica: curvas obtidas por análise de **a)** DSC e **b)** TG do composto de inclusão $\alpha\text{CD}\cdot 2\text{MeOPh}$ (linha a cheio), αCD pura (.....) e hóspede puro 2MeOPh (-----).

Tal como é evidente pela análise da **Tabela 5.4**, os compostos de inclusão com αCD apresentam três estequiometrias distintas, dependendo do tamanho e posição do substituinte no anel do fenol. Em geral, a dimensão da ciclodextrina α não é suficiente para acomodar completamente o anel aromático, estando o hóspede “entalado” entre duas moléculas de αCD . Este é o caso do $\alpha\text{CD}\cdot 2\text{MeOPh}$, que exibe o substituinte metoxilo na posição *orto*.

O composto $\alpha\text{CD}\cdot 3\text{MeOPh}$ apresenta uma estequiometria 1:1.5. Esta é uma estequiometria pouco usual (2:3) e, tanto quanto sabemos, apenas previamente observada para o composto de inclusão $\alpha\text{CD}\cdot(m\text{-bromofenol})$.⁵⁸ No caso do $\alpha\text{CD}\cdot 3\text{MePh}$ uma estequiometria invulgar de 1:2 também foi observada. Este valor pode ser explicado com base nos resultados de raios-X para o *m*-nitrofenol⁵⁹ e álcool benzílico⁶⁰ – ambas as estruturas apresentam uma molécula do hóspede incluída na cavidade da αCD e outra molécula fora da cavidade, que resulta na proporção final de 1:2.

Tabela 5.4 – Estequiometria dos compostos de inclusão, baseada em análise de DSC e TG.

Sistema	% (Hóspede)	% (H ₂ O)	Moléculas de água por CD	Estequiometria hospedeiro:hóspede
α CD•3MePh	17.25	7.11	5	1:2
α CD•2MeOPh	6.95	11.05	7	2:1
α CD•3MeOPh	14.44	7.97	6	2:3
β CD•3MePh	14.89	6.08	5	1:2
	---	---	10 ^[a]	1:2 ^[a]
β CD•2MeOPh	10.65	9.54	8	1:1
β CD•3MeOPh	11.26	5.69	4	1:1
γ CD•3MePh	13.20	13.84	14	1:2
γ CD•2MeOPh	15.74	13.17	13	1:2
γ CD•3MeOPh	16.21	11.74	12	1:2

[a] Valor obtido na literatura.⁶¹

Considerando a β CD, as dimensões da sua cavidade são normalmente suficientes para acomodar uma molécula de hóspede, tal como encontrado para β CD•3MeOPh e β CD•2MeOPh. O sistema β CD•3MePh é uma exceção, com uma proporção hospedeiro:hóspede de 1:2. Este resultado está de acordo com os dados de raios-X disponíveis para este composto,⁶¹ tal como se mostra na **Tabela 5.4**. A discrepância observada no teor de água (5 moléculas de água por ciclodextrina neste trabalho e 10 moléculas de água por CD na literatura⁶¹) pode surgir devido ao carácter lábil de algumas moléculas de água presentes na estrutura dos compostos de inclusão.

No que diz respeito aos compostos de inclusão com γ CD, foi observada uma estequiometria 1:2 (hospedeiro:hóspede) para todos os derivados fenólicos em estudo, de acordo com o esperado para esta CD, devido às dimensões da sua cavidade.

ESPECTROSCOPIA DE RAMAN

A espectroscopia de Raman pode fornecer evidências do sucesso da formação de um composto de inclusão comparando o espectro das misturas físicas “hóspede+CD” e o espectro dos compostos de inclusão. É esperado que os espectros de Raman dos compostos de inclusão apresentem diferenças significativas nas características espectrais das moléculas de hóspede e CD, enquanto que o espectro

das misturas físicas “hóspede+CD” é geralmente o resultado da soma dos espectros individuais.

As regiões espectrais que se encontram livres de bandas de CD são particularmente úteis para enfatizar as alterações promovidas pelo processo de inclusão. Estas regiões espectrais podem ser encontradas acima de *ca.* 1550 cm⁻¹ e *ca.* 3000 cm⁻¹, incluindo alguns modos de elongação dos osciladores C-C e C-H (ν C-C_{anel} e ν C-H_{anel}), respectivamente. A interferência de bandas das CDs não permite o uso sistemático de outros modos do hóspede para monitorizar os efeitos do processo de inclusão. No entanto, em alguns casos, modos relevantes do hóspede podem ser observados em algumas pequenas “janelas” espectrais presentes no espectro de Raman dos hospedeiros (CDs). Este é o caso do 3MeOPh, para o qual os efeitos da inclusão são evidentes nas bandas atribuídas aos modos de deformação fora do plano do C₁-O (γ C₁-O) e de elongação do anel (ν C-C_{anel}) – observados a 244 cm⁻¹ e 734 cm⁻¹, respectivamente, no hóspede puro. Os diversos modos vibracionais utilizados para monitorizar o processo de inclusão das três moléculas hóspede estão enumerados na **Tabela 5.5**, bem como a correspondente atribuição vibracional.

Tabela 5.5 – Valores de número de onda (cm⁻¹) e descrição aproximada para as bandas mais relevantes observadas no espectro de Raman dos hóspedes puros.

Descrição aproximada ^[a]	Número de onda (cm ⁻¹)					
	3MePh		3MeOPh		2MeOPh	
	Exp.	Calc. ^[b]	Exp.	Calc. ^[b]	Exp.	Calc. ^[b]
γ C ₃ -Me	216	207	---	---	---	---
γ C ₁ -O	244	239	244	240	236	237
β C-C _{anel}	518	504	530	516	503	489
β C-C _{anel}	541	524	555	540	584	573
ν C-C _{anel}	735	720	734	714	759	746
8b ; ν C-C _{anel}	1591/1598	1597	1599	1588	1598	1593
8a ; ν C-C _{anel}	1615	1604	1613	1611	1614	1607
ν C-H	3054	3060	3064	3074	3074	3080

[a] ν - elongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano; [b] números de onda calculados para cada composto, de acordo com o procedimento descrito na Secção 9.14 do Capítulo 9.

3MeOPh

Na **Figura 5.5** encontram-se representados os espectros de Raman do líquido puro 3MeOPh e os respectivos compostos de inclusão no estado sólido, nas regiões espectrais 220-270 cm^{-1} e 715-750 cm^{-1} . Na região entre 220-270 cm^{-1} , o processo de inclusão na αCD conduz a uma separação inequívoca da banda registada a 244 cm^{-1} , atribuída ao modo $\gamma_{\text{C}_1\text{-O}}$. O desdobramento deste modo vibracional pode ser atribuído a uma de duas situações: **a)** uma ressonância de Fermi resultante do processo de inclusão ou **b)** a presença de moléculas de hóspede em dois ambientes químicos distintos. Tendo em conta a estequiometria obtida para este composto de inclusão (2:3), determinada pelos resultados combinados de análise por TG e DSC mencionados na secção anterior, a última explicação parece ser a mais apropriada, tal como será discutido em seguida.

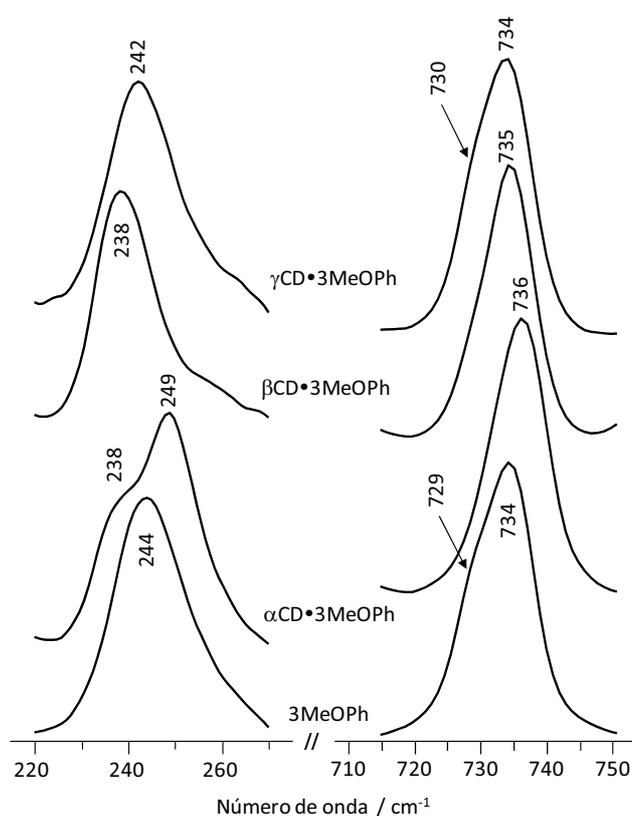


Figura 5.5 – Espectros de Raman, nas regiões 220-270 e 715-750 cm^{-1} , do hóspede puro 3MeOPh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.

Relativamente aos compostos de inclusão com β - e γ CD, os efeitos do processo de inclusão são menos evidentes, sendo que apenas um desvio para menores valores de número de onda da banda a 244 cm^{-1} indica a formação de um composto de inclusão. Tal como encontrado anteriormente para

outros compostos aromáticos incluídos em CDs,^{43, 45, 48, 62} o perfil da banda no composto γ CD•3MeOPh é mais parecido com o perfil da banda no hóspede puro, provavelmente como resultado de um menor número de restrições impostas pela cavidade da γ CD.

Para a região 715-750 cm^{-1} , as alterações observadas são menos evidentes. O perfil da banda atribuída a $\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (734 cm^{-1} , líquido puro) no espectro do composto de inclusão em γ CD não revela nenhuma alteração significativa com respeito ao espectro do líquido puro. Este comportamento é consistente com a dimensão larga da cavidade desta CD. No caso dos compostos com α - e β CD, apenas pequenas diferenças são observadas nos números de onda e no perfil da banda que se torna um pouco mais estreito, provavelmente devido ao deslocamento para maiores valores de número de onda da banda a 729 cm^{-1} . Esta é uma indicação de um maior número de restrições impostas por estas duas cavidades.

Na **Figura 5.6** encontram-se representados os espectros do hóspede puro e os correspondentes compostos de inclusão em α -, β - e γ CD na região 1540-1660 cm^{-1} .

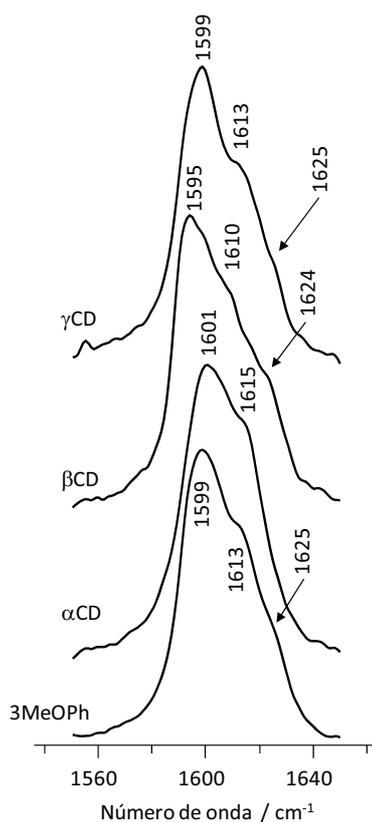


Figura 5.6 – Espectros de Raman, na região 1540-1660 cm^{-1} , do hóspede puro 3MeOPh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.

No espectro do composto 3MeOPh puro, o perfil da banda evidencia claramente a presença de pelo menos três bandas, a 1599, *ca.* 1613 e *ca.* 1625 cm^{-1} . No entanto, de acordo com a atribuição empírica baseada em cálculos DFT, apenas duas bandas são esperadas nesta região do espectro (correspondendo a modos $\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ e denominados 8a e 8b de acordo com a notação de Wilson para modos do benzeno). Estes modos são atribuídos às duas bandas com menores números de onda, a 1599 e 1613 cm^{-1} . A terceira banda, *ca.* 1625 cm^{-1} é atribuída a uma ressonância de Fermi entre o modo fundamental 8a e uma banda de combinação (possíveis bandas de combinação: 1154 cm^{-1} + 477 cm^{-1} e 997 cm^{-1} + 620 cm^{-1}). O comportamento desta região após a inclusão, apoia de uma forma geral as observações retiradas para as regiões anteriores. Globalmente, os perfis e números de onda das bandas não são significativamente alterados no processo de inclusão nas cavidades maiores das CDs β e γ . Por seu lado, a inclusão em αCD é claramente diferente – provavelmente devido a alterações geométricas impostas pelo tamanho da cavidade da αCD , a componente atribuída a uma ressonância de Fermi registada a 1625 cm^{-1} (no hóspede puro) desaparece no decorrer do processo de inclusão.

2MeOPh

As alterações espectrais promovidas pela inclusão de 2MeOPh na cavidade das ciclodextrinas, não são tão evidentes. De facto, apenas pequenos desvios na intensidade e números de onda são observados nos espectros destes compostos de inclusão, relativamente ao espectro do hóspede puro. No entanto, estas diferenças são claramente consistentes com a formação de um composto de inclusão (tal como observado através dos resultados obtidos pelas técnicas de TG e DSC).

Na **Figura 5.7** encontram-se representados os espectros de Raman do hóspede puro, 2MeOPh, e dos correspondentes compostos de inclusão em α -, β - e γCD , na região espectral 1520-1680 cm^{-1} . Esta é a região espectral na qual se observam as diferenças mais pronunciadas. Para o hóspede puro, as duas bandas bem definidas observadas a 1598 e 1614 cm^{-1} , são atribuídas ao par $\nu\text{C-C}_{\text{anel}}$ (8b e 8a, respectivamente). O processo de inclusão em todas as CDs leva a uma diminuição (cerca de 6 cm^{-1}) no número de onda apenas da componente do modo 8a, um efeito que pode ser relacionado com a alteração das condições de simetria do ambiente químico. Sendo assim, o perfil geral desta região espectral é alterado significativamente aquando da inclusão. É interessante referir que, em contraste com a análise anterior (para o 3MeOPh, bem como para outros compostos de inclusão aromáticos^{45, 48}) o mesmo efeito é observado independentemente do tamanho da CD, embora tenham sido obtidas, por análise térmica, estequiometrias distintas para cada composto de inclusão.

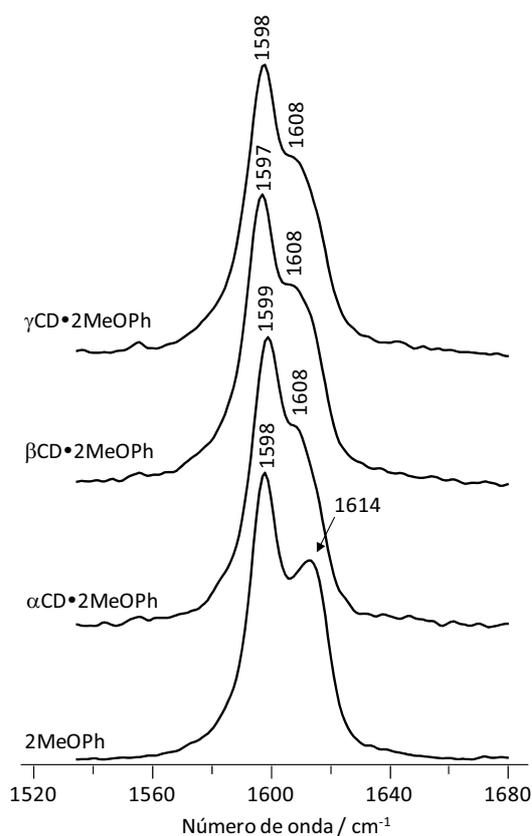


Figura 5.7 – Espectros de Raman, na região 1520-1680 cm⁻¹, do hóspede puro 2MeOPh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.

3MePh

De acordo com os cálculos DFT para o hóspede puro, existem dois modos presentes em cada uma das duas regiões representadas na **Figura 5.8**: os modos de deformação fora do plano dos substituintes do anel aromático, γ C₃-Me e γ C₁-O, na região 190-270 cm⁻¹ (**Figura 5.8**, esquerda) e duas deformações no plano do anel, β C-C_{anel}, na região 500-560 cm⁻¹ (**Figura 5.8**, direita). Tal como pode ser observado, o espectro experimental do composto puro (3MePh) está de acordo com estas previsões, e os modos γ C₃-Me e γ C₁-O são atribuídos às bandas a 216 e 244 cm⁻¹, respectivamente, enquanto as duas deformações β C-C_{anel} estão associadas às bandas observadas a 518 e 541 cm⁻¹.

A inclusão de 3MePh nas ciclodextrinas β - e γ CD conduz apenas a pequenos desvios para menores valores de número de onda das bandas associadas aos modos γ C₃-Me e γ C₁-O, sendo que o efeito é mais pronunciado no caso do composto com β CD. As bandas registadas na outra região - 500-560 cm⁻¹ - parecem ser insensíveis ao processo de inclusão. Por outro lado, a inclusão na cavidade mais pequena da α CD, conduz a alterações significativas em ambas as regiões espectrais representadas na

Figura 5.8. Na primeira região ($190\text{-}270\text{ cm}^{-1}$), os dois modos observados $\gamma_{C_3\text{-Me}}$ e $\gamma_{C_1\text{-O}}$ são desdobrados em dois pares de bandas aquando da inclusão. Um efeito semelhante ocorre na região compreendida entre $500\text{-}560\text{ cm}^{-1}$, na qual o componente com número de onda mais elevado também apresenta dois componentes bem definidos no espectro de $\alpha\text{CD}\cdot 3\text{MePh}$. O desdobramento de três modos distintos constitui uma forte indicação da existência de dois ambientes químicos diferentes sentidos pela molécula hóspede no composto de inclusão $\alpha\text{CD}\cdot 3\text{MePh}$.

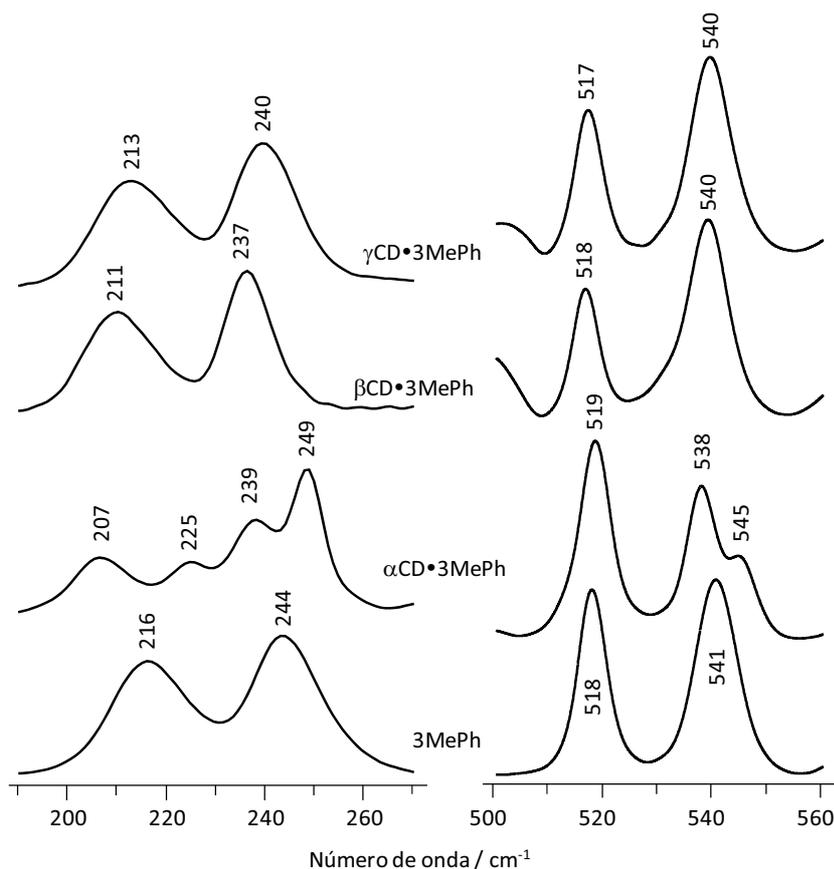


Figura 5.8 – Espectros de Raman, nas regiões $190\text{-}270$ e $500\text{-}560\text{ cm}^{-1}$, do hóspede puro 3MePh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.

As observações retiradas da análise da **Figura 5.8**, são, no geral confirmadas pela interpretação da região espectral compreendida entre 1540 e 1680 cm^{-1} (representada na **Figura 5.9**). Esta região, para a qual apenas são esperados dois modos fundamentais – 8a e 8b, de acordo com o discutido anteriormente – apresenta sinais claros de desdobramento de bandas por interações de ressonância de Fermi, com grandes alterações de intensidade associadas a pequenos desvios de números de onda. A presença de múltiplas interações de ressonância de Fermi explica a elevada sensibilidade deste perfil de banda ao processo de inclusão.

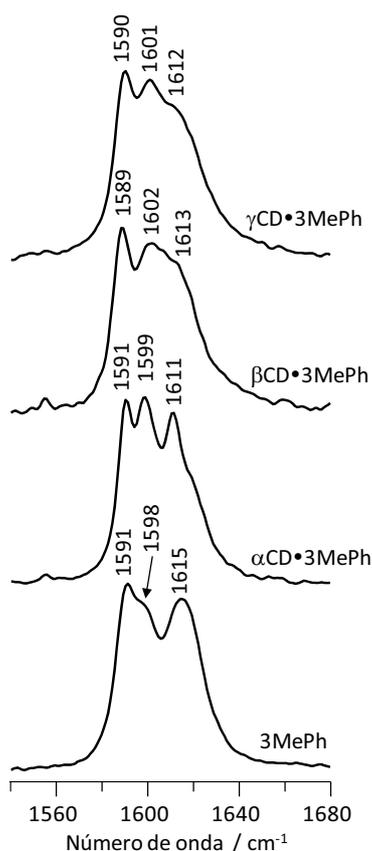


Figura 5.9 – Espectros de Raman, na região 1540-1680 cm^{-1} , do hóspede puro 3MePh no estado líquido e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.

Região $\nu\text{C-H}$

Os efeitos do processo de inclusão são observáveis nas bandas atribuídas aos diferentes grupos CH para todos os compostos de inclusão considerados. De uma forma geral, as alterações espectrais observadas na região das elongações dos grupos C-H ($2800\text{-}3120\text{ cm}^{-1}$) são consistentes com as observações descritas nas secções anteriores para cada molécula hóspede em estudo.

As bandas nesta região são atribuídas a modos de elongação de grupos C-H, aromáticos e do grupo metilo ($\nu\text{C-H}_{\text{anel}}$ e $\nu\text{C-H}_{\text{metilo}}$, respectivamente). No entanto, os modos vibracionais pertencentes ao grupo metilo, localizados a *ca.* 2950 cm^{-1} , são fortemente sobrepostos pelas bandas fortes correspondentes aos $\nu\text{C-H}$ das CDs. Sendo assim, apenas os modos $\nu\text{C-H}$ aromáticos, *ca.* 3060 cm^{-1} , permitem a comparação entre os hóspedes puros e os correspondentes compostos de inclusão. Estudos anteriores envolvendo compostos de inclusão em CDs mostram que os modos $\nu\text{C-H}$ do anel aromático podem ser particularmente sensíveis ao processo de inclusão.^{41, 43, 45, 48} Por exemplo, no

espectro vibracional dos compostos de inclusão do benzaldeído em CDs observa-se um aumento significativo no número de onda da banda correspondente a uma elongação C-H envelope.^{41, 43, 45} Este facto tem sido associado à presença de ligações de hidrogénio intermoleculares do tipo $C-H \cdots O=C$ observadas na estrutura de raios-X deste composto de inclusão.⁶³

Na **Figura 5.10**, estão representados os espectros na região $2800-3120\text{ cm}^{-1}$ dos hóspedes puros no estado líquido (3MeOPh, 2MeOPh e 3MePh) e os correspondentes compostos de inclusão em α -, β - e γ CD.

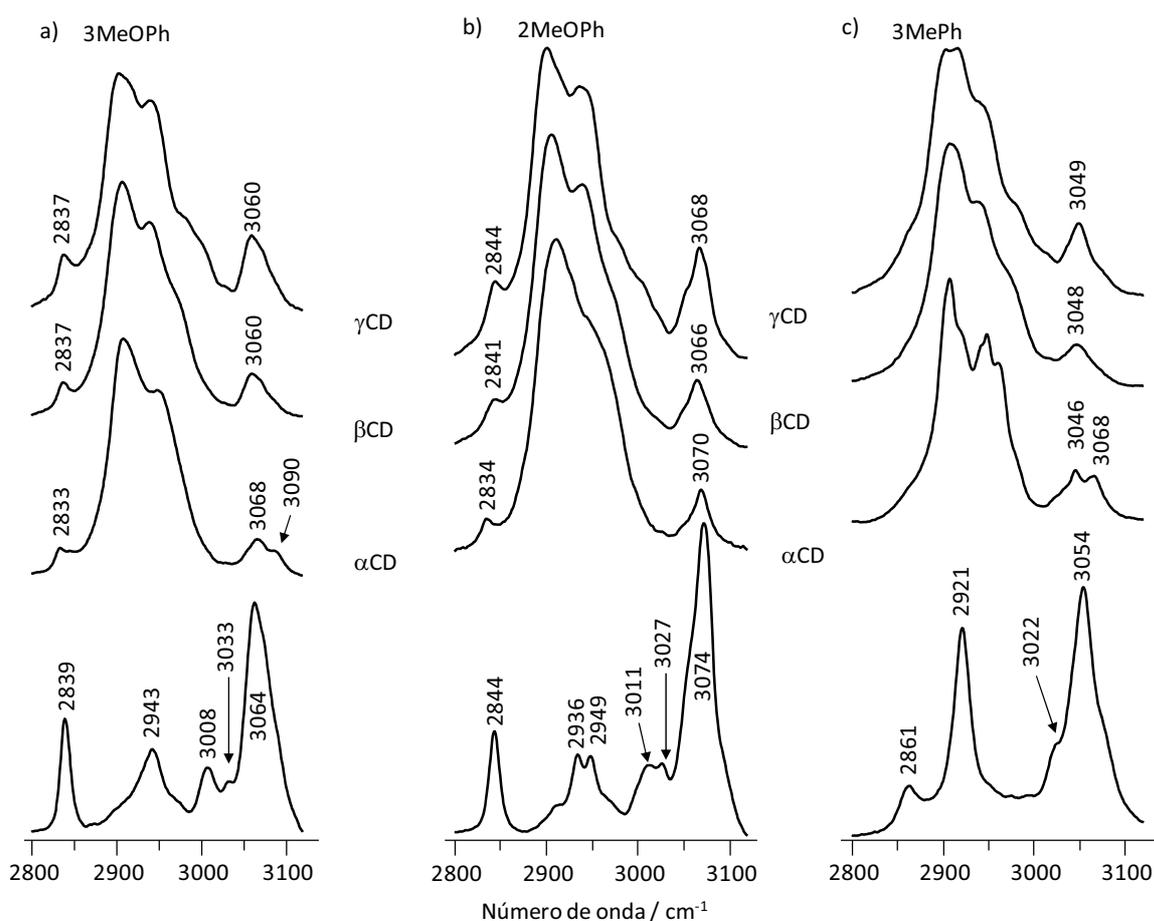


Figura 5.10 – Espectros de Raman, na região $2800-3120\text{ cm}^{-1}$, dos hóspedes puros no estado líquido **a)** 3MeOPh, **b)** 2MeOPh e **c)** 3MePh e respectivos compostos de inclusão no estado sólido com α -, β - e γ CD.

A comparação entre os modos ν_{C-H} dos hóspedes puros e dos compostos de inclusão, origina três situações diferentes:

- i) O hóspede substituído na posição *orto*;
- ii) Os hóspedes substituídos na posição *meta* incluídos em β - e γ CD;

iii) Os hóspedes substituídos na posição *meta* com α CD.

No primeiro caso (2MeOPh), o perfil da banda atribuída a ν C-H é mantido nos três compostos de inclusão, mas o máximo da banda é deslocado para números de onda inferiores em cerca de 4-8 cm^{-1} , aquando da inclusão. De acordo com o discutido anteriormente (**Figura 5.7**), as diferenças entre os espectros vibracionais dos compostos incluídos em α -, β - e γ CD são quase inexistentes, o que contrasta com o comportamento habitual de compostos de inclusão com hóspedes aromáticos.^{45, 48} Para os hóspedes substituídos em posição *meta* (3MeOPh e 3MePh) com β - e γ CD, apenas são observados pequenos desvios nos números de onda. As alterações mais relevantes observadas aquando da inclusão, são registadas para os hóspedes substituídos em posição *meta* com α CD. Esta análise é evidente por observação das **Figuras 5.10a** e **5.10c**, nas quais é possível observar o desdobramento das bandas a 3064 e 3054 cm^{-1} , respectivamente. Este desdobramento dos modos atribuídos a ν C-H é consistente com a análise das regiões de baixas frequências, bem como com a existência de dois ambientes químicos diferentes sentidos pelas moléculas de hóspede.

GEOMETRIAS DE INCLUSÃO

As alterações espectrais observadas na secção anterior revelam um comportamento distinto relativamente aos hospedeiros α -, β - e γ CD, que é normalmente associado às diferenças no tamanho da cavidade de cada ciclodextrina. A cavidade pequena da α CD impõe restrições geométricas às moléculas hóspede, promovendo grandes alterações espectrais. A cavidade de grande dimensão da γ CD permite a inclusão, sem perturbar consideravelmente as moléculas hóspede, dando origem a bandas com perfil idêntico ao das bandas do hóspede puro. Por último, a cavidade de tamanho intermédio exibida pela β CD origina normalmente casos intermédios. Desta forma, as alterações relativamente pequenas promovidas pela inclusão em β - e γ CD oferecem informação limitada no que diz respeito ao processo de inclusão. Em contraste, os compostos de inclusão em α CD revelam-se muito mais interessantes, uma vez que as grandes alterações espectrais associadas ao processo de inclusão fornecem informação relevante quanto à geometria de inclusão do composto.

Apesar de não ser possível efectuar uma associação directa entre o espectro de Raman de um composto e a sua geometria de inclusão, a observação das alterações nos valores de número de onda e na intensidade das bandas pode fornecer algumas pistas úteis relativamente aos contactos intermoleculares preferenciais. A relevância dos possíveis contactos intermoleculares também pode ser avaliada por métodos computacionais⁶⁴ e comparada com estruturas de raios-X conhecidas para compostos semelhantes, apresentando a mesma estequiometria hospedeiro:hóspede. A utilização

concertada dos dados disponíveis através de diferentes fontes, permite a proposta de estruturas prováveis para os compostos de inclusão em α CD.

3MeOPh

De acordo com os resultados obtidos pela análise TG/DSC, a estequiometria do composto de inclusão com 3MeOPh é de 2:3. Por outro lado, o espectro de Raman do composto α CD•3MeOPh apresenta o desdobramento dos modos γ_{C_1-O} (244 cm^{-1}) e $\nu_{\text{anel}}\text{ C-H}$ (3064 cm^{-1}). Tal como referido anteriormente, estes desdobramentos podem ser atribuídos ou a um efeito intramolecular (como por exemplo um efeito de ressonância de Fermi) ou a um efeito intermolecular (implicando a existência de moléculas de hóspede em duas posições não equivalentes). É improvável que ocorra ressonância de Fermi num modo de número de onda baixo (embora possível), enquanto a presença de moléculas de hóspede em duas posições não equivalentes está de acordo com a estequiometria determinada de 2:3. Uma situação semelhante – estequiometria 2:3 e moléculas hóspede em duas posições não equivalentes – já foi determinada por técnicas de raios-X para um composto semelhante, α CD•3-Bromofenol.⁵⁸ De acordo com estas observações, a geometria de inclusão proposta para o composto α CD•3MeOPh é ilustrada pela **Figura 5.11**. Esta proposta baseia-se nos dados térmicos e vibracionais, discutidos nas secções anteriores para este composto, em cálculos DFT e na estrutura de raios-X do α CD•3-Bromofenol,⁵⁸ retirada da CSD (Cambridge Structural Database).

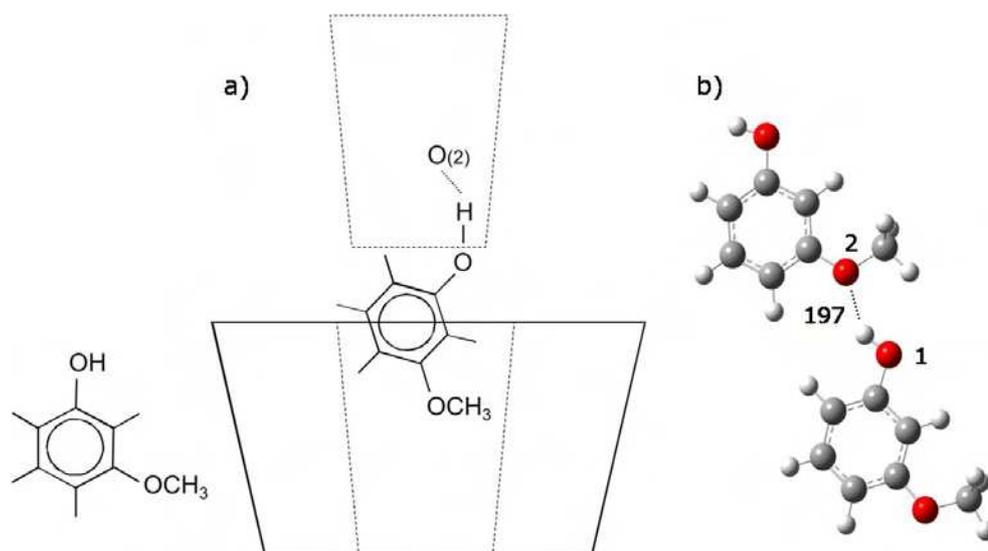


Figura 5.11 – a) Representação esquemática da estrutura do composto α CD•3MeOPh (estequiometria 2:3) e b) estrutura otimizada do par molecular construído com base na interação intermolecular $O_{(2)}\cdots H-O_{(1)}$. A distância calculada para $O\cdots H$ (em pm) está também incluída.

No cristal de α CD•3-Bromofenol, as moléculas de 3-Bromofenol posicionadas no interior da cavidade estão ligadas entre si por ligações de hidrogénio do tipo $O-H\cdots Br$, com distâncias $H\cdots Br$ de *ca.* 200 pm. As moléculas de 3-Bromofenol localizadas no exterior da cavidade não estabelecem contactos entre si e estão ligadas por intermédio de ligações de hidrogénio a moléculas de CD vizinhas, através do grupo hidroxilo. Tal como se ilustra na **Figura 5.11b**, a geometria calculada para o dímero isolado de 3MeOPh, apresenta a geometria exacta que é necessária para se ajustar à posição no interior da cavidade numa estrutura cristalina idêntica à do α CD•3-Bromofenol.

Baseado na força relativa dos contactos por ligações de hidrogénio e nas restrições estéricas à volta do grupo fenilo, atribuem-se como mais prováveis as bandas 249 cm^{-1} (γ_{C_1-O}) e 3090 cm^{-1} (ν_{C-H}) à molécula de 3MeOPh no interior da cavidade. De forma semelhante, as bandas a 238 cm^{-1} (γ_{C_1-O}) e 3068 cm^{-1} (ν_{C-H}) são atribuídas à molécula de 3MeOPh localizada no exterior da cavidade.

2MeOPh

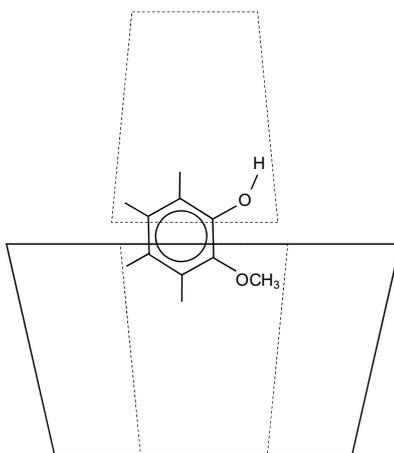


Figura 5.12 – Estrutura esquemática do composto de inclusão α CD•2MeOPh (estequiometria 2:1).

As alterações espectrais promovidas pela inclusão de 2MeOPh em CD não são tão informativas como no caso anterior. Os desvios dos números de onda observados na região dos modos $\nu_{C-H_{anel}}$ indicam uma alteração assimétrica no ambiente do anel, que afecta mais o modo 8a que o modo 8b. A principal singularidade deste composto está relacionada com a quase inexistência de diferenças no espectro de Raman entre os compostos incluídos em α -, β - e γ CDs. Tal comportamento pode surgir da falta de restrições no composto de inclusão α CD devido à estequiometria 2:1. Uma possível geometria de inclusão, consistente com os dados disponíveis, encontra-se representada na **Figura 5.12**. Esta geometria, com uma relação de 2:1 (hospedeiro:hóspede), é explicada pela formação de um número

máximo de ligações de hidrogénio entre a molécula de 2MeOPh e as moléculas de α CD. O grupo hidroxilo pode estar envolvido em ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo primários do bordo maior (tal como observado para o feniletanol⁶⁵) ou com os átomos de oxigénio tipo-éter no interior da cavidade (como observado para o 4-Fluorofenol⁵¹). Esta última possibilidade encontra-se representada na **Figura 5.12**.

3MePh

Tal como referido anteriormente, o processo de inclusão origina um desdobramento de quatro modos vibracionais distintos do hóspede: γ_{C_3-Me} , γ_{C_1-O} , $\beta_{C_{anel}}$ e $\nu_{C-H_{anel}}$. Embora seja possível que este desdobramento resulte de efeitos intramoleculares tais como ressonância de Fermi, a propagação dos modos desdobrados ao longo de toda a gama espectral é uma forte indicação da existência de dois ambientes químicos sentidos pelo hóspede, no composto de inclusão α CD•3MePh.

Também como mencionado anteriormente, tanto o composto α CD•3-Nitrofenol como o α CD•álcool benzílico apresentam uma estequiometria de 1:2, com uma molécula de hóspede no espaço interior da cavidade e outra molécula localizada no exterior da cavidade da CD, “entalada” entre duas moléculas de CD vizinhas. As estruturas de raios-X destes compostos estão na base da geometria de inclusão proposta para o α CD•3MePh, representada na **Figura 5.13**.

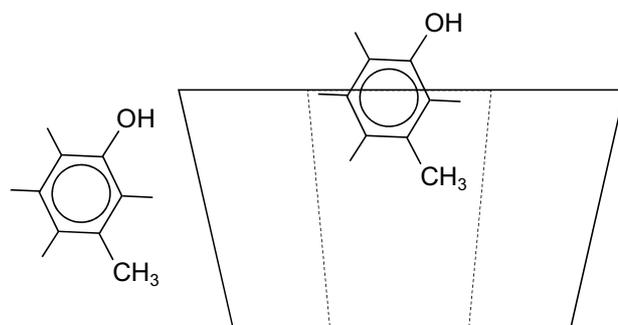


Figura 5.13 – Estrutura esquemática do composto de inclusão α CD•3MePh (estequiometria 1:2).

A estrutura cristalina do hóspede puro 3MePh⁵³ revela a existência de interações intermoleculares fortes do tipo O-H...O. Por seu lado, os valores elevados de número de onda exibidos pelo modo vibracional γ_{C_1-O} aquando da inclusão (ver **Figura 5.8**) sugerem que interações fortes, idênticas às que ocorrem no hóspede puro, poderão igualmente ser encontradas no composto de inclusão, estabelecidas entre o hóspede e a CD. No caso dos compostos α CD•3-Nitrofenol e α CD•álcool benzílico, a molécula de hóspede localizada fora da cavidade é descrita como fracamente

ligada e apresenta uma desordem estatística superior. A possível atribuição das bandas desdobradas observadas no composto α CD•3MePh (sumariadas na **Tabela 5.6**) é baseada no pressuposto de que a molécula de 3MePh incluída na cavidade encontra-se mais firmemente ligada ao hospedeiro do que a molécula no espaço extra-cavidade.

Tabela 5.6 – Valores de número de onda (cm^{-1}) e possível atribuição para as bandas desdobradas observadas no composto de inclusão α CD•3MePh.

Modo Vibracional	Número de onda (cm^{-1})		
	Hóspede puro	Intra-cavidade	Extra-cavidade
γ C ₃ -Me	216	225	207
γ C ₁ -O	244	249	239
β C-C _{anel}	541	545	538
ν C-H _{anel}	3054	3068	3046

ν - alongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano;

5.3. Conclusões

Os resultados combinados de espectroscopia de Raman, cálculos DFT e análise por DSC e TG, permitem uma descrição consistente dos compostos de inclusão de alguns derivados do fenol em α -, β - e γ CDs no estado sólido. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com outros trabalhos envolvendo inclusão de compostos aromáticos em CDs,^{41, 43, 45, 48} e fornecem informações adicionais relativamente ao processo de inclusão. Nomeadamente, no que diz respeito à identificação de diferentes ambientes químicos sentidos pelas moléculas hóspede, detectados pelo desdobramento de diversos modos distintos no espectro experimental e apoiados por resultados termogravimétricos.

Os dados obtidos por análises de DSC e TG sugerem que a estequiometria destes compostos de inclusão varia entre 2:1 e 1:2, dependendo não só do tamanho da cavidade do hospedeiro, como também das características estruturais do hóspede. Para a maioria dos hóspedes estudados neste trabalho, a inclusão em β - e γ CD origina estequiometrias de 1:1 e 1:2, respectivamente (sendo a exceção uma estequiometria de 1:2 determinada para β CD•3MePh).

A inclusão na γ CD provoca pequenas alterações relativamente ao espectro do hóspede puro, provavelmente devido às pequenas restrições impostas pela cavidade de maior dimensão. No caso dos

compostos de inclusão em α CD, foram obtidas estequiometrias diferentes: 1:2 e 2:3 para os hóspedes com substituintes na posição *meta* e 2:1 para a molécula com substituinte na posição *orto*.

As características espectrais observadas em regiões bem caracterizadas do espectro de Raman das moléculas hóspede incluídas nas CDs foram justificadas em termos de interações específicas entre o hóspede e o hospedeiro. Adicionalmente, o comportamento distinto das três moléculas hóspede consideradas relativamente à inclusão em α CD foi associado às dimensões e posição do grupo substituinte no anel do fenol.

5.4. Referências

1. É. Fenyvesi, L. Szente, N. R. Russel, M. Mcnamara, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3*, p. 305-366, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
2. J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1753.
3. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, E. Herdtweck, J. J. C. Teixeira-Dias, Solid state inclusion compound of S-ibuprofen in β -cyclodextrin: structure and characterisation, *New J. Chem.* **2003**, *27*, 597-601.
4. S. S. Braga, T. Aree, K. Imamura, P. Vertut, I. Boal-Palheiros, W. Saenger, J. J. C. Teixeira-Dias, Structure of the β -Cyclodextrin-p-Hydroxybenzaldehyde Inclusion Complex in Aqueous Solution and in the Crystalline State, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *43*, 115-125.
5. L. Cunha-Silva, J. J. C. Teixeira-Dias, Solid State Inclusion of the Nonionic Surfactant C₁₂E₄ in β -Cyclodextrin, at Various Humidities: A Combined Raman and ¹³C CP MAS NMR Study, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 3323-3328.
6. M. V. Rekharsky, Y. Inoue, Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-1918.
7. S. S. Braga, P. Ribeiro-Claro, M. Pillinger, I. S. Gonçalves, A. C. Fernandes, F. Pereira, C. C. Romão, P. B. Correia, J. J. C. Teixeira-Dias, Interactions of Omeprazole and Precursors with β -Cyclodextrin Host Molecules, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2003**, *47*, 47-52.
8. S. S. Braga, P. Ribeiro-Claro, M. Pillinger, I. S. Gonçalves, F. Pereira, A. C. Fernandes, C. C. Romão, P. B. Correia, J. J. C. Teixeira-Dias, Encapsulation of sodium nimesulide and precursors in β -cyclodextrin, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 873-878.
9. A. M. M. d. Silva, J. M. A. Empis, J. J. C. Teixeira-Dias, Inclusion of carvone enantiomers in cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin): thermal behaviour and H-D and D-H exchange, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2501-2504.
10. A. Harada, Cyclodextrin-Based Molecular Machines, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 456-464.
11. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, P. Ribeiro-Claro, A. D. Lopes, M. Pillinger, J. J. C. Teixeira-Dias, J. Rocha, C. C. Romão, Encapsulation of Cyano(cyclopentadienyl) Complexes of Iron with β -cyclodextrin, *Supramol. Chem.* **2002**, *14*, 359-366.
12. J. A. Fernandes, S. Lima, S. S. Braga, M. Pillinger, J. E. Rodríguez-Borges, P. Ribeiro-Claro, J. J. C. Teixeira-Dias, I. S. Gonçalves, Experimental and Theoretical Study of the Encapsulation of a Linear Oligo(ferrocenylsilane) Trimer with β -Cyclodextrin, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 4729-4734.
13. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, M. Pillinger, P. Ribeiro-Claro, J. J. C. Teixeira-Dias, Experimental and theoretical study of the interaction of molybdenocene dichloride (Cp₂MoCl₂) with β -cyclodextrin, *J. Organomet. Chem.* **2001**, *632*, 11-16.

14. S. Lima, I. S. Goncalves, P. Ribeiro-Claro, M. Pillinger, A. D. Lopes, P. Ferreira, J. J. C. Teixeira-Dias, J. Rocha, C. C. Romao, Interactions of Cationic and Neutral Molybdenum Complexes with β -Cyclodextrin Host Molecules, *Organometallics* **2001**, *20*, 2191-2197.
15. J. A. Fernandes, S. Lima, S. S. Braga, M. Pillinger, P. Ribeiro-Claro, J. E. Rodriguez-Borges, A. D. Lopes, J. J. C. Teixeira-Dias, I. S. Goncalves, Inclusion Complexation of Dimeric and Trimeric Oligo(ferrocenyldimethylsilanes) with γ -Cyclodextrin, *Organometallics* **2005**, *24*, 5673-5677.
16. S. H. Toma, M. Uemi, S. Nikolaou, D. M. Tomazela, M. N. Eberlin, H. E. Toma, {trans-1,4-Bis[(4-pyridyl)ethenyl]benzene}(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) Complexes and Their Supramolecular Assemblies with β -Cyclodextrin, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 3521-3527.
17. F. Hapiot, S. Tilloy, E. Monflier, Cyclodextrins as Supramolecular Hosts for Organometallic Complexes, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 767-781.
18. L. Barr, P. G. Dumanski, C. J. Easton, J. B. Harper, K. Lee, S. F. Lincoln, A. G. Meyer, J. S. Simpson, Cyclodextrin Molecular Reactors, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2004**, *50*, 19-24.
19. T. Nagai, H. Ueda, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3, p. 441-450, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
20. A. R. Hedges, Industrial Applications of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2035-2044.
21. M. M. D. Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033-1046.
22. J. Snopek, E. Smolková-keulemansová, T. Cserhádi, A. M. Stalcup, K. H. Gahm, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3, p. 516-571, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
23. J. Szejtli, Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes, *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 575-587.
24. Z. Juvancz, J. Szejtli, The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 379-388.
25. B. Chankvetadze, Combined approach using capillary electrophoresis and NMR spectroscopy for an understanding of enantioselective recognition mechanisms by cyclodextrins, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 337-347.
26. E. Schneiderman, A. M. Stalcup, Cyclodextrins: a versatile tool in separation science, *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 83-102.
27. R. Bar, in *Comprehensive supramolecular Chemistry*, Vol. 3, p. 423-440, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
28. M. Singh, R. Sharma, U. C. Banerjee, Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 341-359.
29. C. M. Fernandes, M. Teresa Vieira, F. J. B. Veiga, Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrins inclusion compounds, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 79-88.

30. T. Van Hees, G. Piel, S. H. de Hassonville, B. Evrard, L. Delattre, Determination of the free/included piroxicam ratio in cyclodextrin complexes: comparison between UV spectrophotometry and differential scanning calorimetry, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 347-353.
31. T. Loftsson, Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *44*, 63-67.
32. J. Li, X. J. Loh, Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery, *Adv. Drug Del. Rev.* **2008**, *60*, 1000-1017.
33. A. Vyas, S. Saraf, S. Saraf, Cyclodextrin based novel drug delivery systems, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2008**, *62*, 23-42.
34. K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, Cyclodextrin Drug Carrier Systems, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045-2076.
35. H. Hashimoto, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3*, p. 483-502, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
36. L. Szente, J. Szejtli, Cyclodextrins as food ingredients, *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 137-142.
37. P. Lo Nostro, L. Fratoni, P. Baglioni, Modification of a Cellulosic Fabric with β -Cyclodextrin for Textile Finishing Applications, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *44*, 423-427.
38. H. J. Buschmann, D. Knittel, E. Schollmeyer, New Textile Applications of Cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2001**, *40*, 169-172.
39. H. Hashimoto, Present Status of Industrial Application of Cyclodextrins in Japan, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *44*, 57-62.
40. A. Tonelli, Cyclodextrins as a means to nanostructure and functionalize polymers, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2008**, *60*, 197-202.
41. A. M. Amado, A. M. M. d. Silva, P. J. A. Ribeiro-Claro, J. J. C. Teixeira-Dias, Meta-Substituted styrene molecules included in cyclodextrins: a Raman Spectroscopic study, *J. Raman Spectrosc.* **1994**, *25*, 599-605.
42. J. C. Netto-Ferreira, L. M. Ilharco, A. R. Garcia, L. F. Vieira Ferreira, Characterization of Solid Complexes between Aromatic Ketones and β -Cyclodextrin Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy, *Langmuir* **2000**, *16*, 10392-10397.
43. P. J. A. Ribeiro-Claro, A. M. Amado, J. J. C. Teixeira-Dias, Substituted Styrene Molecules Included in Cyclodextrins: a Raman Spectroscopic Study. Part II, *J. Raman Spectrosc.* **1996**, *27*, 155-161.
44. L. Szente, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3*, p. 253-278, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
45. A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Selection of substituted benzaldehyde conformers by the cyclodextrin inclusion process: a Raman spectroscopic study, *J. Raman Spectrosc.* **2000**, *31*, 971-978
46. T. Iliescu, M. Baia, V. Miclaus, A Raman spectroscopic study of the diclofenac sodium- β -cyclodextrin interaction, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *22*, 487-495.
47. B. Rossi, P. Verrocchio, G. Vilianni, G. Scarduelli, G. Guella, I. Mancini, Vibrational properties of inclusion complexes: The case of indomethacin-cyclodextrin, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 044511.

48. P. J. A. Ribeiro-Claro, A. M. A. d. Costa, M. L. Vueba, M. E. Pina, A. M. Amado, Para-halogenated benzaldehyde molecules included in cyclodextrins: a combined spectroscopic and thermal analysis, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 472–479.
49. A. M. M. d. Silva, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, J. Empis, J. J. C. Teixeira-Dias, β -Cyclodextrin Complexes of Benzaldehyde, Vanillin and Cinnamaldehyde: A Raman Spectroscopic Study, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 677-684.
50. L. Szenté, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3*, p. 243-252, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
51. M. Shibakami, A. Sekiya, X-ray Crystallographic study of fluorine atom effect on guest orientation inside the α -Cyclodextrin cavity, *J. Chem. Soc., Chem Commun.* **1992**, 1742-1743.
52. P. D. Ross, M. V. Rekharsky, Thermodynamics of Hydrogen Bond and Hydrophobic Interactions in Cyclodextrin Complexes, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2144-2154.
53. C. Bois, Structure du m-cresol, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1973**, *29*, 1011-1017.
54. X.-T. Li, J.-H. Li, G.-E. Zhang, G.-X. Xi, X.-D. Lou, Kinetic studies on the thermal dissociation of [beta]-cyclodextrin-anisaldehyde inclusion complex, *Thermochim. Acta* **1995**, *262*, 165-173.
55. G. Bettinetti, C. Novák, M. Sorrenti, Thermal And Structural Characterization of Commercial α -, β -, and γ -Cyclodextrins, *J. Therm. Anal. Cal.* **2002**, *68*, 517-529.
56. L. R. Nassimbeni, Structure–reactivity relations of inclusion compounds, *Cryst. Eng. Comm.* **2003**, *5*, 200-203.
57. F. Giordano, C. Novak, J. R. Moyano, Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds, *Thermochim. Acta* **2001**, *380*, 123-151.
58. S. Kamitori, Y. Toyama, O. Matsuzaka, Crystal structures of cyclomaltohexaose ([α]-cyclodextrin) complexes with p-bromophenol and m-bromophenol, *Carbohydrate Research* **2001**, *332*, 235-240.
59. K. Harata, H. Uedaira, J. Tanaka, The structure of the cyclodextrin complex. VI. The crystal structure of alfa-cyclodextrin-m-Nitrophenol (1:2) Complex, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 1627-1634.
60. T. Steiner, K. Geler, Aromatic molecules included into and contacting the outer surface of cyclomaltohexaose ([α]-cyclodextrin): crystal structure of [α]-cyclodextrin-(benzyl alcohol)₂-hexahydrate, *Carbohydr. Res.* **1994**, *260*, 27-38.
61. K. H. Jogun, J. M. MacLennan, J. J. Stezowski, *Eur. Cryst. Meeting* **1979**, *5*, 34.
62. M. M. Nolasco, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Spectroscopic and thermal studies on the inclusion of trans-cinnamic acid and a number of its hydroxyl-derivatives with α , β and γ -cyclodextrins molecules, *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40*, 687-695.
63. K. Harata, K. Uekama, M. Otagiri, F. Hirayama, H. Ogino, The structure of the Cyclodextrin Complex. X. Crystal Structure of α -Cyclodextrin-Benzaldehyde (1:1) Complex Hexahydrate, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 1954-1959.

64. M. M. Nolasco, A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, Computationally-Assisted Approach to the Vibrational Spectra of Molecular Crystals: Study of Hydrogen-bonding and Pseudo-Polymorphism, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 2150-2161.
65. K. Harata, The structure of the Cyclodextrin Complex. XII. Crystal structure of α -Cyclodextrin-1-Phenylethanol (1:1) Tetrahydrate, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 1367-1371.

Capítulo 6

**Análise de sólidos farmacêuticos por
espectroscopia de Raman intensificada à
superfície (SERS)**

CONTEÚDO

Resumo	165
6.1. Características Gerais da Espectroscopia de Raman intensificada à superfície	166
6.1.1. Factores que influenciam a intensificação SERS.....	169
NATUREZA DO ADSORVATO	169
NATUREZA E MORFOLOGIA DO METAL	169
6.1.2. Mecanismos de intensificação	170
ELECTROMAGNÉTICO (EM)	171
QUÍMICO OU DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA (CT)	172
6.1.3. Técnicas de aquisição de espectros experimentais.....	174
6.2. Detecção de processos CT nos espectros SERS de sólidos farmacêuticos.....	175
6.2.1. Ácido trans-3-Hidroxicinâmico.....	175
6.2.1.1. Resultados e discussão	176
6.2.2. 5-Fluorouracil	182
6.2.2.1. Resultados e discussão	183
6.3. Conclusão	191
6.4. Referências.....	192

RESUMO

Neste Capítulo pretende-se descrever a análise dos espectros SERS de dois compostos farmacêuticos, utilizando duas técnicas distintas de aquisição. Numa primeira parte, os espectros SERS do ácido *trans*-3-hidroxicinâmico adsorvido em colóides de prata foram analisados de forma a detectar processos ressonantes de transferência de carga semelhantes a mecanismos de ressonância de Raman, envolvendo a transferência foto-induzida de um electrão do metal para o adsorvato. Foram calculadas intensidades SERS baseadas no mecanismo de transferência de carga para as espécies neutra, aniónica e dianiónica e foi determinado que a espécie activa em SERS corresponde ao ião hidroxicinamato ligado ao metal através do grupo carboxilato. Adicionalmente, foi demonstrado que o mecanismo de transferência de carga está presente nos espectros SERS, o que explica a forte intensificação da banda *ca.* 1600 cm⁻¹, atribuída ao modo vibracional 8a.

Seguidamente, os espectros SERS do 5-Fluorouracilo registados sob diversas condições experimentais, foram igualmente analisados de acordo com um mecanismo ressonante de transferência de carga, envolvendo a transferência foto-induzida de um electrão de um nível Fermi do metal para orbitais livres do adsorvato. De forma a detectar o mecanismo de intensificação e identificar qual a espécie química que origina o espectro, as intensidades teóricas para processos de transferência de carga foram determinadas para as formas di-enólica e di-cetónica e para os respectivos aniões N1 e N3 (resultantes da perda de um protão nos átomos de azoto na posição 1 e 3, respectivamente) e comparadas com os resultados experimentais. Desta forma, a presença do anião N1 foi confirmada no espectro SERS uma vez que as intensidades calculadas prevêm a intensificação selectiva da banda *ca.* 1680 cm⁻¹, consistente com os resultados experimentais, o que reforça a relevância do papel desempenhado pelo mecanismo de transferência de carga nos espectros SERS.

6.1. Características Gerais da Espectroscopia de Raman intensificada à superfície

A descoberta da espectroscopia SERS (*Surface-enhanced Raman Scattering*, SERS na sigla em inglês) ocorreu de forma casual por *Fleischmann, Hendra e McQuillan* em 1974¹ ao tentarem registrar o espectro de Raman da piridina adsorvida sobre um eléctrodo de prata submetido a vários ciclos de oxidação-redução, tendo sido obtido um espectro inexplicavelmente intenso. Este fenómeno consiste essencialmente na extraordinária intensificação que ocorre no espectro de Raman de algumas moléculas quando se encontram nas proximidades de determinadas superfícies metálicas rugosas. As intensificações detectadas em SERS, embora sejam estimadas num factor médio de 6 ordens de magnitude, podem ser muito variadas e dependem de numerosos factores, tais como a natureza da molécula em estudo, a natureza e morfologia do metal e as condições experimentais do registo. Em condições favoráveis, a intensificação SERS pode ser suficiente para observar o sinal de Raman de uma única molécula, o que implica intensificações de 14 ordens de magnitude.

A descoberta do fenómeno SERS forneceu o estímulo necessário ao estudo de difusão óptica intensificada em interfaces e possibilitou o aparecimento de um novo campo de espectroscopia intensificada de superfície que inclui a intensificação à superfície de geração de 2ª harmónica (*Surface-enhanced Second-harmonic Generation*, SE-SHG na sigla em inglês), espectroscopia de infravermelho intensificada à superfície (*Surface-enhanced Infrared Spectroscopy*, SEIRS na sigla em inglês), fluorescência intensificada à superfície (*Surface-enhanced Fluorescence*, SEF na sigla em inglês) e intensificação à superfície de geração de soma de frequências (*Surface-enhanced Sum Frequency Generation*, SE-SFG na sigla em inglês).² Adicionalmente, a descoberta deste fenómeno forneceu uma sonda de diagnóstico *in situ* ultra-sensível na determinação da estrutura detalhada e orientação das moléculas à superfície que é amplamente aplicada em interfaces biológicas, catalíticas e electroquímicas.^{3,4}

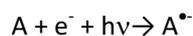
No âmbito da espectroscopia SERS, desenvolveram-se outras técnicas baseadas no mesmo princípio fundamental das quais se destacam a espectroscopia SERS de moléculas isoladas (*single molecule SERS*, SM-SERS na sigla em inglês), a espectroscopia de hiper-Raman intensificada à superfície (*Surface-enhanced Hyper-Raman Spectroscopy*, SEHRS na sigla em inglês), a espectroscopia de ressonância de Raman intensificada à superfície (*Surface-enhanced Resonance Raman Spectroscopy*, SERRS na sigla em inglês), a espectroscopia de Raman intensificada numa ponta (*Tip-enhanced Raman Spectroscopy*, TERS na sigla em inglês) e SERS com excitação ultravioleta (*ultraviolet-excited SERS*, UV-SERS na sigla em inglês).

Através de inúmeras investigações nesta área, *Campion*⁵ resumiu as características específicas de todos os tipos de espectros SERS nos seguintes pontos:

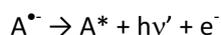
1. É possível obter espectros SERS de uma grande quantidade de moléculas adsorvidas na superfície de relativamente poucos metais.
2. É necessário que as superfícies sejam rugosas e a maior contribuição é devida à rugosidade sub-microscópica (de dimensões entre 10 e 100 nm) ou atômicas (vértices, defeitos, etc.) dependendo do sistema.
3. O fenómeno de intensificação pode propagar-se a grandes distâncias da superfície metálica, dependendo da topografia da mesma. Foi possível observar uma intensa difusão de Raman em moléculas separadas dezenas de nanómetros do metal.
4. Os perfis de excitação (dependência da intensidade de uma banda com a frequência excitatriz) desviam-se significativamente do comportamento de Raman normal, o que indica a existência de um fenómeno de ressonância.
5. As intensidades das bandas SERS diminuem, geralmente, com o aumento da frequência vibracional.
6. As bandas SERS são completamente despolarizadas.
7. As moléculas adsorvidas directamente sobre o metal são, em alguns casos, distinguíveis daquelas que são adsorvidas em camadas adjacentes, caracterizando-se por deslocamentos vibracionais, aparecimento de novas bandas e por factores de intensificação maiores.
8. As regras de selecção de Raman estão relaxadas, originando em alguns casos o aparecimento de modos que são normalmente inactivos, tanto em IV como em Raman.
9. Em eléctrodo, as frequências vibracionais e os perfis de excitação são função do potencial eléctrico aplicado em cada experiência electroquímica. Os perfis de excitação de modos distintos podem ser diferentes.
10. Os espectros SERS exibem um fundo de difusão inelástica contínuo e débil, mesmo na ausência de espécies adsorvidas.

Da análise dos espectros SERS é possível extrair informações relativas à adsorção de uma molécula na superfície de um metal e ao processo de intensificação observado. De uma forma geral, quando uma molécula interage com uma superfície metálica, são observadas alterações na frequência e intensidade relativa das bandas nos espectros de Raman e SERS. A maioria dos trabalhos anteriores relativos a SERS de compostos aromáticos⁶⁻⁸ interpreta estes factos experimentais do ponto de vista

do mecanismo electromagnético (*Electromagnetic mechanism*, EM na sigla em inglês). Este mecanismo permite-nos deduzir a orientação molecular do adsorvato em relação à superfície metálica. Por este motivo, as regras de selecção para SERS do mecanismo EM⁸ relacionam a orientação molecular perpendicular ou paralela à superfície de uma molécula planar com a intensificação de modos normais no plano e fora do plano, respectivamente. No entanto, este mecanismo não explica a intensificação selectiva demonstrada por algumas bandas que correspondem a modos com a mesma simetria nem explica o papel do potencial de eléctrodo nas intensidades relativas. Este comportamento complexo é muitas vezes causado pela presença do denominado mecanismo de transferência de carga (*Charge-transfer*, CT na sigla em inglês) – ver detalhes relativos a estes dois mecanismos na Secção 6.1.2. Uma das questões mais pertinentes e difíceis de responder em SERS é precisamente identificar qual dos dois mecanismos de intensificação, EM ou CT, está envolvido na intensificação selectiva observada e de que forma contribui cada um para um determinado registo. Esta é uma controvérsia antiga e o grupo de investigação do Professor Otero tem vindo a desenvolver uma metodologia para detectar a presença de processos CT num espectro SERS.⁹⁻¹¹ De uma forma simples, a abordagem consiste em assumir que o mecanismo de intensificação do sinal SERS por transferência de carga (SERS-CT) é análogo a um processo de ressonância de Raman (RR).¹² O fóton incidente ($h\nu$) produz a transferência ressonante de um electrão do metal para orbitais vazias da molécula adsorvida (A) conduzindo à formação do correspondente radical aniónico ($A^{\bullet-}$) de moléculas neutras:



Quando o electrão regressa ao metal, um fóton é emitido com $h\nu'$ (sendo $\nu' < \nu$, se a molécula permanece excitada, A^*):



Este mecanismo CT permite-nos prever a intensificação selectiva das bandas de acordo com o formalismo proposto por *Albrecht et. al.* para RR.¹² De acordo com trabalhos anteriores deste grupo de investigação⁹⁻¹¹ a principal característica dos espectros SERS-CT de moléculas aromáticas é a forte intensificação da banda correspondente ao modo 8a, registada *ca.* 1600 cm^{-1} . Considerando a metodologia proposta, é possível explicar a intensificação selectiva observada nos espectros SERS de diferentes moléculas aromáticas tais como pirimidina,¹⁰ piridina,¹³ pirazina¹⁴ e outros derivados metilados.^{9, 15-17}

6.1.1. Factores que influenciam a intensificação SERS

A maior ou menor intensificação do sinal de Raman quando se regista um espectro na presença de uma superfície metálica depende de vários factores, entre os quais se destacam:

- ✓ Natureza do metal e do adsorvato;
- ✓ Morfologia e potencial eléctrico da superfície;
- ✓ Energia e excitação laser;
- ✓ Presença de determinados iões em solução (o electrólito utilizado pode competir com a amostra em estudo);
- ✓ Temperatura;
- ✓ pH;
- ✓ Volume total da amostra.

NATUREZA DO ADSORVATO

A espectroscopia SERS tem sido aplicada ao estudo de substâncias inorgânicas e orgânicas, sendo superior o número de trabalhos publicados relativamente ao segundo caso. Geralmente é necessário que a molécula possua um centro capaz de interagir com a superfície do metal, como a nuvem electrónica de um sistema conjugado, os pares de electrões livres de um átomo ou um grupo funcional com excesso de carga negativa. A intensidade SERS depende da afinidade entre o adsorvato e a superfície (traduzindo-se numa interacção directa mediante um mecanismo de adsorção físico ou químico) e da resposta que é capaz de produzir quando é excitado por um laser nas condições da experiência. Geralmente, o sinal SERS de uma determinada molécula depende da sua concentração. No entanto, se a emissão é produzida por moléculas em contacto directo com o metal, há a possibilidade de se produzir um efeito de saturação, mesmo a concentrações baixas. Uma característica essencial do fenómeno SERS é o grau de sensibilidade tão diferente e específico que pode demonstrar, dependendo da natureza do adsorvato, sendo por vezes difícil extrapolar um determinado comportamento.

NATUREZA E MORFOLOGIA DO METAL

O mesmo adsorvato pode exibir um grau de sensibilidade SERS muito diferente em função da natureza e método de preparação da superfície metálica. Foi possível comprovar num grande número

de experiências que o facto de um determinado adsorvato proporcionar espectros SERS intensos na superfície de um metal específico, não implica que produza necessariamente uma resposta semelhante se a natureza do metal for modificada, ou mesmo se o método de preparação de um colóide ou eléctrodo for alterado.

A maior ou menor capacidade de produzir espectros SERS intensos é estabelecida pelas características electrónicas do metal. Os mais adequados são os metais alcalinos e os metais nobres, mais especificamente a prata, que origina os espectros SERS mais intensos e tem sido o metal mais utilizado. Também se pode utilizar o cobre, ouro, lítio, potássio, alumínio e índio, por ordem decrescente de relevância SERS. Praticamente não se observa o efeito SERS quando se trata de uma superfície não rugosa e por isso as experiências mais frequentes realizam-se em colóides ou em eléctrodos submetidos a vários ciclos de oxidação-redução.

Num meio coloidal, as partículas em suspensão apresentam um certo número de imperfeições que podem ser observadas em fotografias de microscopia electrónica, nas quais se conclui que o sistema é formado por partículas aproximadamente esféricas que apresentam zonas de superfície irregular. Estas irregularidades aumentam por efeito de união entre partículas quando se adiciona o adsorvato, levando à formação de agregados de diferentes formas e cuja distribuição de tamanhos tem uma repercussão directa sobre o factor de amplificação do sinal e sobre as intensidades das bandas.

Um inconveniente relacionado com as experiências SERS está relacionado com uma certa falta de reprodutibilidade, devido à impossibilidade de obter uma superfície exactamente nas mesmas condições em experiências diferentes.

6.1.2. Mecanismos de intensificação

Uma teoria geral do fenómeno SERS deveria ser capaz de explicar adequadamente a origem da intensificação e das suas diferentes características. Desde a sua descoberta, têm sido propostos inúmeros modelos teóricos que se agrupam segundo o tipo de mecanismo em que se baseiam e, embora nos dias de hoje não exista uma teoria única que explique o fenómeno no seu conjunto, considera-se que existem duas contribuições fundamentais para a intensificação SERS:

1. Contribuição clássica ou electromagnética.
2. Contribuição não clássica, química ou de transferência de carga.

Estes mecanismos que se fundamentam em princípios completamente distintos, podem actuar de forma conjunta ou separada, dependendo das condições de cada experiência. A contribuição de

cada um deles para a intensificação SERS de uma molécula é uma questão de extrema importância que ainda não possui uma resposta definitiva. Na prática, embora se reconheça a importância dos dois mecanismos, os resultados são analisados exclusivamente tendo em conta apenas uma das contribuições (EM ou CT). Neste sentido, é necessário ter em consideração que o mecanismo CT afecta exclusivamente as moléculas em contacto directo com o metal, por ser um fenómeno de curto alcance, enquanto o mecanismo de intensificação EM é de longo alcance e pode chegar a afectar moléculas consideravelmente afastadas da superfície metálica. Ambas as contribuições constituem fenómenos ressonantes que intensificam o sinal de Raman através de mecanismos diferentes. O problema reside em detectar a presença ou ausência destes mecanismos e sobretudo em estabelecer a contribuição relativa de cada um na intensificação SERS observada, que pode variar, dependendo das condições experimentais.

	Mecanismo CT	Mecanismo EM
Origem	Processo ressonante onde participa a radiação incidente e transições CT do complexo metal-molécula (semelhante a um processo de RR).	Intensificação do campo eléctrico local devido ao acoplamento do fotão incidente com os plasmões de superfície do metal.
Rugosidade	Rugosidade à escala atómica.	Rugosidade a grande escala (10-200 nm).
Dependência com a distância	Efeito de curto alcance. Importante apenas para espécies directamente adsorvidas sobre a superfície metálica.	Efeito de longo alcance. Importante mesmo para espécies afastadas da superfície metálica.
Dependência com o potencial	A energia das transições CT pode ser modulada pelo potencial eléctrico aplicado. O factor de intensificação depende do potencial de eléctrodo.	O factor de intensificação não depende do potencial aplicado. As alterações de intensidade dos perfis de excitação devem-se a re-orientações da morfologia superficial com o potencial aplicado.
Dependência com a radiação incidente	A condição de ressonância depende do comprimento de onda da radiação incidente. O potencial ao qual se obtém uma intensidade máxima depende da energia do fotão incidente.	O factor de intensificação depende da constante dieléctrica do metal, a qual depende do comprimento de onda da radiação incidente.

ELECTROMAGNÉTICO (EM)

O mecanismo de intensificação EM considera que o campo eléctrico efectivo que incide sobre uma molécula é muito maior nas proximidades de uma superfície activa em SERS que na sua ausência.

A enorme intensificação produzida na presença de uma superfície rugosa pode ser explicada segundo o mecanismo EM como consequência de dois processos diferentes:

- a) À intensidade da radiação que incide directamente sobre a molécula de adsorvato, deve somar-se a radiação dispersa pelo metal, que tem a mesma frequência.
- b) O campo eléctrico associado à radiação de Raman dispersa é uma composição da radiação emitida directamente pela molécula e dispersa pelas partículas metálicas na sua vizinhança.

O campo disperso pelas partículas metálicas é fortemente intensificado quando a frequência da radiação incidente coincide com a frequência de ressonância dos plasmões superficiais do metal, ou seja, das oscilações dos electrões da banda de condução do metal. Desta forma, o metal actua como uma antena que amplifica tanto o campo da radiação incidente como a própria radiação de Raman dispersa pela molécula, sendo máxima a intensificação nas zonas de maior rugosidade. Este mecanismo explica a dependência do efeito SERS com a morfologia da superfície, a influência exercida pela distância à superfície metálica no factor de intensificação e a despolarização da dispersão elástica e inelástica gerada pelo sistema. No entanto, há duas características do fenómeno SERS que não são razoavelmente bem descritas por este mecanismo. A primeira é a dependência SERS com a natureza da molécula analisada. Neste mecanismo, o papel fundamental é desempenhado pelo metal, pela sua superfície, pelo que a intensificação observada deveria ser semelhante para duas moléculas distintas, o que não acontece experimentalmente. A segunda característica é a dependência observada das intensidades, especialmente as intensidades relativas, com o potencial de eléctrodo.

QUÍMICO OU DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA (CT)

Os cálculos teóricos baseados no mecanismo EM prevêm que a intensificação pode ocorrer inclusive em moléculas situadas a distâncias significativas da superfície metálica. Por outro lado, o mecanismo CT limita-se apenas às moléculas que se encontram adsorvidas directamente sobre o metal. Trata-se de um fenómeno limitado a espécies situadas na primeira camada de adsorção, com a consequente formação de uma ligação química com o metal. Se por um lado se considera que o mecanismo EM deve estar presente em todos os registos SERS, o mecanismo CT pode ou não actuar dependendo das propriedades do complexo superficial. Este mecanismo supõe que a formação do complexo superficial (M-A) entre a molécula em estudo (A) e o metal (M) pode apresentar novas transições electrónicas, diferentes das do metal e da molécula; transições semelhantes às observadas em alguns complexos inorgânicos. Estas novas transições electrónicas podem ter um carácter de

transferência de carga (CT) e podem ser excitadas por fótons visíveis normalmente utilizados em espectroscopia de Raman.

No processo de difusão de Raman, a molécula é excitada a um nível virtual, um estado com tempo de vida muito curto, uma vez que não corresponde a um estado estacionário (**Figura 6.1**). Se a energia do fóton incidente coincide ou se encontra muito próxima de uma transição electrónica permitida pelas regras de selecção, o sistema encontra-se em condições de ressonância de Raman (RR), na qual a molécula é excitada a um estado que normalmente coincide com o primeiro singlete excitado ($S_0 \rightarrow S_1$). Neste caso, o espectro de Raman é muito intenso. O mecanismo CT é muito semelhante ao RR, uma vez que a molécula é excitada a um novo estado estacionário CT e a intensidade do espectro registado nestas condições intensifica-se enormemente. Não obstante, o fenómeno de adsorção superficial é capaz de criar um novo estado de transferência de carga situado mais próximo ao nível fundamental S_1 . A diferença básica entre uma experiência Raman convencional e em condições de ressonância (RR ou SERS-CT) é o tempo que a molécula permanece transitoriamente excitada.

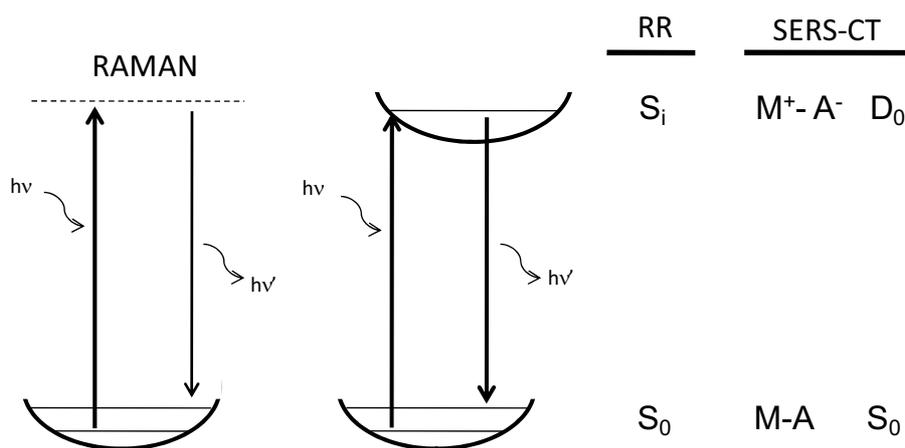


Figura 6.1 – Estados envolvidos nos mecanismos de Raman, ressonância de Raman (RR) e SERS em ressonância com estados de transferência de carga (SERS-CT) do complexo superficial M-A (figura adaptada de¹⁸).

O mecanismo químico ou de transferência de carga é capaz de explicar a dependência observada entre a intensificação selectiva de certas bandas SERS com a natureza da espécie química adsorvida e com o potencial eléctrico da interface. Este modelo pressupõe a existência de uma interacção directa entre o metal e o adsorvato, centrando-se exclusivamente sobre a primeira camada de moléculas em contacto directo com a superfície metálica. Nestas condições é possível que o sistema metal-molécula apresente novas transições electrónicas que sejam capazes de ser excitadas com a energia da radiação laser utilizada.

Estas novas bandas correspondem a transições electrónicas nas quais se produz uma transferência de carga metal-adsorvato ou adsorvato-metal e por isso são estados estacionários da molécula isolada. Se a energia desta transição coincide com a energia da radiação excitatriz estão preenchidas as condições de ressonância de Raman, produzindo-se a intensificação do sinal de Raman de certas bandas devido ao aumento da polarizabilidade molecular do adsorvato.

Na **Figura 6.2** é possível observar uma representação esquemática da transição induzida pela radiação incidente, de um electrão do metal para uma orbital vazia do adsorvato.

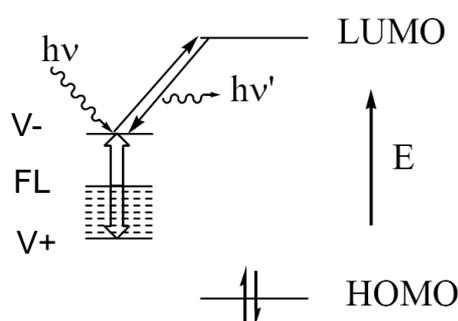


Figura 6.2 – Esquema do mecanismo CT para a transferência foto-induzida de um electrão do nível de Fermi do metal (FL – *Fermi level*) para orbitais vazias do adsorvato.¹⁸

6.1.3. Técnicas de aquisição de espectros experimentais

As experiências SERS podem ser realizadas em interfaces metal-electrólito ou metal-gás, embora os espectros SERS em metal-gás utilizem normalmente técnicas de ultra-vazio e um dispositivo experimental demasiado dispendioso. Por outro lado, os estudos em interfaces metal-electrólito em colóide ou em eléctrodo podem realizar-se num espectrómetro de Raman convencional com um sistema de iluminação e detecção no visível. O dispositivo experimental mínimo para trabalhos em eléctrodo requer um sistema electroquímico básico (célula adequada, potenciostato-galvanostato, programador e registo) enquanto para o registo de SERS em colóide é apenas necessária uma célula, geralmente de quartzo.

No caso de trabalhos com eléctrodo, o sistema iluminado pelo laser é composto pela superfície metálica devidamente tratada de forma a obter o grau de rugosidade adequado e uma dissolução aquosa do adsorvato que contém geralmente cloreto de potássio que actua como electrólito inerte. Este sistema é constituído por três eléctrodos: de trabalho, de referência e um eléctrodo indicador (por exemplo de platina) – ver Secção 9.9 do **Capítulo 9** para representação esquemática. O eléctrodo de trabalho (normalmente um disco de prata), sobre o qual incide o laser, tem que ser previamente

sujeito a um tratamento de oxidação-redução de forma a apresentar o grau de rugosidade pretendido.

Uma diferença fundamental entre as experiências realizadas em colóide (detalhes experimentais na Secção 9.8 do Capítulo 9) e em eléctrodo é o controlo da diferença de potencial eléctrico na interface. O fenómeno SERS é sensível a esta variável, tanto em relação à intensificação global do espectro de uma determinada molécula como em relação a intensidades relativas das bandas. No caso de se utilizar um eléctrodo, o potencial pode ser ajustado com um potenciostato, enquanto que em colóide o potencial eléctrico não é homogéneo em toda a amostra e pode variar com o envelhecimento da solução coloidal. A única forma de variar o potencial é através da adição de espécies iónicas, como o próprio BH_4^- utilizado no processo de obtenção do colóide.

6.2. Detecção de processos CT nos espectros SERS de sólidos farmacêuticos

6.2.1. Ácido *trans*-3-Hidroxicinâmico

O ácido hidroxicinâmico e seus derivados são vulgarmente encontrados no reino vegetal. Normalmente existem como ésteres de ácidos orgânicos, glicósidos ou estão ligados a proteínas ou outros polímeros celulares. Apenas uma pequena quantidade existe sob a forma de ácidos livres na natureza. No entanto, a ocorrência de tais compostos nos alimentos afecta um vasto conjunto de qualidades como a estabilidade, cor, sabor e mesmo o valor nutricional. Os compostos derivados do ácido hidroxicinâmico também possuem actividade biológica.¹⁹⁻²⁶ Ácidos fenólicos como o ácido cafeico, ferúlico, coumárico e seus análogos estão distribuídos na natureza e constituem uma classe de compostos com diversas propriedades farmacológicas tais como anti-oxidação, anti-trombose, anti-inflamatória, anti-viral e inibição ao vírus humano da imunodeficiência.²⁷⁻³¹

Neste trabalho, os espectros SERS em colóide de prata do ácido *trans*-3-hidroxicinâmico (t-3OHCIA, Figura 6.3) foram registados a pH=7 e pH=12 e analisados de acordo com o mecanismo de intensificação CT. Diversas espécies químicas de t-3OHCIA foram consideradas nas condições de pH utilizadas neste estudo: a molécula neutra, o anião carboxilato e o dianião carboxilato-alcoolato.

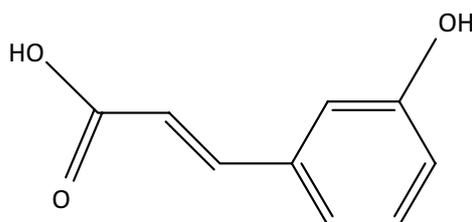


Figura 6.3 – Representação esquemática do ácido *trans*-3-hidroxicinâmico (t-3OHCIA).

De forma a identificar a espécie química activa em SERS, foram calculadas as suas intensidades em condições de transferência de carga ressonante e comparadas com os resultados experimentais. Adicionalmente, foi proposta uma atribuição vibracional empírica, baseada em cálculos DFT de campo de forças e em atribuições anteriores de moléculas semelhantes.

6.2.1.1. Resultados e discussão

O ácido *t*-3OHClA possui três estados diferentes de ionização: a espécie neutra (AH_2), o respectivo anião (AH^-) no qual o ácido carboxílico está ionizado e o dianião (A^{2-}) no qual o grupo hidroxilo perde o protão. Na **Figura 6.4** encontram-se representados os espectros de Raman de uma solução aquosa de *t*-3OHClA 1M a pH=7 e pH=14, bem como os espectros SERS em colóide de prata com concentração 10^{-4} M a pH=7 e pH=12 do *trans*-3-hidroxicinamato.

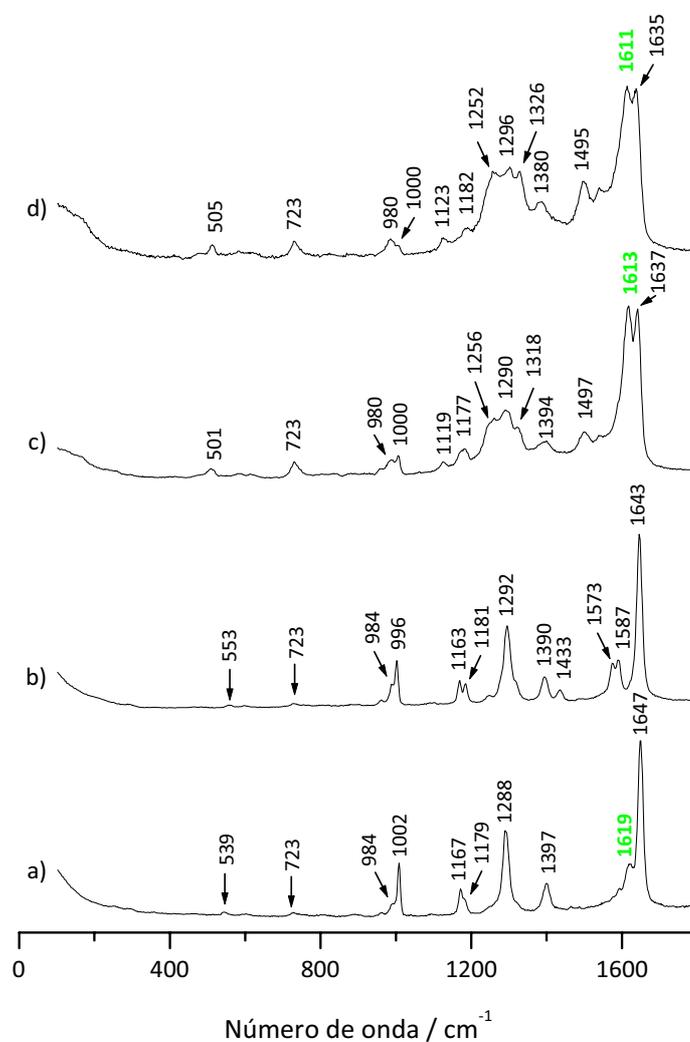


Figura 6.4 – Espectro de Raman de duas soluções aquosas 1 M de *trans*-3-hidroxicinamato **a)** pH=7, **b)** pH=14 e espectros SERS 10^{-4} M de soluções coloidais de prata **a)** pH=7 e **d)** pH=12 (modo **8a** a verde).

A estrutura geométrica das três espécies químicas (neutra, anião e dianião) do t-3OHClA foi otimizada ao nível B3LYP/6-31G* e os campos de forças e as frequências correspondentes a cada espécie foram também calculadas de forma a atribuir o espectro e confirmar a convergência para um mínimo no processo de otimização. Na **Tabela 6.1** estão representados os números de onda e atribuições propostas baseadas em cálculos de campos de forças e em atribuições encontradas na literatura.³²⁻³⁴

Tabela 6.1 – Atribuições vibracionais propostas para as bandas observadas nos espectros experimentais de Raman e SERS do *trans*-3-hidroxicinamato (números de onda em cm^{-1}).

Raman pH=7	Raman pH=14	SERS pH=7	SERS pH=12	Atribuição proposta
3072	3064	3108	3108	$\nu(\text{C-H})$
3038	3032	-	-	$\nu(\text{C-H})$
1647	1643	1637	1635	$\nu(\text{C=C})$
1619	-	1613	1611	8a; ν_{anel}
-	1587	-	-	8b; ν_{anel}
-	1573	-	-	$\nu(\text{CO})$ hidroxilo
-	-	1497	1495	19a; ν_{anel}
-	1433	-	-	19b; ν_{anel}
1397	1390	1394	1380	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1288	1292	1290	1296	$\beta(\text{C-H})$
-	-	1256	1252	$\nu(\text{C-H})$
1179	1181	1177	1182	$\beta(\text{C-H})$
1167	1163	-	-	$\beta(\text{C-H})$
1002	996	1000	1000	12; β_{anel}
984	984	980	980	17a; $\gamma(\text{C-H})$
-	-	723	723	$\beta(\text{COO}^-) + 1$; ν_{anel}
-	-	501	505	6a; β_{anel}

ν - alongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano

Da análise da **Figura 6.4**, é possível observar que não há diferenças significativas entre os números de onda dos dois espectros de Raman a pH=7 e pH=14. Ambos são caracterizados por bandas muito fortes a *ca.* 1640 cm^{-1} atribuídas ao modo $\nu\text{C=C}$ e por duas bandas médias registadas a 1290 e 1000 cm^{-1} atribuídas a $\beta\text{C-H}$ e ao modo 12 (na nomenclatura de Wilson para modos de anéis

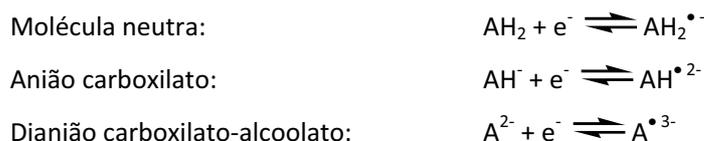
aromáticos), respectivamente. Apenas duas bandas de intensidade média, registadas a 1587 e 1573 cm^{-1} a $\text{pH}=14$ não aparecem no espectro a $\text{pH}=7$. Estas duas bandas são atribuídas aos modos 8b e νCO^- , respectivamente, com base nos cálculos de campo de forças. Esta última banda indica que o grupo hidroxilo se encontra desprotonado em solução a $\text{pH}=14$. Tendo em conta o valor de pK_{a1} para este composto ($\text{pK}_{a1}=4.5^{35}$), a forma aniónica é a espécie dominante em solução a $\text{pH}=7$ (com pouca contribuição da espécie neutra). Não existem dados na literatura relativos ao pK_a do grupo álcool, no entanto é de esperar que o valor de pK_{a2} para o *t*-3OHClA seja semelhante ao do fenol ($\text{pK}_a=10$) uma vez que o efeito indutivo em derivados substituídos diminui à medida que a distância entre os grupos polares e com carga aumenta. Assim sendo, a espécie dianiónica deve também estar presente em solução a $\text{pH}=14$.

De forma análoga, os dois espectros SERS são muito semelhantes e não são observadas alterações com a mudança de pH (**Figura 6.4**). Na região *ca.* 1600 cm^{-1} , são observadas duas bandas intensas a 1637 e 1613 cm^{-1} , atribuídas a $\nu\text{C}=\text{C}$ e 8a, respectivamente. Uma banda larga é registada na região 1250-1320 cm^{-1} e duas bandas são registadas a 723 e 501 cm^{-1} apresentando uma intensificação significativa, relativamente ao correspondente espectro de Raman.

Tal como se encontra indicado na **Tabela 6.1**, não se observam desvios significativos nos valores de número de onda dos espectros de Raman e SERS de modos atribuídos ao anel aromático. Consequentemente, é possível concluir que não existe nenhuma interacção metal-benzeno envolvida no processo de adsorção. Apenas as frequências correspondentes aos modos $\nu_s\text{COO}^-$ e $\nu\text{C}=\text{C}$ são desviadas para o vermelho indicando que a molécula interage através do grupo carboxilato com uma orientação perpendicular à superfície de prata, tal como anteriormente observado para outros ácidos carboxílicos.^{32, 33, 36}

Adicionalmente, uma vez que não são observadas diferenças significativas entre os dois espectros SERS, é possível deduzir que a mesma espécie química é responsável pelos espectros SERS em solução a $\text{pH}=7$ e $\text{pH}=12$. Tendo em conta que todas as alterações espectrais observadas entre os espectros de Raman e SERS são explicadas como resultado da adsorção e nenhuma banda invulgar é detectada, é possível concluir que não ocorrem transformações químicas no decorrer do processo de adsorção. Consequentemente, a principal diferença entre os espectros de Raman e SERS é a forte intensificação do modo 8a, uma vibração aromática de alongação dos grupos CC do anel, registada a 1613 e 1611 cm^{-1} nos espectros SERS a $\text{pH}=7$ e $\text{pH}=12$, respectivamente, registando uma intensidade semelhante à banda 1635 cm^{-1} , correspondente ao modo $\nu\text{C}=\text{C}$.

De forma a explicar a forte intensificação do modo 8a nos espectros SERS, foram calculadas as intensidades relativas previstas para três possíveis processos ressonantes de CT que podem ocorrer da seguinte forma:



As intensidades relativas previstas para estes processos ressonantes de transferência de carga foram calculadas tendo em conta os detalhes descritos na **Secção 9.14 do Capítulo 9**.

Na **Figura 6.5** estão representados três espectros SERS-CT correspondendo aos processos de transferência de carga envolvendo cada uma das espécies ionizadas bem como o espectro experimental SERS a pH=7. Os espectros calculados foram desenhados usando funções gaussianas com áreas proporcionais às intensidades relativas dos números de onda calculados. É possível observar que o espectro teórico correspondente ao anião AH^- reproduz o comportamento experimental, ou seja, a intensificação selectiva do modo 8a.

O resultado obtido para o dianião A^{2-} é caracterizado por duas bandas intensas a 1582 e 1311 cm^{-1} , atribuídas aos modos 8a e $\beta C-H$, respectivamente, com base nos campos de forças calculados. Experimentalmente, não se observa a intensificação de nenhuma banda a *ca.* 1311 cm^{-1} e o número de onda calculado para o modo 8a está desviado em cerca de 30 cm^{-1} para valores mais baixos do que os valores determinados experimentalmente. Por outro lado, o espectro calculado para a espécie neutra prevê a intensificação de bandas a 1115 e 1746 cm^{-1} (a última banda atribuída ao modo $\nu C=O$) não observada nos espectros experimentais. Por último, o espectro calculado para a espécie neutra não considera a intensificação selectiva da banda 8a relativamente ao modo $\nu C=C$ uma vez que prevê intensidades semelhantes para as duas bandas. Apenas o espectro calculado para o anião carboxilato (AH^-) reproduz a intensificação selectiva da banda 8a registada a 1613 cm^{-1} no espectro SERS a pH=7.

Na **Tabela 6.2** é possível analisar os valores de número de onda calculados para a região dos 1600 cm^{-1} e a respectiva atribuição proposta. O número de onda para o modo 8a é calculado a 1598 cm^{-1} na espécie aniónica embora fortemente misturado com o modo $\nu C=C$ tal como observado na **Figura 6.6**. O modo normal 8a está relacionado com a forma das orbitais LUMO (Orbital não ocupada de menor energia, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) do adsorvato. Quando o electrão transferido está localizado na orbital LUMO, as interações ligantes e anti-ligantes produzem uma deformação da estrutura molecular semelhante a este modo fundamental. Consequentemente, esta vibração relaciona a geometria do anião (AH^-) e o radical dianião ($AH^{\bullet 2-}$) e explica a intensificação selectiva SERS através de processos de transferência de carga ressonantes entre o metal e a molécula.

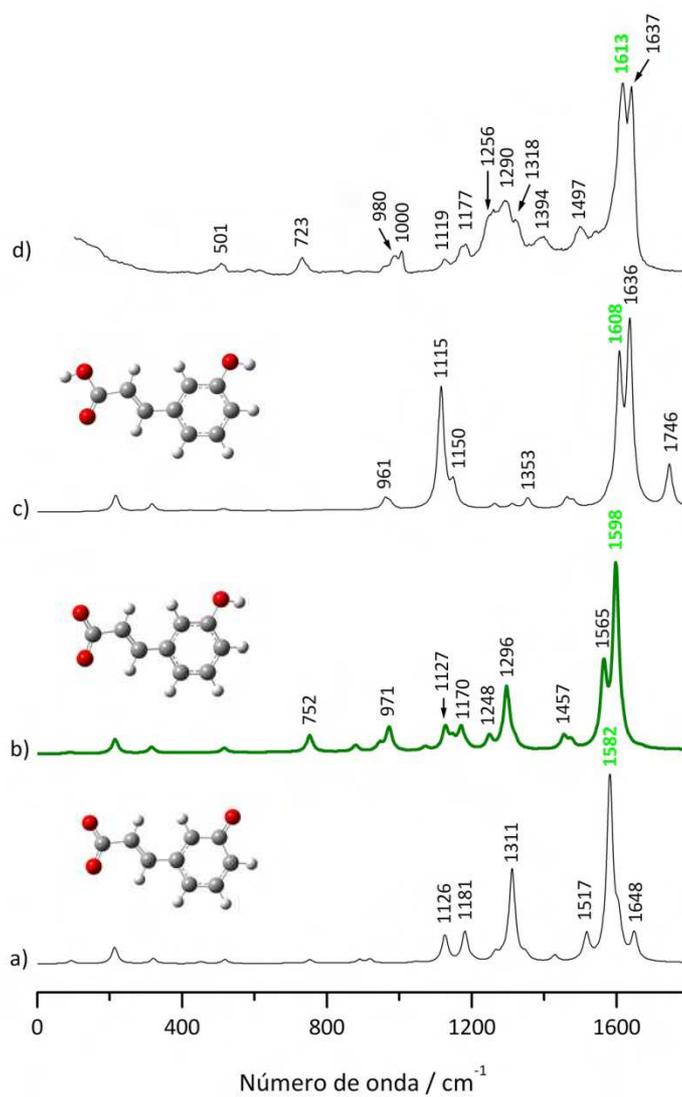


Figura 6.5 – Espectros SERS-CT calculados para **a)** dianião, **b)** anião e **c)** espécie neutra do *trans*-3-hidroxicinamato e **d)** espectro SERS experimental pH=7 (modo **8a** a verde).

Tabela 6.2 - Atribuições vibracionais propostas para os espectros de Raman calculados ao nível B3LYP/6-31G* do *trans*-3-hidroxicinamato na região de 1600 cm^{-1} .

SERS (experimental)	Calculado			Atribuição proposta	
	pH=7	Espécie Neutra	Anião		Dianião
-	-	1746	-	-	$\nu(\text{C}=\text{O})$
-	-	-	1670	1648	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1613	-	1608	1598 / 1615	1582	$8a; \nu_{\text{anel}}$
-	-	-	-	1582	$\nu(\text{CO}^-)$ álcool
-	-	1577	1565	1517	$8b; \nu_{\text{anel}}$

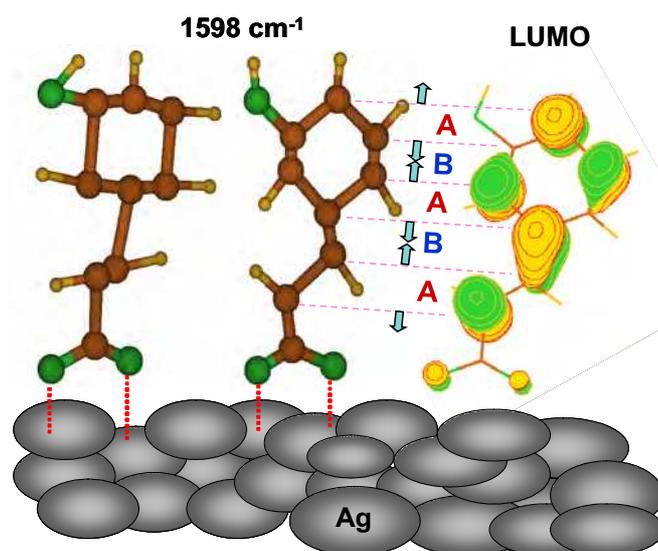


Figura 6.6 – Representação pictórica das orbitais LUMO e estruturas calculadas para a espécie AH^- nos pontos de viragem da vibração $8a$ localizada a 1598 cm^{-1} . As interações ligantes (B, bonding) e anti-ligantes (A, antibonding) nas orbitais LUMO estão directamente relacionadas com as elongações alternadas das ligações C-C evidenciadas pela vibração $8a$.

6.2.2. 5-Fluorouracil

A adsorção de biomoléculas em substratos metálicos é um tópico interessante devido às suas potenciais aplicações em análise ambiental e biológica.^{37, 38} Neste contexto, a espectroscopia SERS é uma técnica poderosa no estudo da natureza das interações metal-adsorvato nomeadamente as espécies moleculares que se encontram ligadas e a sua orientação relativamente às nanoestruturas metálicas.³⁹ Devido à elevada sensibilidade revelada, a técnica SERS é usada actualmente como uma ferramenta analítica actuando como um sensor químico e, em casos favoráveis, é mesmo capaz de detectar o sinal de Raman de moléculas isoladas,^{37, 40} tal como referido na introdução a este trabalho.

O composto 5-Fluorouracilo (5-Flu) é um anti-metabolito derivado de uma pirimidina fluorinada, estruturalmente semelhante ao uracilo, sendo extensivamente utilizado em tratamentos de tumores sólidos e quimioterapia, maioritariamente em terapêuticas paliativas de neoplasmos malignos inoperáveis, especialmente em carcinomas do trato gastrointestinal, peito, fígado, pâncreas e colo-rectal.^{41, 42}

O uracilo e seus derivados, fundamentais na divisão celular e crescimento, desempenham um papel vital em processos biológicos básicos. Todos os compostos baseados no uracilo, nos quais o átomo C5 está ligado a átomos do grupo dos halogéneos, são actualmente testados contra o vírus do HIV e utilizados como anti-tumorais e anti-virais.^{43, 44} A actividade biológica de compostos da família do 5-halouracilo desperta grande interesse nas áreas da Farmacologia e Bioquímica, uma vez que foi provado que estes compostos impedem o crescimento celular através da incorporação em moléculas de ADN e ARN, causando um crescimento impróprio das bases de ácidos nucleicos e a síntese bioquímica incompleta.⁴⁵

Neste trabalho, os espectros SERS do 5-Flu adsorvido em soluções coloidais e em eléctrodo foram registados e analisados assumindo a presença do mecanismo de intensificação CT. Este é um sistema relativamente complexo, uma vez que diferentes espécies moleculares ou formas iónicas podem estar presentes em solução aquosa^{46, 47} e por este motivo um desafio adicional deste sistema é precisamente reconhecer qual destas formas origina o sinal SERS. Sob diferentes condições de pH, diversas espécies químicas de 5-Flu podem existir. De forma a simplificar o problema, a discussão deste trabalho será restrita a quatro formas distintas, nomeadamente as duas formas tautoméricas relacionadas com o equilíbrio cetó-enólico (formas di-cetónica e di-enólica) e dois aniões da forma di-cetónica, N1 e N3 resultado da desprotonação do respectivo átomo de azoto (**Figura 6.7**). De forma a identificar a espécie química que originou o espectro, as intensidades SERS sob condições CT foram calculadas para cada uma destas quatro formas e comparadas com os resultados experimentais.

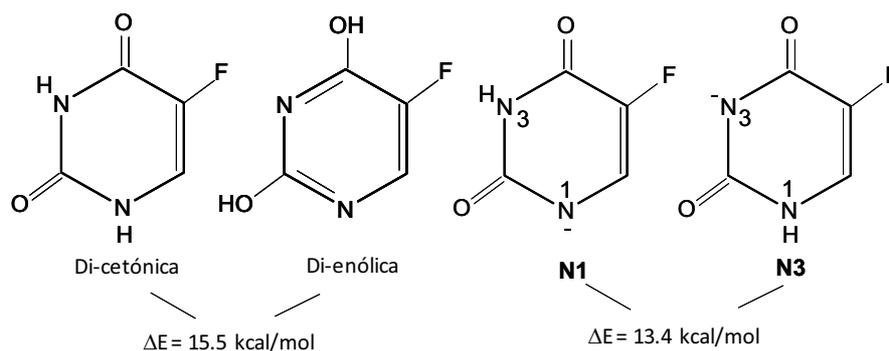


Figura 6.7 – Diferença de energias entre as formas di-cetónica e di-enólica ($\Delta E = E_{\text{diceto}} - E_{\text{dienol}}$) de 5-Flu e entre os dois aniões da forma di-cetónica, N1 e N3 ($\Delta E = E_{\text{N1}} - E_{\text{N3}}$).

6.2.2.1. Resultados e discussão

A optimização geométrica, ao nível B3LYP/6-31G* da espécie neutra do 5-Flu fornece uma estrutura planar. Todos os números de onda calculados são reais, indicando que a estrutura determinada representa um mínimo de energia. Diversos estudos teóricos relacionados com o uracilo^{48, 49} apontam a forma di-cetónica como o tautómero mais estável, sendo o di-enólico cerca de 10-25 kcal/mol menos estável. A diferença de energia calculada entre as duas formas neutras do 5-Flu (representada na **Figura 6.7**) é de 15.5 Kcal/mol sendo a forma di-cetónica mais estável que a di-enólica, de acordo com os estudos mencionados relativos ao uracilo. Desta forma, os números de onda do espectro de Raman foram correlacionados com os valores calculados para a forma di-cetónica e encontram-se ilustrados na **Tabela 6.3** juntamente com a correspondente atribuição para as bandas observadas. De uma forma geral, a atribuição vibracional do 5-Flu é semelhante à atribuição proposta para o uracilo.^{50, 51} O espectro do sólido é caracterizado por uma banda intensa a 1349 cm^{-1} , que pode ser atribuída a $\beta\text{N}_1\text{-H}$ ou a $\beta\text{N}_3\text{-H}$, e duas bandas com intensidade média registadas a 1225 e 769 cm^{-1} atribuídas a $\nu_{\text{anel}} + \nu\text{C}_5\text{-F}$ e modos de respiração do anel, respectivamente. A banda intensa a 112 cm^{-1} é associada a uma vibração da rede.

Na **Figura 6.8** estão representados os espectros de Raman relativos ao 5-Flu no estado sólido e em solução aquosa a pH=10 e pH=14. Os valores de pH foram escolhidos tendo em conta os valores de pKa do 5-Flu. O primeiro valor de pKa ($\text{pKa}_1=8.15$) é inferior ao valor correspondente para o uracilo ($\text{pKa}_1=9.45$), tal como esperado tendo em conta a electronegatividade do átomo de flúor. O valor de pKa_1 deve ser associado à ionização da ligação $\text{N}_1\text{-H}$ uma vez que o anião correspondente é mais estável que o anião formado pela ionização da ligação $\text{N}_3\text{-H}$ (**Figura 6.7**). Não foram encontrados na literatura dados relativos ao valor de pKa_2 , associado à formação do dianião, mas é de esperar que seja

inferior ao valor análogo para o uracilo ($pK_{a2}=13$).⁴⁶

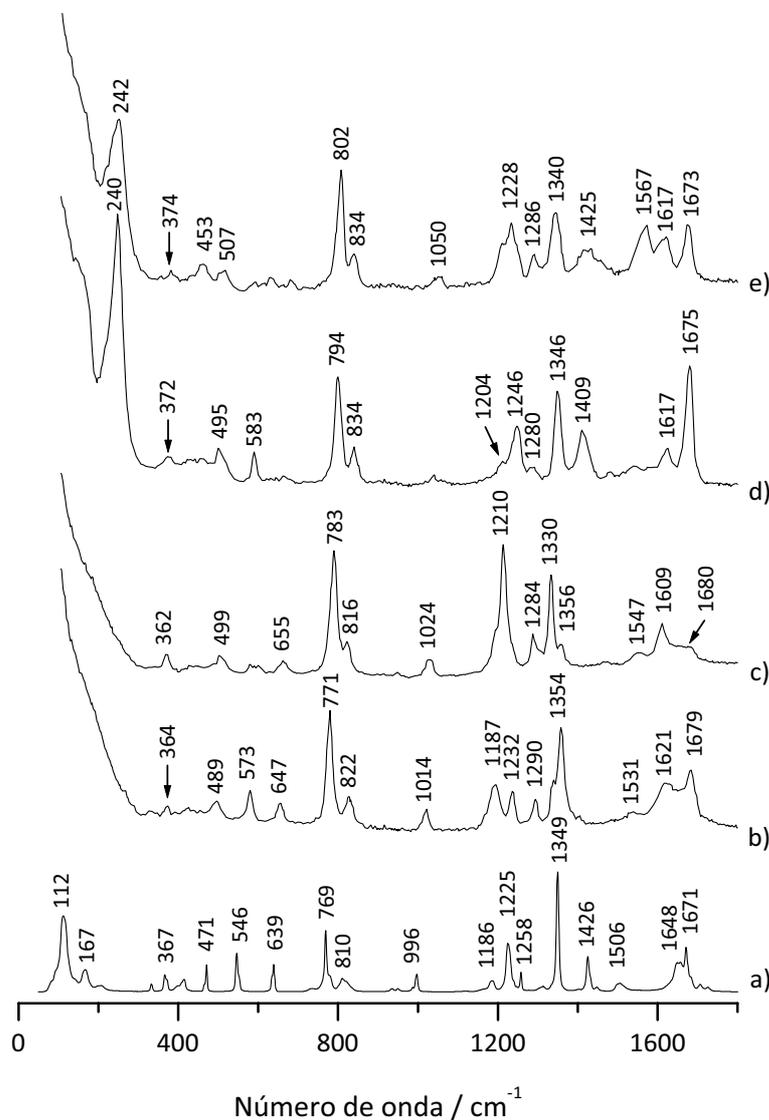


Figura 6.8 – a) Espectro de Raman do 5-Flu sólido (linha de excitação $\lambda=1064$ nm), espectros de Raman (linha de excitação $\lambda=514.5$ nm) de soluções aquosas de 5-Flu 0.5 M a **b)** pH=10, **c)** pH=14 e espectros SERS em colóide de prata de uma solução 10^{-3} M a **d)** pH=7 e **e)** pH=12.

Embora o anião N1 deva ser a espécie maioritária em solução a pH=10, o espectro de Raman indica que a forma iónica N3 pode também estar presente, atingindo uma maior concentração a pH=14. Os espectros de Raman das duas soluções aquosas são caracterizados por uma banda intensa na região $770\text{-}780\text{ cm}^{-1}$ que é atribuída a um modo de respiração do anel. No entanto, um comportamento diferente é observado na região dos 1300 cm^{-1} . A pH=10, pode ser observado que a banda registada a 1354 cm^{-1} exhibe um ombro a 1337 cm^{-1} . Com base nos campos de força calculados, estas duas bandas estão associadas a deformações no plano das ligações $\text{N}_3\text{-H}$ e $\text{N}_1\text{-H}$ dos respectivos

aniões N1 e N3. Estas duas bandas são também observadas no espectro de Raman a pH=14, mas neste caso as intensidades encontram-se invertidas. A banda registada a 1330 cm^{-1} , mais intensa que a banda a 1356 cm^{-1} , deve ser atribuída à deformação no plano do oscilador $N_1\text{-H}$. Consequentemente, estas duas bandas intensas a 1354 e 1330 cm^{-1} podem ser utilizadas como “marcadores” para os aniões N1 e N3, respectivamente. Embora não seja possível determinar a proporção N1/N3 uma vez que os espectros dos iões desprotonados puros não estão disponíveis, pode ser estimada em 2:1 e 1:4 a pH=10 e 14, respectivamente, tendo em conta a intensidade relativa das duas bandas mencionadas anteriormente. Este resultado indica que a forma N3 está presente a pH=7 e é predominante a pH=14, tal como foi determinado para soluções de uracilo.⁴⁶

Tabela 6.3 – Atribuições propostas para as bandas observadas nos espectros experimentais de Raman e SERS a vários valores de pH e bandas calculadas ao nível B3LYP/6-31G* para os aniões di-cetónicos N3 e N1 do 5-Flu (números de onda em cm^{-1}).

Raman Sólido	Forma di-cetónica	Atribuição	Raman pH=10	Anião N3	Raman pH=14	Anião N1
-	3503	$\nu(N_1\text{-H})$	-	3478	-	-
-	3461	$\nu(N_3\text{-H})$	-	-	-	3457
-	3126	$\nu(C_6\text{-H})$	-	3072	-	2982
1671	1777	$\nu(C=O)$	1679	1688	1680	1687
1648	1745	$\nu(C=O)$	1621	1614	1609	1670
1506	1668	$\nu_{\text{anel}} + \nu(C=C)$	1531	1669	1547	1566
1426	1454	ν_{anel}	-	1411	-	1429
1349	1382	$\beta(N_3\text{-H})$	1354	-	1356	1323
-	1355	$\nu_{\text{anel}} + \beta(N_1\text{-H})$	1337	1300	1330	-
1258	1308	$\beta(C_6\text{-H}) + \nu_{\text{anel}}$	1290	1242	1284	1273
1225	1236	$\nu(C_5\text{-F}) + \nu_{\text{anel}}$	1232	1270	1210	1260
1186	1146	$\beta(C\text{-H}) + \beta(N_1\text{-H})$	1187	1091	1187	1168
-	1120	ν_{anel}	-	1158	-	1080
996	934	12; β_{anel}	1014	895	1024	925
810	854	$\gamma(C_6\text{-H})$	822	810	816	919
-	786	$\beta_{\text{anel}} + \nu(C_5\text{-F})$	-	777	-	786
-	719	$\gamma(C_2=O) + \gamma(C_4=O)$	-	732	-	744
769	717	1; ν_{anel}	771	703	783	724
-	713	$\gamma(C_2=O) + \gamma(C_4=O)$	-	708	-	706

-	650	$\gamma(N_3-H)$	-	-	-	643
639	604	$\beta(C_2=O) + \beta(C_4=O)$	647	606	655	615
546	515	β_{anel}	573	521	581	540
-	524	$\gamma N_1-H)$	-	479	-	-
471	437	β_{anel}	489	453	499	439
367	373	$\beta(C_2=O) + \beta(C_4=O)$	364	397	362	371
-	362	τ_{anel}	-	328	-	425
-	332	τ_{anel}	-	260	-	307
-	288	$\beta C_5-F) + \beta(C_4=O)$	-	287	-	282
167	146	τ_{anel}	-	165	-	159
-	112	$\gamma C_5-F) + \gamma(C_2=O)$	-	56	-	119
112	-	Vibração de rede	-	-	-	-

v- alongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano; τ -torção

Resumindo, a forma N1 predomina ligeiramente a pH=10, enquanto a pH=14 predomina a forma N3. Não foram encontradas quaisquer evidências da presença da forma dianiónica a qualquer valor de pH testado. Finalmente, deve ser referido que os números de onda de Raman das soluções aquosas estão desviados para o azul cerca de 30 cm^{-1} relativamente aos números de onda registados para o sólido devido ao efeito das ligações de hidrogénio entre as moléculas de 5-Flu e as moléculas de água, à semelhança do que ocorre para o uracilo.⁵² Por exemplo, a banda registada a 546 cm^{-1} e atribuída a β_{anel} no sólido, é identificada no espectro da solução a pH=10 a cerca de 573 cm^{-1} .

Relativamente à análise dos espectros SERS (também representados na **Figura 6.8**), o espectro em solução coloidal do 5-Flu a pH=7 é caracterizado por três bandas intensas a 794 , 1346 e 1675 cm^{-1} atribuídas a modos no plano. A principal diferença entre os espectros de Raman e SERS é a intensificação selectiva da última banda. Na **Tabela 6.4** estão reunidos os números de onda e a correspondente atribuição do espectro calculado para a forma di-cetónica e dos espectros experimentais SERS em colóide e em eléctrodo. É possível observar que os números de onda SERS se correlacionam bem com os números de onda dos espectros de Raman em solução, sendo os desvios observados devidos ao efeito de adsorção do 5-Flu na superfície metálica.¹⁰ A valores de pH alcalino, o comportamento é ligeiramente diferente. A banda mais intensa é registada a 800 cm^{-1} , enquanto a banda a 1673 cm^{-1} não exhibe a intensificação selectiva observada no espectro SERS a pH=7.

Todas as bandas SERS observadas a pH neutro são igualmente registadas a pH=12 e por isso, a espécie adsorvida não se altera com o pH. Apenas uma banda registada em ambos os espectros SERS a 1300 cm^{-1} , pode ser alternadamente atribuída a βN_1-H ou βN_3-H . Consequentemente, não é possível

identificar a espécie química que dá origem ao sinal SERS. No entanto, uma vez que as bandas SERS mais intensas correspondem a modos no plano e a banda $\nu\text{C}=\text{O}$ é registada a 1675 cm^{-1} , é possível deduzir que o 5-Flu é adsorvido à superfície da prata através de um dos átomos de azoto desprotonados adoptando uma orientação quase perpendicular.

Tabela 6.4 - Atribuição proposta para bandas Raman e SERS calculadas para a forma di-cetónica e observadas experimentalmente para soluções em colóide e em eléctrodo a diferentes valores de potencial do 5-Flu. (números de onda em cm^{-1})

Calculado	Atribuição	Raman	SERS colóide			SERS eléctrodo	
		pH=10	pH=7	pH=12	0.0 V	-0.25 V	-0.50 V
Forma di-cetónica							
3503	$\nu(\text{N}_1\text{-H})$	-	-	-	-	-	-
3461	$\nu(\text{N}_3\text{-H})$	-	-	-	-	-	-
3126	$\nu(\text{C}_6\text{-H})$	-	-	-	-	-	-
1777	$\nu(\text{C}=\text{O})$	1679	1675	1673	1669	1671	1671
1745	$\nu(\text{C}=\text{O})$	1621	1617	1617	1613	1619	1617
1668	$\nu_{\text{anel}} + \nu(\text{C}=\text{C})$	1531	-	1567	1529	1533	1539
1454	ν_{anel}	-	1409	1425	1419	1413	1414
1382	$\beta(\text{N}_3\text{-H})$	1354	1346	1340	1346	1344	1346
1355	$\nu_{\text{anel}} + \beta(\text{N}_1\text{-H})$	1337	1346	1340	1346	1344	1346
1308	$\beta(\text{C}_6\text{-H}) + \nu_{\text{anel}}$	1290	1280	1286	1280	1276	1274
1236	$\nu(\text{C}_5\text{-F}) + \nu_{\text{anel}}$	1232	1246	1228	1240	1238	1238
1146	$\beta(\text{C-H}) + \beta(\text{N}_1\text{-H})$	1187	1204	1202	-	-	1196
1120	ν_{anel}	-	-	-	-	-	-
934	12; β_{anel}	1014	1020	1050	-	1024	1022
854	$\gamma(\text{C}_6\text{-H})$	822	834	834	828	826	824
786	$\beta_{\text{anel}} + \nu(\text{C}_5\text{-F})$	-	-	-	-	-	-
719	$\gamma(\text{C}_2=\text{O}) + \gamma(\text{C}_4=\text{O})$	-	-	-	-	-	-
717	1; ν_{anel}	771	794	802	786	785	783
713	$\gamma(\text{C}_2=\text{O}) + \gamma(\text{C}_4=\text{O})$	-	-	-	-	-	-
650	$\gamma(\text{N}_3\text{-H})$	-	-	-	-	-	-
604	$\beta(\text{C}_2=\text{O}) + \beta(\text{C}_4=\text{O})$	647	650	650	655	653	663
515	β_{anel}	573	583	580	589	579	575
524	$\gamma(\text{N}_1\text{-H})$	-	-	-	-	-	-

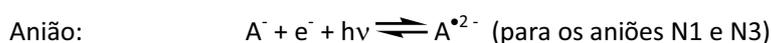
437	β_{anel}	489	495	507	-	-	-
373	$\beta(\text{C}_2=\text{O}) + \beta(\text{C}_4=\text{O})$	364	372	374	-	-	-
362	τ_{anel}	-	-	-	-	-	-
332	τ_{anel}	-	-	-	-	-	-
288	$\beta(\text{C}_5-\text{F}) + \beta(\text{C}_4=\text{O})$	-	-	-	268	268	268
146	τ_{anel}	-	-	-	-	-	-
112	$\beta(\text{C}_5-\text{F}) + \beta(\text{C}_2=\text{O})$	-	-	-	-	-	-

ν - alongação; β - deformação no plano; γ - deformação fora do plano; τ -torção

Os espectros SERS de 5-Flu registados em prata a pH neutro e com diferentes potenciais de eléctrodo, encontram-se representados na **Figura 6.9**. Estes espectros apresentam um comportamento semelhante aos espectros registados em colóide. Todos os espectros são caracterizados por três bandas intensas registadas a 780, 1334 e 1671 cm^{-1} . À medida que o potencial de eléctrodo se torna mais negativo, a intensidade da banda a 780 cm^{-1} aumenta, atingindo a -0.50 V uma intensidade semelhante à observada no espectro de Raman em solução aquosa. Pelo contrário, a intensidade das bandas a 1344 e 1670 cm^{-1} permanece constante independentemente do valor do potencial de eléctrodo. Mais uma vez, apenas uma banda é observada a 1344 cm^{-1} , pelo que não é possível decidir qual a forma que origina o espectro SERS. A principal diferença que surge da comparação entre os espectros de Raman e SERS é novamente a forte intensificação da banda registada a 1675 cm^{-1} e atribuída à vibração $\nu\text{C}=\text{O}$.

A condição de transferência de carga ressonante é preenchida nos espectros SERS registados a 0.0 V e -0.25 V (**Figura 6.9c** e **6.9d**), enquanto o espectro a -0.5 V parece estar fora de ressonância uma vez que a banda a 1671 cm^{-1} não mostra intensificação selectiva. Os espectros SERS em colóide mostram um comportamento semelhante e a banda a 1673 cm^{-1} torna-se mais fraca no espectro a pH=12. É possível que os iões em solução modifiquem o potencial eléctrico da interface de forma semelhante ao potencial imposto nas experiências de eléctrodo.

Na **Figura 6.10** encontram-se representados os espectros SERS-CT calculados para os quatro processos de transferência de carga que poderão ocorrer:



Da análise dos espectros calculados, é possível concluir que há diferenças significativas dependendo da espécie envolvida. Como conclusão, apenas o espectro correspondente ao anião N1

reproduz o comportamento experimental, ou seja, a intensificação selectiva do modo $\nu\text{C}=\text{O}$ registado a 1675 cm^{-1} . O espectro calculado para o anião N3 é caracterizado por duas bandas médias a 1671 e 1687 cm^{-1} , exibindo intensidades semelhantes e atribuídas a $\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{O}$, com base em cálculos de campo de forças. O envolvimento das espécies neutras di-cetónica e di-enólica é também pouco provável uma vez que o espectro teórico prevê a intensificação das bandas a 1745 (e 1776) cm^{-1} e 1628 cm^{-1} , respectivamente, facto que não está de acordo com o comportamento observado experimentalmente. Por este motivo, apenas o espectro do anião N1 reproduz o comportamento observado nos resultados experimentais.

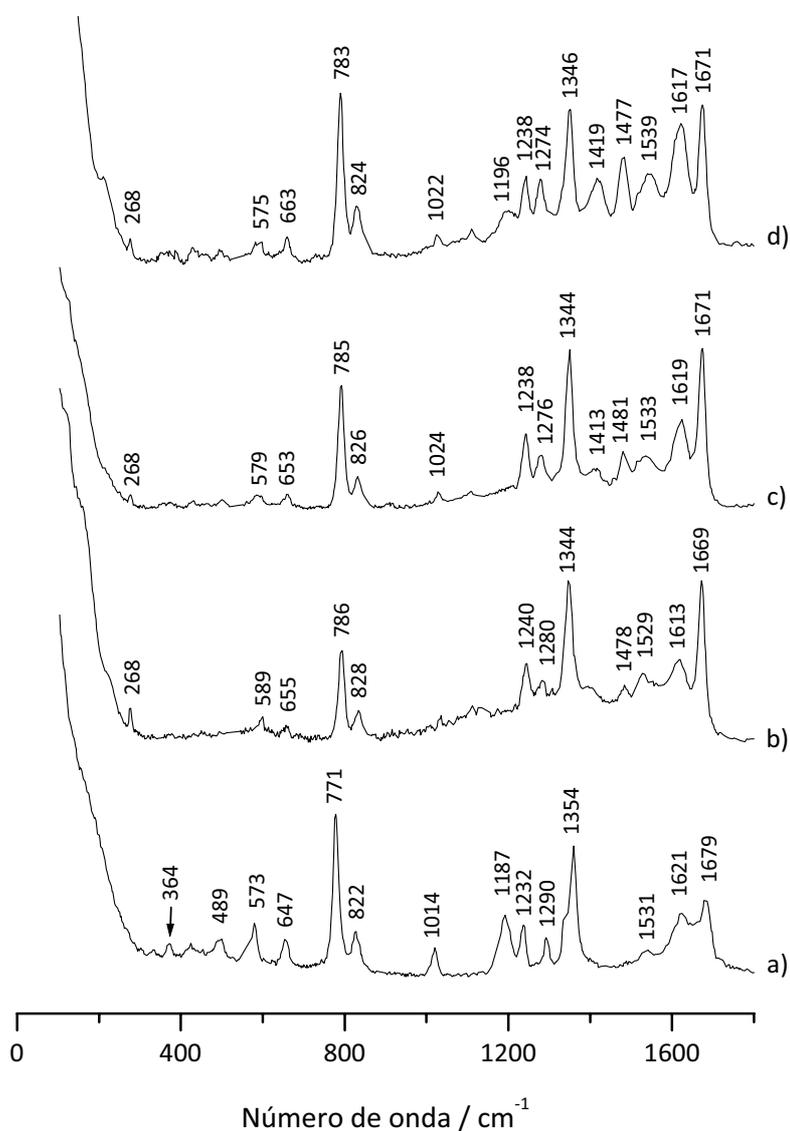


Figura 6.9 – a) Espectro de Raman da solução aquosa de 5-Flu 0.5 M a pH=10, espectros SERS em prata a diferentes valores de potencial de eléctrodo b) 0.00 V, c) -0.25 V e d) -0.50 V obtidos com uma solução aquosa 0.1 M em Na_2SO_4 e 10^{-3} M em 5-Flu a pH=7.

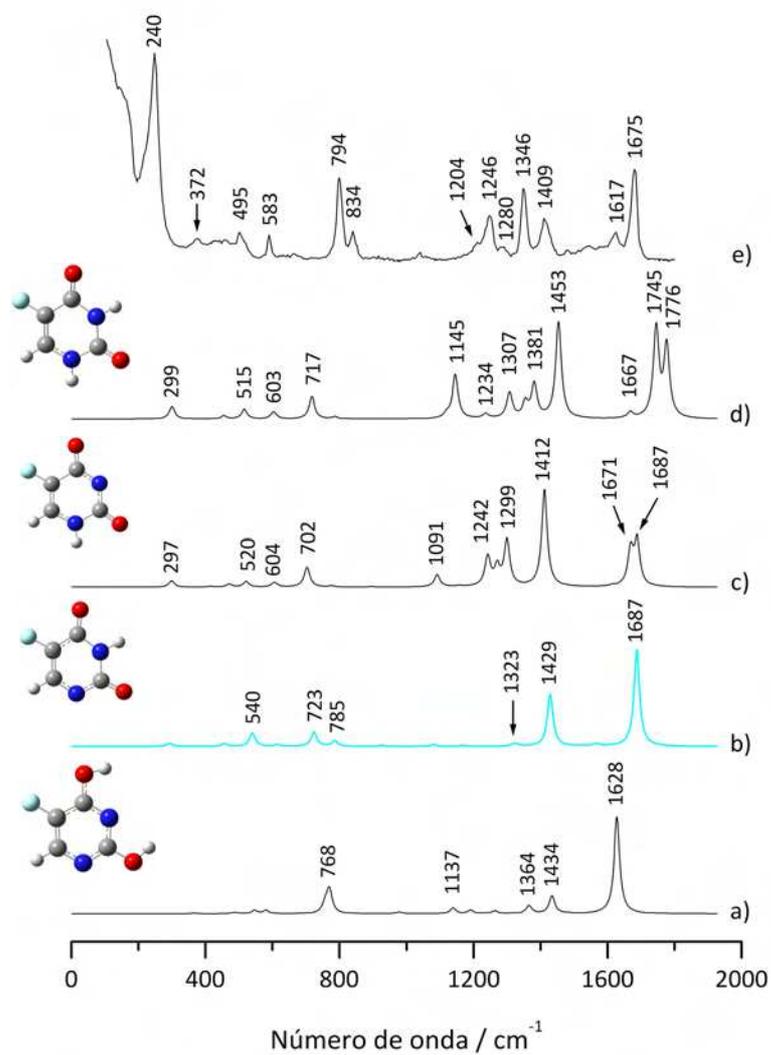


Figura 6.10 – Espectros calculados para processos CT-RR para as diferentes espécies de 5-Flu consideradas: **a)** molécula neutra (forma di-enólica), **b)** anião N1, **c)** anião N3 e **d)** molécula neutra (forma di-cetónica). O espectro SERS em colóide a **e)** pH=7 está também representado.

6.3. Conclusão

Relativamente à investigação realizada com o ácido t-3OHCIA, dados experimentais e computacionais mostram que:

- ✓ Apenas a espécie aniónica (carboxilato) do t-3OHCIA, adsorvida à superfície da prata com uma orientação perpendicular é responsável pelos espectros SERS a qualquer valor de pH;
- ✓ Processos ressonantes de transferência de carga estão envolvidos nestes registos, explicando a intensificação selectiva do modo 8a tal como acontece com outras moléculas aromáticas.

Por outro lado, no estudo da adsorção do 5-Flu em superfícies metálicas e com base nos respectivos campos de forças, foi possível identificar dois tautómeros desprotonados nos espectros de Raman de soluções aquosas registados a valores de pH alcalinos, sendo as duas bandas de referência as bandas a 1350 e 1330 cm^{-1} para os aniões N1 e N3, respectivamente. Foram calculadas intensidades teóricas de acordo com um mecanismo CT ressonante para cada espécie química de forma a detectar a participação deste mecanismo de intensificação e identificar qual a espécie molecular que origina o espectro. As intensidades calculadas para este processo SERS-CT permitem deduzir que o anião N1 é responsável pelos registos SERS uma vez que tem em consideração a intensificação selectiva da banda registada a *ca.* 1680 cm^{-1} . Tendo em conta que todas as bandas intensas em SERS correspondem a modos no plano e não são registadas bandas correspondentes a vibrações fora do plano, é de esperar que a molécula de 5-Flu permaneça quase perpendicular à superfície metálica.

6.4. Referências

1. M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163-166.
2. Z. Q. Tian, Surface-enhanced Raman spectroscopy: advancements and applications, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 466–470.
3. Z.-Q. Tian, B. Ren, Adsorption and reaction at electrochemical interfaces as probed by surface-enhanced Raman Spectroscopy, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 197.
4. T. Vo-Dinh, Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures, *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 557-582.
5. A. Campion, in *Vibrational Spectroscopy of molecules on surfaces*, p., (Eds.: J. T. Yates, T. E. Madey), Plenum, New York, **1987**.
6. J. A. Creighton, in *Spectroscopy of Surfaces*, p., (Eds.: R. J. H. Clark, R. E. Hester), Wiley, Chichester, **1988**.
7. H. Metiu, P. Das, The Electromagnetic Theory of Surface Enhanced Spectroscopy, *Annual Review of Physical Chemistry* **1984**, *35*, 507-536.
8. M. Moskovits, D. P. DiLella, K. J. Maynard, Surface Raman spectroscopy of a number of cyclic aromatic molecules adsorbed on silver: selection rules and molecular reorientation, *Langmuir* **1988**, *4*, 67-76.
9. I. López-Tocón, S. P. Centeno, J. L. Castro, M. R. López-Ramírez, J. C. Otero, Photoinduced charge transfer processes in the surface-enhanced Raman scattering of 2,4,6-trimethylpyridine recorded on silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *377*, 111–118.
10. S. P. Centeno, I. López-Tocón, J. F. Arenas, J. Soto, J. C. Otero, Selection Rules of the Charge Transfer Mechanism of Surface-Enhanced Raman Scattering: The Effect of the Adsorption on the Relative Intensities of Pyrimidine Bonded to Silver Nanoclusters, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 14916-14922.
11. J. F. Arenas, J. Soto, I. L. Tocon, D. J. Fernandez, J. C. Otero, J. I. Marcos, The role of charge-transfer states of the metal-adsorbate complex in surface-enhanced Raman scattering, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 7207-7216.
12. R. J. H. Clark, T. J. Dines, Resonance Raman Spectroscopy, and Its Application to Inorganic Chemistry. New Analytical Methods (27), *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 131-158.
13. J. F. Arenas, I. López-Tocón, J. C. Otero, J. I. Marcos, Charge Transfer Processes in Surface-Enhanced Raman Scattering. Franck-Condon Active Vibrations of Pyridine, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 9254-9261.
14. J. F. Arenas, M. S. Woolley, I. L. Tocón, J. C. Otero, J. I. Marcos, Complete analysis of the surface-enhanced Raman scattering of pyrazine on the silver electrode on the basis of a resonant charge transfer mechanism involving three states, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 7669-7683.
15. J. F. Arenas, S. P. Centeno, I. López-Tocón, J. C. Otero, Surface-enhanced Raman scattering of 2,3-dimethylpyrazine adsorbed on silver electrode: selective enhancement explained through the charge transfer mechanism, *Vib. Spectrosc.* **2004**, *35*, 39–44.

16. J. F. Arenas, J. C. Otero, S. P. Centeno, I. López-Tocón, J. Soto, Evidences for the contribution of a resonant charge transfer process to the surface-enhanced Raman scattering of 2,6-dimethylpyridine, *Surf. Sci.* **2002**, *511*, 163–170.
17. F. Avila, J. Soto, J. F. Arenas, J. A. Rodríguez, D. Peláez, J. C. Otero, Outstanding Role of Silver Nanoparticles in the Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering of p-Benzosemiquinone, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 105-108.
18. J. F. Arenas, D. Peláez, M. R. L. Ramírez, J. L. Castro, J. C. Otero, Chemical enhancement mechanism in SERS, *Opt. Pur. y Apl.* **2004**, *37*, 23-32.
19. J. H. Chen, C.-T. Ho, Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2374-2378.
20. R. I. M. Chan, R. H. C. San, H. F. Stich, Mechanism of inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutagenesis by phenolic compounds, *Cancer Lett.* **1986**, *31*, 27-34.
21. K. Herrmann, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, *28*, 315-347.
22. K. Herrmann, Contents of principal plant phenols in fruits, *Fluess. Obst.* **1992**, *59*, 66-70.
23. K. Herrmann, Phenolcarboxylic acids in plant foods and their antioxidative activity, *Gordian* **1993**, *93*, 92-96.
24. M.-T. Huang, R. C. Smart, C.-Q. Wong, A. H. Conney, Inhibitory Effect of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Ferulic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 5941-5946.
25. J. Laranjinha, O. Vieira, L. Almeida, V. Modeira, Inhibition of metmyoglobin/H₂O₂-dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids, *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 395-402.
26. M. Nardini, M. D'Aquino, G. Tomassi, V. Gentili, M. Di Felice, C. Scaccini, Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives, *Free Radical Biology and Medicine* **1995**, *19*, 541-552.
27. Y.-T. Lee, M.-J. Don, P.-S. Hung, Y.-C. Shen, Y.-S. Lo, K.-W. Chang, C.-F. Chen, L.-K. Ho, Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells, *Cancer Lett.* **2005**, *223*, 19-25.
28. M. Artico, R. Di Santo, R. Costi, E. Novellino, G. Greco, S. Massa, E. Tramontano, M. E. Marongiu, A. De Montis, P. La Colla, Geometrically and Conformationally Restrained Cinnamoyl Compounds as Inhibitors of HIV-1 Integrase: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 3948-3960.
29. Y. J. Chen, M. S. Shiao, M. L. Hsu, T. H. Tsai, S. Y. Wang, Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Antioxidant from Propolis, on Inducing Apoptosis in Human Leukemic HL-60 Cells, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5615-5619.

30. P. Montpied, F. de Bock, G. Rondouin, G. Niel, L. Briant, A.-S. Courseau, M. Lerner-Natoli, J. Bockaert, Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures, *Mol. Brain Res.* **2003**, *115*, 111-120.
31. S. Son, B. A. Lewis, Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 468-472.
32. J. L. Castro, M. R. L. Ramírez, I. L. Tocón, J. C. Otero, Vibrational study of the metal-adsorbate interaction of phenylacetic acid and α -phenylglycine on silver surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *263* 357-363.
33. J. L. Castro, M. R. L. Ramírez, I. L. Tocón, J. C. Otero, Surface-enhanced Raman scattering of 3-phenylpropionic acid (hydrocinnamic acid), *J. Raman Spectrosc.* **2002**, *33*, 455-459.
34. M. Moskovits, J. S. Suh, Conformation of mono- and dicarboxylic acids adsorbed on silver surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6826-6829.
35. K. A. Connors, J. M. Lipari, Effect of cyclodextrins on apparent dissociation constants of carboxylic acids and phenols: Equilibrium analytical selectivity induced by complex formation, *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 379-383.
36. H. Park, S. B. Lee, K. Kim, M. S. Kim, Surface-enhanced Raman scattering of p-aminobenzoic acid at silver electrode, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 7576-7580.
37. S. Nie, S. R. Emory, Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering, *Science* **1997**, *275*, 1102-1106.
38. J. S. Suh, N. H. Jang, D. H. Jeong, M. Moskovits, Adsorbate Photochemistry on a Colloid Surface: Phthalazine on Silver, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 805-813.
39. A. K. Ojha, pH dependent SERS and solvation studies of tyrosine adsorbed on silver colloidal nano particles combined with DFT calculations, *Chem. Phys.* **2007**, *340*, 69-78.
40. K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, Population Pumping of Excited Vibrational States by Spontaneous Surface-Enhanced Raman Scattering, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 2444-2447.
41. S. Farquharson, C. Shende, F. E. Inscore, P. Maksymiuk, A. Gift, Analysis of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 208-212.
42. M. A. Graham, G. F. Lockwood, D. Greenslade, S. Brienza, M. Bayssas, E. Gamelin, Clinical Pharmacokinetics of Oxaliplatin: A Critical Review, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1205-1218.
43. I. Pavel, S. Cota, S. Cînta-Pînzaru, W. Kiefer, Raman, Surface Enhanced Raman Spectroscopy, and DFT Calculations: A Powerful Approach for the Identification and Characterization of 5-Fluorouracil Anticarcinogenic Drug Species, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 9945-9952.
44. V. K. Rastogi, V. Jain, R. A. Yadav, C. Singh, M. A. Palafox, Fourier transform Raman spectrum and ab initio and density functional computations of the vibrational spectrum, molecular geometry, atomic charges and some molecular properties of the anticarcinogenic drug 5-fluorouracil *J. Raman Spectrosc.* **2000**, *31*, 595-603.

45. G. N. Ten, T. G. Burova, V. I. Baranov, Calculation and interpretation of IR and Resonant Raman spectra of 5-Halosubstituted uracils, *J. Appl. Spectrosc.* **2006**, *73*, 492-498.
46. B. Giese, D. McNaughton, Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Study of Uracil. The Influence of the Surface Substrate, Surface Potential, and pH, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1461-1470.
47. J. Rejnek, M. Hanus, M. Kabelác, F. Ryjáček, P. Hobza, Correlated ab initio study of nucleic acid bases and their tautomers in the gas phase, in a microhydrated environment and in aqueous solution. Part 4. Uracil and thymine, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 2006-2017.
48. D. A. Estrin, L. Paglieri, G. Corongiu, A Density Functional Study of Tautomerism of Uracil and Cytosine, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 5653-5660.
49. S. X. Tian, C. F. Zhang, Z. J. Zhang, X. J. Chen, K. Z. Xu, How many uracil tautomers there are? Density functional studies of stability ordering of tautomers, *Chem. Phys.* **1999**, *242*, 217-225.
50. A. Aamouche, G. Berthier, B. Cadioli, E. Gallinella, M. Ghomi, Hydrogen bonding effects in quantum mechanical force fields of pyrimidine bases: uracil, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1998**, *426*, 307-312.
51. A. Aamouche, M. Ghomi, C. Coulombeau, H. Jobic, L. Grajcar, M. H. Baron, V. Baumruk, P. Y. Turpin, C. Henriot, G. Berthier, Neutron Inelastic Scattering, Optical Spectroscopies and Scaled Quantum Mechanical Force Fields for Analyzing the Vibrational Dynamics of Pyrimidine Nucleic Acid Bases. 1. Uracil, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5224-5234.
52. M. P. Gageot, C. Kadri, M. Ghomi, Analysis of uracil hydration by means of vibrational spectroscopy and density functional calculations, *J. Mol. Struct.* **2001**, *565-566*, 469-473.

Capítulo 7

**Caracterização de agregados de água:
espectroscopia vibracional e métodos
computacionais**

CONTEÚDO

Resumo	199
7.1. Conceitos Gerais	200
7.1.1. Agregados de água	200
7.1.2. Aplicação de métodos computacionais	201
7.2. Rede 3D de moléculas de água	201
7.2.1. Métodos computacionais na determinação da estabilidade de agregados de água	202
7.2.2. Estudos espectroscópicos	206
7.3. Rede 2D de moléculas de água	210
7.4. Conclusões	216
7.5. Referências	217

RESUMO

No âmbito deste Capítulo estudaram-se alguns agregados de água, nomeadamente redes bi-(2D) e tridimensionais (3D) de moléculas de água encontradas no interior de estruturas cristalinas de materiais orgânicos-inorgânicos. O agregado de água correspondente à rede 3D é estabilizado por uma matriz híbrida, na qual as moléculas de água estabelecem contactos por ligações de hidrogénio com o sal supramolecular $(\text{H}_2\text{pip})_3[\text{Ge}(\text{hedp})_2] \bullet 14\text{H}_2\text{O}$. Foram efectuados alguns estudos computacionais envolvendo as unidades de água isoladas, de forma a determinar as estabilidades relativas de diversas geometrias possíveis para cada um dos agregados com $(\text{H}_2\text{O})_6$ e $(\text{H}_2\text{O})_8$. Adicionalmente, foram analisados os espectros de Raman do composto híbrido exposto a uma atmosfera de D_2O ao longo de períodos de tempo bem definidos. Este estudo espectroscópico permitiu recolher algumas informações relativas às dinâmicas de troca $\text{H} \rightarrow \text{D}$ e $\text{D} \rightarrow \text{H}$, possibilitando tecer algumas considerações relativamente ao ambiente químico na vizinhança das moléculas de água.

Paralelamente à análise da rede 3D de moléculas de água, foram igualmente realizados alguns estudos espectroscópicos envolvendo um agregado bidimensional de moléculas de água, cuja unidade mais simples é um hexâmero. Neste caso, embora se trate apenas de um estudo preliminar, é possível deduzir alguns dados relacionados com a natureza dos grupos *O-H* presentes no cristal e o respectivo comportamento no processo de substituição isotópica.

7.1. Conceitos Gerais

A água, fonte de vida, é o composto mais abundante na Terra, muito provavelmente o mais investigado mas não necessariamente compreendido na sua plenitude. A água desempenha um papel fundamental em muitos sistemas biológicos e químicos e possui ligações de hidrogénio fortemente polares que controlam as estruturas intermoleculares e são responsáveis por um conjunto notável de propriedades físicas e químicas anómalas. Estas propriedades promoveram um grande esforço de caracterização da estrutura e dinâmica das ligações de hidrogénio a nível experimental e teórico.¹

A água é utilizada na definição comum das escalas Fahrenheit, Celsius e Kelvin através dos pontos triplo, de ebulição e fusão. É inquestionável que estes pontos são característicos da própria substância água e que uma molécula de água não tem nem ponto de ebulição nem ponto de fusão. Assim sendo, a água representa um caso paradigmático para o estudo da transição entre a realidade quântica e a física clássica: quantas moléculas de água são necessárias para que estas propriedades apareçam? A exploração de propriedades estruturais e de ligação de pequenos complexos de água é crucial para a compreensão da água nas suas fases líquida e sólida e para compreender fenómenos de solvatação.

7.1.1. Agregados de água

O primeiro passo para entender o comportamento da água enquanto substância reside na obtenção de informação estrutural relativa a pequenos agregados de moléculas de água. Por este motivo, os agregados de água têm constituído um foco de interesse de muitos estudos,²⁻⁵ uma vez que permitem investigar a natureza das ligações de hidrogénio, contribuindo para uma compreensão mais profunda da água líquida baseada nas suas propriedades à escala molecular. Neste contexto, os poros e canais de materiais microporosos semelhantes aos zeólitos são hospedeiros ideais para estudar a natureza e o comportamento dos agregados de água.

A formação de agregados de água está directamente relacionada com o ambiente químico da vizinhança e tem sido objecto de estudo de inúmeros trabalhos que pretendem entender a relação entre a estrutura e o ambiente cristalino. A estrutura das unidades de $(\text{H}_2\text{O})_n$ depende em grande medida do ambiente cristalino no qual se encontram encapsuladas.¹

Várias estruturas de agregados de água foram caracterizadas na literatura, revelando diversas configurações dos hóspedes cristalinos no estado sólido: tetrâmeros,⁶⁻⁸ pentâmeros,⁹ hexâmeros,^{10, 11} octâmeros,^{2, 3, 8-10, 12, 13} decâmeros,¹⁴ entre outros.^{15, 16} Dos agregados finitos de moléculas de água, o octâmero cúbico é particularmente estável uma vez que, ao contrário de estruturas cíclicas e do hexâmero tridimensional, cada molécula de água participa em três ligações de hidrogénio.¹⁷

7.1.2. Aplicação de métodos computacionais

É possível encontrar inúmeros estudos semi-empíricos e cálculos *ab initio* relativos a agregados de água.¹⁵ O desenvolvimento verificado nesta área acompanhou a evolução dos métodos e capacidades computacionais, sendo conhecidos estudos teóricos que envolvem hexâmeros,¹⁸ heptâmeros,¹⁹ octâmeros,^{17, 20-22} entre outros.²³⁻²⁵

Pequenos agregados de água e as suas propriedades podem ser calculados utilizando métodos *ab initio* de elevada qualidade. A maioria das previsões teóricas para as geometrias e frequências vibracionais, assim como o seu comportamento com o aumento do tamanho do agregado, são apoiados por resultados experimentais.

Os métodos computacionais são aplicados ao estudo de agregados de pequena dimensão (maioritariamente cálculos DFT) e de grande dimensão (Hartree-Fock), utilizando diversas bases de cálculo (6-311++G**, 6-311G*, 6-311G**, MP2/TZ2P++, TZ2P(f,d)++), na optimização de geometrias, determinação de frequências e de valores de entalpia e entropia.

7.2. Rede 3D de moléculas de água

Neste trabalho, foi analisado o espectro de Raman do sal supramolecular **1** ($(\text{H}_2\text{pip})_3[\text{Ge}(\text{hedp})_2] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$, ($\text{H}_2\text{pip}^{2+}$ - catião piperazina, $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2^{2+}$; hedp^{5-} - forma desprotonada do ácido etidrónico, $\text{C}_2\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^{5-}$) a várias temperaturas na sua forma pura e deuterada. Adicionalmente, foram efectuados alguns estudos teóricos relativos aos agregados de água tridimensionais (3D) encontrados na estrutura cristalina.

O composto **1** é constituído por uma matriz híbrida orgânica-inorgânica, unida por ligações de hidrogénio, que contém cavidades no seu interior apresentando uma organização tridimensional de moléculas de água. Esta estrutura de moléculas de água é estável até 22 °C e a sua destruição provoca o colapso da estrutura. Uma das características interessantes deste composto é um novo tipo de agregado de água, um octâmero, cuja estabilidade é determinada pela estrutura híbrida, tal como será demonstrado por intermédio da aplicação de cálculos DFT.

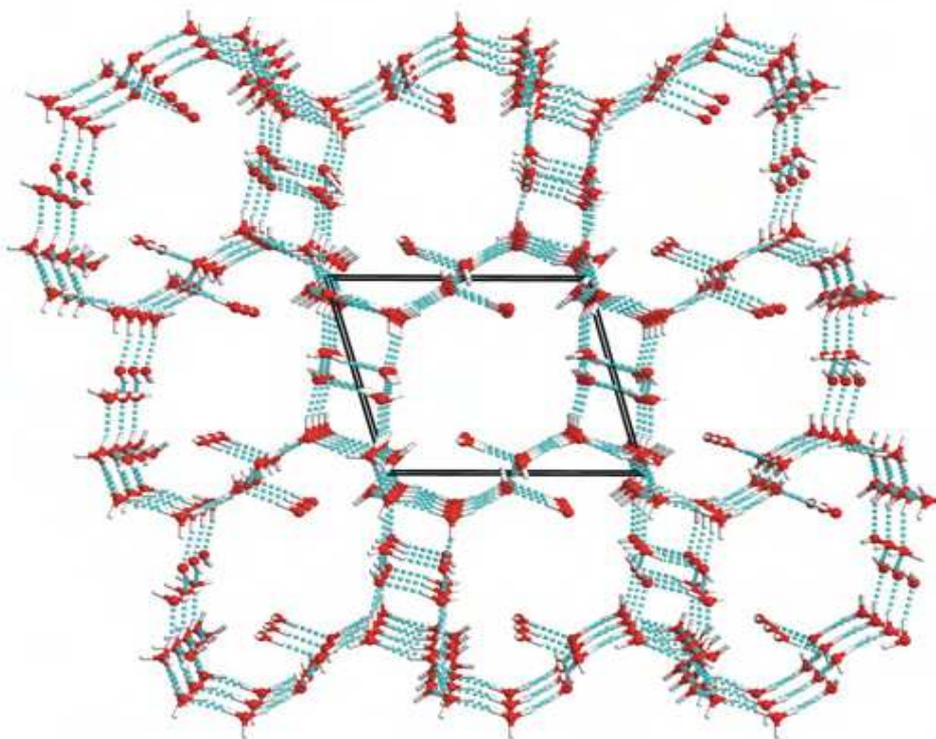


Figura 7.1 - Perspectiva ao longo da direcção [100] da célula unitária da estrutura tridimensional de ligações de hidrogénio. Estrutura 3D de moléculas de água (ligações de hidrogénio representadas a azul claro).²⁶

7.2.1. Métodos computacionais na determinação da estabilidade de agregados de água

Dependendo da abordagem efectuada ao cristal **1**, a unidade estrutural mais significativa do agregado de água tridimensional pode ser considerada um hexâmero ou um octâmero. Se analisarmos exclusivamente as interacções entre as moléculas que se encontram mais próximas, a unidade estrutural mais importante é sem dúvida um hexâmero (**Figura 7.2**).

A geometria linear do hexâmero representada na **Figura 7.2** é apenas possível devido às interacções estabelecidas entre as moléculas de água do agregado e a matriz híbrida do composto **1**. Cálculos efectuados com algumas restrições geométricas mostram que a estrutura linear isolada possui uma energia cerca de 88 kJ/mol superior ao agregado mais estável constituído por seis moléculas de água (ver **Tabela 7.1**).^{18, 27}

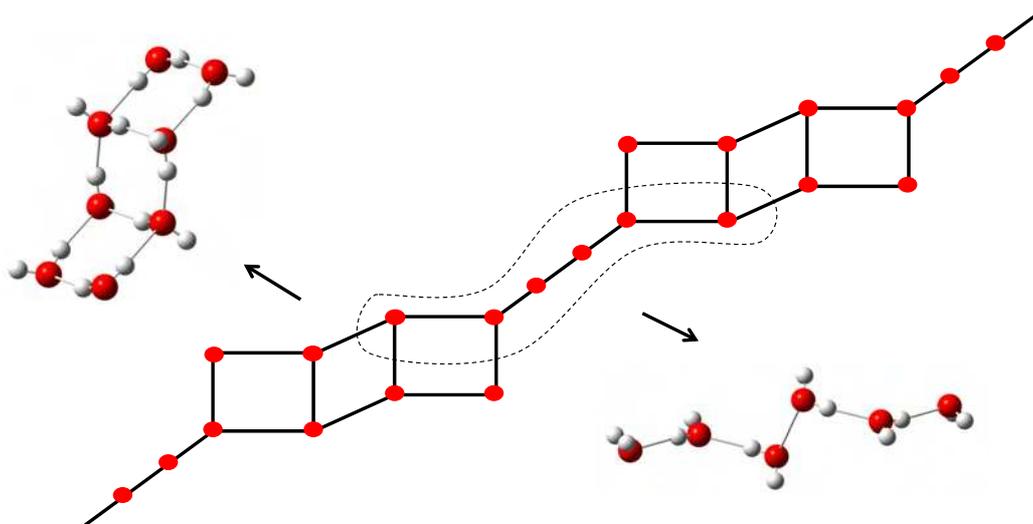


Figura 7.2 – Representação esquemática do arranjo de moléculas de água existente na estrutura cristalina do composto **1**. É possível distinguir um hexâmero (se considerarmos as moléculas mais próximas entre si) e também um octômero, formado no interior da cavidade (estabelecendo a ligação entre as diversas camadas).

Tabela 7.1 – Energia e estruturas otimizadas de três hexâmeros de água.

	Estrutura	Energia (kJ/mol)	ΔE (kJ/mol) ^[a]
I – Linear		$-1,20457526 \times 10^6$	88.11
II – Barco		$-1,204657998 \times 10^6$	5.4
III - Cadeira		$-1,204663372 \times 10^6$	0.00

[a] $\Delta E = E_{\text{estrutura I-III}} - E_{\text{cadeira}}$

Tal como já foi referido, uma das características interessantes do agregado de água encontrado em **1** é o octômero em cadeira centrossimétrico.

Inúmeros estudos teóricos e experimentais têm sido dedicados à análise da estrutura de agregados com oito moléculas de água (H_2O)₈.^{3, 12, 15, 19, 21-23, 25, 28} A maioria destes estudos tem dado ênfase a estruturas cúbicas, sendo que as estruturas D_{2d} e S_4 correspondem ao mínimo de energia, uma vez que maximizam a co-operatividade das ligações de hidrogénio.²² Para além de estudos dedicados a estruturas cúbicas,^{10, 12} é também possível encontrar referências a estruturas cíclicas³ e um elevado número de outras estruturas.¹³ Tanto quanto foi possível averiguar, estas estruturas em cadeira tricíclicas e centrossimétricas não foram até à data descritas entre as mais estáveis.

Estudos cristalográficos de várias moléculas revelam agregados de (H_2O)₈ ligados a complexos orgânicos e inorgânicos, incluindo um cubo C_i ,¹² um octâmero distorcido pseudo- S_4 ¹⁰ e uma estrutura cíclica.³ Na maioria dos casos analisados, as forças de empacotamento cristalino e as ligações de hidrogénio entre os agregados de água e as moléculas vizinhas do complexo, tornam a fase sólida muito diferente do ambiente de fase gasosa, estabilizando geometrias que não correspondem a mínimos globais de energia, de acordo com os cálculos efectuados para as estruturas isoladas.

Existem apenas seis possíveis arranjos centrossimétricos para octâmeros de água em cadeira, dependendo da localização de seis grupos OH “livres” (não envolvidos em ligações de hidrogénio com outras moléculas do octâmero, **Figura 7.3**).

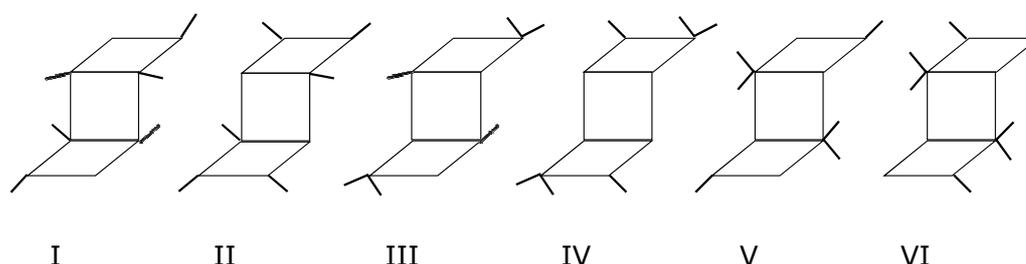
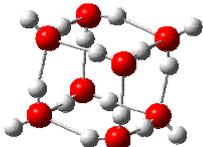


Figura 7.3 – Representação esquemática de seis cadeiras tricíclicas centrossimétricas de octâmeros de água, combinando as distintas localizações dos seis grupos OH “livres” (não se incluem alterações em orientações relativas das ligações). Apenas as estruturas I-IV convergem para um mínimo na otimização de geometria ao nível B3LYP/6-311++G**.

De forma a investigar as estabilidades relativas da estrutura em cadeira tricíclica encontrada em **1** em comparação com outras formas estáveis do octâmero, foram efectuados cálculos de energia e otimização de geometrias ao nível B3LYP, com a base 6-311++G**, utilizada anteriormente em agregados de água com resultados bastante satisfatórios.^{19, 22, 23} A estrutura, bem como as energias dos diferentes conformémeros encontram-se esquematizadas na **Tabela 7.2**.

Tabela 7.2 – Energia e estruturas otimizadas dos cinco octâmeros de água considerados neste estudo.

	Estrutura	Energia (kJ/mol)	ΔE (kJ/mol) ^[a]	λ ^[b]
I		$-1,60617103 \times 10^6$	77,09	2
II		$-1,60623326 \times 10^6$	14,86	0
III		$-1,60616699 \times 10^6$	81,13	2
IV		$-1,60616564 \times 10^6$	82,48	2
Cubo		$-1,60624812 \times 10^6$	0,00	0

[a] $\Delta E = E_{\text{estrutura I-IV}} - E_{\text{cubo}}$; [b] λ - número de frequências vibracionais imaginárias

Das cinco geometrias octaméricas consideradas, a mais estável é o cubo centrossimétrico. No que diz respeito aos quatro confórmeros em cadeia, o mais estável é a cadeia tricíclica II. As principais diferenças entre estas quatro estruturas residem nas posições relativas dos átomos de hidrogénio nas quatro moléculas de água do agregado central. Na estrutura I, existem quatro hidrogénios orientados para fora do plano no agregado central (H3, H6, H9, H12, **Figura 7.4**) e um hidrogénio em cada um dos lados da cadeia (H14 e H 23, **Figura 7.4**). Por outro lado, a estrutura IV (menos estável) não possui qualquer átomo de hidrogénio “livre” no agregado central.

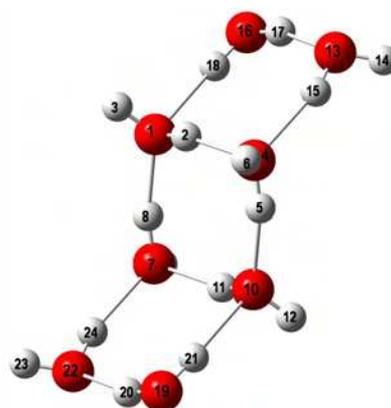


Figura 7.4 – Octâmero tricíclico e centrossimétrico (estrutura I) de moléculas de água otimizado por cálculos DFT e numeração atômica utilizada no texto.

Tabela 7.3 – Parâmetros geométricos do octâmero I.

Comprimento de ligação		Comprimento das ligações de H (pm)		Ângulos (°)	
O7-H8	98,5	H11-O7	184,4	H5-O10-H11	109,026
O7-H9	96,3	H5-O10	176,8	H11-O7-H8	99,479
O22-H24	97,1	H21-O10	215,5	H20-O22-H24	108,913
O22-H23	96,1	H24-O7	193,7	H24-O7-H11	93,162
O19-H20	97,0	H20-O22	199,4	H11-O10-H21	97,559
O19-H21	96,5				
O10-H11	98,1				
O10-H12	96,3				

Os resultados descritos anteriormente indicam que a estrutura I não corresponde a um mínimo de energia e que a sua existência na estrutura cristalina do composto **1** é devida exclusivamente às restrições impostas pela cavidade, através da formação de ligações de hidrogênio adicionais entre o octâmero de água e o cristal.

7.2.2. Estudos espectroscópicos

A dinâmica dos agregados de água foi igualmente analisada por espectroscopia de Raman, através da monitorização das velocidades de troca $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ e $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$, à temperatura ambiente, pela observação das alterações espectrais nas bandas correspondentes às elongações dos grupos OH e

OD.²⁹ A troca H/D (deuteração) é cerca de duas vezes mais rápida que o processo inverso (D/H), indicando que o passo limitante do mecanismo de substituição H/D não é a quebra das ligações O-H e O-D (neste caso a relação entre a velocidade dos dois processos seria *ca.* 10). Sendo assim, é mais plausível que o mecanismo seja controlado pela difusão de moléculas D₂O/H₂O no interior do cristal.²⁹ No entanto, a análise do espectro vibracional na região dos modos ν OH(D) mostra a presença de osciladores OH/D com velocidades de troca diferentes.

Na **Figura 7.5** encontram-se representados os espectros de Raman de uma amostra do composto **1** exposta a uma atmosfera de D₂O durante intervalos de tempo diferentes. Em primeiro lugar (**Figura 7.5** – 0,5 h), as moléculas de D₂O são adsorvidas pelos cristais de uma forma não estruturada. O perfil da banda corresponde ao perfil da mesma banda no espectro da substância D₂O (**Figura 7.6**). O segundo passo (**Figura 7.5** – 6,0 h) é caracterizado pela presença de uma banda bem definida a 2514 cm⁻¹, relacionada com ligações OD que possuem uma localização restrita. No terceiro passo (**Figura 7.5** – 22,5 h), a banda a 2385 cm⁻¹ torna-se dominante e por fim, no último passo ocorre uma definição do ombro a 2577 cm⁻¹. Este comportamento evidencia a presença de moléculas de água em ambientes marcadamente distintos e, portanto, com dinâmicas de troca H/D diferentes. Embora não seja possível identificar as moléculas de água ou os agregados responsáveis por cada um dos passos acima descritos, estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por ²H RMN que revelam a presença de moléculas de água móveis e uma estrutura híbrida relativamente rígida.²⁶

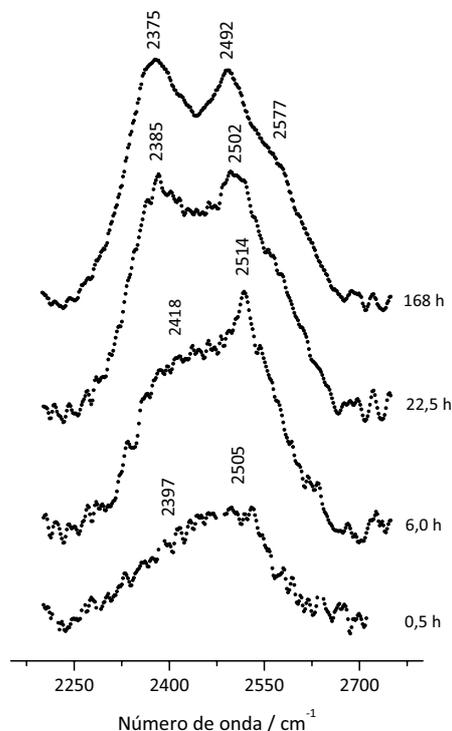


Figura 7.5 – Espectros de Raman do composto **1** na região de ν OD para diferentes tempos de exposição a uma atmosfera de D₂O.

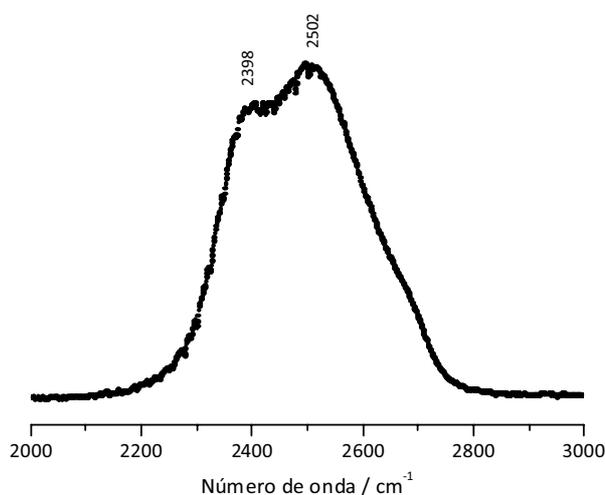


Figura 7.6 – Espectro de Raman de D₂O à temperatura ambiente.

Analisando os processos de substituição isotópica noutras regiões espectrais e aplicando uma metodologia semelhante à aplicada no **Capítulo 3**, é possível determinar a cinética de cada processo para cada região estudada. As regiões escolhidas para este estudo foram 780-850 e 1140-1225 cm⁻¹ e os resultados obtidos estão ilustrados nas **Tabelas 7.4 e 7.5**.

A evolução do perfil das bandas em cada um dos processos analisados encontra-se representada na **Figura 7.7** (região 780-850 cm⁻¹ para o processo de deuteração) e na **Figura 7.8** (região 1140-1225 cm⁻¹ para o processo inverso à deuteração).

Tabela 7.4 – Parâmetros cinéticos para o processo de troca H → D (Deuteração).

Região espectral (cm ⁻¹)	Modelo Cinético	f(α)	k (h ⁻¹)	S _b	R ²	t _{1/2} (h) ^[a]	
780-850	M4	α ^{3/2}	0.0436t+0.0167	0.0436	0.0011	0.9981	7.7
	M8	-ln(1-α)	0.0834t+0.0741	0.0834	0.0066	0.9870	7.4
1140-1225	M8	-ln(1-α)	0.0379t+0.0447	0.0379	0.0009	0.9983	17
	M17	1-(2α/3)-(1-α) ^{2/3}	0.0020t-0.0012	0.0020	0.00004	0.9983	19

[a] Tempo de meia hidratação [f(α)=0.354, 0.693 e 0.0367 para os modelos M4, M8 e M17, respectivamente, usando α=0.5]

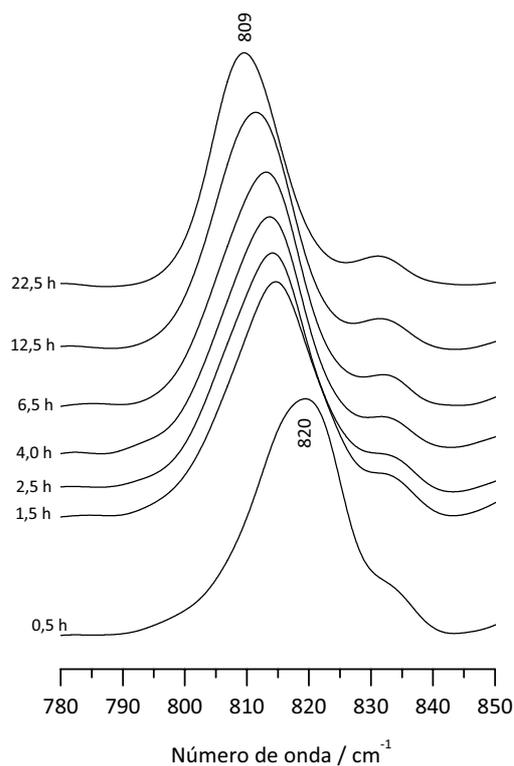


Figura 7.7 – Espectros de Raman do composto **1** na região 780-850 cm^{-1} para diferentes intervalos de exposição a uma atmosfera de D_2O (troca $\text{H} \rightarrow \text{D}$).

Tabela 7.5 – Parâmetros cinéticos para o processo de troca $\text{D} \rightarrow \text{H}$ (inverso da deuteração).

Região espectral (cm^{-1})	Modelo Cinético	$f(\alpha)$	k (h^{-1})	S_b	R^2	$t_{1/2}$ (h) ^[a]	
780-850	M18	$-\ln(1-\alpha)$	$0.042t+0.0203$	0.042	0.00149	0.9912	16.0
	M14	α^2	$0.015t-0.0153$	0.015	0.00048	0.9919	17.7
1140-1225	M14	α^2	$0.0069t+0.001$	0.0069	0.00023	0.9921	36.2
	M15	$(1-\alpha)\ln(1-\alpha)+\alpha$	$0.0044t-0.0014$	0.0044	0.00017	0.9899	35.3

[a] Tempo de meia hidratação [$f(\alpha)=0.693, 0.250$ e 0.153 para os modelos M8, M14 e M15, respectivamente, usando $\alpha=0.5$]

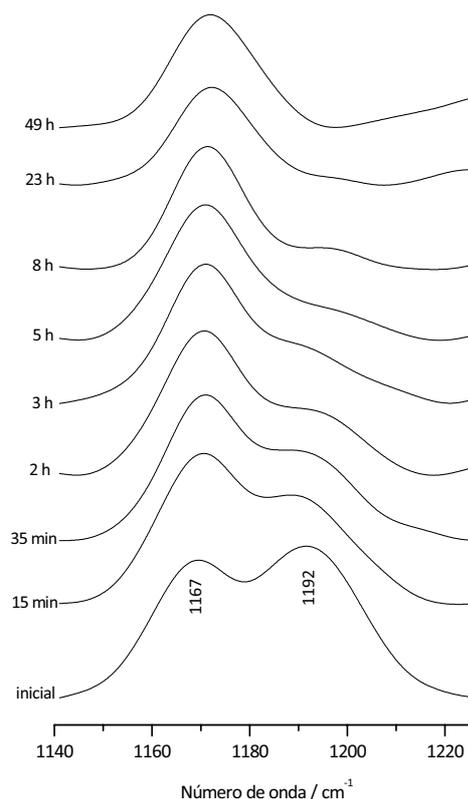


Figura 7.8 – Espectros de Raman do composto **1** (após a deuteração) na região 1140-1225 cm^{-1} para diferentes intervalos de exposição a uma atmosfera de H_2O (troca D \rightarrow H).

Tal como já foi referido anteriormente, a troca H/D é cerca de duas vezes mais rápida comparativamente ao processo inverso, de troca D/H, o que parece indicar que ocorre difusão de moléculas de água “inteiras” e não de D^+/H^+ . Por outro lado, a troca H/D e D/H é sempre mais rápida na região 780-850 cm^{-1} . O modo vibracional localizado na região 1140-1225 cm^{-1} é portanto afectado pela deuteração de uma molécula /cluster cuja estrutura é mais rígida.

7.3. Rede 2D de moléculas de água

No âmbito deste Capítulo foi igualmente analisada uma rede bidimensional (2D) de moléculas de água localizada no interior de uma estrutura microporosa metalorgânica (composto **2**): $[\text{Y}(\text{H}_2\text{hedp})(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3(\text{H}_2\text{O}) - \text{H}_3\text{hedp}$: ácido etidrónico. Esta estrutura cristalina, classificada como metalorgânica (*Metal-organic framework*, sigla em inglês MOF¹) estabiliza uma rede de moléculas de

¹ materiais poliméricos porosos, constituídos por iões metálicos e ligandos orgânicos formando estruturas mono-, bi- e tridimensionais que podem ser porosas.

água baseada em estruturas hexaméricas, que se associam de forma a criar anéis decâmicos, tal como se encontra ilustrado na **Figura 7.9**.

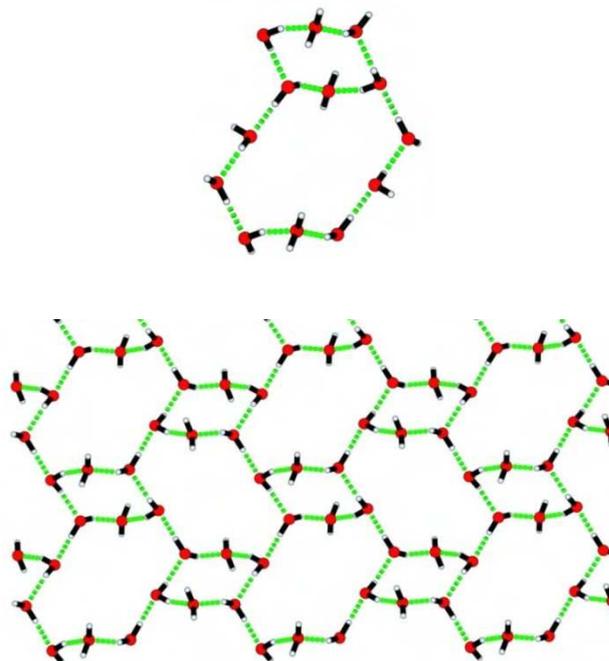


Figura 7.9 – Unidade básica (em cima) da rede bidimensional de moléculas de água encontrada no espaço intercamadas do composto **2** (em baixo).³⁰

Embora diversos estudos recentes descrevam vários tipos de agregados de água discretos (tais como tetrâmeros, pentâmeros, hexâmeros, octâmeros, decâmeros e dodecâmeros), não existem muitos dados relativos a descrições cristalográficas completas de agregados 2D de moléculas de água não coordenadas. Tanto quanto sabemos, o agregado de água 2D encontrado no composto **2** não foi, até à data, descrito na literatura.

As unidades decâmicas e hexaméricas representadas na **Figura 7.9** exibem ambas a conformação típica em “cadeira”, com a distância internuclear média $O\cdots O$ de 2.841 Å,³⁰ valor próximo da distância internuclear na água líquida (2.85 Å), o que torna este material um potencial modelo para o estudo da água em espaços confinados.

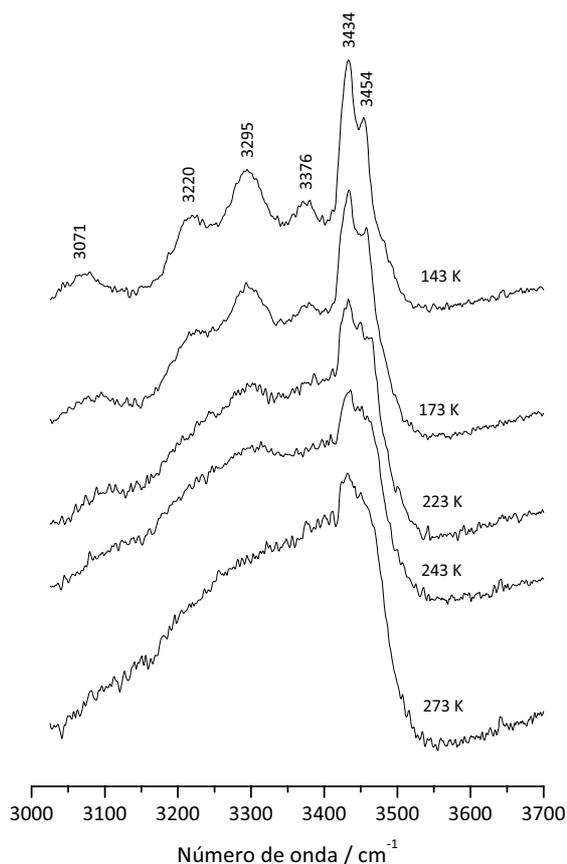


Figura 7.10 – Espectros de Raman do composto **2** a várias temperaturas.

Pela análise da **Figura 7.10** observa-se que, à medida que a temperatura diminui, é possível distinguir no espectro de Raman do composto **2** seis bandas bem definidas. A observação deste fenómeno (definição das bandas à medida que a temperatura diminui) corresponde à diminuição da dinâmica molecular, promovida pelo decréscimo na mobilidade e liberdade vibracional dos grupos OH.

De forma a obter dados espectroscópicos adicionais relativos a este composto, foi efectuada a substituição H→D, através da cristalização do composto **2** em D₂O. Nas **Figuras 7.11** e **7.12** estão representados os espectros de Raman a 143 K do composto puro (cristalizado em H₂O), do composto parcialmente deuterado (cristalizado em D₂O) e o resultado da subtracção numérica do espectro puro e do deuterado. Através da análise dos resultados desta subtracção para toda a gama espectral, é possível concluir que a amostra exposta a D₂O não foi totalmente deuterada, uma vez que facilmente se detecta a presença de inúmeras bandas do composto não deuterado.

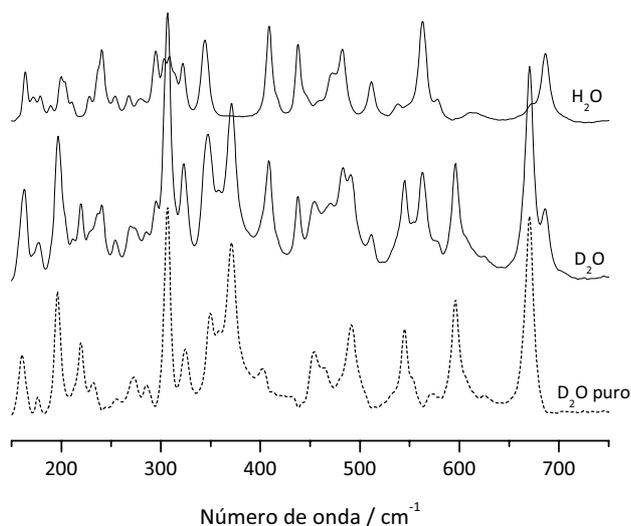


Figura 7.11 – Espectros de Raman do composto **2** puro (H_2O), cristalizado em D_2O (ao centro) e resultado da subtração algébrica dos dois primeiros espectros na região $150\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ ($T=143\text{ K}$).

Uma característica interessante deste sistema é que o composto parcialmente deuterado se apresenta como uma mistura de dois componentes distintos: o não deuterado e o totalmente deuterado – sendo o espectro observado equivalente à soma de dois espectros independentes. Deste modo, a subtração do espectro não deuterado elimina todos os vestígios da contribuição de H_2O , na quase totalidade do espectro, permitindo obter o espectro do “deuterado puro” (**Figuras 7.11 e 7.12**). A exceção é observada na região $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, representada na **Figura 7.13**. Os osciladores responsáveis por estas vibrações (referentes à região $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) deverão, em princípio, estar localizados de forma a não perturbarem as restantes vibrações, o que nos leva a propor que estarão localizados no agregado de moléculas de água. Ou seja, prevê-se que todos os hidrogénios sejam completamente substituídos por deutérios nos grupos P-OH, C-OH e Y-OH₂ e não totalmente substituídos na rede 2D de moléculas de água. A hipótese apresentada baseia-se na dinâmica dos agregados de $(\text{H}_2\text{O})_n$, que permitem ao átomo de hidrogénio deslocar-se entre as várias moléculas de água que interagem por intermédio de ligações de hidrogénio.

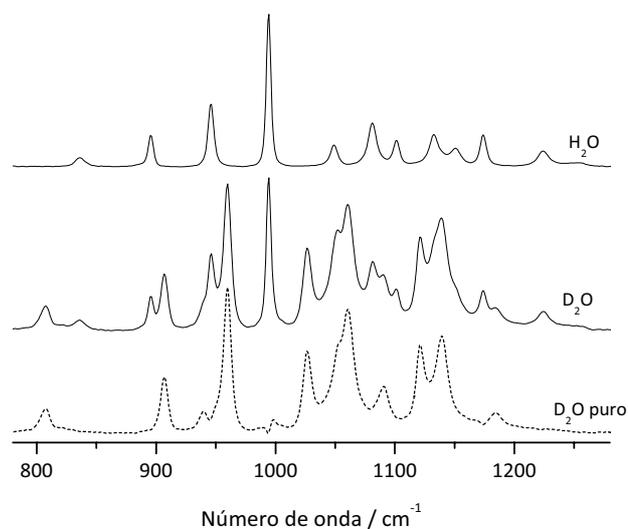


Figura 7.12 – Espectros de Raman do composto **2** puro (H_2O), cristalizado em D_2O (ao centro) e resultado da subtração algébrica dos dois primeiros espectros na região na região $800\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ ($T=143\text{ K}$).

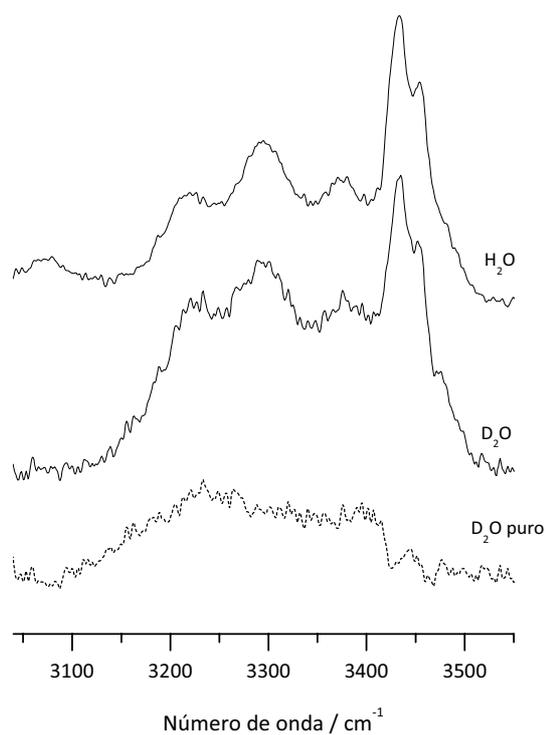


Figura 7.13 - Espectros de Raman do composto **2** puro (H_2O), cristalizado em D_2O (ao centro) e resultado da subtração algébrica dos dois primeiros espectros na região na região $3050\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ ($T=143\text{ K}$).

Consequentemente, é possível propor uma atribuição para as bandas que se encontram na região $3050\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$, sendo as bandas A e B relacionadas com a molécula de água ligada ao átomo

de Y, as bandas C, D e E pertencentes ao grupo OH de C-OH e à rede bidimensional de águas e por fim, a banda designada por F poderá ser associada ao grupo OH de P-OH. Esta interpretação está de acordo com alguns cálculos preliminares realizados por um método ONIOM ao nível B3LYP/6-311G** para as moléculas de água e B3LYP/LANL2DZ para a matriz híbrida. Os cálculos efectuados, bem como dados recolhidos da literatura³¹ indicam que a banda a menores valores de número de onda deve ser atribuída ao grupo OH ligado ao átomo de fósforo (P-OH) e aproximadamente a 3300 cm^{-1} localiza-se a $\nu\text{O-H}$ do grupo C-OH.

A atribuição das bandas A e B a elongações dos grupos OH ligados ao átomo de Ítrio (Y) pode ser justificada com base na observação do perfil quase constante que apresenta à medida que a temperatura diminui. Esta característica parece indicar que o ambiente químico em redor destes grupos OH é distinto dos restantes grupos OH presentes no composto, o que revela que a localização destes grupos OH (Y-OH_2) é bastante específica.

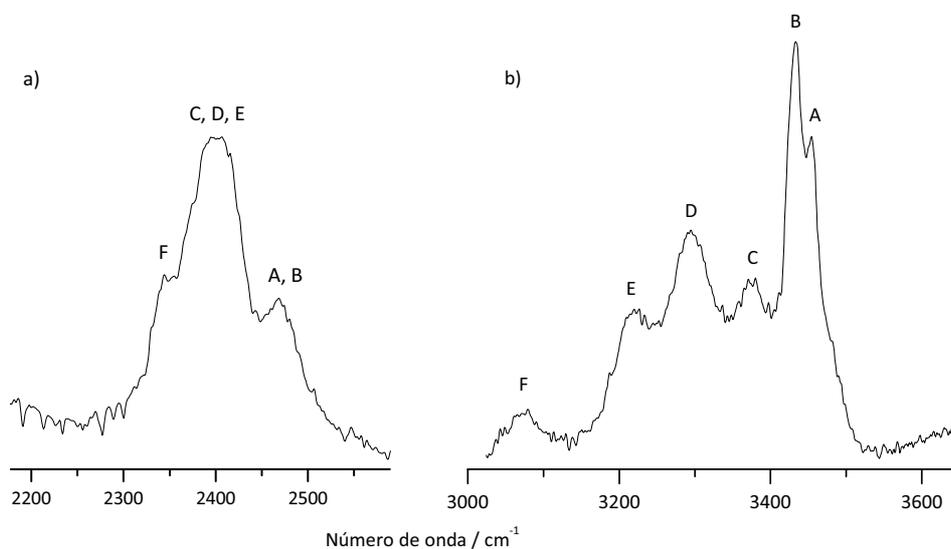


Figura 7.14 – Espectros de Raman do composto **2 a)** exposto a D_2O na região de $\nu\text{O-D}$ e **b)** puro na região $\nu\text{O-H}$.

7.4. Conclusões

A utilização combinada de cálculos DFT e espectroscopia de Raman (variação de temperatura e substituição isotópica) permite reunir um vasto conjunto de dados que, articulado com resultados provenientes de outras técnicas experimentais (cristalografia, RMN, análise térmica, entre outras) auxilia na caracterização e compreensão das características de agregados de água.

Os resultados apresentados ao longo deste Capítulo indicam que as geometrias encontradas no interior de estruturas cristalinas de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos, podem não corresponder a mínimos globais de energia, caso em que a sua existência nos cristais dos compostos hospedeiros é devida unicamente à influência exercida pela cavidade (efeito de “molde”) através de ligações de hidrogénio adicionais. Por outro lado, pela análise do resultado de processos de substituição isotópica, foi possível identificar vários tipos de ambientes químicos na vizinhança das moléculas de água que formam os agregados ou de grupos OH existentes na composição química das matrizes híbridas. Desta forma, foi possível confirmar a existência de pelo menos dois agregados distintos de moléculas de água na rede tridimensional composta por hexâmeros e octâmeros no interior do sal supramolecular $(\text{H}_2\text{pip})_3[\text{Ge}(\text{hedp})_2] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$. Por último, foram identificadas as bandas correspondentes aos diversos grupos hidroxilo bem como as características dinâmicas do agregado bidimensional de moléculas de água pertencentes ao composto $[\text{Y}(\text{H}_2\text{hedp})(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$.

7.5. Referências

1. A. Datta, S. K. Pati, Stability of Cyclic $(\text{H}_2\text{O})_n$ Clusters Within Molecular Solids: Role of Aromaticity, *Int. J. Quantum Chem.* **2006**, *106*, 1697-1702.
2. T. K. Prasad, M. V. Rajasekharan, A Novel Water Octamer in $\text{Ce}(\text{dipic})_2(\text{H}_2\text{O})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Crystallographic, Thermal, and Theoretical Studies, *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 488-491.
3. J. L. Atwood, L. J. Barbour, T. J. Ness, C. L. Raston, P. L. Raston, A Well-Resolved Ice-like $(\text{H}_2\text{O})_8$ Cluster in an Organic Supramolecular Complex, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7192-7193.
4. B. Sreenivasulu, J. J. Vittal, Helix inside a Helix: Encapsulation of Hydrogen-Bonded Water Molecules in a Staircase Coordination Polymer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5769-5772.
5. K. Raghuraman, K. K. Katti, L. J. Barbour, N. Pillarsetty, C. L. Barnes, K. V. Katti, Characterization of Supramolecular $(\text{H}_2\text{O})_{18}$ Water Morphology and Water-Methanol $(\text{H}_2\text{O})_{15}(\text{CH}_3\text{OH})_3$ Clusters in a Novel Phosphorus Functionalized Trimeric Amino Acid Host, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6955-6961.
6. M. Zuhayra, W. U. Kampen, E. Henze, Z. Soti, L. Zsolnai, G. Huttner, F. Oberdorfer, A Planar Water Tetramer with Tetrahedrally Coordinated Water Embedded in a Hydrogen Bonding Network of $[\text{Tc}_4(\text{CO})_{12}(\text{u}_3\text{-OH})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*.
7. G. Jiang, J. Bai, H. Xing, Y. Li, X. You, A Tetrahedral Water Tetramer in a Zeolite-like Metal-Organic Framework Constructed from $\{(\text{H}_3\text{O})_2[\text{Fe}_6\text{O}\{(\text{OCH}_2)_3\text{CCH}_3\}_4\text{Cl}_6]4\text{H}_2\text{O}\}$, *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 1264-1266.
8. Y.-g. Sun, E.-j. Gao, D.-z. Wei, Construction of two-dimensional supramolecular structure containing water tetramer and octamer, *Inorg. Chem. Commun.* **2007**, *10*, 467-470.
9. S. K. Ghosh, P. K. Bharadwaj, Supramolecularly assembled pentameric and octameric water clusters stabilized by a mixed complex of Ni(II), *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 1685-1689.
10. R. J. Doedens, E. Yohannes, M. I. Khan, Novel water clusters in the crystalline state: structures of a symmetrical, cyclic hexamer and an 'opened-cube' octamer, *Chem. Commun.* **2002**, 62-63.
11. J. N. Moorthy, R. Natarajan, P. Venugopalan, Characterization of a Planar Cyclic Form of Water Hexamer in an Organic Supramolecular Complex: An Unusual Self-Assembly of Bimesityl-3,3'-Dicarboxylic Acid, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3417-3420.
12. W. B. Blanton, S. W. Gordon-Wylie, G. R. Clark, K. D. Jordan, J. T. Wood, Synthesis and Crystallographic Characterization of an Octameric Water Complex, $(\text{H}_2\text{O})_8$, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3551-3552.
13. D.-s. Li, Y.-y. Wang, X.-j. Luan, P. Liu, C.-h. Zhou, H.-r. Ma, Q.-h. Shi, 1-D Open-Channeled 3-D Supramolecular Self-Assembled Frameworks Encapsulating Unprecedented Cyclic $(\text{H}_2\text{O})_8$ Clusters or Solvent Molecules, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 2678-2684.
14. L. J. Barbour, G. W. Orr, J. L. Atwood, An intermolecular $(\text{H}_2\text{O})_{10}$ cluster in a solid-state supramolecular complex, *Nature* **1998**, *393*, 671-673.
15. R. Ludwig, Water: From Clusters to the Bulk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1808 - 1827.

16. Z.-H. Dang, J. Zhao, L. Xu, Supramolecular architectures built of triangular molybdenum(IV) heterometallic clusters encapsulating novel water clusters, *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 2999-3004.
17. S. D. Belair, J. S. Francisco, Stability of the cubic water octamer, *Phys. Rev. A* **2003**, *67*, 063206.
18. J. Kim, K. S. Kim, Structures, binding energies, and spectra of isoenergetic water hexamer clusters: Extensive ab initio studies, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 5886-5895.
19. J. Kim, D. Majumdar, H. M. Lee, K. S. Kim, Structures and energetics of the water heptamer: Comparison with the water hexamer and octamer, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 9128-9134.
20. S. Maeda, K. Ohno, Structures of Water Octamers (H₂O)₈: Exploration on Ab Initio Potential Energy Surfaces by the Scaled Hypersphere Search Method, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4527-4534.
21. J. O. Jensen, P. N. Krishnan, L. A. Burke, Theoretical study of water clusters: octamer, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *246*, 13-19.
22. M. B. Day, K. N. Kirschner, G. C. Shields, Pople's Gaussian-3 Model Chemistry Applied to an Investigation of (H₂O)₈ Water Clusters, *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, *102*, 565-572.
23. H. M. Lee, S. B. Suh, J. Y. Lee, P. Tarakeshwar, K. S. Kim, Structures, energies, vibrational spectra, and electronic properties of water monomer to decamer, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 9759-9772.
24. J. M. Ugalde, I. Alkorta, J. Elguero, Water Clusters: Towards an Understanding Based on First Principles of Their Static and Dynamic Properties, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 717-721.
25. J. Sadlej, V. Buch, J. K. Kazimirski, U. Buck, Theoretical Study of Structure and Spectra of Cage Clusters (H₂O)_n, n = 7-10, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 4933-4947.
26. J. Rocha, F.-N. Shi, F. A. A. Paz, L. Mafra, M. Sardo, L. Cunha-Silva, J. Chisholm, P. Ribeiro-Claro, T. Trindade, Water framework within nanoporous organic-inorganic hybrid (H₂pip)₃[Ge(hedp)₂].14(H₂O), *submetido* **2009**.
27. K. Ohno, M. Okimura, N. Akaib, Y. Katsumotoa, The effect of cooperative hydrogen bonding on the OH stretching-band shift for water clusters studied by matrix-isolation infrared spectroscopy and density functional theory, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3005-3014.
28. U. Buck, I. Ettischer, M. Melzer, V. Buch, J. Sadlej, Structure and Spectra of Three-Dimensional (H₂O)_n Clusters, n = 8, 9, 10, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 2578-2581.
29. A. M. Amado, P. J. A. Ribeiro-Claro, H/D and D/H exchange rates in α -cyclodextrin and α -cyclodextrin inclusion compounds. Raman spectroscopic study, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1997**, *93*, 2387-2390.
30. F. N. Shi, L. Cunha-Silva, L. Mafra, T. Trindade, L. D. Carlos, F. A. Almeida Paz, J. Rocha, Interconvertible Modular Framework and Layered Lanthanide(III)-Etidronic Acid Coordination Polymers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 150-167.
31. N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed., Academic Press, San Diego, **1990**.

Capítulo 8

Considerações Finais

CONTEÚDO

8.1. Discussão final	221
PSEUDOPOLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS	221
POLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS E TRANSIÇÃO DE FASE DE MISTURAS DE ÁCIDOS GORDOS	221
COMPOSTOS AROMÁTICOS INCLUÍDOS EM CICLODEXTRINAS	222
INTERACÇÃO DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS COM SUPERFÍCIES METÁLICAS	222
AGREGADOS DE ÁGUA EM MATERIAIS HÍBRIDOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS	223
8.2. Perspectivas Futuras	224
PSEUDOPOLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS	224
PARES EM MATERIAIS MOLECULARES	224
AGREGADOS DE ÁGUA EM MATERIAIS HÍBRIDOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS	224

8.1. Discussão geral

As considerações apresentadas neste Capítulo não são conclusões finais, na medida em que todos os estudos descritos ao longo desta dissertação poderão ser aperfeiçoados, complementados e considerados como pontos de partida para outras investigações.

A perspectiva unificadora subjacente a estes trabalhos consiste na demonstração da aplicabilidade e relevância de estudos espectroscópicos (particularmente espectroscopia de Raman) associados a cálculos DFT na caracterização de diversos sistemas com interações intermoleculares.¹ Foi possível verificar, no decurso dos trabalhos que conduziram à presente dissertação, que a aplicação desta metodologia (espectroscopia de Raman apoiada por métodos computacionais) permite reunir um conjunto de informação importante no estudo de sistemas complexos envolvendo associações moleculares. Os tópicos abordados foram:

✓ PSEUDOPOLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS

Amostras cristalinas de duas formas pseudopolimórficas de Niclosamida foram monitorizadas por espectroscopia de Raman, que se revelou uma técnica útil na caracterização qualitativa e quantitativa de transições pseudopolimórficas anidro↔hidrato deste sistema. Concluiu-se que os processos de hidratação e desidratação ocorrem num só passo com tempos de meia vida de *ca.* 144 h e 63 h a 24 °C, respectivamente. Outro parâmetro relevante neste tipo de estudos, a humidade relativa crítica, foi também determinado para os dois processos, sendo de *ca.* 90% para a hidratação e 6% para a desidratação no decorrer de duas semanas de exposição.

Foi ainda possível, através da análise do espectro vibracional, inferir algumas conclusões relativas à localização da molécula de água na forma mono-hidratada, pela interpretação das alterações espectrais observadas em bandas relevantes.

✓ POLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS E TRANSIÇÃO DE FASE DE MISTURAS DE ÁCIDOS GORDOS

A metodologia PiMM foi aplicada de forma global e parcial a dois sistemas distintos: um sólido farmacêutico com polimorfismo e misturas binárias de ácidos gordos. Esta metodologia proporciona um suporte computacional robusto para a atribuição completa do espectro vibracional e também para a elucidação estrutural de alguns sistemas. Através da aplicação desta abordagem foi possível efectuar a atribuição completa dos espectros de IV e Raman de dois polimorfos anidros da Nitrofurantoína,

¹ Resumo esquemático dos trabalhos apresentados e discutidos na presente dissertação pode ser consultado na última página deste Capítulo.

sólido cristalino que apresenta padrões distintos de ligações $C-H\cdots O$ e $N-H\cdots O$ que se traduzem em espectros vibracionais diferentes. A mesma metodologia permitiu a atribuição mais fundamentada do espectro vibracional dos ácidos gordos, num trabalho em que a espectroscopia vibracional foi aplicada com sucesso na monitorização de transições de fase de misturas binárias de ácidos gordos, funcionando como técnica complementar na construção de diagramas de fase sólido-líquido para alguns sistemas.

✓ COMPOSTOS AROMÁTICOS INCLUÍDOS EM CICLODEXTRINAS

A utilização da espectroscopia vibracional e de cálculos DFT revelou-se particularmente útil na análise de compostos resultantes da inclusão de derivados fenólicos em α , β e γ -Ciclodextrinas.

A estequiometria dos compostos hospedeiro:hóspede foi determinada por análise térmica, enquanto as geometrias de inclusão e a caracterização das interações existentes entre as moléculas de hóspede e as ciclodextrinas foram investigadas com base em dados espectroscópicos e computacionais. Associando os dados de todas as técnicas aplicadas, foi possível propor geometrias de inclusão prováveis para os compostos em ciclodextrina α .

Neste trabalho, os cálculos DFT foram aplicados na optimização da geometria dos monómeros (com respectivos confórmeros) e dímeros e na determinação de frequências vibracionais. Deste modo, foi possível a atribuição completa do espectro vibracional do 3MeOPh, 2MeOPh e 3MePh, que constitui o primeiro passo para uma correcta interpretação das alterações verificadas no espectro em termos estruturais.

✓ INTERACÇÃO DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS COM SUPERFÍCIES METÁLICAS

A interacção de dois sólidos farmacêuticos com superfícies metálicas foi investigada através da utilização de espectroscopia de Raman intensificada à superfície (SERS). A principal conclusão a retirar destes estudos relaciona-se com a detecção e importância do mecanismo de transferência de carga na intensificação do sinal de Raman, possível através da utilização complementar de técnicas experimentais e cálculos DFT. Provou-se ainda ser possível identificar quais as espécies adsorvidas à superfície da prata e sua possível orientação, por análise de espectros de Raman e SERS de soluções aquosas a diferentes valores de pH. Os dados experimentais foram apoiados por cálculos DFT na optimização de geometrias e previsão de frequências vibracionais e por cálculos de intensidades SERS baseados em processos ressonantes de transferência de carga semelhantes a mecanismos de ressonância de Raman.

✓ AGREGADOS DE ÁGUA EM MATERIAIS HÍBRIDOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS

A análise de duas redes de moléculas de água existentes em matrizes cristalinas híbridas foi possível por intermédio da aplicação de espectroscopia de Raman (estudos de variação de temperatura – baixas temperaturas – e substituição isotópica) apoiada por métodos computacionais (otimização de geometrias e cálculo de energias ao nível B3LYP/6-311++G**). Em ambos os casos, rede bidimensional e tridimensional, foi demonstrado que as geometrias exibidas pelos agregados de água não correspondem às geometrias mais estáveis do ponto de vista teórico. Por este motivo, pode concluir-se que a matriz híbrida tem um efeito preponderante na formação deste tipo de agregados, fortemente estabilizados pela formação de ligações de hidrogénio cooperativas entre: (H₂O)-(H₂O) e entre (H₂O)-estrutura híbrida.

Considerando todos os estudos supramencionados, bem como as discussões que os seus resultados proporcionaram, é possível concluir que **a associação da espectroscopia vibracional a cálculos DFT fornece uma ferramenta extremamente vantajosa para o estudo de sistemas químicos/materiais envolvendo associações moleculares**. Este tipo de abordagem é particularmente profícua quando conjugada com outras técnicas de análise (cristalografia, ressonância magnética, análise térmica, entre outras) de forma a reunir o maior número de informação possível para uma caracterização completa, ampla e integrada do material em análise. De uma forma geral, foi possível aprofundar o conhecimento de alguns mecanismos de auto-associação em sistemas que envolvem a existência de interações intermoleculares fracas. Contudo, como foi referido anteriormente, as conclusões deste trabalho esclareceram apenas algumas questões. Outras dúvidas ficaram ainda em aberto e, como seria de esperar, este estudo originou novas questões, desencadeando perspectivas de investigações futuras.

8.2. Perspectivas Futuras

Inerente a qualquer processo de investigação, surgem frequentemente novas questões a investigar, novas ideias para consolidar, aprofundar e melhorar as conclusões retiradas de cada estudo. Desta forma, para complementar o trabalho já efectuado sugerem-se, de seguida, alguns estudos que poderão ser realizados no âmbito de cada tópico abordado.

✓ PSEUDOPOLIMORFISMO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS

Neste contexto, estudos vibracionais que envolvam a medição da intensidade da banda de alongação da ligação *O-H* (ν_{O-H}) permitem obter informação útil relativa ao movimento das moléculas de água no decorrer dos processos de hidratação e desidratação.

✓ PARES EM MATERIAIS MOLECULARES

A aplicação complementar do método PiMM a espectros vibracionais e de RMN, poderá constituir uma abordagem mais completa na previsão de estruturas cristalinas desconhecidas. Partindo dos efeitos observados nos espectros, será possível reproduzir os contactos responsáveis por tais efeitos, otimizar as estruturas de cada dímero e simular quais os contactos presentes na estrutura cristalina de um determinado composto.

O PiMM poderá ser aplicado às duas formas hidratadas da Nitrofurantoína, de forma a estudar na globalidade os fenómenos de polimorfismo e pseudopolimorfismo deste composto, analisando todos os padrões existentes de ligações *C-H...O* e *N-H...O* e os seus efeitos no correspondente espectro vibracional.

Para avaliar as vantagens da aplicação da metodologia PiMM, deveria ser efectuado um estudo sistemático, envolvendo um conjunto considerável de moléculas, no qual a atribuição vibracional fosse realizada aplicando simultaneamente dois métodos: PiMM e cálculos para o cluster completo. Desta forma seria possível avaliar a viabilidade das aproximações propostas pelo PiMM e as suas vantagens, tanto a nível da qualidade dos resultados como do verdadeiro custo computacional.

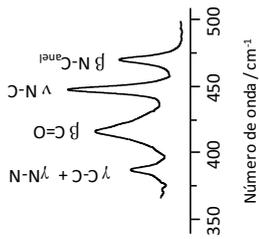
✓ AGREGADOS DE ÁGUA EM MATERIAIS HÍBRIDOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS

Os resultados apresentados para estes sistemas são ainda preliminares, constituindo uma primeira abordagem para estudos mais aprofundados relativos à natureza e características de

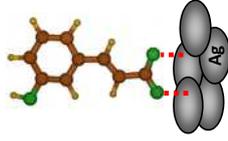
agregados de água. Possíveis trabalhos futuros que poderão enriquecer a investigação envolvem: estudos de temperatura para espectros de infravermelho, substituição isotópica total das estruturas, cálculos envolvendo toda a matriz híbrida e as redes de agregados de água, de forma a possibilitar a atribuição vibracional dos espectros.

De uma forma geral, devem ser exploradas em paralelo outras técnicas para a detecção e estudo de ligações $C-H\cdots O$, nomeadamente a espectroscopia de RMN (de ^{13}C) e difusão inelástica de neutrões (detecção do modo $\nu H\cdots O$). Por RMN é possível monitorizar os comprimentos de ligação entre núcleos de carbono e hidrogénio e verificar se a ligação aumenta ou diminui de comprimento, o que indica o estabelecimento de ligações $C-H\cdots O$. Por outro lado, a difusão inelástica de neutrões, pelas suas características, pode revelar-se de grande utilidade no estudo destas interações pois é especialmente sensível a fenómenos que envolvam átomos de hidrogénio.

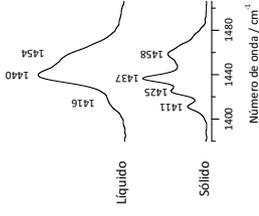
É cada vez mais frequente na investigação em Ciência a procura de abordagens completas e integradas, que possibilitam a caracterização de materiais com recurso a dados provenientes de inúmeras fontes experimentais e modelação teórica. É precisamente nesta óptica de trabalho que se deverá prosseguir, procurando conciliar o conhecimento recolhido de múltiplas áreas do saber.



Calc.	FT-Raman	FT-IR	Descrição
1069	1080 (m)	1078 (m)	β C-H
1038	1041 (w)	1035 (vs)	ν O₂-Me
972	997 (vs)	994 (m)	β C-C (12)
934	-	943 (s)	pMe

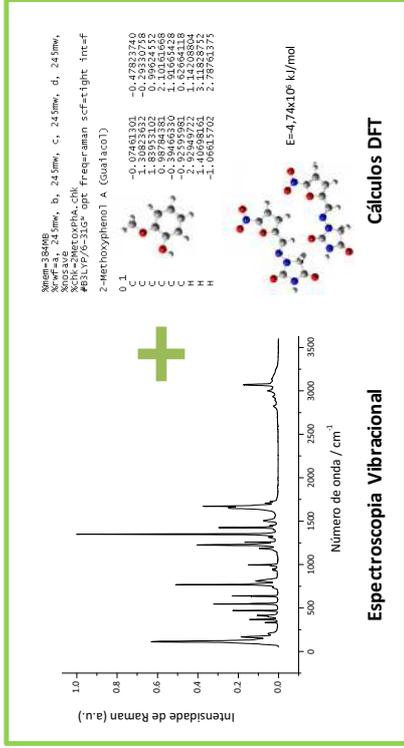


Identificação de espécies adsorvidas (e orientações) em superfícies metálicas

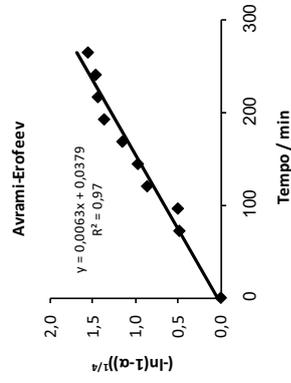


Atribuição Vibracional

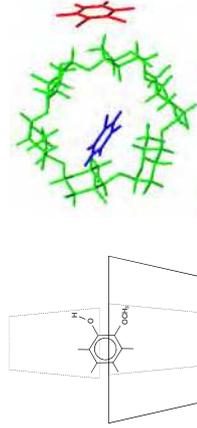
Identificação de diferentes fases numa mistura



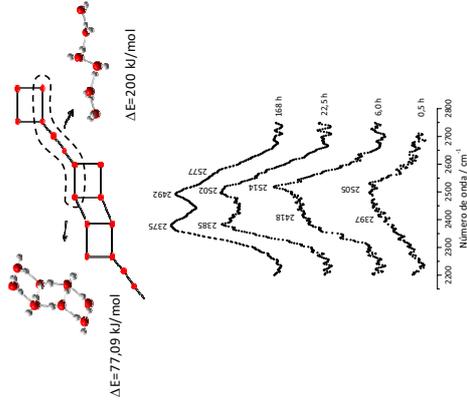
Cinética de processos de hidratação/desidratação



Geometrias de Inclusão em Ciclodextrinas



Monitorização da deuteração e previsão da estabilidade de agregados de água



Capítulo 9

Métodos Experimentais e Computacionais

CONTEÚDO

SECÇÃO EXPERIMENTAL	230
9.1. Materiais.....	230
9.2. Preparação de amostras de niclosamida hidratada	231
9.3. Preparação de amostras de niclosamida a humidades relativas definidas.....	232
9.4. Estudos de calibração para o sistema niclosamida	232
9.5. Preparação das duas formas polimórficas da Nitrofurantoína.....	233
9.6. Preparação de várias misturas binárias de ácidos gordos	233
9.7. Preparação de compostos de inclusão de derivados fenólicos em α -, β - e γ -ciclodextrinas	234
9.8. Preparação de colóides para registo de espectros SERS.....	234
9.9. Preparação da superfície do eléctrodo e das soluções necessárias à obtenção de espectros SERS em eléctrodo	234
9.10. Estudos de deuteração com $(\text{H}_2\text{pip})_3[\text{Ge}(\text{hedp})_2] \cdot 14(\text{H}_2\text{O})$	237
INSTRUMENTAÇÃO.....	237
9.11. Técnicas de caracterização	237
9.11.1. Espectroscopia de Raman.....	237
9.11.2. Espectroscopia de Infravermelho.....	238
9.11.3. Espectroscopia de Raman intensificada à superfície (SERS).....	239
9.11.4. Análises termogravimétricas e calorimétricas	239
TRATAMENTO DE DADOS	240
9.12. Obtenção de pontos pseudo-isobésticos e ajuste de bandas	240
9.13. Tratamento matemático	241
MÉTODOS COMPUTACIONAIS	241
9.14. Cálculos DFT.....	241
9.15. Referências.....	243

SECÇÃO EXPERIMENTAL

9.1. Materiais

Os sistemas niclosamida ($C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$, Sigma, NC), nitrofurantoína ($C_8H_6N_4O_5$, Sigma, NF), ácido *trans*-3-hidroxicinâmico ($C_9H_8O_3$, Aldrich, t-3OHClA), 5-fluorouracilo ($C_4H_3FN_2O_2$, Sigma, 5Flu), 2-metoxifenol ($CH_3OC_6H_4OH$, Sigma, 2MeOPh), 3-metoxifenol ($CH_3OC_6H_4OH$, Aldrich, 3MeOPh), 2-metilfenol ($CH_3C_6H_4OH$, Sigma-Aldrich, 2MePh), ácidos caprílico ($CH_3(CH_2)_6COOH$, Sigma-Aldrich), cáprico ($CH_3(CH_2)_8COOH$, Sigma-Aldrich), láurico ($CH_3(CH_2)_{10}COOH$, Sigma-Aldrich), mirístico ($CH_3(CH_2)_{12}COOH$), palmítico ($CH_3(CH_2)_{14}COOH$, Sigma-Aldrich), esteárico ($CH_3(CH_2)_{16}COOH$, Merck) e os solventes óxido de deutério (D_2O , Aldrich) e etanol (C_2H_5OH , Riedel-de Haën) foram obtidos comercialmente, com elevados graus de pureza e usados sem qualquer tipo de purificação adicional. Verificou-se que os tamanhos de grão da NCa e NCh se encontram compreendidos no intervalo 125-250 μm .

Na preparação de soluções saturadas foram utilizados os seguintes sais, obtidos comercialmente e sem qualquer tipo de purificação adicional: hidróxido de sódio (NaOH, Panreac), hidróxido de potássio (KOH, Merck), cloreto de lítio hidratado ($LiCl \cdot H_2O$, BDH Chemicals), acetato de potássio (KCH_3COO , Panreac), cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Merck), nitrato de zinco hexahidratado ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, Fluka), tiocianato de potássio (KSCN, Merck), hidrogenossulfato de sódio monohidratado ($NaHSO_4 \cdot H_2O$, Panreac), brometo de sódio (NaBr, Carlo Erba), nitrato de amónio (NH_4NO_3 , Aldrich), nitrito de sódio ($NaNO_2$, Aldrich), sulfito de sódio (Na_2SO_3 , Sigma-Aldrich), cloreto de amónio (NH_4Cl , Panreac), sulfato de amónio ($(NH_4)_2SO_4$, Aldrich), brometo de potássio (KBr, Aldrich), hidrogenossulfato de potássio ($KHSO_4$, May & Baker), cloreto de bário dihidratado ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$, Sigma-Aldrich), nitrato de potássio (KNO_3 , Aldrich). As ciclodextrinas (α -, β - e γ -CD) foram gentilmente cedidas pela Wacker-Chemie (Alemanha).

9.2. Preparação de amostras de niclosamida hidratada

As amostras de niclosamida hidratada (NCh) foram preparadas através da dissolução de niclosamida anidra (NCa) em água destilada a 60 °C até se formar uma solução supersaturada. Após o arrefecimento da solução à temperatura ambiente, verificou-se a formação de cristais que foram posteriormente filtrados do líquido-mãe e deixados a secar em condições de temperatura e humidade relativa ambiente. Depois da secagem, os cristais foram suavemente moídos até à obtenção de pós,

que apresentaram tamanho de grão compreendido entre 125-250 μm . Os mesmos resultados foram obtidos por exposição de NCa a condições de humidade relativa de 100% durante duas semanas.

O grau de cristalinidade das amostras foi avaliado por difracção de raios-X, através da comparação dos padrões de difracção de ambas as formas NCa e NCh com os padrões registados para as amostras cristalinas.¹⁻³

9.3. Preparação de amostras de niclosamida a humidades relativas definidas

Aproximadamente 0.05 g de NCa e NCh foram armazenadas (durante diferentes períodos de tempo, de forma a estabelecerem-se condições de equilíbrio) à temperatura ambiente de 24 °C em pequenos reservatórios selados no interior dos quais, por exposição a vapor de água destilada e sílica (ou sulfato de cobre anidro), se estabeleceu uma humidade relativa (RH) de 100% e 0%, respectivamente (**Figura 9.1**). Para a determinação dos valores de humidade relativa crítica, as amostras de NCa e NCh (aproximadamente 0.05 g) foram expostas a diferentes condições de RH que foram criadas pela utilização de soluções saturadas de sais com depósito. Os valores de RH considerados (e respectivo sal utilizado⁴): 6% (NaOH), 9% (KOH), 13% (LiCl), 20% ($\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), 30% (CaCl_2), 42% ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$), 48% (KSCN), 52% (NaHSO_4), 58% (NaBr), 61% (NH_4NO_3), 66% (NaNO_2), 78% (Na_2SO_3), 79% (NH_4Cl), 81% ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 84% (KBr), 86% (KHSO_4), 90% ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 92% (KNO_3) e 97% (K_2SO_4).

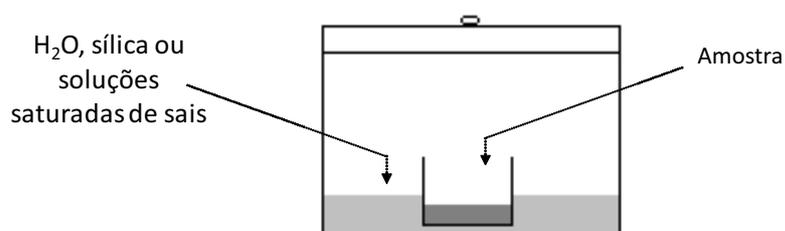


Figura 9.1 – Representação esquemática do reservatório utilizado na exposição de amostras a determinados valores de humidade relativa (RH).

De maneira a estudar a influência da temperatura na cinética do processo de desidratação da NCh, pequenas quantidades (aproximadamente 0.05 g) de amostras de NCh foram expostas a temperaturas de 35 °C, 45 °C e 60 °C durante diferentes períodos de tempo, no interior de uma estufa.

9.4. Estudos de calibração para o sistema niclosamida

Os valores da fracção de hidratação e desidratação, α_h e α_d , respectivamente, foram calculados de acordo com as equações 3 e 4 do **Capítulo 3** e tendo em conta a relação das intensidades intrínsecas (δ_a/δ_h). Deste modo, foi necessário proceder-se previamente ao cálculo desta relação, realizando para isso, estudos de calibração para o sistema NC, através do registo de espectros de Raman de misturas físicas de ambas as formas (anidra e hidratada) e com composição conhecida. Para cada mistura física, procedeu-se ao registo em triplicado dos espectros de Raman, isto é, foram registos espectros de diferentes partes da mistura física, garantindo-se assim a uniformidade dos resultados. Foram utilizadas misturas físicas com fracções molares de NCh iguais a 0.00, 0.18, 0.58, 0.77, 1.00, nas quais os componentes (NCa e NCh) foram suavemente misturados num almofariz.

9.5. Preparação das duas formas polimórficas da Nitrofurantoína

A preparação das duas formas polimórficas anidras da nitrofurantoína, formas α e β , foi efectuada com base no procedimento descrito na literatura.⁵ De uma forma breve, o polimorfo α é obtido por recristalização de 2500 mg de nitrofurantoína comercial em 200 cm³ de uma mistura a quente de ácido acético e água (relação de 4:1 em volume). Os cristais em agulha que se formaram desta solução foram novamente dissolvidos por aquecimento (temperatura final de 80 °C) e foram adicionados 200 cm³ de acetona quente. O recipiente contendo a solução anterior foi parcialmente selado e mantido a 40 °C para permitir evaporação lenta do solvente. Num espaço de nove dias, foram obtidos cristais de cor laranja-amarelado.

No que diz respeito ao polimorfo β , este foi obtido por recristalização de 500 mg de nitrofurantoína comercial em 200 cm³ de acetona quente. Os cristais de cor laranja-amarelado foram obtidos em 6 dias.

Os polimorfos α e β foram identificados com recurso a métodos de difracção de raios-X de pós, através da comparação dos padrões obtidos experimentalmente com os resultados encontrados na literatura.⁶

9.6. Preparação de várias misturas binárias de ácidos gordos

As misturas binárias de ácidos gordos foram preparadas pelo grupo de investigação orientado pelo Professor Doutor João Coutinho. As amostras foram preparadas numa balança analítica (Adam AAA/L) com uma precisão de ± 0.2 mg. Os compostos depois de pesados foram colocados num tubo

de vidro, aquecidos e agitados sob uma atmosfera de azoto a uma temperatura 10 K acima da temperatura de fusão dos seus componentes. De seguida, as misturas foram deixadas a arrefecer à temperatura ambiente e mantidas num congelador a 273 K até ao momento da análise. Para os espectros de Raman registados antes da fusão, as amostras no estado sólido foram apenas pesadas e misturadas num almofariz. A fusão destas amostras foi feita dentro do tubo capilar usado para a análise, no interior do espectrómetro (após o registo da amostra antes da fusão), a uma temperatura de cerca de 10 K acima do ponto de fusão do componente com o ponto de fusão mais elevado. As amostras foram então arrefecidas dentro do espectrómetro até atingirem a temperatura desejada para a aquisição dos restantes espectros.

9.7. Preparação de compostos de inclusão de derivados fenólicos em α -, β - e γ -ciclodextrinas

Os compostos de inclusão em α -, β - e γ CD foram preparados por um processo de precipitação,^{7, 8} pela adição gota a gota dos hóspedes (2MeOPh, 3MeOPh, 3MePh) no estado líquido a soluções aquosas de α -, β - e γ CD. A mistura resultante foi mantida sob agitação a cerca de 40 °C durante algumas horas. De seguida, promoveu-se o arrefecimento da mistura resultante até à temperatura ambiente, tendo-se obtido um precipitado branco. Este foi filtrado e exposto à temperatura e humidade ambiente durante 1-2 dias para promover a secagem. Depois de seco, foi moído suavemente até à obtenção de um pó fino. Estes compostos de inclusão demonstraram ser estáveis ao longo de vários meses.

9.8. Preparação de colóides para registo de espectros SERS

As soluções coloidais de prata (Ag) foram preparadas utilizando água desionizada e triplamente destilada de acordo com o método descrito por Creighton *et al.*⁹ De uma forma breve, o método consiste em reduzir uma solução aquosa de AgNO_3 (10^{-3} M, um volume) com um excesso de NaBH_4 (2×10^{-3} M, três volumes, previamente arrefecido a 0-5 °C). Após agitar a mistura durante algum tempo para a homogeneizar, é deixada a repousar à temperatura ambiente durante ~90 minutos. Por vezes, durante este período de espera, aparece uma cor escura no interior da solução e é necessário agitar fortemente a mistura de forma a estabilizar o colóide. No final, obtém-se uma solução amarela e transparente, com um máximo de absorção a 390 nm. Quando se pretende registar um espectro SERS, adiciona-se o adsorbato ao colóide de forma a obter a concentração desejada. Os colóides preparados de acordo com o método descrito são estáveis durante vários meses.

9.9. Preparação da superfície do eléctrodo e das soluções necessárias à obtenção de espectros SERS em eléctrodo

Para a aquisição de espectros SERS em eléctrodo foi utilizado um sistema electroquímico constituído por um potenciostato-galvanostato PAR modelo 173, um programador PAR modelo 175 e uma célula electroquímica (**Figura 9.2**) composta por um sistema de três eléctrodos:

- O eléctrodo de trabalho é constituído por um disco de prata (Ag, 99,9999%, Metales Preciosos S.A.) sobre cuja superfície o laser incide. Esta superfície deve ser previamente polida com alumina em pó (Bühler, 0.3 e 0.05 μm de tamanho de partícula) durante cerca de 30 minutos para eliminar qualquer tipo de contaminação e fornecer sempre que possível o mesmo ponto de partida no processo de preparação da superfície, de forma a que os resultados sejam reprodutíveis. O disco de Ag será depois submetido a um tratamento de oxidação-redução com o intuito de adquirir um grau de rugosidade adequado para que se produza a intensificação do espectro de Raman. O disco de Ag encontra-se situado no extremo de um cilindro oco de vidro (**Figura 9.3b** e **9.4c**) e a ligação deste ao potenciostato é estabelecida por intermédio de um condutor de cobre (**Figura 9.3c**). O cilindro é introduzido na célula até que o eléctrodo de prata toque na janela de vidro transparente ao visível (**Figura 9.4**), reduzindo-se ao mínimo o sinal proveniente da solução aquosa.

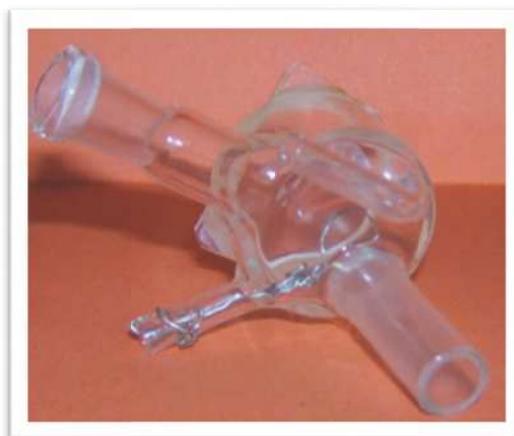


Figura 9.2 – Fotografia da célula utilizada, no interior da qual se coloca a solução com a amostra a analisar, o eléctrodo de prata, o de referência e o de platina (fio metálico que se observa na parte esquerda da fotografia).

- Eléctrodo de referência Ag/AgCl/KCl saturado (PAR modelo K0265) ao qual se referem todos os potenciais (**Figura 9.3a**).

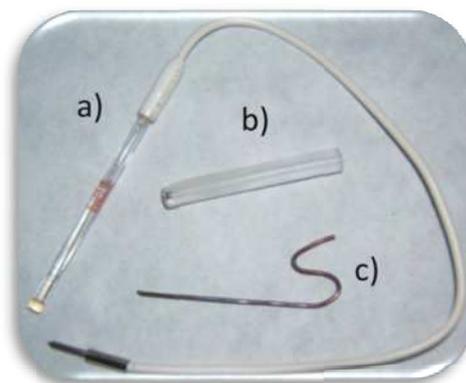


Figura 9.3 – a) Eléctrodo de referência (contendo no seu interior um fio de prata e solução saturada de KCl), b) cilindro oco de vidro com um disco de prata na extremidade e no qual se insere c) o fio de cobre.

- O eléctrodo indicador é um fio de platina (Pt, 99,9999%, Metales Preciosos S.A.) que se ajusta de forma circular de modo a envolver o disco de Ag do eléctrodo de trabalho (**Figura 9.2 e 9.4b**).

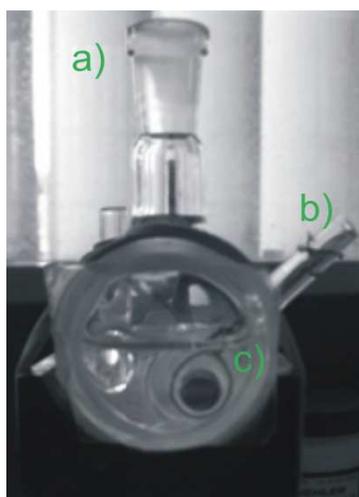


Figura 9.4 – Montagem da célula com a solução aquosa de adsorbato no seu interior bem como a) local onde é inserido o eléctrodo de referência, b) eléctrodo de platina e c) eléctrodo de prata.

Para obter a rugosidade superficial desejada, o eléctrodo de trabalho é submetido a uma série de ciclos de oxidação-redução. Em cada ciclo, os iões metálicos, gerados pela oxidação, são depositados no processo de redução sobre o metal de forma aleatória, dando origem à rugosidade superficial. Devido à presença do ião Cl^- no electrólito, o catião Ag^+ produzido na oxidação reage imediatamente com ele e deposita-se em forma de AgCl na superfície, que é a espécie que se reduz na parte final de cada ciclo. Todo este tratamento é realizado na ausência de moléculas de adsorbato

para evitar que algumas se decomponham no decorrer do processo. Para cada sistema electroquímico utilizado, é necessário otimizar os parâmetros de oxidação-redução, resultando para este caso que o melhor sinal SERS é obtido quando se inicia com um potencial de -0.5 V e posteriormente se aplicam pulsos de 2 s de duração a + 0.6 V, com intervalos de 2 s a - 0.5 V (**Figura 9.5**). Como electrólito foi utilizada uma solução aquosa 0.1 M de KCl.

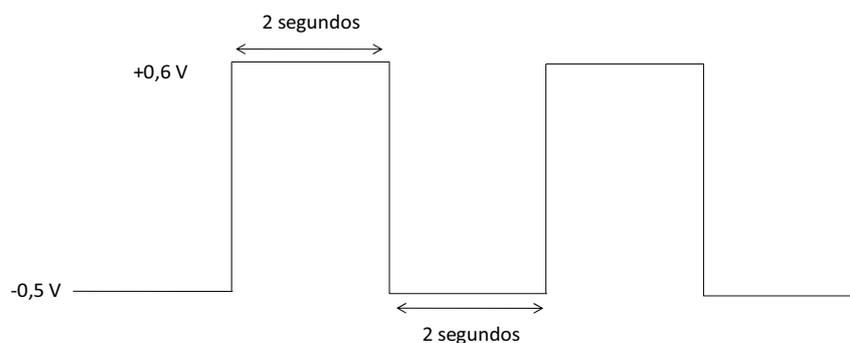


Figura 9.5 – Sequência de pulsos utilizada no processo de oxidação-redução para preparar a superfície de prata.

Trabalhar com eléctrodo permite ajustar o potencial mediante o uso de um potenciostato, o que constitui uma vantagem, uma vez que a espectroscopia SERS é muito sensível a esta variável, tanto a intensificação global do espectro de uma molécula como as intensidades relativas das bandas. Um possível inconveniente do uso desta técnica é o tempo dispendido na montagem e preparação deste aparato experimental, que conduz a uma maior morosidade na aquisição dos espectros.

9.10. Estudos de deuteração com $(\text{H}_2\text{pip})_3[\text{Ge}(\text{hedp})_2]\cdot 14(\text{H}_2\text{O})$

O composto $(\text{H}_2\text{pip})_3[\text{Ge}(\text{hedp})_2]\cdot 14(\text{H}_2\text{O})$ foi preparado pelo grupo de investigação orientado pelo Professor Doutor João Rocha.

INSTRUMENTAÇÃO

9.11. Técnicas de caracterização

9.11.1. Espectroscopia de Raman

Os espectros de Raman na região $70\text{-}5000\text{ cm}^{-1}$ foram registados à temperatura ambiente num espectrómetro de Raman com transformada de Fourier, Bruker RFS-100 utilizando um detector

InGaAs, equipado com um laser díodo de Nd:YAG a emitir a 1064 nm, de marca Coherent, modelo Compass 1064/500 N. A resolução utilizada foi de 2 cm^{-1} .

As amostras líquidas foram seladas em capilares de vidro Kimax (diâmetro interno de 0.8 mm) e as amostras sólidas foram colocadas num porta-amostras apropriado para o efeito. De modo a obter uma boa razão sinal/ruído, o número de varrimentos foi variável consoante o tipo de amostras.

Para a maioria dos espectros, a potência do laser utilizada foi de 504 mW. No entanto, no registo dos espectros de Raman da niclosamida, nitrofurantoína, e misturas binárias de ácidos gordos, a potência do laser utilizada foi de 400 mW. Existem alguns trabalhos experimentais que indicam que a temperatura da amostra pode aumentar significativamente devido à exposição ao laser,^{10, 11} o que pode provocar quer transformações polimórficas, quer perda de moléculas de solvente. Para avaliar este efeito, uma amostra do composto em estudo foi exposta de forma contínua a uma potência de 400 mW durante 3-4 horas, durante as quais diversos espectros de 5 minutos foram registados. A comparação dos espectros demonstrou que durante o tempo necessário para a aquisição de cada espectro (ca. 12 minutos um registo de 100 scans) não se observou qualquer alteração espectral. Neste contexto, todos os registos dos espectros de Raman destas amostras foram efectuados em 25 minutos ou menos.

No estudo das misturas binárias de vários ácidos gordos (descrito no **Capítulo 4**), as amostras foram colocadas no interior de tubos capilares fechados (Kimax, 0.8 mm). Os estudos de temperatura no intervalo 273 K – 353 K foram efectuados com um dispositivo comercial do tipo Harney-Miller da Bruker e a temperatura foi monitorizada pela resistividade de um termopar calibrado. Nestas condições, o erro na temperatura é estimado ser inferior a 0.5 K com flutuações durante cada registo inferiores a 1 K.

9.11.2. Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho na região do infravermelho médio ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) foram adquiridos à temperatura ambiente num espectrómetro Mattson 7000, com transformada de Fourier, utilizando-se apodização triangular e resolução de 2 cm^{-1} . Foi utilizada uma fonte globalar, um detector sulfato de triglicina deuterada (DTGS), e janelas e pastilhas de KBr.

Os espectros de ATR foram obtidos com um acessório Golden Gate ATR da Specac acoplado ao espectrómetro de infravermelho descrito no parágrafo anterior e as amostras foram analisadas sem tratamento prévio.

9.11.3. Espectroscopia de Raman intensificada à superfície (SERS)

Todos os espectros de Raman e SERS apresentados no **Capítulo 6** foram registados num espectrómetro Jobin-Yvon U-1000 de monocromador duplo equipado com um sistema de detecção consistente num tubo fotomultiplicador refrigerado Hamamatsu R943-02, usando uma linha de excitação de 514.5 nm de um laser Spectra Physics de Ar⁺. Foi usada uma largura de fenda constante que permitiu uma resolução espectral de 4 cm⁻¹ sendo a potência do laser a atingir a amostra de 50 mW. Os números de onda das bandas foram medidos com a ajuda das mesmas linhas de laser como padrões, sendo obtida uma precisão de ± 2 cm⁻¹ nas condições descritas.

No caso das amostras líquidas, foi utilizada uma célula de quartzo para líquidos de 1 cm, enquanto os sólidos microcristalinos foram depositados em capilares de vidro.

9.11.4. Análises termogravimétricas e calorimétricas

A análise termogravimétrica (TGA) é um método com um vasto campo de aplicação na caracterização do comportamento térmico dos materiais. É composto por um forno tubular de aquecimento eléctrico com amplitude até 1500 °C, uma balança de alta resolução, uma unidade de condicionamento da atmosfera e um sistema computadorizado de aquisição e tratamento de dados. As medições de TGA foram efectuadas num sistema TGA-50 Shimadzu, utilizando-se uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min, sob uma atmosfera de nitrogénio, com um fluxo de 20 mL/min. As amostras foram cuidadosamente pesadas e colocadas num suporte de platina com 5 mm de diâmetro. Estas análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade de Aveiro pela Mestre Celeste Azevedo.

A Calorimetria diferencial de varrimento (Differential Scanning Calorimetry, sigla em inglês DSC) é utilizada para a análise térmica de materiais e baseia-se na medida do fluxo de calor entre uma amostra e uma referência em função da temperatura, sendo ambas submetidas a um programa de temperatura controlado. Esta técnica permite a detecção de processos endo ou exotérmicos através da análise das curvas de calorimetria diferencial de varrimento das amostras. As medições de DSC foram efectuadas num sistema Shimadzu DSC-50. As amostras foram aquecidas em pequenos reservatórios de alumínio selados, sob um fluxo de nitrogénio de 20 mL/min, usando um reservatório vazio e selado como referência a uma taxa de aquecimento de 5 °C/min na gama de temperaturas de 25 a 400 °C. Estas análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade de Aveiro pela Mestre Celeste Azevedo.

TRATAMENTO DE DADOS

9.12. Obtenção de pontos pseudo-isobésticos e ajuste de bandas

De maneira a verificar a presença de pontos pseudo-isobésticos, os espectros de Raman foram normalizados para uma área unitária, de acordo com o procedimento descrito por Shurvell e colaboradores.^{12, 13} As intensidades de banda integradas I_a e I_h , necessárias no **Capítulo 3**, foram determinadas por ajuste de bandas, usando funções Gaussianas ou Lorentzianas, consoante o melhor ajuste, após se efectuar uma correcção de linha de base usando três pontos.

O melhor ajuste das bandas utilizadas para monitorizar e quantificar os processos de hidratação e desidratação, foi obtido utilizando três Lorentzianas e duas Gaussianas para as regiões espectrais compreendidas entre 1620-1710 cm^{-1} e 620-646 cm^{-1} , respectivamente (**Figuras 9.6 e 9.7**).

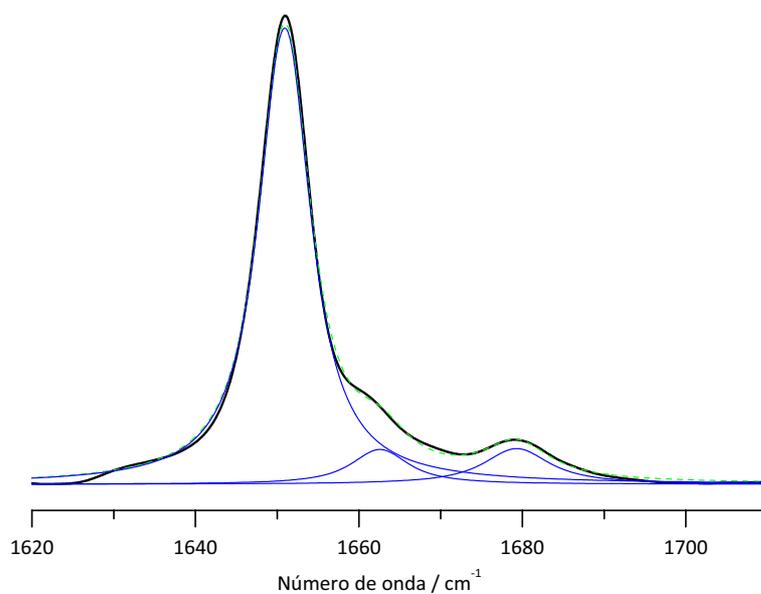


Figura 9.6. Espectro de Raman na região compreendida entre 1620-1710 cm^{-1} de amostras de NCh armazenadas a condições de RH 0% durante 96 h (linha a preto). O ajuste matemático utilizando três funções Lorentzianas, encontra-se representado a azul. A linha verde representa o ajuste global com $R^2=0.99834$. Para este tempo de exposição, $\alpha_i=0.10$.

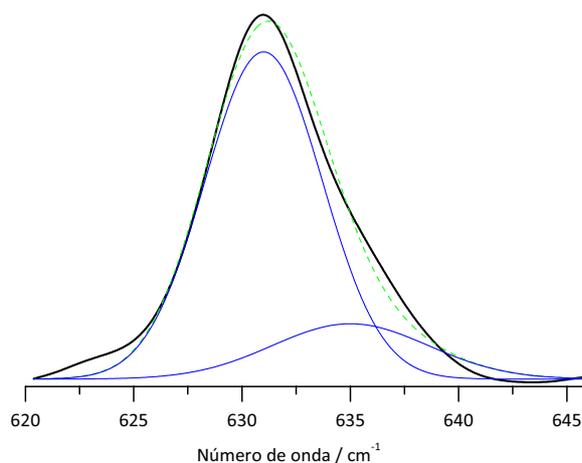


Figura 9.7. Espectro de Raman na região compreendida entre 620-646 cm^{-1} de amostras de NCh armazenadas a condições de RH 0% durante 96 h (linha a preto). O ajuste matemático utilizando duas funções Gaussianas, encontra-se representado a azul. A linha a tracejado verde representa o ajuste global com $R^2=0.99205$. Para este tempo de exposição, $\alpha_h=0.11$ e a presença de 11% de NCh é observável através da assimetria da banda na região de frequências mais elevadas.

9.13. Tratamento matemático

É possível utilizar diferentes critérios estatísticos na determinação do afastamento total de um conjunto de pontos medidos em relação aos calculados por uma relação linear. Dos vários critérios, os mais utilizados são o coeficiente de correlação (R^2) e o desvio padrão do declive da linha de regressão (S_b). Alguns autores^{14, 15} demonstraram que a utilização do valor de R^2 como único critério estatístico na escolha de um modelo cinético não é a mais adequada, particularmente quando se revela necessário distinguir mecanismos que apresentam coeficientes de correlação lineares (R^2) muito similares. Nestas situações, é vantajoso recorrer à utilização complementar do valor obtido para S_b , tal como evidenciado por *Davies e Pryor*.¹⁵

MÉTODOS COMPUTACIONAIS

9.14. Cálculos DFT

Os cálculos teóricos DFT foram realizados com o pacote Gaussian 03W¹⁶, a correr num PC comum. As estruturas moleculares dos monómeros (NC, NF, ácidos láurico, mirístico e esteárico), dos vários conformeros 2MeOPh, 3MeOPh, 3MePh e dos dímeros (NF, 2MeOPh, 3MeOPh, 3MePh, ácido láurico, mirístico e esteárico) foram completamente optimizadas ao nível padrão B3LYP/6-31G*. Por

sua vez, as estruturas dos agregados de oito moléculas de água foram completamente otimizadas ao nível padrão B3LYP/6-311++G**.

As frequências vibracionais harmónicas foram calculadas, ao nível padrão B3LYP/6-31G* para todas as geometrias otimizadas, usando as segundas derivadas analíticas para confirmar a convergência dos mínimos na superfície potencial bem como avaliar as energias vibracionais do ponto zero (ZPVE). No caso dos agregados de oito moléculas de água, as frequências foram calculadas ao nível B3LYP/6-311++G**. As frequências calculadas (acima dos 500 cm⁻¹) foram corrigidas por um factor padrão, conforme o nível de teoria e bases utilizados,¹⁷ de forma a considerar a anarmonicidade e efeitos de correlação electrónica. O programa GaussView¹⁸ foi utilizado para visualizar as estruturas otimizadas e para estabelecer a atribuição dos modos vibracionais com base nos deslocamentos atómicos.

No caso dos cálculos efectuados para a interpretação dos espectros SERS obtidos para o ácido *trans*-3-hidroxicinâmico e o 5-fluorouracilo, as geometrias para as várias espécies químicas possíveis (neutra, anião, dianião) foram otimizadas ao nível B3LYP/6-31G*. Os campos de força e os números de onda também foram determinados de forma a atribuir o espectro vibracional e confirmar a convergência para um mínimo no processo de optimização. As intensidades SERS-CT (SERS – charge transfer) para cada espécie molecular foram calculadas tendo em conta as equações propostas por *Wolde et al.*¹⁹ para um processo de ressonância Raman (RR). Neste caso, as intensidades relativas de um determinado modo normal “*j*” podem ser estimadas com base na seguinte equação:

$$I_j = \mathcal{R}B_j^2\omega_j^2 \quad (9.1)$$

onde ω_j é o número de onda correspondente ao modo normal *j*, \mathcal{R} é uma constante que pode ser ajustada arbitrariamente para normalizar as intensidades relativas, e o parâmetro B_j que se relaciona com a diferença entre as geometrias de equilíbrio dos dois estados envolvidos no processo de RR, pode ser obtido calculando as forças moleculares (*f*) no ponto de Franck-Condon na superfície de energia potencial do estado electrónico excitado (respectivos radicais) e é dado pela expressão:

$$B_j = (2.41 \times 10^6)f\sqrt{M}L_j\omega^{-3/2} \quad (9.2)$$

onde *L* corresponde à matriz de modos normais do estado electrónico fundamental e *M* é a matriz de massas atómicas.

9.15. Referências

1. E. C. v. Tonder, T. S. P. Maleka, W. Liebenberg, M. Song, D. E. Wurster, M. M. d. Villiers, Preparation and physicochemical properties of niclosamide anhydrate and two monohydrates, *Int. J. Pharm.* **2004**, *269*, 417-432.
2. M. M. d. Villiers, M. D. Mahlatji, E. C. v. Tonder, S. F. Malan, A. P. Lötter, W. Liebenberg, Comparison of the Physical and Chemical Stability of Niclosamide Crystal Forms in Aqueous Versus Nonaqueous Suspensions, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2004**, *30*, 581-592.
3. R. V. Manek, W. M. Kolling, Influence of Moisture on the Crystal Forms of Niclosamide obtained from Acetone and Ethyl Acetate, *AAPS PharmSciTech* **2004**, *5*.
4. *CRC Handbook of Chemistry and Physics a Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data*, 64th ed., CRC Press, Florida, **1983**.
5. E. W. Pienaar, M. R. Caira, A. P. Lötter, Polymorphs of nitrofurantoin. 2. Preparation and X-ray crystal structures of the two anhydrous forms of nitrofurantoin, *J. Crystall. Spectr. Res.* **1993**, *23*, 785-790.
6. M. R. Caira, E. W. Pienaar, A. P. Lötter, Polymorphism and pseudopolymorphism of the antibacterial nitrofurantoin, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1996**, *279*, 241-264.
7. L. Szenté, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3*, p. 243-252, (Eds.: J. Szejtli, T. Osa), Pergamon, Oxford, **1996**.
8. A. R. Hedges, Industrial Applications of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2035-2044.
9. J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **1979**, *75*, 790-798.
10. N. A. Marigheto, E. K. Kemsley, J. Potter, P. S. Belton, R. H. Wilson, Effects of sample heating in FT-Raman spectra of biological materials, *Spectrochim. Acta A* **1996**, *52*, 1571-1579.
11. J. Johansson, S. Pettersson, L. S. Taylor, Infrared imaging of laser-induced heating during Raman spectroscopy of pharmaceutical solids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 1223-1231.
12. R. B. Girling, H. F. Shurvell, A Raman spectroscopic study of complex formation between o-cresol and propionitrile, *Vib. Spectrosc.* **1998**, *18*, 77-82.
13. E. Lamcharfi, G. Kunesch, C. Meyer, B. Robert, Investigation of cyclodextrin inclusion compounds using FT-IR and Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta A* **1995**, *51*, 1861-1870.
14. M. E. Brown, A. K. Galwey, The distinguishability of selected kinetic models for isothermal solid-state reactions, *Thermochim. Acta* **1979**, *29*, 129-146.
15. W. H. J. Davis, W. A. Pryor, Measures of goodness of fit in linear free energy relationships, *J. Chem. Educ.* **1976**, *53*, 285-287.
16. R. B. Gaussian 03, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B.

Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **2003**.

17. A. P. Scott, L. Radom, Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation of Hartree-Fock, Møller-Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, and Semiempirical Scale Factors, *J. Phys. Chem. B* **1996**, *100*, 16502-16513.

18. GaussView 3.0, G. Inc., Pittsburgh PA 15106, USA.

19. A. ten Wolde, H. J. C. Jacobs, F. W. Langkilde, K. Bajdor, R. Wilbrandt, F. Negri, F. Zerbetto, G. Orlandi, Triplet State Resonance Raman and Absorption Spectroscopy of a Configurationally Locked (Z)-Hexatriene: 1,2-Divinylcyclopentene, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 9437-9445.