



**Susana Santos Braga**

**A ciclodextrina-beta na formação de complexos de  
inclusão e de novas estruturas supramoleculares**



**Susana Santos Braga    A ciclodextrina-beta na formação de complexos de  
inclusão e de novas estruturas supramoleculares**

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 prof. doutor José Joaquim Cristino Teixeira Dias, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Doutor António Francisco Carrelhas Cachapuz**  
professor catedrático da Universidade de Aveiro

**Doutor Júlio Maggiolly Novais**  
professor catedrático do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa

**Doutor Carlos José Rodrigues Crispim Romão**  
professor catedrático do Instituto de Tecnologia Química e Biológica

**Doutor José Joaquim Cristino Teixeira Dias**  
professor catedrático da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil**  
professora associada Universidade de Aveiro

**Doutora Isabel Maria Sousa Gonçalves**  
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

A doutoranda agradece à FCT e ao FSE pelo apoio financeiro – BD 20320/99 – concedido no âmbito do III quadro comunitário de apoio.

## **resumo**

O presente trabalho descreve a inclusão de diversos compostos orgânicos e organometálicos na ciclodextrina- $\beta$  ( $\beta$ -CD). Os complexos formados são estudados por várias técnicas de estado sólido. Presta-se particular atenção à compreensão das interações formadas entre a  $\beta$ -CD hospedeira e o respectivo hóspede e à organização supramolecular no sólido. Na maioria dos casos os compostos de inclusão estudados originam estruturas em canais onde o hóspede se aloja.

**abstract**

This work describes  $\beta$ -CD inclusion of several organic and organometallic guest compounds. The resulting complexes are studied using various solid state characterisation techniques. The understanding of host ( $\beta$ -CD) – guest interactions and of the solid's supramolecular structure is emphasised. In most cases,  $\beta$ -CD molecules are stacked to form channel-like frames that hold the guest molecule in their tubular cavities.



## Índice geral

Abreviaturas	11
<b>1. Ciclodextrinas e hóspedes</b>	<b>13</b>
1.1. Uma breve história das ciclodextrinas	15
1.2. Formação das ciclodextrinas	16
1.3. Propriedades das ciclodextrinas nativas	16
1.4. Formação de complexos de inclusão	18
1.5. Aplicações das ciclodextrinas	20
Indústria farmacêutica	20
Cosmética	21
Indústria alimentar	21
Química analítica	22
Indústria têxtil	22
Outras aplicações	23
1.6. Perspectiva geral	23
1.7. Linhas orientadoras do trabalho	24
O hospedeiro	24
Os hóspedes	24
Caracterização dos complexos de inclusão	26
Artigos publicados	27
Referências	29
<b>2. Dímeros dentro de dímeros: a estrutura de <math>2\beta</math>-CD <math>4p</math>-HB <math>9,45H_2O</math></b>	<b>31</b>
2.1. Introdução	33
2.2. Os cristais de $\beta$ -CD e $p$ -HB	34
Estrutura molecular do complexo de inclusão $2\beta$ -CD $4p$ -HB $9,45H_2O$	34
Empacotamento do complexo na rede cristalina	37
2.3. Caracterização do complexo no estado sólido	38
Espectroscopia de RMN de $^{13}C$	38
Espectroscopia vibracional	39
Termogravimetria	40
2.4. Conclusões	41
Referências	42

<b>3. 2<math>\beta</math>-CD Ibu, uma estequiometria inesperada</b>	43
3.1. Introdução	45
3.2. Os cristais de $\beta$ -CD e Ibu	46
Estrutura molecular do complexo de inclusão 2 $\beta$ -CD $\cdot$ S-Ibu $\cdot$ 12,5H <sub>2</sub> O	46
Empacotamento do complexo na rede cristalina	49
3.3. Caracterização dos complexos no estado sólido	
Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup> C	50
Espectroscopia vibracional	51
Termogravimetria	52
3.4. Conclusões	53
Referências	54
<b>4. A formação de sais favorece a inclusão de certos compostos na <math>\beta</math>-CD</b>	55
4.1. Introdução	57
4.2. Preparação dos complexos de inclusão	59
4.3. Estrutura dos complexos de inclusão	60
Difracção de Raios X de pós	61
Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup> C	62
Espectroscopia vibracional	65
Termogravimetria	65
4.4. Estudos teóricos	67
4.5. Conclusões	70
Referências	71
<b>5. Inclusões em <math>\beta</math>-CD de Omprazole e dois precursores</b>	73
5.1. Introdução	75
5.2. Características dos complexos de inclusão	76
Difracção de raios X de pós	77
Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup> C	78
Espectroscopia vibracional	80
Termogravimetria	81
5.3. Estudos teóricos	83
5.4. Conclusões	85
Referências	86

<b>6. Inclusão de organometálicos, uma questão de tamanho</b>	87
6.1. Introdução	89
6.2. Características dos complexos de inclusão	90
Difracção de raios X de pós	91
Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup> C	92
Espectroscopia vibracional	94
Termogravimetria	95
6.3. Cálculos <i>ab initio</i>	96
6.4. Conclusões	98
Referências	100
<b>7. Influência da inclusão nas propriedades físico-químicas e anti-tumorais de Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub></b>	101
7.1. Introdução	103
7.2. Preparação e estudo do complexo de inclusão	104
Espectroscopia vibracional	104
Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup> C	106
Difracção de raios X de pós	106
Termogravimetria	107
7.3. Cálculos <i>ab initio</i>	108
7.4. Estudos citológicos	108
7.5. Conclusões	110
Referências	111
<b>8. Considerações finais</b>	113
A importância da geometria	115
Múltiplas formas de obter complexos	115
Os complexos	116
Propriedades modificadas	118
Trabalho futuro	118
<b>Secção experimental</b>	119
Materiais utilizados	121
Solventes	121
Reagentes	121
Técnicas de caracterização	122

Análise elementar	122
Espectroscopia vibracional	122
Termogravimetria	122
Espectroscopia de RMN em solução	122
Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$	122
Difracção de raios X de amostras pulverizadas	123
Caracterização da interacção $\beta$ -CD - <i>p</i> -HB em solução	123
Estequiometria da inclusão segundo o método de Job	123
Constante de inclusão	124
Preparação de complexos de inclusão no estado sólido	124
Cristalização de $\beta$ -CD com <i>p</i> -HB	124
Cristalização de $\beta$ -CD com R e S-Ibu	125
Complexação de $\beta$ -CD com PN1, PN2, SSP e SSN	125
Complexação de $\beta$ -CD com PO1, PO2 e Ompz	126
Complexação de $\beta$ -CD com $\text{CpMo}(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)(\text{CO})_2$ , $\text{Ind}'\text{Mo}(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)(\text{CO})_2$ , $(\text{C}_5\text{H}_4\text{SiMe}_3)\text{Mo}(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)(\text{CO})_2$	126
Complexação de $\beta$ -CD com $\text{CpFe}(\text{CO})_2\text{CN}$ , $\text{CpFe}(\text{dppe})\text{CN}$ e $\text{K}[\text{CpFe}(\text{CO})(\text{CN})_2]$	127
Complexação de $\beta$ -CD com $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$	127
Análise elementar	128
Espectroscopia de infra-vermelho	128
Espectroscopia de RMN CP-MAS de $^{13}\text{C}$	130
Estudos cristalográficos	133
Complexo $2\beta\text{-CD} \cdot 4p\text{-HB} \cdot 9,45\text{H}_2\text{O}$	133
Complexo $2\beta\text{-CD} \cdot \text{S-Ibu} \cdot 25\text{H}_2\text{O}$	142
Estudos teóricos	146
Estudos citotóxicos e antiproliferativos	147
Material biológico e Culturas celulares	147
Determinação da viabilidade e da densidade celulares	148
Método do azul de tripano	148
Método do MTT	149
Método do azul de alamar	149
Referências	151

## Abreviaturas

$\alpha$ -CD – Ciclodextrina-alfa, com seis unidades de glicose

ADN – Ácido desoxirribonucleico

$\beta$ -CD – Ciclodextrina-beta, com sete unidades de glicose

**BSSE** – “Basis Set Superposition Error”, ou seja o erro resultante da sobreposição de duas bases de funções usada para o cálculo da estrutura dum composto misto, por exemplo, um complexo de inclusão (não sendo consideradas as moléculas de água de inclusão). A base resultante é mais completa do que cada uma das bases que a constituem. Deste modo, a estabilidade calculada para o composto misto é mais elevada. Este valor não pode ser comparado com a estabilidade de cada um dos componentes porque estes não foram determinados na mesma base de funções.

$C_{ald}$  – Carbono aldeídico

$C_{arom}$  – Carbono aromático

$Cp$  – Ciclopentadienilo

**CP-MAS** – “Cross polarization with Magic Angle Spinning”, ou seja, o uso de polarização cruzada e de rotação segundo o ângulo mágico. A técnica de CP consiste em excitar os núcleos de prótio, que depois transmitem a sua polarização aos núcleos de carbono 13. Deste modo, aumenta-se a taxa sinal/ruído e diminui-se o tempo de espera entre duas aquisições (necessário para a despolarização). A rotação segundo o ângulo mágico (ver figura A.1 ao lado) não é mais do que aplicar um movimento giratório à amostra, segundo uma inclinação de  $54,74^\circ$  relativamente ao campo magnético. Na realidade, a largura das bandas de RMN observadas no estado sólido é causada por efeitos de anisotropia e por interações entre dois dipolos magnéticos de *spins* nucleares. Estes são definidos por expressões matemáticas que apresentam um termo em comum:  $1 - 3\cos^2\theta$ . Assim, o ângulo mágico ( $54,74^\circ$ ) é aquele para o qual esta expressão é nula, permitindo eliminar os efeitos da anisotropia e das interações dipolo-dipolo.

**CpMo1** –  $C_5H_5Mo(\eta^3-C_3H_5)(CO)_2$

**CpMo2** –  $C_5H_4SiMe_3Mo(\eta^3-C_3H_5)(CO)_2$

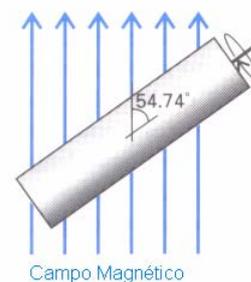
**dAMP** – 5'-monofosfato de 2'-desoxiadenosina

**dGMP** – 5'-monofosfato de 2'-desoxiguanosina

**dppe** – bis(1, 2-difenilfosfina)etano

**DRX** – Difracção de raios X

**EIV** – Espectroscopia de absorção no Infra-vermelho



**A.1** Na rotação segundo o ângulo mágico, a amostra roda a  $54,74^\circ$  (ou seja, o valor de  $\arccos 1/\sqrt{3}$ ) de inclinação relativamente ao campo magnético aplicado. O rápido movimento de rotação a esta inclinação faz com que a média das interações dipolo-dipolo e dos desvios causados pela anisotropia seja igual a zero.

**ELISA** - “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”. Este ensaio consiste em usar um anticorpo com uma certa especificidade para o composto em estudo de modo a que ambos interactuem. O anticorpo transporta uma enzima que cataliza uma reacção com formação de um produto corado. A amostra contendo o composto em estudo é adicionada de uma solução contendo anticorpo que se fixa ao composto. Depois adiciona-se um substracto para a enzima que vai ser transformado num produto que absorve luz (geralmente na região entre o UV e a luz visível). A quantidade de composto é proporcional à absorção da amostra e determina-se por espectrofotometria de UV-Visível.

**FeCN1** -  $\text{CpFe}(\text{CO})_2\text{CN}$

**FeCN2** -  $\text{CpFe}(\text{dppe})\text{CN}$

**$\gamma$ -CD** - Ciclodextrina-gama, com oito unidades de glicose

**Ibu** - Ácido isobutilfenilpropiónico, vulgarmente conhecido por ibuprofeno

**IndMo** -  $\text{IndMo}(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)(\text{CO})_2$

**$K_{\text{app}}$**  - Constante aparente de inclusão

**KFeCN** -  $\text{K}^+[\text{CpFeCO}(\text{CN})_2]^-$

**Me** - Grupo metilo

**MTT**- “Mitochondrial dehydrogenase activity test” ou seja, teste da actividade da desidrogenase mitocondrial. É usado para medir a viabilidade das células quando em contacto com um composto citotóxico (como o  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$ ) A viabilidade celular representa mais genuinamente a actividade do composto do que a simples medição de células vivas e mortas. De facto, algumas células poderão ainda estar vivas mas apresentarem profundas alterações nas suas funções normais, pelo que se dizem *não viáveis*.

**Ompz** - 5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil-1H-benzimidazole, vulgarmente conhecido por omeprazole

***p*-HB** - 4-hidroxibenzaldeído ou *para*-hidroxibenzaldeído

**PN1** - 2-fenoxinitrobenzeno

**PN2** - 2-fenoxianilina

**PN3** - 2-fenoxi-metanossulfonilida

**Ppm** - Partes por milhão

**PrO1** - 2-metoxi-2-mercaptobenzimidazole

**PrO2** - 5-metoxi-2-[(3,5-dimetil-4-metoxi-2-piridina)metiltio]-1H-benzimidazole

**RMN** - Ressonância magnética nuclear

**SSN** - Sal sódico do nimesulide

**SSP** - Sal sódico do PN3, ou seja, da 2-fenoxi-metanossulfonilida

**TMS** - Tetrametilsilano

**UV** - Ultra-violeta

# Capítulo 1

## Capítulo 1

### **Ciclodextrinas e hóspedes**

A história das ciclodextrinas é apresentada, desde a sua descoberta até ao tempo presente, referindo-se ainda a evolução do seu custo de produção e o crescente número de publicações sobre estes compostos. A importância das ciclodextrinas no panorama industrial, científico e social da actualidade é salientada com base em exemplos das suas inúmeras aplicações. Depois de justificado o interesse das CDs, são apresentados os compostos estudados durante a preparação desta tese de doutoramento, bem como as técnicas usadas para a sua caracterização. Finalmente, são mencionadas as publicações resultantes do trabalho desenvolvido ao longo do doutoramento.

## **1. Ciclodextrinas e hóspedes**

1.1. Uma breve história das ciclodextrinas	15
1.2. Formação das ciclodextrinas	16
1.3. Propriedades das ciclodextrinas nativas	16
1.4. Formação de complexos de inclusão	18
1.5. Aplicações das ciclodextrinas	20
Indústria farmacêutica	20
Cosmética	21
Indústria alimentar	21
Química analítica	22
Indústria têxtil	22
Outras aplicações	23
1.6. Perspectiva geral	23
1.7. Linhas orientadoras do trabalho	24
O hospedeiro	24
Os hóspedes	24
Caracterização dos complexos de inclusão	26
Artigos publicados	28
Referências	29

## 1.1. Uma breve história das ciclodextrinas

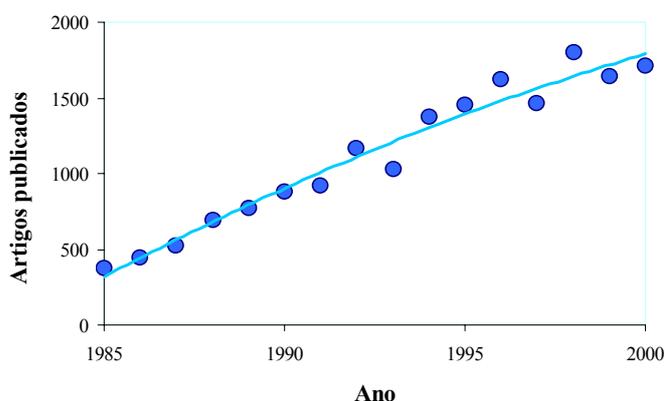
A história destes compostos começou há mais de um século, concretamente em 1891, com a descoberta de um novo derivado do amido por Villiers [1]. Este produto foi obtido por degradação bacteriana do amido e apresentava propriedades semelhantes à celulose, pelo que foi chamado *celulosina*. Já nesta altura, foi possível distinguir entre dois tipos de cristais de celulosina que provavelmente corresponderiam às actuais ciclodextrinas  $\alpha$  e  $\beta$ .

Doze anos mais tarde, Schardinger [2], ao estudar a digestão bacteriana do amido, identificou dois produtos cristalinos com as mesmas características que as celulosinas de Villiers. Em estudos posteriores, aperfeiçoou a obtenção destes cristais a que chamou *dextrinas* e isolou a bactéria que as produz, chamando-lhe *Bacillus macerans* [3, 4]. Recentemente, a classificação taxonómica desta bactéria foi revista tendo a sua denominação sido alterada para *Bacillus firmus*.

Até cerca de 1930, mais autores se debruçaram sobre o estudo destes novos compostos, com destaque para Freudenberg e seus colaboradores [5] que, com base nos resultados obtidos e na pouca bibliografia existente, descreveram as dextrinas como anéis com várias unidades de maltose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4. Em 1948, estes autores descobriram e realizaram a caracterização estrutural de mais um destes compostos, a ciclodextrina  $\gamma$ .

A partir de 1950, vários grupos de investigação começaram a competir pela produção intensiva de ciclodextrinas, salientando-se os de French [6] e de Cramer [7]. A primeira patente foi registada por Freudenberg, Cramer e Plieninger em 1953, referindo-se às aplicações das ciclodextrinas em formulações farmacológicas [8].

No final dos anos sessenta, já estavam descobertos os métodos para a sua preparação industrial e descritas as suas características físico-químicas, estruturais e de formação de complexos. Desde então, o seu preço tem vindo a baixar significativamente, na razão inversa da quantidade produzida. De facto, a produção anual de  $\beta$ -CD, que em 1970 foi de cento e quarenta quilos, com um preço por quilo de aproximadamente dois mil euros [9], excede actualmente as mil toneladas, com um custo por quilo de cinquenta a cem euros consoante a pureza do produto.



**Figura 1.1.** Evolução do número total de artigos sobre ciclodextrinas publicados entre 1985 e 2000 [*Cyclodextrin News*, **16**, nº 4 (2002), J. Szejtli Ed., Cyclolab, Budapeste, Hungria]

Paralelamente ao desenvolvimento da produção industrial das ciclodextrinas, e como consequência da sua maior disponibilidade, houve também um aumento do número de publicações sobre estes compostos, que se ilustra na figura 1.1. Pode notar-se uma tendência crescente no número de publicações, mostrando que a investigação nesta área continua a suscitar muito interesse.

## 1.2. Formação das ciclodextrinas

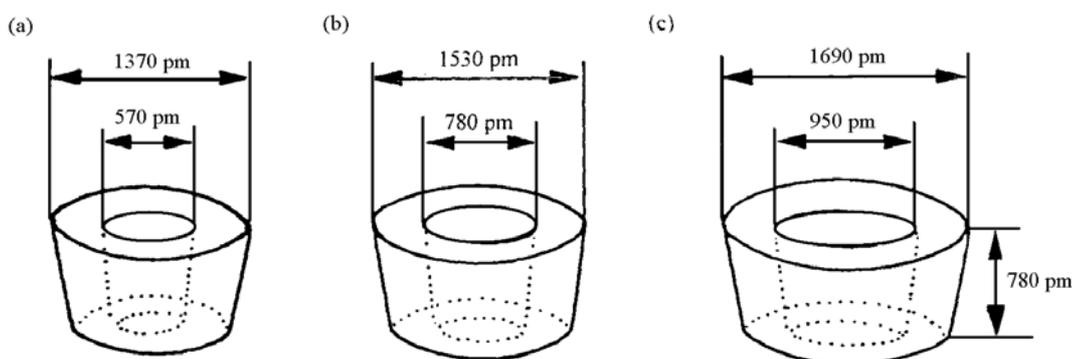
Foi já descrito que as ciclodextrinas se formam a partir do amido por digestão bacteriana. Esta transformação envolve a enzima ciclodextrinaglicosiltransferase (CGTase) [10] cuja acção resulta na formação de anéis de  $\alpha$ -D-glicose, com seis, sete ou oito unidades, que se denominam de ciclodextrinas alfa, beta e gama ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD), respectivamente. Por ocorrerem espontaneamente na natureza devido à presença de bactérias, foram denominadas de *ciclodextrinas nativas* e constituem as CDs mais bem caracterizadas e mais utilizadas.

Nos últimos quinze anos, estudos sobre a acção da CGTase sobre o amido mostraram que também são formados, em pequeníssimas quantidades, anéis com nove ( $\delta$ -CD), dez ( $\epsilon$ -CD) ou mais unidades de glicose, denominados *ciclodextrinas de anel largo* [11]. Até ao momento, a maior ciclodextrina conhecida tem 31 unidades de glicose [12], mas pensa-se ser possível obter anéis com mais de 60 unidades, recorrendo a variedades sintéticas de amido e reduzindo o tempo de actuação da enzima CGTase [11f]. Têm ainda sido utilizadas enzimas de outras bactérias para obter CDs de anel largo: assim, a  $\delta$ -CD pode ser obtida pela CGTase de vários *Bacillus* ou de *Paenibacillus* [13], e a enzima amilomaltase, presente nas bactérias *Escherichia coli* e *Thermus aquaticus* dá origem a CDs com 17 a 22 glicoses [14].

## 1.3. Propriedades das ciclodextrinas nativas

O historial de grande sucesso destas moléculas junto das comunidades científica e industrial deve-se, sem dúvida, às suas particulares características estruturais e químicas.

As ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são substâncias cristalinas, formadas por macrociclos de glicose em forma de cone truncado, conforme se mostra na figura 1.2.



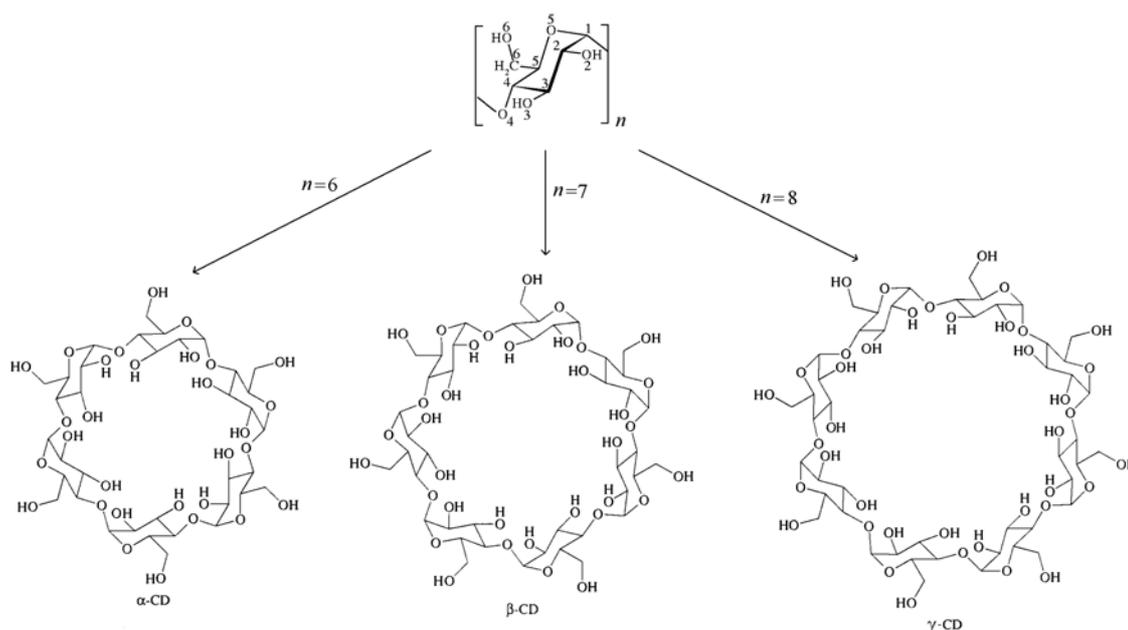
**Figura 1.2.** Estrutura tridimensional de (a)  $\alpha$ -CD, (b)  $\beta$ -CD e (c)  $\gamma$ -CD mostrando as suas dimensões aproximadas

Os nomes IUPAC das CDs quase nunca são utilizados, o que é compreensível devido à sua extensão. Por exemplo, o nome IUPAC da  $\beta$ -CD é [15]:

5, 10, 15, 20, 25, 30, 35-hepta-quis-(hidroximetil)-2, 4, 7, 9, 12, 14, 17, 19, 22, 24, 27, 29, 32, 34-tetradecaoxaociclo[31.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>.2<sup>28,31</sup>]nonatetracontano-36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49-tetradecol

Assim, usa-se vulgarmente o nome de ciclodextrinas, uma vez que se trata de compostos cíclicos constituídos por dextrose. A distinção entre CDs com diferentes unidades de D-glicose faz-se recorrendo a letras do alfabeto grego:  $\alpha$  para seis,  $\beta$  para sete, e assim sucessivamente.

Todas as unidades de glicose das CDs se apresentam na conformação de cadeira,  ${}^4C_1$  (ver figura 1.3.), o que resulta em posições muito específicas para os grupos hidroxilo. De facto, os hidroxilos secundários (ligados aos carbonos 2 e 3, ver esquema de numeração na figura 1.3.) estão virados para a orla superior da CD e os hidroxilos primários (carbonos 6) estão virados para a orla inferior.



**Figura 1.3.** Esquema de numeração dos átomos de carbono e dos grupos hidroxilo das ciclodextrinas e representação das CDs nativas evidenciando a conformação em cadeira das unidades de glicose que as constituem.

O alinhamento dos grupos OH sobre as orlas das CDs torna-as muito solúveis em água. Porém, cada ciclodextrina nativa apresenta um valor de solubilidade diferente, fenómeno que tem sido explicado em função do número de pontes de hidrogénio intramoleculares:

- Na  $\beta$ -CD, cada hidroxilo secundário está envolvido numa ligação de hidrogénio com o grupo OH seguinte, formando uma cadeia *homodrómica* (todas as ligações de hidrogénio no mesmo sentido). Havendo menos disponibilidade para formar pontes

de H com a própria água, esta é a menos solúvel das ciclodextrinas nativas (ver tabela 1.1).

- Na  $\alpha$ -CD a cadeia de ligações H está incompleta, resultando numa solubilidade muito superior à da  $\beta$ -CD.
- A  $\gamma$ -CD apresenta uma estrutura muito flexível com distorção das orlas, ou seja, os hidroxilos não são coplanares, sendo, portanto, a mais solúvel das ciclodextrinas nativas.

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidades de glicose	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidade em água, g / 100mL, à temp. ambiente	14.5	1.85	23.2
Água de hidratação, % (m / m)	10.2	13.2 – 14.5	8.13 – 17.7

**Tabela 1.1.** Características das ciclodextrinas nativas

Os protões ligados aos carbonos 3 e 5, por seu turno, apresentam-se virados para o interior da cavidade, conferindo-lhe tendência hidrófoba. Esta disposição permite às CDs acomodarem nas suas cavidades substâncias apolares, funcionando como agentes solubilizantes.

A capacidade de incluir uma molécula – *hóspede* – na cavidade duma ciclodextrina, formando um *complexo de inclusão*, constitui a sua característica mais importante e explica como, decorridos mais de cem anos desde a sua descoberta, estas moléculas continuam a suscitar um interesse crescente em ciência e na indústria.

#### 1.4. Formação de complexos de inclusão

As ciclodextrinas formam complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas que, à primeira vista, parecem ter de satisfazer apenas uma condição – terem dimensões adequadas para encaixar, por inteiro ou em parte, dentro da cavidade da CD.

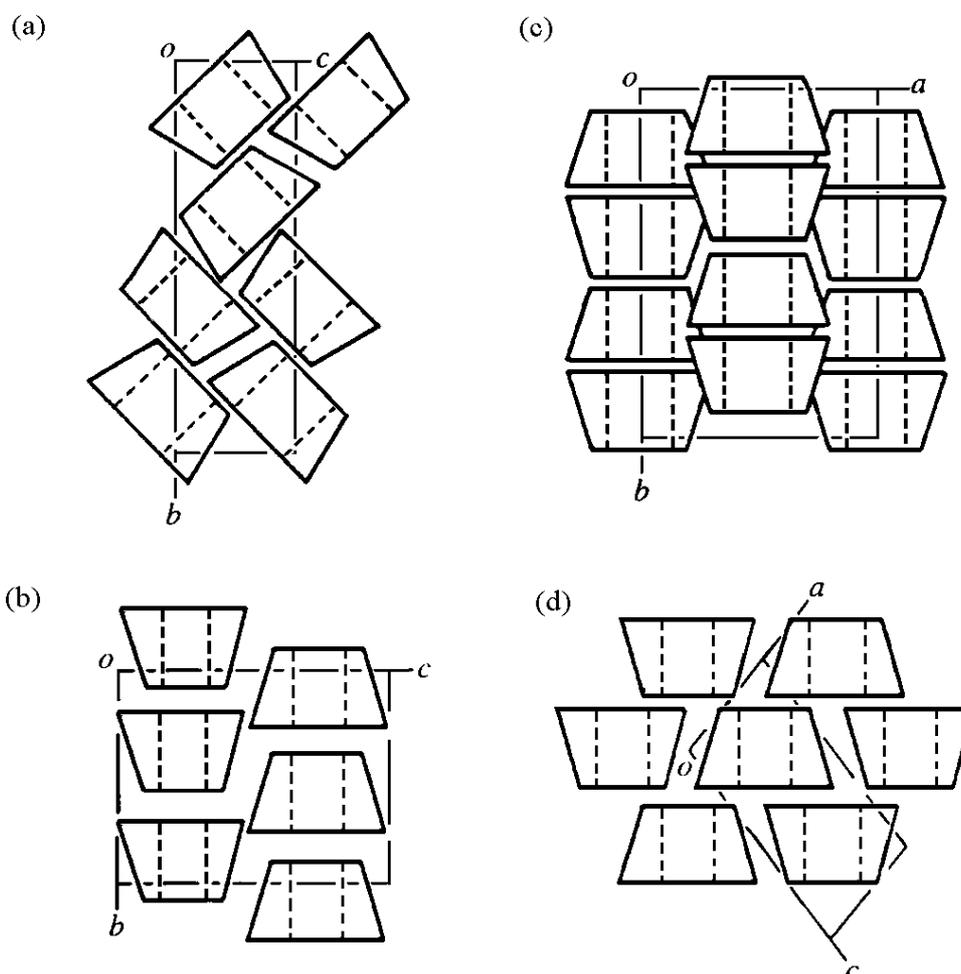
Basicamente, o princípio subjacente à preparação de complexos de inclusão é proporcionar o encontro entre a ciclodextrina e o hóspede, pois só assim podem interagir ao nível molecular. Caso o hóspede seja solúvel em água, é adicionado a uma solução de ciclodextrina; caso seja insolúvel, terá de ser dissolvido num solvente orgânico (éter, diclorometano,...) e depois esta fase é agitada com uma solução aquosa de CD, formando-se o complexo de inclusão na interface [16]. A maioria dos processos de obtenção dos complexos de inclusão são variações destes dois, que podem ser mais ou menos sofisticadas de acordo com as características de cada hóspede. Contudo, não se trata de métodos infalíveis, pelo que estão a ser investigados novos procedimentos, como o uso de dióxido de carbono supercrítico como solvente [17, 18].

A compreensão dos fenómenos de interacção subjacentes à formação de complexos de inclusão tem sido alvo de vários trabalhos e discussões. Em face aos conhecimentos actuais, pode dizer-se que há a acção simultânea de várias interacções,

predominando as interações hidrofóbicas e de Van der Waals e podendo também ocorrer pontes de hidrogénio com o hóspede e com o próprio solvente. Na realidade, a maioria dos complexos de inclusão cristalinos são hidratos e as pontes de hidrogénio com a água são vitais para a estabilização da estrutura cristalina.

Os complexos de ciclodextrinas apresentam, no geral, uma estrutura cristalina ou micro-cristalina; estudos cristalográficos efectuados sobre uma série destes complexos mostram que o empacotamento das CDs pode fazer-se de diferentes formas, conforme o tipo de hóspede incluído (ver figura 1.4).

- Quando o hóspede é suficientemente pequeno para ficar totalmente incluído dentro da cavidade das CDs, forma-se uma estrutura em *gaiola*, com empacotamento igual às CDs hidratadas, ou seja, em espinha de peixe (fig. 1.4.a).



**Figura 1.4.** Representação esquemática das diversas estruturas de empacotamento dos complexos de inclusão: (a) espinha de arenque, (b) canal cabeça-cauda, (c) canal cabeça-cabeça e (d) camada.

- Com moléculas de maiores dimensões as ciclodextrinas empilham-se em canais, virtualmente infinitos, no interior dos quais de aloja o hóspede; a estrutura é reforçada por pontes de hidrogénio entre hidroxilos de CDs adjacentes e o empacotamento pode

ser “cabeça com cauda” (fig. 1.4.b) ou “cabeça com cabeça”, formando-se dímeros com o feitiço de barris (fig. 1.4.c).

- Quando o hóspede é demasiado grande, ficando parcialmente fora da cavidade, as ciclodextrinas adoptam um empacotamento em camada, ficando a parte não incluída do hóspede no espaço entre duas camadas (fig. 1.4.d).

A participação em complexos de inclusão leva, pois, a uma adaptação da ciclodextrina ao hóspede, que se reflecte não só na sua rede cristalina, mas também permite obter uma série de novas propriedades:

- ✓ Solubilização de substâncias lipófilas
- ✓ Protecção de compostos sensíveis à oxidação, à radiação UV ou ao calor
- ✓ Retenção e diminuição de reactividade de produtos tóxicos
- ✓ Alteração do espectro de certos pigmentos
- ✓ Fixação de substâncias voláteis
- ✓ Efeito catalítico
- ✓ Mimetização da função enzimática

Todas estas propriedades das CDs conferem-lhes um enorme potencial de aplicações numa grande variedade de indústrias, como se descreve a seguir.

## 1.5. Aplicações das ciclodextrinas

### *Indústria farmacêutica*

A modificação das propriedades de fármacos pelas CDs foi a primeira aplicação conhecida para as ciclodextrinas e ainda hoje constitui um campo de interesse crescente. Além do aumento da solubilidade, pode-se ainda tirar partido de efeitos mais específicos, como a melhoria da absorção ou a redução de efeitos indesejáveis. Nos últimos quinze anos, foram registadas mais de 500 patentes nesta área (apresentam-se alguns exemplos na tabela 1.2.), tendendo a surgir muitas mais.

<i>Composto de inclusão utilizado</i>	<i>Tipo de medicamento</i>	<i>Aplicação</i>	<i>Nome comercial</i>	<i>Companhia que registou a patente</i>
Piroxicam-β-CD	Comprimidos	Antiflogístico e analgésico	Brexin, Brexidol	Chiesi (Itália), Pharmácia (Alemanha)
Benexato-β-CD	Cápsulas	Anti-ulceroso	Ulgut, Lonmiel	Teikoku (Japão), Shionogo (Japão)
Cloranfenicol-Me-β-CD	Gotas oculares	Antibiótico	Clorocil	Oftalder (Portugal)
Itroconazole-HP-β-CD	Solução	Infecções fúngicas	Sporanox	Janssen-Cilag (Estados Unidos)

**Tabela 1.2.** Exemplos de patentes de medicamentos contendo ciclodextrinas [J.-P. Moldenhauer, M. Regiert, H. Reuscher, T. Wimmer, *WWW – Wacker World Wide*, **2/98**, 42 (1989)]

Conforme se mostra na tabela, são utilizadas não só as CDs nativas como também *ciclodextrinas modificadas quimicamente* pela substituição de um ou vários hidroxilos por

outros grupos. As novas CDs assim obtidas podem ser *hidrófilas* – caso das ciclodextrinas metiladas (Me-CDs) e das hidroxipropilciclodextrinas (HP-CDs) – ou *hidrófobas* [19]:

- As ciclodextrinas hidrófilas são frequentemente utilizadas para aumentar a solubilidade de fármacos em água, sendo particularmente úteis na preparação de soluções injectáveis e colírios. Permitem ainda aumentar a absorção de um fármaco pela pele e mucosas, pois são capazes de interferir com a estrutura da membrana celular, tornando-a mais permeável. Têm também um papel importante como agentes estabilizadores, quer de emulsões, quer em medicamentos contendo proteínas.
- As ciclodextrinas hidrófobas podem incluir fármacos hidrossolúveis, sendo depois o complexo de inclusão usado em medicamentos de libertação retardada.

A procura de transportadores de fármacos de escala molecular levou à criação de *ciclodextrinas ramificadas*, contendo como substituinte um conjunto de açúcares concebido de forma a mimetizar o substrato de um receptor molecular presente num determinado órgão como o fígado, por exemplo. A CD ramificada contendo o açúcar específico circula por todo o organismo mas apenas é reconhecida pelos receptores do fígado, onde se liga e liberta o fármaco que transporta. Deste modo, consegue administrar-se um fármaco de forma direccionada, surgindo actividade farmacológica apenas no órgão pretendido.

### ***Cosmética***

O uso de ciclodextrinas na preparação de cosméticos envolve efeitos muito variados que vão desde a estabilização de emulsões à sua participação como componente activo, por exemplo, em desodorizantes, retendo as moléculas com odor desagradável formadas na pele.

Uma das funções mais importantes das CDs nesta área é a de agente estabilizante e protector contra o calor e a oxidação. Moléculas aromáticas,  $\alpha$ -hidroxiácidos (efeito anti-envelhecimento) e vitaminas são incluídas na cavidade da ciclodextrina, e depois usadas em perfumes para prolongar a sensação de aroma ou em cremes, champôs,... para alargamento do prazo de validade.

### ***Indústria alimentar***

O uso de ciclodextrinas no processamento de alimentos está muito desenvolvido no Japão, onde não há restrições legais à sua presença na alimentação humana como aditivo. De facto, estima-se que, no ano de 2000, 8% do total de CDs consumidas no Japão foram na alimentação. Nos Estados Unidos, as ciclodextrinas só recentemente começaram a ser introduzidas na composição de alimentos (bolachas, cereais, chocolates, café e chá) e na Europa são usadas como estabilizantes de aroma em alguns países, como a Hungria, a França, e a Espanha, por exemplo.

As CDs protegem os alimentos da degradação e contribuem para preservar o sabor. Assim, são adicionadas a condimentos como o gengibre e o alho em pó ou usadas para extrair aromas de plantas, como o chá verde, muito apreciado pelos japoneses. O

complexo formado com este extracto é um pó solúvel, usado para produzir gelado de chá verde ou outros alimentos com este aroma [20].

O efeito estabilizador de emulsões e espumas também é usado na produção de alimentos. Um exemplo é a presença de ciclodextrinas na mistura para *capuccino* da Nescafé® que, depois de preparada, apresenta uma espuma abundante.

Em certos casos, as ciclodextrinas ajudam no processamento do alimento mas não estão presentes no produto final. Um exemplo é a preparação de manteiga sem colesterol por contacto com CDs quimicamente modificadas, desenhadas para reter apenas o colesterol e deixar intactas as restantes gorduras alimentares. No final do processo, a manteiga é separada das CDs e fica pronta a ser consumida, sem perigo, por indivíduos com problemas de colesterol.

A indústria de embalagens alimentares também recorre às ciclodextrinas para revestir os plásticos que envolvem alimentos, de modo a reter por mais tempo o seu aroma característico. Podem ainda ser usados complexos de inclusão contendo extracto de “Wasabi” (rábano japonês), com propriedades anti-bacterianas, no revestimento de tabuleiros para embalar, por exemplo, peças de carne; o composto é lentamente libertado pela ciclodextrina, mantendo a frescura da carne por bastante tempo [20].

### ***Química analítica***

O uso de ciclodextrinas em química analítica compreende dois grandes tipos de aplicações: os processos separativos e as técnicas não-separativas. Dentro dos processos separativos, são maioritariamente utilizadas em cromatografia, em particular nas de camada fina, gasosa, HPLC e electroforese. Uma das particularidades das ciclodextrinas é a sua capacidade de distinguir enantiómeros, e de os separar durante uma cromatografia; presentemente, está a ser estudado o seu potencial na separação enantiomérica em grande escala [21].

Em processos analíticos não-separativos, as CDs podem ser usadas na preparação de amostras, removendo contaminantes ou extraindo o analito de uma matriz complexa, como uma amostra de sangue. Usam-se ainda na solubilização ou estabilização de um substrato para uma reacção enzimática e na construção de sensores supramoleculares, detectores ou indicadores.

### ***Indústria têxtil***

As ciclodextrinas são ligadas covalentemente às fibras de tecido para formar um revestimento que não é removido durante as lavagens. Os tecidos são depois usados para produzir vestuário desportivo, roupa interior e meias que absorvem os odores corporais indesejáveis. Alternativamente, os tecidos revestidos com ciclodextrinas podem ser mergulhados numa solução contendo um hóspede que ficará incluído na sua cavidade. Consoante o composto utilizado, obtêm-se têxteis com diversas aplicações [20]:

- A inclusão de aromas origina roupas perfumadas, que já se podem encontrar em alguns países. Após cerca de vinte lavagens, perde-se o aroma, estando prevista a venda de um sistema de re-introdução do perfume. Para tal, basta colocar a peça de roupa numa caixa hermética, pulverizá-la com o aroma e deixar em contacto algumas horas.
- Tecidos contendo complexos de inclusão com esqualeno (composto hidratante) são usados no fabrico de roupa interior que mantém a pele hidratada.
- A introdução de compostos anti-sépticos resulta na criação de vestuário para tratamento de afecções cutâneas, como a dermatite atópica. A grande vantagem de colocar os compostos activos na roupa é a de se conseguir a libertação permanente e a ritmo constante do medicamento.

### ***Outras aplicações***

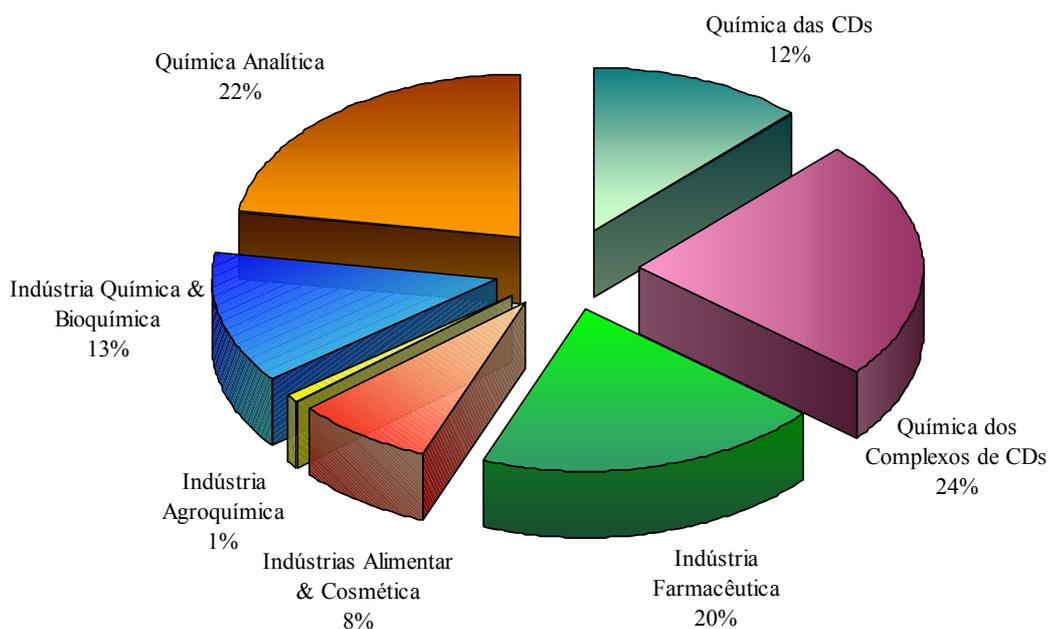
A ciclodextrinas surgem hoje em produtos de áreas tão diversas que seria impossível falar sobre todos. Referem-se, pois, apenas os mais conhecidos, bem como alguns exemplos mais curiosos [22]:

- O produto Febreeze<sup>®</sup>, para limpar superfícies ou têxteis, contém ciclodextrinas, o que lhe permite eliminar não só a sujidade, mas também os odores retidos nos materiais.
- Às tintas para impressoras são adicionadas CDs para aumentar a sua estabilidade e evitar que a impressão esborrate quando o papel ganha humidade.
- Na indústria madeireira banha as madeiras em soluções aquosas de CDs para as proteger contra o envelhecimento.
- Um projecto do exército Norte-Americano envolve o estudo de ciclodextrinas quimicamente modificadas na estabilização de nitraminas, poderosos explosivos utilizados em mísseis de longo alcance.

## **1.6. Perspectiva geral**

A análise das publicações sobre ciclodextrinas permite obter um panorama da distribuição e quantidade dos estudos efectuados em cada área. Relativamente ao ano de 1996, a área com maior expressão a nível de publicações foi a das Ciências farmacêuticas, seguida de perto pela da investigação dos fenómenos químicos relacionados com a formação de novos complexos.

Em 2001 (Figura 1.5.), a química dos complexos de inclusão passou para primeiro lugar, constituindo 24% do total de publicações [22]. Esta evolução parece demonstrar que, muito embora o potencial comercial das ciclodextrinas motive a investigação e desenvolvimento na constante busca de novos produtos, a ciência básica, centrada na preparação e caracterização física e química de novos complexos de inclusão, continua a ser um dos pilares fundamentais no conhecimento das ciclodextrinas.



**Figura 1.5.** Distribuição por categorias dos 1651 artigos sobre CDs publicados em 2001 [22]

## 1.7. Linhas orientadoras do trabalho

O trabalho apresentado nesta tese constitui uma contribuição para conhecimento e compreensão dos fenómenos de inclusão, centrando-se no estudo das estruturas de complexos formadas com a  $\beta$ -CD no estado sólido. Sempre que possível, procura-se comparar resultados obtidos com hóspedes semelhantes. Nesse sentido, foram seleccionadas moléculas que apresentassem características em comum ou uma evolução crescente numa das propriedades (tamanho, polaridade) para sondar as preferências de inclusão da  $\beta$ -ciclodextrina.

### *O hospedeiro*

A ciclodextrina escolhida para molécula hospedeira foi a  $\beta$ -CD, por reunir um conjunto único de características dentro das CDs nativas. De facto, apenas ela apresenta uma cadeia contínua e homodrómica de pontes de hidrogénio entre os hidroxilos em C2 e C3, que lhe confere uma maior rigidez e menor solubilidade.

A baixa solubilidade em água traz vantagens, tornando-se mais fácil obter cristais. Consequentemente, é a ciclodextrina mais simples de purificar, mais abundante no mercado e de mais baixo preço. Adicionalmente, permite a preparação de complexos de inclusão na forma cristalina num curto espaço de tempo.

### *Os hóspedes*

O factor mais importante para garantir o sucesso de uma inclusão é a selecção de hóspedes com um tamanho adequado ao da cavidade da ciclodextrina hospedeira. No caso da  $\beta$ -CD, moléculas com dimensões que lhes permitem ficar totalmente incluídas são,

por exemplo, benzenos mono-substituídos, como o tolueno, o ácido benzóico ou o benzaldeído. Moléculas de maiores dimensões ficarão com parte fora da cavidade ou levarão a  $\beta$ -CD a formar dímeros, geralmente cabeça-cabeça, resultando numa cavidade em forma de barril com maior volume.

Na primeira parte do trabalho, utilizam-se hóspedes orgânicos, partindo de moléculas mais pequenas e simples para compostos mais volumosos, que possuem características comuns, destacando-se o formato alongado, com um eixo principal de inércia contendo um ou mais grupos benzénicos.

Nos dois primeiros capítulos dedicados à descrição dos resultados obtidos (capítulos 2 e 3), é tratada a complexação com o *p*-hidroxibenzaldeído e o ácido isobutilfenilpropiónico (ibuprofeno), respectivamente. Ambos são derivados do benzeno por dupla substituição nas posições 1 e 4 pelo que apresentam o tamanho e forma ideais para a encapsulação pela  $\beta$ -CD. Adicionalmente, possuem um grupo carbonilo que constitui, em espectroscopia vibracional, uma excelente sonda para determinar a ocorrência duma verdadeira inclusão: este oscilador é sensível aos ambientes apolares, tal como o que ocorre na cavidade da  $\beta$ -CD, pelo que será de esperar um desvio na sua frequência quando está encapsulado. Note-se também que os carbonilos, podendo formar pontes de hidrogénio com o hóspede, contribuirão para uma maior estabilidade estrutural do complexo.

O ibuprofeno é também um composto de grande interesse farmacológico, constituindo um dos anti-inflamatórios mais vendidos em todo o mundo. A sua complexação pela  $\beta$ -CD aumenta-lhe a solubilidade e a estabilidade química.

No capítulo 4 descreve-se o estudo efectuado com uma série de compostos que por transformações sucessivas, originam o nimesulide. Tal como o ibuprofeno, apresenta propriedades anti-inflamatórias. Parte-se do 2-nitrodifeniléter, que é reduzido a 2-aminodifeniléter. Adicionado um grupo metanossulfóxido, obtêm-se o último "intermediário" (2-fenoximetanossulfonanilida). Finalmente, o nimesulide (4-nitro-2-fenoximetanossulfonanilida) é preparado por adição dum grupo nitro. Estes compostos apresentam dimensões e complexidade crescentes para investigar as preferências de encapsulação da  $\beta$ -CD.

O capítulo 5 apresenta uma nova série de hóspedes com um gradiente de complexidade estrutural. Parte-se dum benzimidazole (o 2-metoxi-2-mercaptobenzimidazole) e duma piridina substituída que reagem formando um tioéter (5-metoxi-2-[(3,5-dimetil-4-metoxi-2-piridina)metiltio]-1H-benzimidazole). Por oxidação desta ligação - formando-se um sulfóxido - é preparado o omeprazole (5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil-1H-benzimidazole). Trata-se dum anti-ulcerativo que inibe a secreção de ácido clorídrico no estômago. Facilmente degradado pela luz ou pelo calor, torna-se mais estável quando encapsulado pela  $\beta$ -CD.

Numa segunda parte do trabalho descrevem-se os resultados da inclusão de compostos organometálicos. Estes comportam-se de forma bastante diferente dos compostos orgânicos face à ciclodextrina. De facto, a coordenação do substrato orgânico a um centro metálico traduz-se por uma elevada hidrofobicidade e grande afinidade para formar complexos com as ciclodextrinas. Pretende-se, pois, obter novos materiais com propriedades distintas dos seus precursores.

O capítulo 6 mostra os primeiros estudos efectuados com estes compostos. Seleccionaram-se duas séries de hóspedes com base em dois metais de conhecida importância em funções biológicas, o ferro e o molibdénio. Dentro de cada série, as moléculas diferem entre si por apresentarem um ligando diferente, mantendo-se constante o resto da estrutura. Deste modo, podem ser estabelecidas comparações sobre a capacidade de formação de complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD. Para mais facilmente seguir a complexação, deu-se preferência a moléculas contendo grupos carbonilo ou cianeto que constituem, conforme foi descrito, excelentes sondas para a inclusão em EIV.

Finalmente, no capítulo 7 são usados os conhecimentos sobre os fenómenos de complexação com organometálicos para incluir na  $\beta$ -CD um composto de elevado interesse médico, o *bis*-ciclopentadienilodicloreto de molibdénio. Trata-se de um anti-tumoral que facilmente perde um dos cloretos na presença de água sendo difícil a sua conservação. A sua inclusão pela  $\beta$ -CD tem um efeito protector e torna-o menos sensível à presença de água.

### ***Caracterização dos complexos de inclusão***

A melhor aproximação à determinação da estrutura dum complexo de inclusão cristalino é a difracção de raios X de monocristal, pois consegue-se obter as coordenadas dos vários átomos no espaço tridimensional. Lamentavelmente, nem todos os complexos formam cristais e alguns dos cristais obtidos não apresentam qualidade suficiente para a recolha das difracções.

Visto que a inclusão acarreta modificação de propriedades quer do hóspede, quer da própria ciclodextrina, pode esperar-se alterações nos seus espectros vibracionais ou de ressonância nuclear, nos padrões de difracção de pós e mesmo do seu comportamento termogravimétrico. Assim, estas medidas podem ser usadas para sondar as interacções e as alterações de estrutura resultantes da inclusão.

A espectroscopia de infravermelho (EIV) permite confirmar a presença duma substância mista e, por vezes, diferenciar uma verdadeira inclusão de uma mera mistura física dos componentes. Hóspedes com grupos sensíveis a mudanças na polaridade do ambiente apresentam um desvio na frequência vibracional desse grupo aquando da inclusão. As bandas características da  $\beta$ -CD praticamente não sofrem alterações com a formação de complexos de inclusão [23].

Uma das espectroscopias mais úteis para estudar a estrutura dum complexo de inclusão é a ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$ , permitindo determinar o empacotamento das ciclodextrinas e as suas interações com o hóspede. Recorre-se geralmente à *rotação segundo o ângulo mágico* ou MAS (uma inclinação de  $54,7^\circ$  relativamente à direcção do campo magnético) para eliminar a anisotropia. Adicionalmente, utilizando-se o método de *polarização cruzada* (CP) para obter espectros de RMN com melhor relação sinal/ruído. Este tira partido da grande quantidade de átomos de hidrogénio apresentada pela  $\beta$ -CD, visto tratar-se dum hidrato de carbono. Resumidamente, pode dizer-se que consiste em aplicar um impulso magnético sobre os núcleos de prótio que depois transmitem a sua polarização para os de carbono 13.

Na impossibilidade de obter cristais apropriados para difracção de raios X, esta metodologia pode ser aplicada ao complexo pulverizado. Contudo, a informação obtida é difícil de analisar, sendo poucos os casos de sucesso na resolução da estrutura molecular a partir do difractograma de pós [24]. Os dados recolhidos em difracção de monocristal são coordenadas tridimensionais, enquanto que em DRX de pós os dados estão condensados numa só dimensão. Consequentemente, há uma sobreposição de reflexões que dificulta o tratamento dos dados. Adicionalmente, as ciclodextrinas e seus complexos com os diferentes hóspedes formam microcristais com células unitárias relativamente grandes e grupos espaciais de baixa simetria, o que contribui para a grande densidade de picos de reflexão no difractograma de pós. Para se poder interpretar o difractograma, recorre-se correntemente à comparação. Numa primeira abordagem, o padrão do complexo é comparado com os da  $\beta$ -CD e do hóspede, verificando-se quase sempre diferenças nos picos de difracção. Um difractograma novo indica a formação de um verdadeiro complexo de inclusão. Seguidamente, são usadas as coordenadas atómicas da estrutura cristalina dum complexo de inclusão descrito na bibliografia para simular um difractograma de pós nas mesmas condições experimentais aplicadas aos pós do complexo cuja estrutura se pretende conhecer. Por comparação com o padrão simulado, é possível prever que a estrutura em estudo seja idêntica à do modelo, caso os difractogramas apresentem grande semelhança.

A análise termogravimétrica também pode ser usada para distinguir entre um verdadeiro complexo e uma simples mistura física, pois os termogramas serão diferentes. Permite ainda determinar o teor de água do complexo e fornece uma medida indirecta da estabilidade da interacção  $\beta$ -CD-hóspede: em vários casos verifica-se a volatilização do hóspede complexado a temperaturas superiores à do seu ponto de ebulição, como consequência de uma forte interacção com o hospedeiro.

### ***Artigos publicados***

O trabalho descrito nesta tese permitiu elaborar as seguintes publicações:

- Susana S. Braga, Isabel S. Gonçalves, André D. Lopes, Martyn Pillinger, João Rocha, Carlos C. Romão e José J. C. Teixeira-Dias "Encapsulation of half sandwich complexes of molybdenum with  $\beta$ -cyclodextrin" *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2963-2968 (2000)
- Susana S. Braga, Isabel S. Gonçalves, Martyn Pillinger, Paulo Ribeiro-Claro e José J. C. Teixeira-Dias "Experimental and theoretical study of the interaction of molybdenocene dichloride ( $Cp_2MoCl_2$ ) with  $\beta$ -cyclodextrin" *J. Organom. Chem.*, 11-16 (2001)
- Susana S. Braga, Isabel S. Gonçalves, Paulo Ribeiro-Claro, André D. Lopes, Martyn Pillinger, José J. C. Teixeira-Dias, João Rocha e Carlos C. Romão "Encapsulation of cyano(cyclopentadienyl) complexes of iron with  $\beta$ -cyclodextrin" *Supramol. Chem.* **14**, 359-366 (2002)
- Susana S. Braga, Thammarat Aree, Kayo Imamura, Pierre Vertut, Isabel Boal-Palheiros, Wolfram Saenger e José J. C. Teixeira-Dias "Structure of the  $\beta$ -Cyclodextrin-*p*-Hydroxybenzaldehyde Inclusion Complex in Aqueous Solution and in the Crystalline State", *J. Incl. Phen.* **43**, 115-125 (2002)
- Susana S. Braga, Isabel S. Gonçalves, E. Herdtweck, José J. C. Teixeira-Dias "Solid State Inclusion Compound of S-Ibuprofen in  $\beta$ -Cyclodextrin: Structure and Characterization", *New J. Chem.* **27**, 597-601 (2003)
- Susana S. Braga, Paulo Ribeiro-Claro, Martyn Pillinger, Isabel S. Gonçalves, Florbela Pereira, Ana C. Fernandes, Carlos C. Romão, Pedro Brito Correia, José J. C. Teixeira-Dias "Encapsulation of sodium nimesulide and precursors in  $\beta$ -cyclodextrin", *Organic Biomol. Chem.* **1**, 873-878 (2003)
- Susana S. Braga, Paulo Ribeiro-Claro, Martyn Pillinger, Isabel S. Gonçalves, Ana C. Fernandes, Florbela Pereira, Carlos C. Romão, Pedro Brito Correia, José J. C. Teixeira-Dias "Solid state interactions of omeprazole and precursors with  $\beta$ -cyclodextrin host molecules" *J. Incl. Phen.*, submetido (2003)

## Referências

1. A. Villiers, *C. R. Acad. Sci.*, 112 (1891)
2. F. Schardinger, *Unters. Nahr. U. Genussm.* **6**, 865 (1903)
3. F. Schardinger, *Wien. Klin. Wochenschr.* **17**, 207 (1904)
4. F. Schardinger, *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. 2*, **14**, 772 (1905)
5. (a) K. Freudenberg, G. Blomquist, Lisa Ewald, K. Soff, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **69**, 1258 (1936); (b) K. Freudenberg, W. Rapp, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **69**, 2041 (1936); (c) K. Freudenberg, H. Boppel, M. Meyer-Delius, *Naturwissenschaften* **26**, 123 (1938); (d) K. Freudenberg, M. Meyer-Delius, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **71**, 1596 (1938); (e) K. Freudenberg, F. Cramer, *Z. Naturforsch.* **3b**, 464 (1948)
6. D. French, *Adv. Carbohydr. Chem.* **12**, 189 (1957)
7. F. Cramer, *Einschlussverbindungen (Inclusion Compounds)*, Springer-Verlag, Berlim, Alemanha (1954)
8. K. Freudenberg, F. Cramer, H. Plieninger, *Ger. Patent*, 895-769 (1953)
9. J. Szejtli, *Chem. Rev.*, **98**, 1743-1753 (1998)
10. Y. Terada, M. Yanase, H. Takata, S. Okada, *J. Biol. Chem.*, **272**, 15729-15733 (1997)
11. Há uma série de trabalhos sobre a obtenção e caracterização das ciclodextrinas de anel largo, que se resumem de seguida: (a) Obtenção e propriedades físico-químicas da  $\delta$ -CD (9 glicoses) – I. Miyazawa, H. Ueda, H. Nagase, T. Endo, S. Kobayashi, T. Nagai, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **3**, 153-162 (1995); (b) Nova técnica para obtenção de  $\delta$ -CD com elevado rendimento – A. Wakamida, T. Endo, H. Nagase, H. Ueda, S. Kobayashi, T. Nagai, *Yakuzaigaku*, **57**(4), 220-223 (1997); (c) Obtenção de  $\eta$ -CD (12 glicoses) – T. Endo, H. Ueda, S. Kobayashi, T. Nagai, *Carbohydr. Res.*, **269**, 369-373 (1995); (d) Obtenção de  $\epsilon$ ,  $\zeta$  e  $\theta$ -CD (10, 11 e 13 glicoses) – T. Endo, H. Nagase, H. Ueda, S. Kobayashi, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**(3), 532-536 (1997); (e) Estrutura cristalina da  $\epsilon$ -CD determinada por raios X – T. Endo, H. Nagase, H. Ueda, S. Kobayashi, M. Shiro, *Anal. Sci.*, **15**, 613-614 (1999) e referências aqui citadas; (f) Obtenção de  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$  e  $\mu$ -CD (14, 15, 16 e 17 glicoses) – T. Endo, H. Nagase, H. Ueda, A. Shigihara, S. Kobayashi, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**(11), 1856-1859 (1997); (f) Estrutura cristalina da  $\iota$ -CD determinada por raios X – K. Harata, T. Endo, H. Ueda, T. Nagai, *Supramol. Chem.*, **9**, 143-150 (1998); (g) Obtenção de  $\nu$ ,  $\xi$ ,  $\omicron$  e  $\pi$ -CD (18, 19, 20 e 21 glicoses) – T. Endo, H. Nagase, H. Ueda, A. Shigihara, S. Kobayashi, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **46**(11), 1840-1843 (1998).
12. K. Koizumi, H. Sanbe, Y. Kubota, Y. Terada, T. Takaha, *J. Chromatogr. A*, **852**, 407-416 (1999)

13. (a) K. L. Larsen, H. J. S. Christensen, F. Mathiensen, L. H. Pedersen, W. Zimmermann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 314-317 (1988); (b) K. L. Larsen, L. Duedahl-Olesen, H. J. S. Christensen, F. Mathiensen, L. H. Pedersen, W. Zimmermann, *Carbohydr. Res.*, **310**, 211-219 (1988).
14. T. Takaha, S. M. Smith, *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, **16**, 257-280 (1999)
15. J. Szejtli, em: Atwood, J. E. D Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, J.-M. Lehn, J. Szejtli, T. Osa (Eds.), *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, **vol 3**, 5-40, Pergamon, Oxford (1996)
16. W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 344-362 (1980)
17. S. Junco, T. Casimiro, N. Ribeiro, M. N. Ponte, H. M. C. Marques, *J. Incl. Phen., special issue: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*, in press (2002)
18. T. Hees, V. Barillaro, G. Piel, P. Bertholet, S. H. Hassonville, B. Evrard, L. Delattre, *J. Incl. Phen., special issue: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*, in press (2002)
19. K. Uekama, *J. Incl. Phen., special issue: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*, in press (2002)
20. H. Hashimoto, *J. Incl. Phen., special issue: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*, in press (2002)
21. L. Szente, J. Szejtli, *J. Incl. Phen., special issue: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*, in press (2002)
22. J. Szejtli, *J. Incl. Phen., special issue: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*, in press (2002)
23. L. Szente, em: Atwood, J. E. D Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, J.-M. Lehn, J. Szejtli, T. Osa (Eds.), *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, **vol 3**, 253-278, Pergamon, Oxford (1996)
24. J. Anwar, em: Frank H. Chung, Deane K. Smith (Eds.), *Industrial Applications of X-Ray Diffraction*, **cap 22**, 539-548, Marcel Dekker, Nova Iorque, EUA (2000)

# Capítulo 2

## Capítulo 2

**Dímeros dentro de dímeros:**

**a estrutura de  $2\beta\text{CD} \cdot 4p\text{HB} \cdot 9,45\text{H}_2\text{O}$**

A inclusão do *p*-HB na  $\beta$ -CD foi estudada em solução aquosa, tendo-se determinado uma estequiometria de 1:1 e uma constante de associação de  $3-4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  que mostra como este sistema apresenta uma interação estável, sendo possível o seu estudo no estado cristalino. O complexo foi obtido na forma de cristais e estudado por cristalografia, revelando uma estrutura bem diferente daquela que ocorre em solução. A célula unitária contém 4 *p*-HB e 2  $\beta$ -CD. A organização das moléculas do hóspede é semelhante à estrutura cristalina do *p*-HB. As moléculas formam dímeros unidos por interações  $\pi$ - $\pi$  e com alinhamento antiparalelo. Cada um está ligado aos vizinhos por pontes de hidrogénio, de modo que formam uma cadeia virtualmente infinita de moléculas. Em torno destas cadeias encontram-se as ciclodextrinas. Tal como o hóspede, estão agrupadas em dímeros que se empilham uns sobre os outros formando canais infinitos. Esta estrutura constitui um bom exemplo de como o hóspede pode definir o empacotamento da ciclodextrina hospedeira, obrigando-a a alinhar-se em canais.

## 2. Dímeros dentro de dímeros: a estrutura de $2\beta\text{-CD}\cdot 4p\text{-HB}\cdot 9,45\text{H}_2\text{O}$

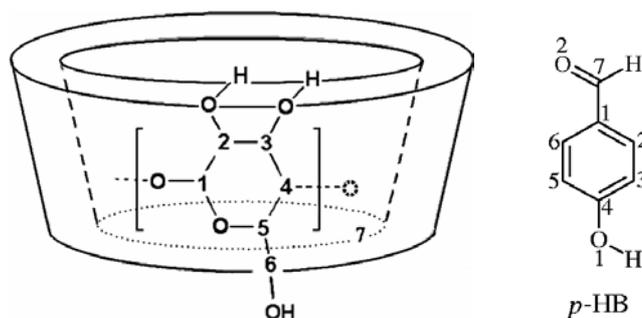
2.1. Introdução	33
2.2. Os cristais de $\beta$ -CD e <i>p</i> -HB	34
Estrutura molecular do complexo de inclusão $2\beta\text{-CD}\cdot 4p\text{-HB}\cdot 9,45\text{H}_2\text{O}$	34
Empacotamento do complexo na rede cristalina	37
2.3. Caracterização do complexo no estado sólido	38
Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$	38
Espectroscopia vibracional	39
Termogravimetria	40
2.4. Conclusões	41
Referências	42

## 2.1. Introdução

A associação entre ciclodextrinas e compostos com um anel benzénico e substituintes pouco volumosos tem sido realizada com sucesso numa série de estudos. Na realidade, moléculas deste tipo apresentam as dimensões adequadas para a inclusão na cavidade das ciclodextrinas. É conhecida a complexação do benzaldeído pela  $\alpha$ -CD [1] e pela  $\beta$ -CD [2]. Este trabalho reveste-se dum interesse particular na medida em que o benzaldeído mostra actividade anti-tumoral contra o adenocarcinoma 755, o carcinoma de Erlich e outros [3, 4] e a sua inclusão permite contornar o problema da volatilidade e evitar a degradação oxidativa sem perda de actividade citotóxica. Estão também descritos complexos entre a  $\beta$ -CD e vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) [5], o ácido e o álcool benzóicos [6] e outros.

Contudo, os mecanismos e geometria de inclusão diferem de hóspede para hóspede e as linhas gerais da selectividade dos processos de inclusão ainda não estão totalmente esclarecidos. Adicionalmente, podendo-se considerar uma estequiometria de inclusão de 1:1 em solução quando se escolhe como hóspede uma molécula cujo tamanho se ajusta ao da cavidade da ciclodextrina, a mesma previsão não pode ser estendida ao estado cristalino, no qual não está garantida, à partida, uma simples estequiometria de 1:1.

Neste capítulo descreve-se um estudo dos processos de formação de um complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD o *p*-hidroxibenzaldeído (*p*-HB) [7], representados esquematicamente na figura 2.1.



**Figura 2.1.** Representação esquemática da  $\beta$ -ciclodextrina e do *p*-hidroxibenzaldeído, onde se mostra a numeração adoptada para os carbonos da  $\beta$ -CD e do *p*-HB; os oxigénios do *p*-HB estão igualmente numerados. O esquema da  $\beta$ -CD foi adaptado de S. Lima, B. Goodfellow, J. J. C. Teixeira-Dias, (artigo submetido)

Sendo bem conhecida a formação de um complexo entre a  $\beta$ -CD e o benzaldeído, optou-se por um derivado desta molécula. A presença do grupo hidroxilo, que geralmente confere ao hóspede características desfavoráveis para a inclusão [8], permite explorar um pouco mais as preferências de inclusão da  $\beta$ -CD.

Estudos preliminares realizados em solução demonstraram que a interacção entre a  $\beta$ -CD e o *p*-HB é estável, com uma estequiometria de 1:1 e uma constante de associação de

valor  $K_{app} = 3-4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ . Com base nestes resultados, partiu-se para a caracterização do sistema no estado cristalino.

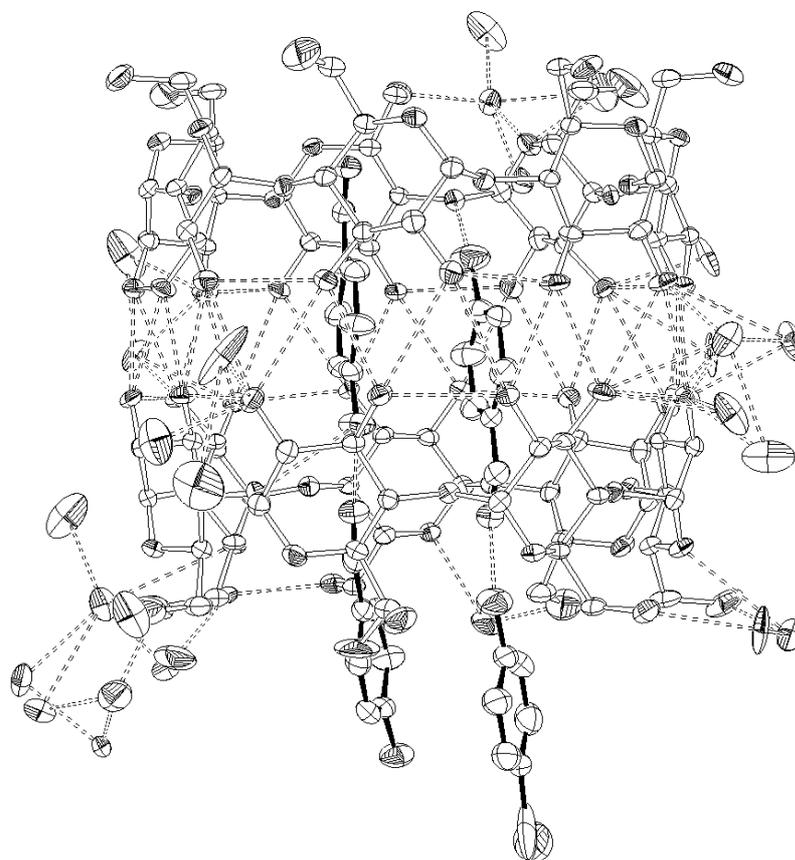
## 2.2. Os cristais de $\beta$ -CD e $p$ -HB

Para a obtenção do complexo  $\beta$ -CD- $p$ -HB na forma de cristais foram testados diferentes solventes, dos quais se elegeu a mistura de água (75%) e etanol (25%). Após dissolução de quantidades estequiométricas de ciclodextrina e do hóspede a 40°C, a solução foi arrefecida muito lentamente (ver detalhes na secção experimental). Decorridos alguns dias, foram obtidos cristais apropriados para análise por difracção de raios X.

A recolha dos dados cristalográficos e a resolução da estrutura foram feitas pelo Doutor Thammarat Aree com a colaboração de Kayo Imamura que realizava, nessa altura, o doutoramento sob a supervisão do Professor Wolfram Saenger.

### *Estrutura molecular do complexo de inclusão 2 $\beta$ -CD-4 $p$ -HB-9,45 $H_2O$*

O complexo cristaliza no sistema triclinico, grupo espacial P1, com os seguintes parâmetros de malha:  $a = 15,262(2) \text{ \AA}$ ;  $b = 15,728(1) \text{ \AA}$ ;  $c = 16,350(1) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 92,67(1)^\circ$ ;  $\beta = 96,97(1)^\circ$ ;  $\gamma = 103,31(1)^\circ$ ;  $V = 3780,1(7) \text{ \AA}^3$  (detalhes na secção experimental). Cada unidade assimétrica contém duas moléculas de  $\beta$ -CD, quatro de  $p$ -HB, e 9,45 de água (figura 2.2).

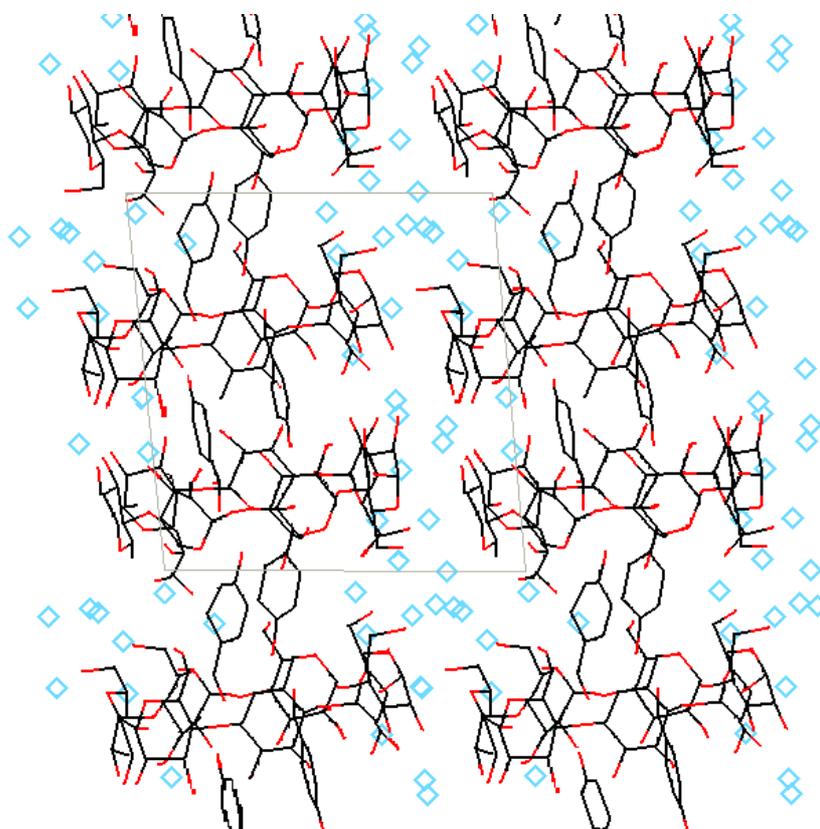


**Figura 2.2.** Representação ORTEP III [9] do complexo 2 $\beta$ -CD-4 $p$ -HB-9,45 $H_2O$  segundo o modelo das elipsóides térmicas (30%). As elipsóides com e sem octantes sombreados são  $C_{CD}$  e  $O_{CD}$ ,  $O_{\text{água}}$ , respectivamente. As ligações da  $\beta$ -CD são representadas a branco e as do  $p$ -HB a preto. As linhas tracejadas indicam possíveis pontes de hidrogénio O-H...O.

As duas moléculas de  $\beta$ -CD têm estrutura e conformação semelhantes e podem praticamente ser sobrepostas. As unidades de glicose apresentam uma conformação em cadeira regular  ${}^4C_1$ . As conformações “cíclicas” dos macrociclos da  $\beta$ -CD são estabilizadas por pontes de hidrogénio intramoleculares sistemáticas entre as várias moléculas de glicose a nível dos átomos  $O3(n)\cdots O2(n+1)$ , com distâncias  $O\cdots O$  dentro do intervalo 2,76–2,87 Å. A rigidez desta estrutura é reforçada pela quase inexistência de movimento a nível dos ângulos de torção do átomo O4 da ligação glicosídica, o que é evidenciado pela pequeno intervalo de dispersão de valores para os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  ( $10,6^\circ$  e  $13,9^\circ$ , respectivamente). NOTA: sobre a variação destes valores com a hidratação da  $\beta$ -CD isolada, ver L. Cunha-Silva *et al* [10].

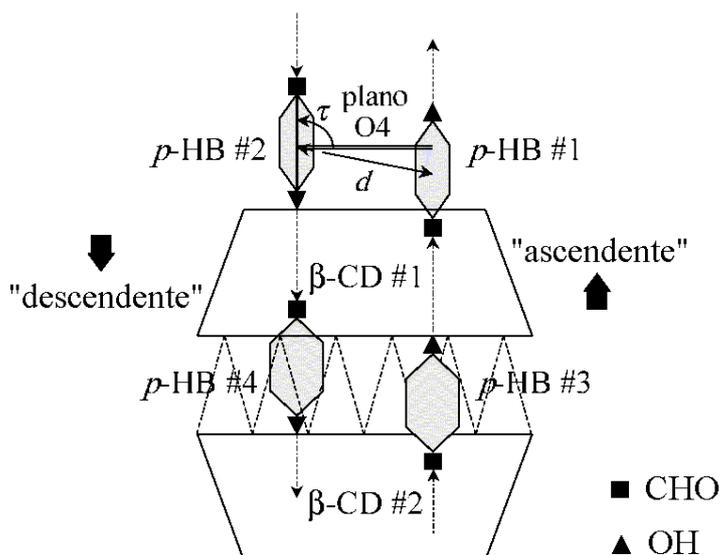
A orientação dos grupos hidroxilo O6–H, definida pelos ângulos de torção  $C4-C5\psi-C6-O6$  e  $O5-C5\psi-C6-O6$ , apresenta todos os grupos O6–H direccionados para o exterior da cavidade da  $\beta$ -CD, na conformação (–)*gauche*. A única excepção é o O61\_1–H que apresenta desordem, ocupando alternadamente duas posições, A (+)*gauche* e B (–)*gauche*.

Nesta estrutura, as moléculas de  $\beta$ -CD agrupam-se pelas orlas mais largas formando dímeros em forma de barril. Na orla mais estreita (a “cauda”) os hidroxilos primários participam em pontes de hidrogénio que os ligam aos dímeros adjacentes e a algumas águas para formar canais (figura 2.3.).



**Figura 2.3.** Esquema do complexo  $2\beta\text{-CD}\cdot 4p\text{-HB}\cdot 9,45\text{H}_2\text{O}$  evidenciando o alinhamento das ciclodextrinas em canais ligeiramente inclinados, em cujo interior se alojam as moléculas de *p*-HB. Os átomos de oxigénio são destacados a vermelho e as posições das moléculas de água são representadas por losangos.

As moléculas de *p*-HB formam igualmente dímeros, havendo dois pares por cada célula unitária. O par de *p*-HB #1 e #2 localiza-se na região interdimerica (entre dois barris de  $\beta$ -CD). O dímero de *p*-HB #3 e #4 situa-se na área interior do barril. Os eixos das moléculas de *p*-HB são praticamente paralelos aos das  $\beta$ -CDs (figura 2.4.), havendo apenas pequenos desvios do ângulo de 90° formado entre o eixo molecular do *p*-HB e o plano formado pelos O4 glicosídicos ( $\tau$ ).



**Figura 2.4.** Esquema da geometria de inclusão do hospede *p*-HB no interior das cavidades de  $\beta$ -CD. As quatro moléculas de *p*-HB são representados por hexágonos com os seus grupos OH (triângulos) dirigidos para cima em *p*-HB #1 e #3 e para baixo em *p*-HB #2 e #4 (ver direcções das setas). Os quadrados representam os grupos CHO.  $d$  corresponde à distância entre os centros de dois anéis aromáticos adjacentes, ou seja, entre *p*-HB #1 e #2 ou entre o #3 e o #4. O ângulo  $\tau$  mostra a inclinação entre o eixo das moléculas de *p*-HB e o plano glicosídico O4. As linhas a tracejado indicam pontes de H, assinalando-se com setas as que ocorrem entre moléculas de *p*-HB e a zigue-zague as que ligam grupos OH secundários da  $\beta$ -CD e estabilizam o dímero.

Em cada dímero de *p*-HB os hidroxilos têm alinhamento antiparalelo, estando o #1 e o #3 orientados no sentido ascendente e o #2 e o #4 no descendente. Cada dímero mantém pontes de hidrogénio com os que estão acima e abaixo dele, tal como foi observado na estrutura cristalina do *p*-HB [11]. Os seus grupos OH e CHO formam pontes O–H...O inter-moleculares (distâncias O...O na ordem dos 2,65–2,70 Å) originando cadeias antiparalelas infinitas:

cadeia 1, OH “para cima”:  $\rightarrow$  O1P#3–H...O2P#1, O1P#1–H...O2P#3( $x, y, z + 1$ ), ...  $\rightarrow$

cadeia 2, OH “para baixo”:  $\leftarrow$  O1P#2–H...O2P#4, O1P#4–H...O2P#2( $x, y, z - 1$ ), ...  $\leftarrow$

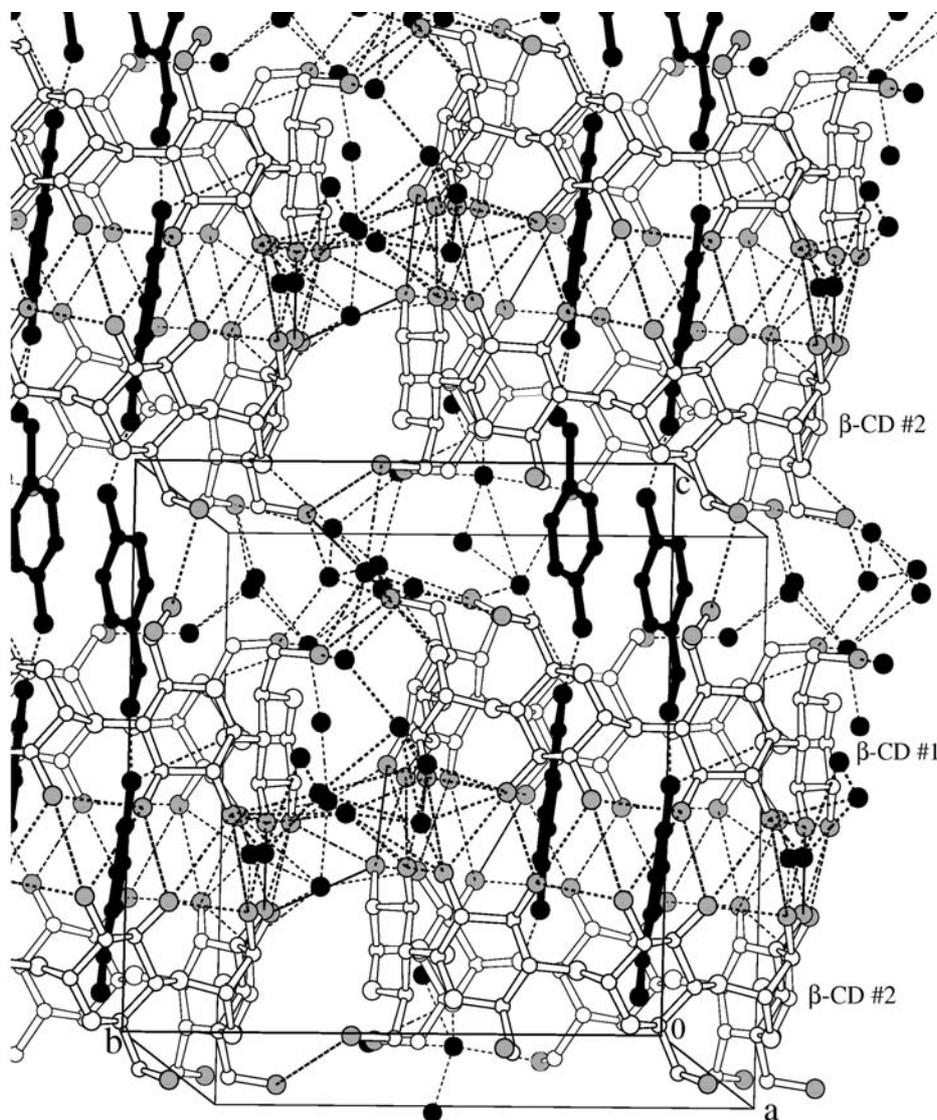
Os anéis aromáticos de *p*-HB distam um do outro pouco mais de 3,5 Å ( $d = 3,66$  Å para o dímero *p*-HB #1, 2 e  $d = 3,78$  Å para *p*-HB #3, 4). Tal proximidade mostra que os dímeros são estabilizados por interacções  $\pi$ - $\pi$  tal como foi observado na estrutura cristalina do *p*-HB [11]. A posição das moléculas de *p*-HB no centro do canal é mantida apenas por

algumas interações de hidrogénio entre o grupo hidroxilo do *p*-HB e alguns oxigénios da ligação glicosídica do  $\beta$ -CD.

As 9,45 moléculas de água encontram-se distribuídas por 25 posições nos espaços entre as moléculas de  $\beta$ -CD. Apresentam-se, pois, altamente desordenadas (com uma ocupação média de 0,38) e estão ligadas entre si e aos hidroxilos da  $\beta$ -CD por pontes de hidrogénio.

### ***Empacotamento do complexo na rede cristalina***

As moléculas de  $\beta$ -CD encontram-se empilhadas ao longo do eixo cristalográfico *c*, em posições alternadamente cabeça-cabeça e cauda-cauda, formando um canal [12], estrutura muito frequente nos complexos de  $\beta$ -CD (figura 2.5).



**Figura 2.5.** Representação MOLSCRIPT [13] do empacotamento em canal do complexo  $2\beta\text{-CD}\cdot 4p\text{-HB}\cdot 9,45\text{H}_2\text{O}$ , estabilizado por pontes de hidrogénio  $\text{O}2(m)_1/\text{O}3(m)_1\cdots\text{O}2(n)_2/\text{O}3(n)_2$  (cauda-cauda) e  $\text{O}6(m)_1\cdots\text{O}_w\cdots(n)_1$  (cabeça-cabeça), representadas a tracejado, entre as  $\beta$ -CDs #1 e #2. Os  $\text{O}2_{\text{CD}}$ ,  $\text{O}3_{\text{CD}}$ ,  $\text{O}6_{\text{CD}}$  e  $\text{O}_{\text{água}}$  são representados por esferas cinzentas e pretas, respectivamente. As moléculas de *p*-HB são pretas. Os hidrogénios foram omitidos para tornar o desenho mais ligeiro.

Os planos glicosídicos O4 das  $\beta$ -CD #1 e #2 são quase paralelos, fazendo entre si um ângulo de  $0,8^\circ$ , e estão ligeiramente inclinados relativamente ao plano  $ab$ .

Cada canal é estabilizado por pontes de hidrogénio intermoleculares. Na orla mais larga da  $\beta$ -CD ocorrem entre hidroxilos secundários. Na orla mais estreita, as pontes de hidrogénio não são formadas directamente entre os grupos O6-H de duas CDs adjacentes, envolvendo uma ou duas moléculas de água, com a excepção da ponte O61A\_1...O67\_2( $x, y, z + 1$ ). Adicionalmente, existe uma rede de pontes de H O<sub>CD</sub>...O<sub>CD</sub>, O<sub>CD</sub>...O<sub>w</sub>...O<sub>CD</sub>, O<sub>CD</sub>...O<sub>w</sub>...O<sub>w</sub>...O<sub>CD</sub> entre colunas vizinhas de  $\beta$ -CD que contribui para estabilizar toda a estrutura cristalina.

### 2.3. Caracterização do complexo no estado sólido

Por vezes, os complexos de inclusão podem não cristalizar de forma homogénea, co-existindo no material cristais com diferentes proporções hóspede-hospedeiro ou mesmo diferentes estruturas. Torna-se, pois, importante conduzir uma caracterização em estado sólido recorrendo a espectroscopias como a RMN de  $^{13}\text{C}$  e EIV e análise termogravimétrica. Investiga-se depois a complementaridade dos resultados de modo a garantir que a estrutura determinada por difracção de raios X é representativa do material como um todo.

#### *Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$*

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo  $2\beta$ -CD-4*p*-HB apresenta alterações notáveis nas ressonâncias da ciclodextrina e do hóspede quando comparados com as dos compostos puros ( ver figura 2.6. na página seguinte).

O espectro da  $\beta$ -CD ostenta ressonâncias múltiplas para cada tipo de átomo de carbono. Para os carbonos C1 e C4 esta facto tem sido relacionado com a grande dispersão de valores dos ângulos de torsão em torno da ligação  $\alpha_{(1\rightarrow4)}$  (variações de  $17^\circ$  para  $\phi$  e de  $25^\circ$  para  $\psi$ ) [14] e para os restantes carbonos com a orientação dos grupos hidroxilo [15]. Os sinais são atribuídos a C1 (101–104 ppm), C4 (78–84 ppm), C2,3,5 (71–76 ppm) e C6 (57–65 ppm). No espectro do complexo há uma redução na multiplicidade dos sinais da  $\beta$ -CD que se apresentam mais largos e com pouca ou nenhuma estrutura como resultado da redução do movimento em torno dos ângulos de torção, conforme foi observado na estrutura cristalina. Este fenómeno é comum em complexos de inclusão com ciclodextrinas. A inclusão de um hóspede com grupos aromáticos tem sido associada a um aumento da simetria da  $\beta$ -CD [16] que também contribui para a redução de multiplicidade dos seus sinais de RMN.

Enquanto no espectro do *p*-HB se observam singuletos (com Caldeídico a 195 ppm, C1P a 165 ppm, C4P a 138 ppm, C2P, 6P a 127 ppm e C3P, 5P a 116 ppm) no espectro do complexo de inclusão a região onde se encontram as ressonâncias do hóspede exhibe multipletos. Este fenómeno é o resultado de ambientes distintos em torno das moléculas de *p*-HB encapsuladas. Com efeito, são observados até quatro sinais para cada átomo de

carbono, o que se correlaciona perfeitamente com as quatro diferentes posições das moléculas de *p*-HB no cristal. Recorde-se que cada unidade assimétrica apresenta dois pares de *p*-HB com os anéis aromáticos em alinhamento anti-paralelo.

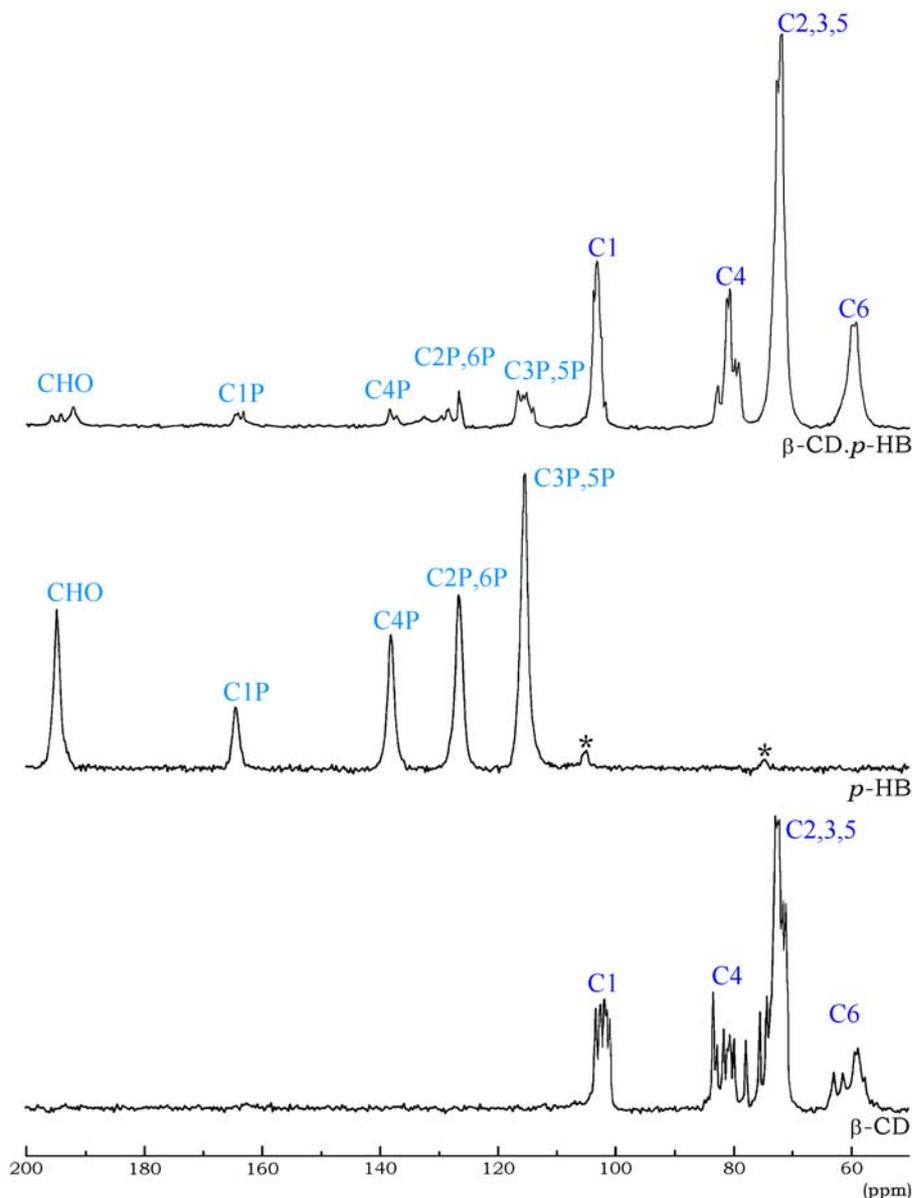


Figura 2.6. Espectros de RMN CP-MAS de <sup>13</sup>C da β-CD, do *p*-HB e do complexo 2β-CD·4*p*-HB

### *Espectroscopia Vibracional*

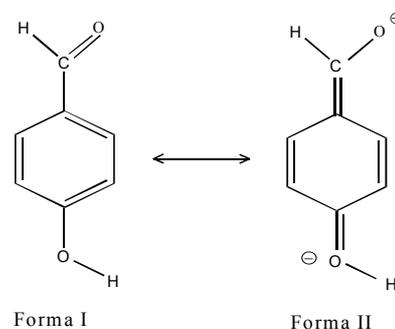
A molécula hóspede estudada neste capítulo apresenta uma característica estrutural com grande interesse na caracterização vibracional da sua inclusão ou de outras possíveis interações com a β-CD, a ligação C=O. A frequência vibracional da elongação do carbonilo é sensível a alterações na polaridade do meio envolvente, como aquelas que resultam da inclusão na cavidade hidrófoba da ciclodextrina [17].

O espectro de  $2\beta\text{-CD}\cdot 4p\text{-HB}$  foi comparado com o do  $p\text{-HB}$  e com o da mistura física 1:1 (mix) de  $p\text{-HB}$  e  $\beta\text{-CD}$ . A tabela 2.1. mostra os valores obtidos para as vibrações mais importantes (elongação das ligações C=O e C-OH). Repare-se no aumento de cerca de  $20\text{ cm}^{-1}$  da frequência da elongação C=O quando o  $p\text{-HB}$  está complexado com a  $\beta\text{-CD}$ . Esta alteração resulta da presença de um ambiente menos polar em torno do grupo carbonilo, podendo ser relacionada com o ambiente hidrofóbico da cavidade da ciclodextrina.

	<i>Hóspede</i>		<i>Mistura física</i>		<i>Complexo</i>	
	<i>IV</i>	<i>Raman</i>	<i>IV</i>	<i>Raman</i>	<i>IV</i>	<i>Raman</i>
<i>Elongação C-OH</i>	1218	—	1217	—	1214	—
<i>Elongação C=O</i>	1667	1646	1666	—	1687	1663

**Tabela 2.1.** Frequências vibracionais ( $\text{cm}^{-1}$ ) seleccionadas para o  $p\text{-HB}$ ,  $4p\text{-HB}\cdot 2\beta\text{-CD}$  e a mistura física 2:1

A influência de um ambiente menos polar traduz-se no aumento da contribuição relativa da forma canónica I (ver figura 2.7). Adicionalmente, o desvio negativo ( $-4\text{ cm}^{-1}$ ) na frequência da elongação C-OH do  $p\text{-HB}$  incluído na  $\beta\text{-CD}$  também pode ser explicado por um carácter de ligação simples mais acentuado, resultante da maior percentagem relativa da forma I. Este resultado é particularmente interessante. De facto, a estrutura cristalina mostra duas moléculas de  $p\text{-HB}$  posicionadas na região interdimérica e outras duas na zona central do dímero. Mesmo assim, elas sentem o ambiente hidrófobo da cavidade hospedeira. Então, ao longo de cada canal existe um ambiente predominantemente hidrófobo, como consequência da quase inexistência de moléculas de água no interior do canal [18].



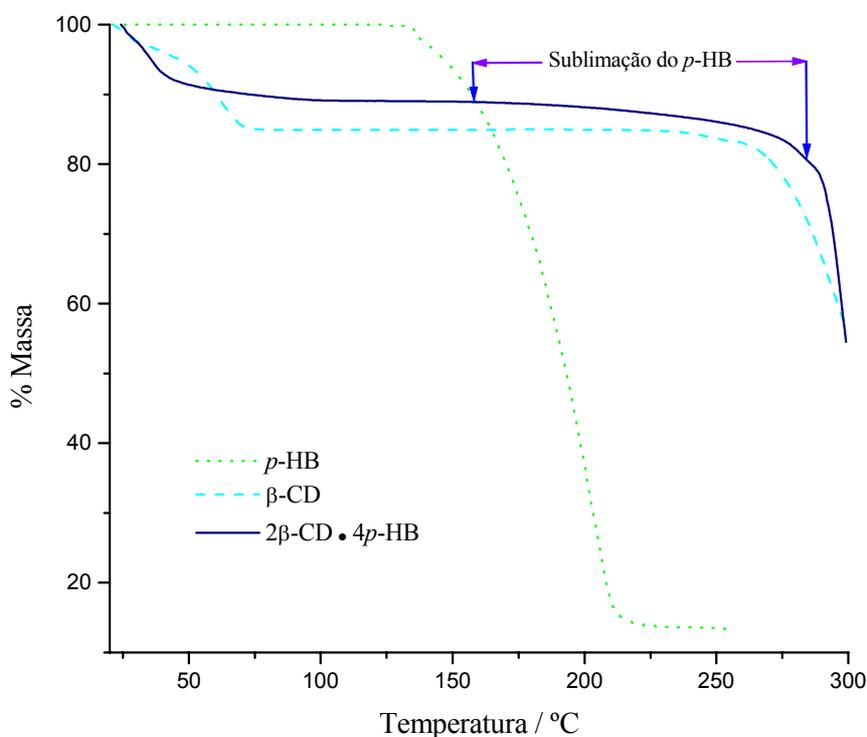
**Figura 2.7.** Formas canónicas relevantes para o  $p\text{-HB}$

### **Termogravimetria**

O termograma de  $2\beta\text{-CD}\cdot 4p\text{-HB}$  apresenta uma série de características notáveis quando comparado com os da  $\beta\text{-CD}$  e do hóspede puro, todos representados na figura 2.8.

A primeira alteração na massa do complexo de inclusão corresponde à perda de água, que ocorre a uma temperatura semelhante à registada com a  $\beta\text{-CD}$ , mas em quantidade inferior. Este fenómeno é comum a todos os complexos de CDs, uma vez que a inclusão corresponde à substituição de algumas moléculas de água de hidratação pela molécula hóspede. A partir dos  $150^\circ\text{C}$  e até aos  $280^\circ\text{C}$ , há uma perda muito gradual de massa na ordem dos 9% (as setas na figura 2.8. mostram o intervalo aproximado desta decomposição) que foi atribuída à sublimação do  $p\text{-HB}$ . Repare-se que este processo é

muito mais abrupto e está terminado a temperaturas muito inferiores no *p*-HB puro. Tal diferença de comportamento termogravimétrico sugere a presença de uma interacção muito forte entre o *p*-HB e a rede do complexo em que está inserido.



**Figura 2.8.** Termogramas de  $\beta$ -CD, *p*-HB e  $2\beta$ -CD·4*p*-HB.

## 2.4. Conclusões

A  $\beta$ -CD foi co-cristalizada com o *p*-HB para obter o complexo  $2\beta$ -CD·4*p*-HB. A sua estrutura apresenta canais infinitos formados por dímeros de ciclodextrinas empilhados uns sobre os outros. As moléculas hóspedes distribuem-se ao longo dos canais. Não existem, pois, cavidades individuais de ciclodextrinas, mas antes cavidades tubulares ao longo das quais se faz sentir o ambiente apolar gerado pelos prótons H3 e H5 das  $\beta$ -CDs. No interior de cada canal, as moléculas de *p*-HB formam dímeros que se organizam em duas cadeias antiparalelas e infinitas pela formação de ligações de hidrogénio. O hóspede serve de molde às ciclodextrinas. Para o poderem acomodar no seu interior, são obrigadas a formar canais. A sublimação do hóspede a partir desta estrutura é lenta e requer elevadas temperaturas, confirmando a estabilidade das interacções entre os elementos que a constituem.

## Referências

1. K. Harata, K. Uekama, M. Otagiri, F. Hirayama, H. Ogino, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **54**, 1954-1959 (1981).
2. H.-S. Choi, A. M. Knevel, C. J. Chang, *Pharmaceut. Res.* **9**, 690-693 (1992).
3. S. Takeuchi, M. Kochi, K. Sakaguchi, K. Nakagawa, T. Mizutani, *Agricult. Biol. Chem.* **42**, 1449-1451 (1978).
4. M. Kochi, S. Takeuchi, T. Mizutani, K. Mochizuki, Y. Matsumoto, Y. Saito, *Cancer Treatment Reports* **64**, 21-23 (1980).
5. (a) S. Divakar, *J. Agricult. Food Chem.* **38**, 940-944 (1990); (b) S. Divakar, M. M. Maheswaran. *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.* **27**, 113-126 (1997).
6. M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **98**, 1875 (1998) e referências aqui citadas.
7. S. S. Braga, T. Aree, K. Imamura, P. Vertut, I. Boal-Palheiros, W. Saenger, J. J. C. Teixeira-Dias, *J. Incl. Phen.* **43**, 115-125 (2002).
8. L. Szente, em: Atwood, J. E. D Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, J.-M. Lehn, J. Szejtli, T. Osa (Eds.), *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol **3**, 243-252, Pergamon, Oxford (1996).
9. M. N. Burnett, C. K. Johnson: ORTEPIII, Thermal-Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations, Oak Ridge Natl. Lab., USA (1996).
10. L. Cunha-Silva, J. J. C. Teixeira-Dias, *J. Phys. Chem. B* **106**, 3323-3328 (2002).
11. F. Iwasaki, *Acta Crystallogr.* **B33**, 1646 (1977).
12. P. J. Kraulis: *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946 (1991).
13. W. Saenger, *Isr. J. Chem.* **25**, 43 (1985).
14. (a) M. J. Gidley, S. M. Bociek, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3820-3829 (1988); (b) S. J. Heyes, N. J. Clayden, C. M. Dobson, *Carbohydr. Res.*, **233**, 1-14 (1992).
15. R. P. Veregin, C. A. Fyfe, R. H. Marcessault, M. G. Tayler, *Carbohydr. Res.*, **160**, 41 (1987).
16. J. Li, A. Harada, M. Kamachi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 2808 (1994).
17. A. Moreira da Silva, A. Amado, P. Ribeiro-Claro, J. Empis, J. J. C. Teixeira-Dias, *J. Carb. Chem.* **14**, 677-684 (1995).
18. S. Makedonopoulou, I. M. Mavridis, *Acta Cryst.* **B56**, 322-331 (2000).

# Capítulo 3

## Capítulo 3

**2 $\beta$ -CD·Ibu,  
uma estequiometria inesperada**

Complexos de  $\beta$ -CD com cada um dos enantiómeros do ibuprofeno foram cristalizados. Com o S-Ibu foram obtidos cristais adequados para estudo por cristalografia, mas não com o R-Ibu. A difracção de raios X do primeiro revelou uma estrutura com estequiometria diferente da esperada. Complexos de  $\beta$ -CD com compostos semelhantes apresentam cristais com um dímero de ciclodextrinas por célula unitária e duas moléculas de hóspede no interior de cada dímero. A presente estrutura é composta por dímeros de ciclodextrina com apenas uma molécula de S-Ibu no interior. Fez-se ainda um estudo comparativo dos complexos  $2\beta$ -CD·S-Ibu e  $2\beta$ -CD·R-Ibu por várias técnicas de estado sólido. Os resultados de RMN CP-MAS de  $^{13}\text{C}$  mostram haver diferenças no comportamento da  $\beta$ -CD face aos dois enantiómeros. A sua cavidade tem quiralidade R pelo que apresenta maior afinidade para o S-Ibu, sendo mais fraca a interacção com o R-Ibu.

### 3. $\beta$ -CD·Ibu, uma estequiometria inesperada

3.1. Introdução	45
3.2. Os cristais de $\beta$ -CD e Ibu	46
Estrutura molecular do complexo de inclusão $2\beta$ -CD·S-Ibu·12,5H <sub>2</sub> O	46
Empacotamento do complexo na rede cristalina	49
3.3. Caracterização dos complexos no estado sólido	
Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$	50
Espectroscopia vibracional	51
Termogravimetria	52
3.4. Conclusões	53
Referências	54

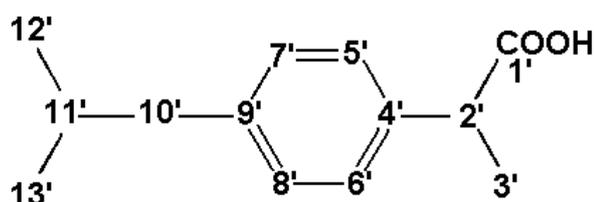
### 3.1. Introdução

O ibuprofeno (ácido 2-(*p*-isobutilfenil)propanóico, Ibu) é um medicamento com actividade analgésica, usado no tratamento da artrite reumatóide e de outras doenças inflamatórias. Recentemente, a descoberta de novas propriedades terapêuticas suscitou um interesse renovado por este composto. Foi demonstrado *in vitro* que o ibuprofeno protege os neurónios contra a toxicidade do glutamato [1] implicada na doença de Alzheimer, nos estados Parkinsonianos e noutras doenças neurodegenerativas, pelo que pode tornar-se num prometedora agente protector contra estas maleitas. Outra série de estudos debruçou-se sobre a sua potencial actividade anti-fúngica. O ibuprofeno apresentou actividade contra dermatófitos [2] (fungos responsáveis por infecções da pele) e contra várias espécies de *Candida*, leveduras que infectam as mucosas [3]. Em ambas as situações, poderá tornar-se o medicamento ideal para o tratamento tópico de infecções fúngicas combinando as vantagens da sua actividade anti-inflamatória clássica com a recém descoberta actividade anti-fúngica.

Para além da sua importante actividade farmacológica, o ibuprofeno apresenta um efeito secundário indesejável sobre a mucosa gástrica. Adicionalmente, ela pode sofrer lesão directa por contacto com esta molécula. Como ácido fraco, o ibuprofeno apresenta-se na forma não-iónica a pH gástrico e passa facilmente através da membrana lipófila das células da mucosa gástrica. No compartimento intracelular o pH é mais elevado e fá-lo passar à forma iónica, com baixa taxa de difusão membranar. O resultado deste processo é a sua acumulação no interior das células.

A inclusão do ibuprofeno na  $\beta$ -CD permite reduzir a toxicidade inerente à sua acidez e aumentar a sua solubilidade em água. São conhecidas várias aplicações desta associação, tais como soluções para administração oral [4], comprimidos ou cápsulas [5]. Recentemente, mostrou-se que a  $\beta$ -CD aumenta a estabilidade do ibuprofeno [6]. Dado o elevado interesse destes complexos, foram estudados outros sistemas contendo anti-inflamatórios. Destaca-se a inclusão em  $\beta$ -CD do flurbiprofeno [7] e do fenoprofeno [8] e sua caracterização em estado sólido da segundo uma série de técnicas, com destaque para a cristalografia de raios X.

No presente capítulo descreve-se a inclusão do ibuprofeno [9], representado esquematicamente na figura 3.1. Note-se que esta molécula apresenta um centro estereogénico em C2, pelo que existem dois enantiómeros, o R(-) e o S-(+)-ibuprofeno. Procurando tirar partido da capacidade de



**Figura 3.1.** Representação esquemática do ibuprofeno, mostrando a numeração adoptada para os átomos de carbono.

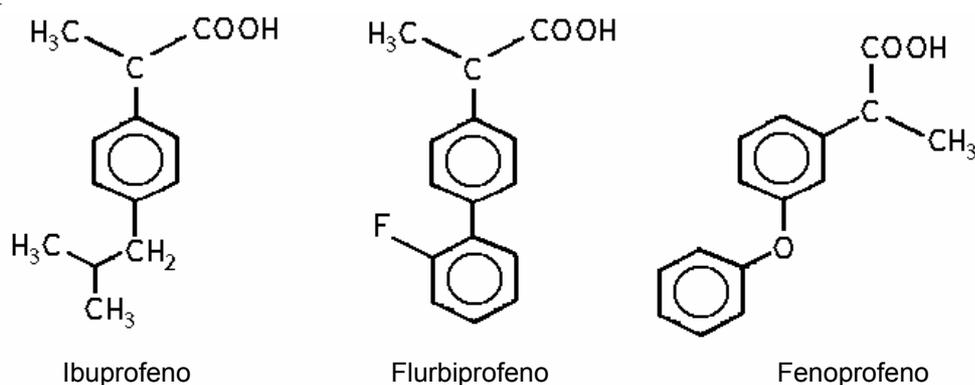
discriminação quiral da  $\beta$ -CD, foram preparados complexos com cada um dos enantiómeros, de modo a comparar os resultados obtidos.

### 3.2. Os cristais de $\beta$ -CD e Ibu

Para a obtenção dos complexos de  $\beta$ -CD com S-Ibu e R-Ibu na forma de cristais, foram preparadas duas soluções aquosas da ciclodextrina a 80 °C. A cada juntou-se um dos enantiómeros em quantidade estequiométrica. As soluções foram arrefecidas lentamente, tendo-se obtido cristais após alguns dias. Lamentavelmente, apenas os cristais de  $\beta$ -CD com S-Ibu se revelaram apropriados para análise por difracção de raios X. A recolha dos dados cristalográficos e a resolução da estrutura foram realizadas pelo Doutor Eberhardt Herdtweck.

#### *Estrutura molecular do complexo de inclusão $2\beta$ -CD·S-Ibu·25H<sub>2</sub>O*

O complexo cristaliza no sistema monoclinico, grupo espacial C2, com os seguintes parâmetros de malha:  $a = 19,4095(4) \text{ \AA}$ ;  $b = 24,4145(5) \text{ \AA}$ ;  $c = 15,8976(2) \text{ \AA}$ ;  $\beta = 109,026(1)^\circ$ ;  $V = 7121,9(2) \text{ \AA}^3$ , ver mais detalhes na secção experimental. Cada unidade assimétrica é constituída por duas moléculas de  $\beta$ -CD, uma de S-Ibu e 25 de água. Esta estequiometria é bastante inesperada, pois não tem paralelo com mais nenhum complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD e compostos anti-inflamatórios derivados do ácido arilpropiónico. Considerem-se dois destes compostos, de dimensões semelhantes ao Ibu, representados na figura 3.2. O flurbiprofeno [7] e o fenoprofeno [8] formam complexos com a  $\beta$ -CD de estequiometria 2:2. Cada unidade assimétrica dos cristais destes complexos contém um dímero de  $\beta$ -CD e dois hóspedes no interior.

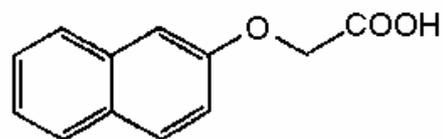


**Figura 3.2.** Representação esquemática de três anti-inflamatórios derivados do ácido arilpropiónico

São ainda conhecidas outras estruturas de complexos de inclusão entre a  $\beta$ -CD e compostos anti-inflamatórios, como o sal de sódio do diclofenac (2[(2,6-diclorofenil)-amino]-benzoacetato de sódio) e o piroxicam. Ambos têm estequiometria 1:1 mas a estrutura cristalina é diferente. No cristal do complexo  $\beta$ -CD diclofenac sódico, de simetria hexagonal, as moléculas hospedeiras estão empilhadas cabeça com cauda formando canais helicoidais com seis moléculas de  $\beta$ -CD por unidade assimétrica [10]. No

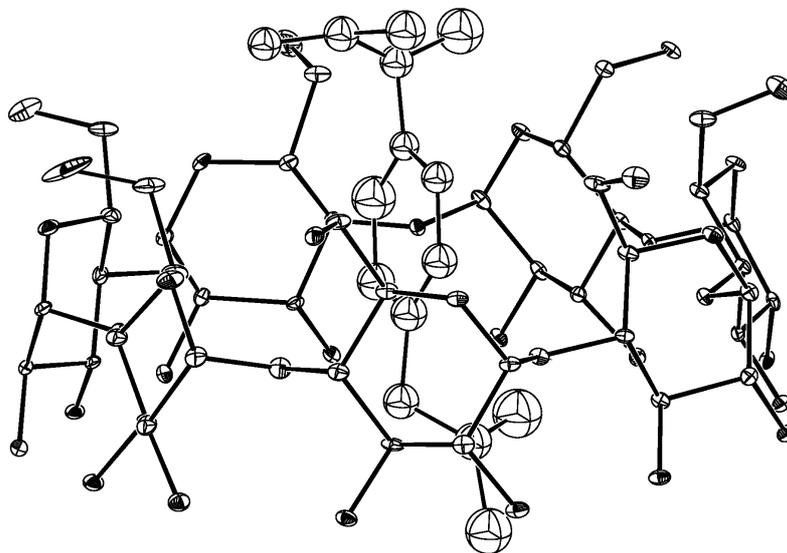
crystal de  $\beta$ -CD piroxicam sódico, as ciclodextrinas também se alinham cabeça com cauda, mas estão ligadas entre si pela molécula de hóspede, formando um canal inclinado na diagonal [11].

Foi encontrado um paralelo para a estrutura de  $2\beta$ -CD S-Ibu num estudo efectuado por Kokkinou *et al.* com cristais de  $\beta$ -CD e ácido naftiloxiacético [12] (ver esquema na figura 3.3). A estequiometria 2:1 deste sistema revelou-se como uma surpresa para os autores do estudo, uma vez



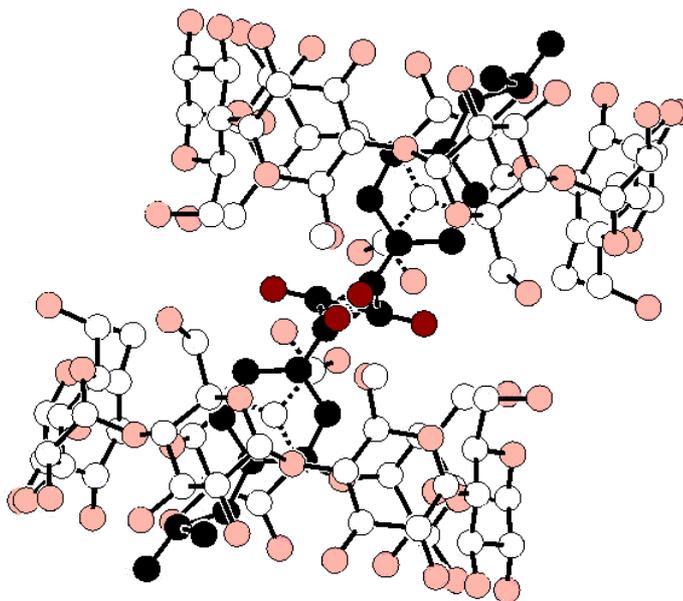
**Figura 3.3.** Representação esquemática do ácido naftiloxiacético.

que a dimensão e a estrutura do hóspede se adequam a uma estequiometria de 2:2, tal como o Ibu. Pela semelhança apresentada, a estrutura determinada por Kokkinou foi usada como solução inicial para resolver a de  $2\beta$ -CD S-Ibu. De facto, as conformações dos macrociclos da  $\beta$ -CD são isomórficas. A única diferença reside na orientação dos hidroxilos primários que geralmente estão virados para o exterior da  $\beta$ -CD. Na estrutura de  $2\beta$ -CD S-Ibu, estes também estão virados para o exterior (ver figura 3.4) com excepção dum grupo hidroxilo que apresenta desordem em duas posições, O20(A) e O20(B). A parte menos significativa deste hidroxilo desordenado, O20(B), está virada para dentro (em direcção ao centro da cavidade) com o ângulo de torção O5-C5-C6-O6 em conformação (+)*gauche*. A maior percentagem deste OH desordenado apresenta conformação(-)*gauche*, tal como os restantes.



**Figura 3.4.** Representação ORTEP do complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD e o S-Ibu. Apresenta-se apenas uma ciclodextrina do dímero. Pode observar-se a posição dos OH primários (topo da figura) virados para o exterior (não é apresentada a posição de menor percentagem do hidroxilo desordenado). Note-se como o hóspede apresenta o grupo propionilo orientado na direcção da orla inferior ou seja, do lado dos hidroxilos primários, e o grupo isobutilo na direcção da orla mais larga (hidroxilos secundários).

As ciclodextrinas agrupam-se em dímeros cabeça com cabeça. Cada  $\beta$ -CD do dímero relaciona-se com a outra  $\beta$ -CD através de um eixo binário de simetria que atravessa o centro do dímero, paralelo ao plano das orlas dos macrociclos. Na cavidade dimérica encontra-se encapsulada uma molécula de S-Ibu com um dos seus átomos localizado precisamente sobre outro eixo binário de simetria que atravessa a região intradimérica. Esta coincidência de posições causaria uma sobreposição mútua se as cavidades de ambas as ciclodextrinas em cada dímero estivessem ocupadas (figura 3.5). De facto, o refinamento da taxa de ocupação parou muito próximo do valor ideal de 0,5 pelo que foi restrito a este valor durante os refinamentos finais. Deste modo, o complexo de inclusão é composto por duas moléculas de  $\beta$ -CD e uma de ibuprofeno. O grupo carboxilo do S-ibuprofeno está orientado na direcção da orla mais estreita da  $\beta$ -CD. A sua posição é estabilizada por uma ponte de hidrogénio com um dos grupos hidroxilo primários do hospedeiro (O114...O20B, com uma distância de contacto de 2,76Å).



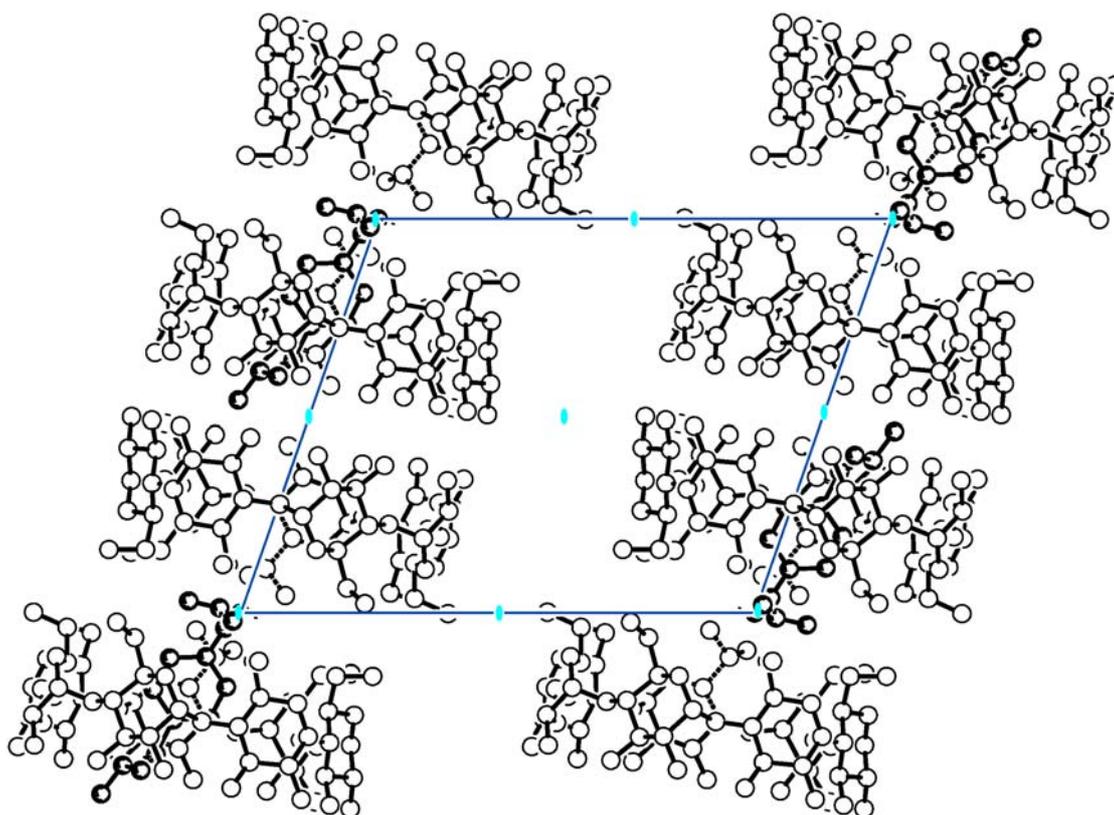
**Figura 3.5.** Esquema mostrando a região interdimérica do complexo de  $\beta$ -CD com S-Ibu supondo que ambas as ciclodextrinas (a branco) de cada dímero albergam uma molécula de S-Ibu (a negro). A tracejado destaca-se a unidade de glicose com um oxigénio primário desordenado, estando representadas as duas posições que ele ocupa. Pode ver-se que há uma sobreposição entre o átomo de carbono do grupo metilo ( $C_3$ ) com o mesmo átomo da molécula adjacente de S-Ibu. Deste modo, demonstra-se que não é possível a estequiometria de 2:2 por impedimento espacial.

Note-se que este modo de inclusão é o inverso do relatado para a inclusão do S-Ibu na ciclodextrina-beta permetilada [13]. Nesta estrutura, o grupo do ácido propiónico da molécula hóspede surge do lado da orla mais larga da ciclodextrina em vez de se direccionar face à orla mais estreita. É comum observar-se inversão do modo de inclusão de hóspedes orgânicos quando se comparam complexos tendo por hospedeiro a  $\beta$ -CD (nativa) ou a  $\beta$ -CD permetilada.

Em cada unidade assimétrica encontram-se ainda 25 moléculas de água. Os refinamentos efectuados sobre os locais de cada uma delas não revelaram ocupâncias parciais, ou seja, elas não apresentam desordem. A ausência de desordem das águas de cristalização deste sistema, em contraste com as de  $2\beta\text{-CD} \cdot 4p\text{-HB}$  (cap. 2), resulta provavelmente da temperatura de recolha dos dados cristalográficos. Neste caso usou-se baixa temperatura, enquanto que no cristal de  $2\beta\text{-CD} \cdot 4p\text{-HB}$  se trabalhou à temperatura ambiente.

### ***Empacotamento do complexo na rede cristalina***

Os dímeros de  $\beta\text{-CD}$  encontram-se empilhados cauda com cauda ao longo do eixo cristalográfico  $c$ , formando um canal ligeiramente inclinado (figura 3.6). Os dois anéis de  $\beta\text{-CD}$  de cada dímero estão unidos por pontes de hidrogénio entre os hidroxilos secundários e relacionam-se entre si por um eixo binário de simetria perpendicular ao eixo do canal. Os canais adjacentes estão unidos entre si por uma rede infinita de pontes de hidrogénio intermoleculares entre os hidroxilos e/ou as moléculas de água.



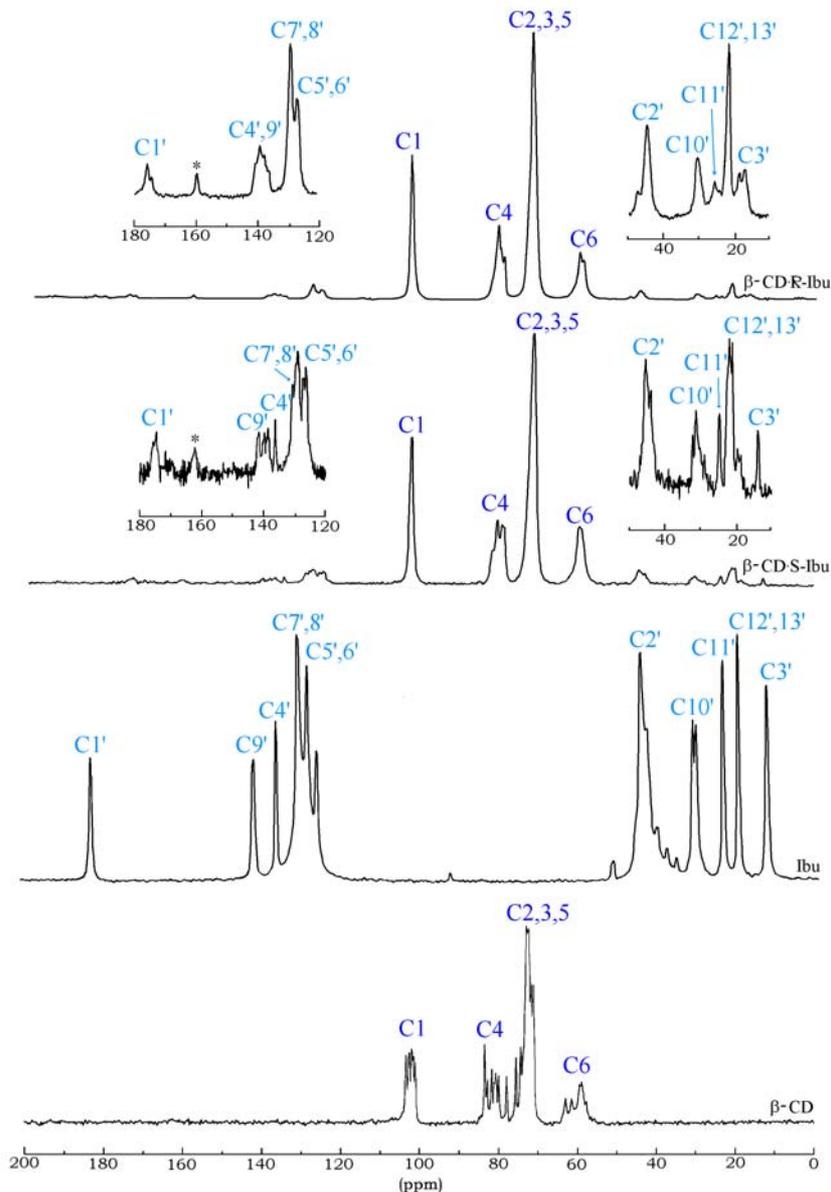
**Figura 3.6.** Representação PLATON do complexo de inclusão de S-Ibu na  $\beta\text{-CD}$ , visto através do eixo cristalográfico  $b$  (perpendicular ao plano do papel). Os átomos de hidrogénio foram omitidos para conferir maior clareza ao esquema. As ligações entre o C6 e o correspondente hidroxilo desordenado estão representadas a tracejado e mostram-se as duas posições ocupadas por este átomo de oxigénio. Os eixos binários de simetria, paralelos ao eixo  $b$ , têm posições definidas em cada um dos cantos da célula unitária, no meio de cada linha de fronteira da célula e no centro da célula; para facilitar a sua visualização, estão marcados com pequenas elipses.

No interior de cada dímero há uma molécula de S-Ibu. Ao longo dum canal (ou seja, ao longo do eixo cristalográfico *c*), estas moléculas estão todas orientadas na mesma direcção para impedir a sobreposição de um dos átomos com o correspondente da molécula vizinha. Não foi possível determinar se entre dois canais adjacentes a orientação dos hóspedes é feita em alinhamento paralelo (ou seja, com o mesmo sentido) ou em alinhamento anti-paralelo, conforme se representa na figura 3.6.

### 3.3. Caracterização dos complexos no estado sólido

#### *Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$*

Foram registados os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos cristais (pulverizados) de  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{S-Ibu}$  e de  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{R-Ibu}$  que notavelmente apresentam diferenças entre si (figura 3.7). Para comparação mostra-se também os de  $\beta\text{-CD}$  e de S- e R-Ibu. Estes mostraram-se idênticos, pelo que se apresenta apenas um, designado por Ibu.



**Figura 3.7.** Espectros de RMN CP-MAS de  $^{13}\text{C}$  de  $\beta\text{-CD}$ , Ibu,  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{S-Ibu}$  e  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{R-Ibu}$ .

Nos espectros de ambos os complexos de inclusão, as ressonâncias da  $\beta$ -CD surgem como sinais largos e com pouca ou nenhuma estrutura, em contraste com as ressonâncias múltiplas observadas para a  $\beta$ -CD pura. Foi já descrito que este padrão pode resultar duma estrutura cristalina em canal. A estrutura de  $2\beta$ -CD S-Ibu contribui para confirmar esta associação e permite supor que o empacotamento molecular em  $2\beta$ -CD R-Ibu será do mesmo tipo.

O espectro do Ibu apresenta um sinal para o carbonilo (182 ppm), um conjunto de cinco picos atribuído aos carbonos aromáticos (126 - 142 ppm), C10' a 45 ppm, C11' a 44 ppm, um duplete para C2' (31,5 e 32,4 ppm), C3' a 14 ppm e C12' e 13' a 21 e 25 ppm.

No espectro de  $2\beta$ -CD S-Ibu, o sinal atribuído ao carbono ácido do hóspede apresenta-se ligeiramente deslocado para campo mais alto (175 ppm) como resultado das diferentes pontes de hidrogénio formadas. A estrutura do ibuprofeno determinada por difracção de neutrões mostra a presença de dímeros ligados entre si por pontes de hidrogénio [14]. Quando está inserido na rede do complexo de inclusão, as interacções entre moléculas adjacentes de S-Ibu são substituídas por ligações de hidrogénio entre o seu grupo carbonilo e um hidroxilo primário da  $\beta$ -CD. Os restantes carbonos do S-Ibu incluído apresentam elevada multiplicidade. Por exemplo, observam-se oito sinais para os carbonos aromáticos enquanto que no espectro do ibuprofeno apenas se observam cinco. Esta particularidade resulta da restrição dos movimentos rotacionais do S-Ibu no interior da cavidade da  $\beta$ -CD, sugerindo uma estreita interacção hóspede-hospedeiro.

No espectro de  $2\beta$ -CD R-Ibu encontra-se um padrão de sinais do hóspede com aspecto geral muito semelhante ao do Ibu puro e portanto bastante distinto dos sinais registados para o complexo  $2\beta$ -CD S-Ibu. Isto pode ser interpretado como o resultado de um diferente comportamento da  $\beta$ -CD em face aos dois enantiómeros hóspedes. Na realidade, pode-se inferir que a encapsulação do R-Ibu na  $\beta$ -CD não é tão estreita como a do S-Ibu, permitindo-lhe ter alguma liberdade rotacional. A diferença encontrada parece reflectir a discriminação quiral apresentada pela cavidade da  $\beta$ -CD. Este hospedeiro tem quiralidade R(-) pelo que a sua afinidade será maior para o S-Ibu.

### ***Espectroscopia Vibracional***

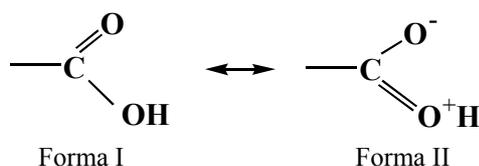
Os resultados de RMN e cristalografia apontam para alterações na rede de pontes de hidrogénio quando é feita a inclusão do ibuprofeno na  $\beta$ -CD. Os cristais do hóspede puro apresentam as moléculas agrupadas em dímeros com duas pontes de hidrogénio (formadas entre os grupos carboxílicos) que deixam de existir nos complexos de inclusão quer com R-Ibu, quer com o S-Ibu. Nestes sistemas cada molécula hóspede está afastada da sua vizinha e apenas é capaz de formar ligações de hidrogénio com a  $\beta$ -CD hospedeira. As diferentes interacções moleculares estabelecidas pelo grupo carboxilo resultaram em desvios no seu sinal de RMN e espera-se que também originem modificações na frequência de elongação do oscilador C=O.

Comparando os espectro de 2 $\beta$ -CD·S-Ibu e 2 $\beta$ -CD·R-Ibu com os de Ibu e da mistura física 2:1 (mix) de  $\beta$ -CD e Ibu, confirma-se um desvio para o azul de  $\nu$ C=O, ver tabela 3.1.

	<i>Hóspede</i>	<i>Mistura física</i>	<i>Complexo</i>	
			<i>2<math>\beta</math>-CD·S-Ibu</i>	<i>2<math>\beta</math>-CD·R-Ibu</i>
<i>Elongação C=O</i>	1707	1707	1735	1734

**Tabela 3.1.** Frequências vibracionais (cm<sup>-1</sup>) do  $\nu$ C=O em Ibu, 2 $\beta$ -CD·S-Ibu, 2 $\beta$ -CD·R-Ibu e a mistura física 2:1

O desvio da frequência da elongação C=O (27-28 cm<sup>-1</sup>), observado tanto em 2 $\beta$ -CD·S-Ibu como em 2 $\beta$ -CD·R-Ibu, pode ser associado a um aumento da contribuição relativa forma canónica I para a estrutura do S-Ibu incluído (ver figura 3.8).



**Figura 3.8.** Formas canónicas relevantes para o carbonilo

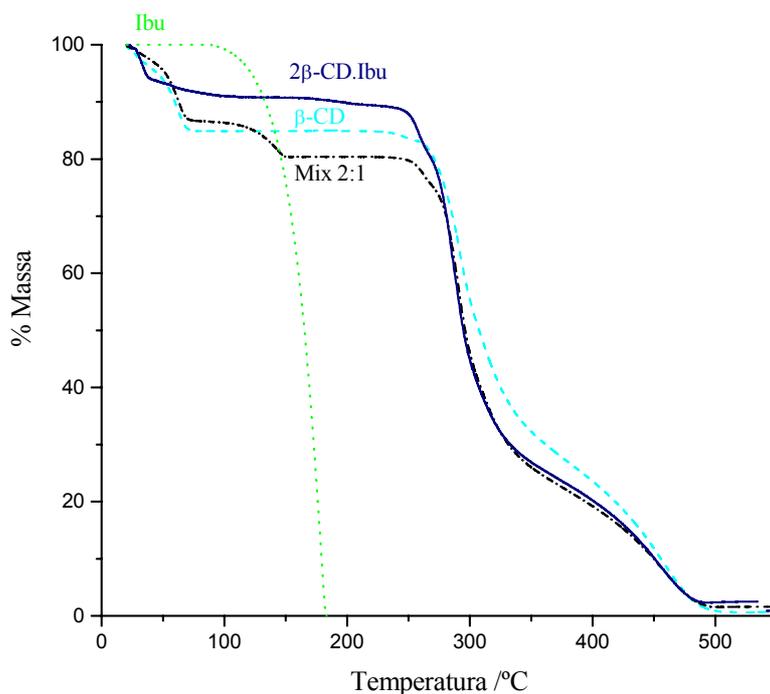
Uma vez que o oscilador C=O está inserido num grupo carboxilo, o seu grau de polarização interage com o estado de polarização da ligação C–O adjacente (ver também figura 3.8). O átomo de oxigénio do hidroxilo na forma I pode funcionar como aceitador duma ponte de hidrogénio (com um dos pares de electrões não ligantes) enquanto na forma II este será obrigatoriamente um dador para pontes de H. No hóspede puro, formam-se duas pontes de hidrogénio entre pares de moléculas com o hidroxilo a funcionar como grupo dador e o carbonilo como aceitador do hidrogénio da molécula vizinha. Estas interacções contribuem preferencialmente para a estabilização da forma canónica II. No complexo de inclusão desaparecem as pontes de hidrogénio entre moléculas adjacentes de ibuprofeno e passa a formar-se uma só ligação H com o grupo hidroxilo O20(B) como dador e o OH do hóspede como aceitador. Deste modo, a forma I passa a ser a mais estabilizada pela nova interacção H formada.

### **Termogravimetria**

Os complexos 2 $\beta$ -CD·S-Ibu e 2 $\beta$ -CD·R-Ibu apresentam um comportamento termogravimétrico semelhante, representado na figura 3.9. como 2 $\beta$ -CD·Ibu. Tal como sucedeu com o complexo descrito no capítulo 2, há uma perda de massa inicial correspondente à desidratação. Segue-se outra mais gradual, atribuída à sublimação do hóspede. Entre 60°C e 224°C a perda de massa é de 7%, valor que corresponde exactamente a uma molécula de ibuprofeno por cada dímero de  $\beta$ -CD. Deste modo, confirma-se a estequiometria observada na estrutura cristalina.

Duma forma semelhante ao que sucedeu com 2 $\beta$ -CD·4*p*-HB no cap. 2, note-se que a sublimação de Ibu no complexo decorre de forma mais lenta e a temperatura mais

elevada que no composto puro (ver figura 3.9), mostrando que ele está fortemente retido na rede do complexo em que está inserido.



**Figura 3.9.** Termogramas de  $\beta$ -CD, Ibu,  $2\beta$ -CD·Ibu e uma mistura física 2:1 de  $\beta$ -CD e Ibu

### 3.4. Conclusões

A  $\beta$ -CD forma complexos de inclusão com o R(-) e o S(+)-Ibu com estequiometria de 2:1. Este valor apresenta-se um tanto inesperado por estarem descritos outros complexos com estequiometria 2:2 formados entre a  $\beta$ -CD e hóspedes de tamanho e estrutura semelhantes ao Ibu. Mesmo assim, foi encontrada na bibliografia outro complexo de inclusão com as mesmas características, que serviu de modelo para resolver a estrutura de  $2\beta$ -CD-S-Ibu. Dímeros de ciclodextrinas alojam as moléculas de S-Ibu e empilham-se para formar canais infinitos. A estrutura é estabilizada por uma rede de pontes de hidrogénio envolvendo os hidroxilos da  $\beta$ -CD e várias moléculas de água. Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  permitiram estudar também a estrutura de  $2\beta$ -CD-R-Ibu e sugerem que a  $\beta$ -CD se empacota de igual forma quer a molécula incluída seja o S-Ibu ou o R-Ibu, embora existam diferenças na interacção hóspede-hospedeiro. A encapsulação do enantiómero S é mais estreita e na do enantiómero R há maior liberdade. Esta diferença reflecte a discriminação quiral da  $\beta$ -CD, com maior afinidade para o S-Ibu.

## Referências

1. D. Casper, U. Yaparalvi, N. Rempel, P. Werner, *Neurosci. Lett.* **289**, 201 (2000) e referências nele citadas.
2. A. K. Sanyal, D. Roy, B. Chowdhury, A. B. Banerjee, *Lett. Appl. Microbiol.* **17** (3), 109 (1993).
3. C. Pina-Vaz, F. Sansonetty, A. G. Rodrigues, J. Martinez-de-Oliveira, A. F. Fonseca, P. Mardh, *J. Med. Microbiol.* **49** (9), 831 (2000).
4. Grattan Timothy Jr., US Patent 5597583, SmithKline Beecham (1997).
5. L. A. Glintenkamp, D. G. M. Nicholson, L. J. Penkler, M. C. B. Van Oudtshoorn, US Patent 5854226, Farmac Netherland (1998).
6. T. Hladon, J. Pawlaczyk, B. Szafran, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **36**, 1 (2000).
7. (a) K. Uekama, T. Imai, F. Hirayama, M. Otagiri, K. Harata, *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 3363 (1983); (b) K. Uekama, T. Imai, F. Hirayama, M. Otagiri, K. Harata, *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1662 (1984).
8. (a) J. A. Hamilton, L. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 583 (1988); (b) J. A. Hamilton, L. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 4379 (1988).
9. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, E. Herdtweck, J. J. C. Teixeira-Dias, *New J. Chem.* **27**, 597-601 (2003).
10. M. R. Caira, V. J. Griffith, L. R. Nassimbeni, B. Oudtshoorn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1061 (1994).
11. A. Chiesi-Villa, C. Rizzoli, G. Amari, M. Delcanale, E. Redenti, P. Ventura, *Supramolec. Chem.* **10**, 111 (1998).
12. A. Kokkinou, K. Yannakopoulou, I. M. Mavridis, D. Mentzafos, *Carbohydr. Res.* **332**, 85 (2001).
13. G. R. Brown, M. R. Caira, L. R. Nassimbeni, B. VanOudtshoorn, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recogn.* **26**, 281 (1996).
14. N. Shankland, A. J. Florence, P. J. Cox, D. B. Sheen, S. W. Love, N. S. Stewart, C. C. Wilson, *Chem. Commun.*, 855 (1996) NOTA: a estrutura dos cristais de Ibuprofeno foi determinada pela primeira vez por difracção de raios X, ver J. F. McConnel, *Cryst. Struct. Commun.* **3**, 73 (1974).

# Capítulo 4

## Capítulo 4

**A formação de sais  
favorece a inclusão  
de certos compostos na  $\beta$ -CD**

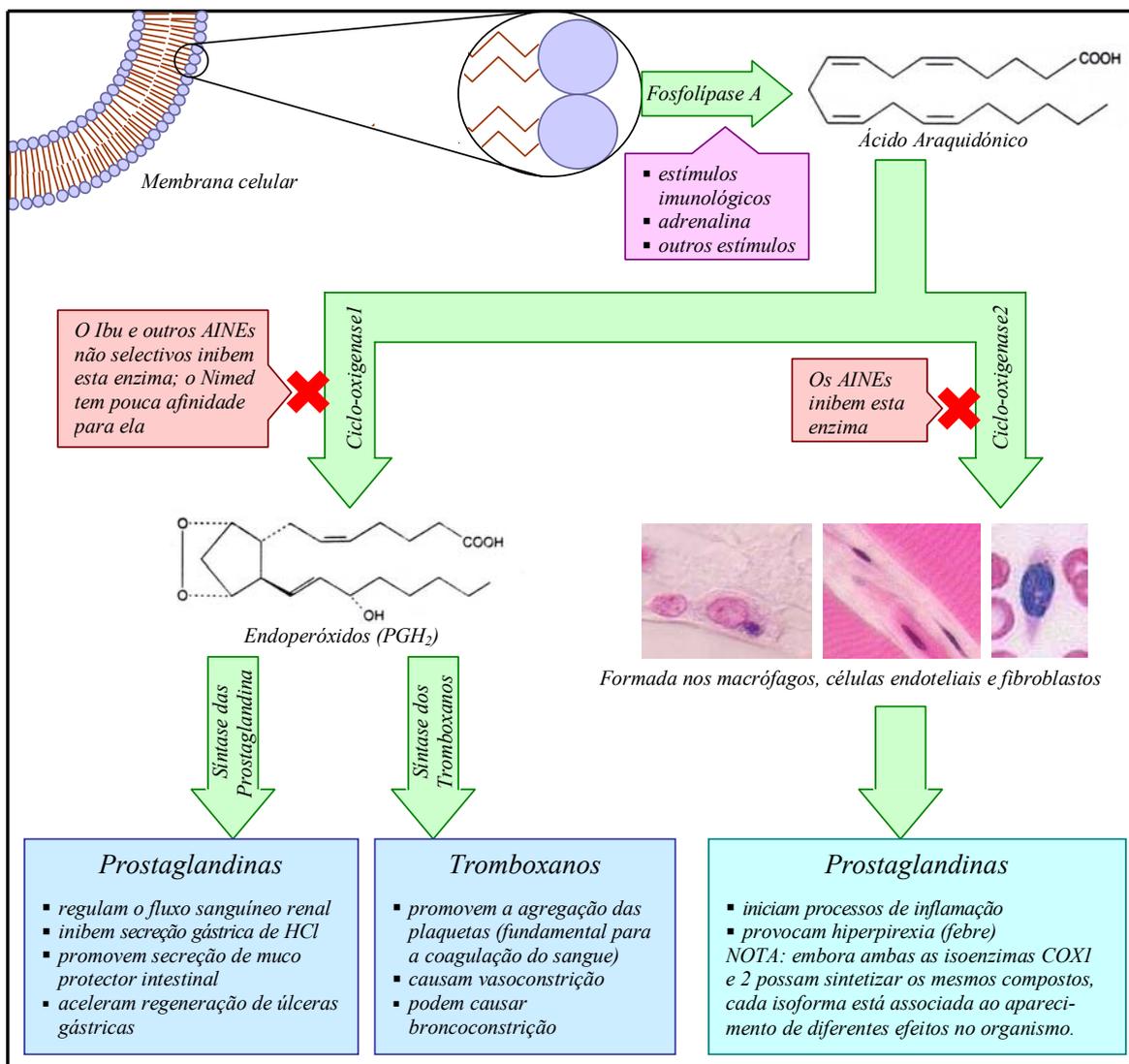
A preparação industrial do nimesulide envolve os precursores PN1, PN2 e PN3. Os dois primeiros são derivados monossustituídos do éter dibenzílico e formam facilmente com a  $\beta$ -CD os complexos  $2\beta$ -CD·PN1 e  $2\beta$ -CD·PN2, ambos com as ciclodextrinas empacotadas em canal. A transformação do PN2 em PN3 envolve adição dum grupo metanossulfóxido ao grupo amina. O substituínte resultante posiciona-se muito próximo dos anéis de benzeno, dificultando a aproximação da  $\beta$ -CD. Deste modo, não é possível incluir nem PN3 nem o nimesulide. A formação de sais de sódio destes compostos leva à alteração da sua geometria molecular ficando o grupo  $-\text{SO}_2\text{CH}_3$  distendido no sentido oposto aos anéis aromáticos. A geometria dos hóspedes na forma salina favorece a sua inclusão. De facto, cada um destes compostos forma complexos com a  $\beta$ -CD, com estequiometria 1:1.

#### **4. A formação de sais favorece a inclusão de certos compostos na $\beta$ -CD**

4.1. Introdução	57
4.2. Preparação dos complexos de inclusão	59
4.3. Estrutura dos complexos de inclusão	60
Difracção de Raios X de pós	61
Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$	62
Espectroscopia vibracional	65
Termogravimetria	65
4.4. Estudos teóricos	67
4.5. Conclusões	70
Referências	71

## 4.1. Introdução

O Nimesulide (4'-nitro-2'-fenoximetanossulfonanilida, Nimed) é um fármaco anti-inflamatório não-esteróide (AINE), tal como o ibuprofeno. No entanto, tem a particularidade de apresentar maior afinidade para a isoforma 2 da ciclo-oxigenase (COX), conforme se mostra no esquema 4.1. [1].



**Esquema 4.1.** Representação simplificada da síntese e acção da ciclo-oxigenase, onde se mostra a que nível actua o Nimed e os medicamentos AINEs não seletivos.

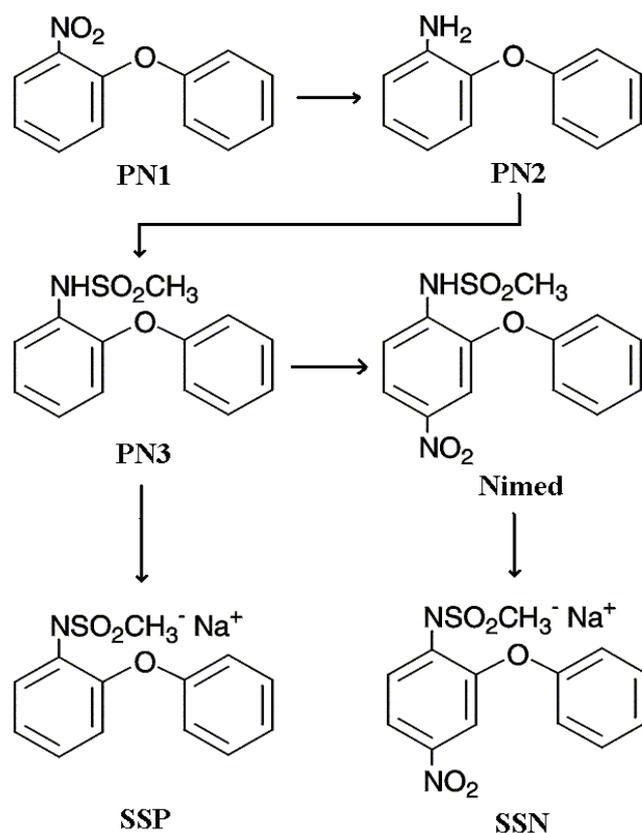
É portanto muito baixa a sua acção inibitória sobre a COX1, responsável por inúmeros processos de regulação do organismo. A acção preferencial do Nimed sobre a COX2 explica a baixa incidência de efeitos secundários indesejáveis, nomeadamente na mucosa gástrica e na agregação plaquetária. O Nimed está também a ser estudado quanto à sua possibilidade de combater a degeneração cerebral associada à doença de Alzheimer, segundo o mesmo mecanismo descrito para o Ibu [1a].

A principal desvantagem na utilização terapêutica do Nimed é a baixa solubilidade aquosa (cerca de  $0,01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) que coloca problemas de biodisponibilidade *in vivo* [1a]. Estes problemas têm sido abordados através do uso das ciclodextrinas como agentes solubilizantes. Uma patente descreve a inclusão do nimesulide na  $\beta$ -CD através da atomização e secagem (spray-drying) numa solução amoniacal dos dois componentes [2]. Desta forma, foi aumentada a sua solubilidade (para  $\pm 16 \text{ mg ml}^{-1}$ ), não só devido à presença da CD, mas também pela formação dum sal mais solúvel. Foi posteriormente descrita a complexação da  $\beta$ -CD com o sal de sódio do nimesulide que aumenta a sua solubilidade em água (5000 vezes), em meio ácido (7 vezes) e a  $\text{pH} = 6,8$  (34 vezes) [3]. A incorporação dum sal de L-lisina de Nimed na  $\beta$ -CD aumenta ainda mais a sua solubilidade, numa vasta gama de valores de  $\text{pH}$  [4].

Existem presentemente várias formulações com nimesulide e CDs no mercado enquanto outras estão na fase de ensaios clínicos. Os estudos efectuados indicam que a combinação com as ciclodextrinas resulta geralmente numa maior rapidez de acção [5]. A inclusão permite ainda aumentar o leque de utilização do Nimed, que poderá substituir outros medicamentos em casos de otite [6], odontologia [5a] e bronquite crónica [7], apenas para referir alguns exemplos.

A importância clínica das formulações contendo Nimed e ciclodextrinas torna ainda mais importante a compreensão da interacção entre eles, tanto em solução como no estado sólido. No exemplo acima mencionado do complexo nimesulide/L-lisina, a inclusão foi demonstrada no estado sólido por calorimetria diferencial (DSC) e em solução por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  [4]. Os resultados dos estudos em solução sugerem que a inclusão é feita pelo anel de nitrofenilo. A. Miro e seus colaboradores também investigaram a interacção Nimed/ $\beta$ -CD em solução e no estado sólido [8]. Em solução, estudos de solubilidade de fase e de espectrofotometria no UV indicaram a formação dum complexo 1:1 com  $K_{\text{app}}$  de aproximadamente  $550 \text{ M}^{-1}$ . No estado sólido, preparações de Nimed/ $\beta$ -CD foram obtidas por mistura física, malaxagem, co-evaporação, liofilização e atomização com secagem e foram caracterizados por DSC, DRX de pós e espectroscopia de IV comparando-se os resultados das diferentes preparações.

No trabalho apresentado neste capítulo faz-se a inclusão na  $\beta$ -CD do nimesulide na forma de sal sódico, comparando a estrutura com as dos complexos preparados com os seus precursores: 2-fenoxinitrobenzeno, 2-fenoxianilina e o sal de sódio da 2-fenoximetanossulfonanilida (ver figura 4.1) [9]. Para além das técnicas experimentais de caracterização dos complexos sólidos, recorre-se ainda a cálculos *ab initio* para determinar as geometrias de inclusão mais prováveis para cada sistema, comparando-os entre si.



**Figura 4.1.** Representação esquemática da síntese do nimesulide (Nimed) evidenciando a estrutura dos seus precursores, PN1, PN2 e PN3. Mostra-se ainda a estrutura dos sais de sódio de PN3 e do Nimed, chamados SSP e SSN, respectivamente.

## 4.2. Preparação dos complexos de inclusão

Os compostos PN1 e PN2 foram facilmente incluídos na  $\beta$ -CD por co-cristalização a partir de soluções aquosas mistas. Os produtos cristalinos são designados por  $2\beta$ -CD·PN1 e  $2\beta$ -CD·PN2, uma vez que apresentam estequiometria 2:1, conforme foi determinada por análise elementar.

A complexação da  $\beta$ -CD com os compostos PN3 e Nimed foi tentada por vários métodos, usando solventes mistos (água com etanol ou com 1,4-dioxano em proporções variadas) e temperaturas crescentes para facilitar a solubilização dos hóspedes. Em todas as tentativas se obteve o mesmo resultado: a cristalização separada da ciclodextrina e do respectivo hóspede. Alguns trabalhos publicados sobre este sistema apresentam resultados semelhantes, referindo tentativas de preparar complexos de inclusão do Nimed na  $\beta$ -CD por acção mecânica [10], por liofilização ou por atomização com secagem [8]. Contudo, embora a presença da  $\beta$ -CD resulte numa melhor dissolução do sistema misto, as taxas de inclusão foram nulas ou pouco significativas de acordo com os dados de calorimetria diferencial.

Conforme foi mencionado durante a introdução a este trabalho, a formação dum sal de Nimed aumenta a sua solubilidade, pelo que poderá ser favorável ao processo de

inclusão. Deste modo, foram preparados sais sódicos de PN3 e de Nimed denominados SSP e SSN, respectivamente. Estes sais formaram complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD por co-precipitação, denominados  $\beta$ -CD SSP e  $\beta$ -CD SSN. O recurso ao sal de um composto orgânico para auxiliar a inclusão não é uma novidade, estando já descrito para o próprio Nimed [3] e para certos ácidos orgânicos: a indometacina, a acetazolamida e o sulfametoxazole formam com as ciclodextrinas complexos mais estáveis do que as respectivas formas não-ionizadas [11, 12].

### 4.3. Estrutura dos complexos de inclusão

Os cristais de  $2\beta$ -CD-PN1 e  $2\beta$ -CD-PN2 foram testados em difracção de raios X, numa tentativa de se determinar a estrutura dos complexos. Em relação a  $2\beta$ -CD-PN1, nenhum dos cristais apresentou qualidade suficiente para este estudo. Já os cristais de  $2\beta$ -CD-PN2 permitiram recolher difracções, mas não foi possível determinar detalhadamente a estrutura de empacotamento devido a um elevado grau de desordem (mesmo trabalhando a baixas temperaturas).

A informação disponível sobre o sistema cristalino  $2\beta$ -CD-PN2·18H<sub>2</sub>O é apresentada na tabela 4.1:

Forma dos cristais	Prismas	
Fórmula	$2(C_{42}H_{70}O_{35}), C_{12}H_{11}NO, 18(H_2O)$	
Massa molecular	2779,45	
Grupo de simetria	Monoclínico	C 2
a = 1909,09(2) pm		
b = 2429,34(4) pm	$\beta = 110,246(1)^\circ$	
c = 1588,68(3) pm		
V = $6912,8(2) \cdot 10^6$ pm <sup>3</sup>	Z = 2	D <sub>calc</sub> = 1,335 g cm <sup>-3</sup>

**Tabela 4.1.** Dados obtidos por difracção de raios X de monocristal para o sistema  $2\beta$ -CD-PN2 trabalhando à temperatura de  $-160^\circ$  C ( $113 \pm 1$  K)

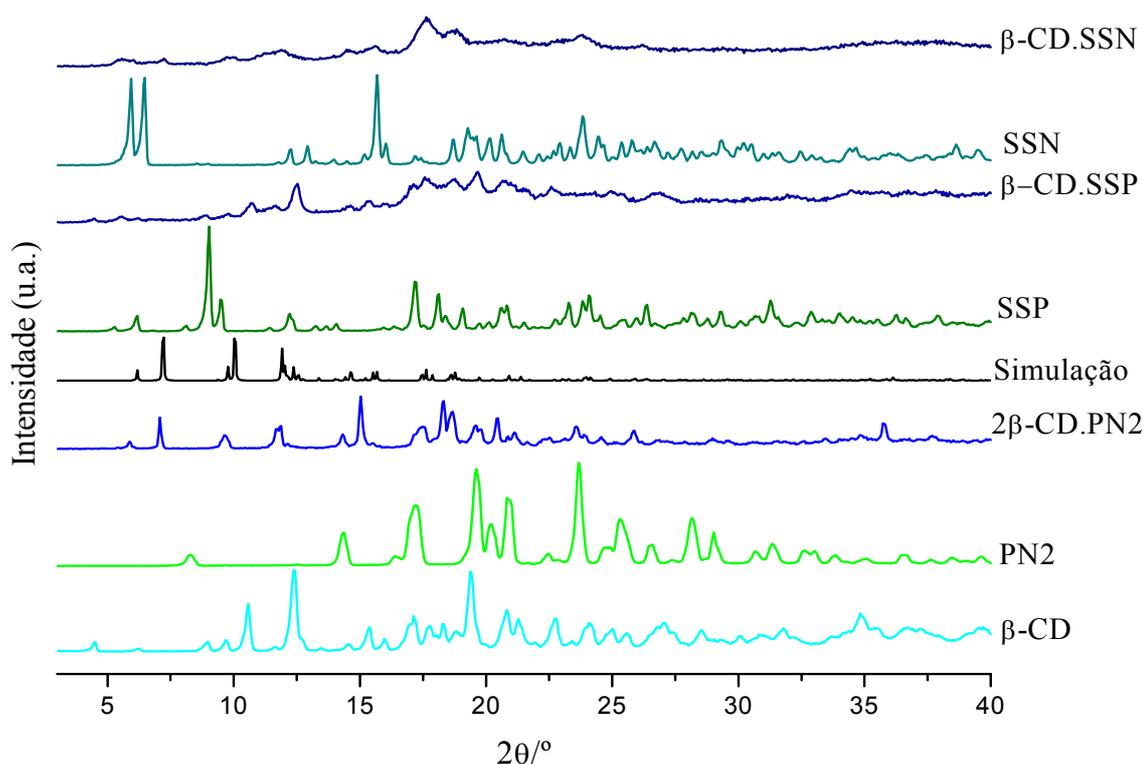
Embora não permita conhecer detalhadamente a estrutura de  $2\beta$ -CD-PN2, a cristalografia fornece o tipo de célula unitária, a partir do qual se pode determinar qual o empacotamento da  $\beta$ -CD neste cristal. De facto, segundo os trabalhos de S. Makedonopoulou *et al* [13] e de T. J. Brett *et al* [14], todos os complexos envolvendo dímeros de  $\beta$ -CD que cristalizam no sistema C2 são isomórficos e correspondem a uma estrutura em canal. Assim, será de prever que os complexos de  $2\beta$ -CD-PN2 se empacotam do mesmo modo no estado cristalino.

Para caracterizar os restantes sistemas e saber mais detalhes sobre o complexo formado com o PN2, recorre-se a outras técnicas de estado sólido.

### Difracção de Raios X de pós

Os difractogramas dos complexos de inclusão são apresentados na figura 4.2, mostrando-se também os da  $\beta$ -CD e dos hóspedes para efeitos de comparação. O único complexo excluído desta figura é  $2\beta$ -CD·PN1, obtido a partir de um hóspede líquido, para o qual não foi possível recolher o difractograma. Não havendo possibilidade de comparar o padrão de difracção com o do hóspede, não é adequado usar esta técnica para estudar o complexo de inclusão.

As coordenadas atómicas do complexo de  $\beta$ -CD com a benzocaína [15] foram utilizadas para simular o padrão de difracção de pós, que também se apresenta na figura. A estrutura molecular do complexo  $\beta$ -CD·benzocaína foi determinada por cristalografia e apresenta dímeros de  $\beta$ -CD cabeça-cabeça que se empilham ao longo do eixo cristalográfico *c*.



**Figura 4.2.** Difractograma de pós de  $\beta$ -CD, PN2,  $2\beta$ -CD·PN2,  $\beta$ -CD·Benzocaína (simulação), SSP,  $\beta$ -CD·SSP, SSN e  $\beta$ -CD·SSN. O difratograma calculado para  $\beta$ -CD·Benzocaína foi obtido aplicando o programa Powdercell [16] aos valores das coordenadas atómicas descritos na literatura. Para simplificar os cálculos, as coordenadas do hóspede foram omitidas.

O padrão de  $2\beta$ -CD·PN2 difere substancialmente daqueles registados para a  $\beta$ -CD e o PN2, caracterizando-se pela presença de picos a ângulos baixos (concretamente a  $2\theta = 5,9^\circ / 7,1^\circ / 9,6^\circ / 11,9^\circ / 14,3^\circ / 15,0^\circ / 17,6^\circ / 18,4^\circ$ ). Note-se que este padrão é quase idêntico ao simulado para o complexo  $\beta$ -CD·benzocaína, em particular a valores de  $2\theta$

entre 3 e 20°. A similaridade entre eles indica que os dímeros de  $\beta$ -CD contendo no seu interior o PN2 estão empacotados em canal, o que está em concordância as conclusões tiradas a partir dos dados do estudo do monocristal.

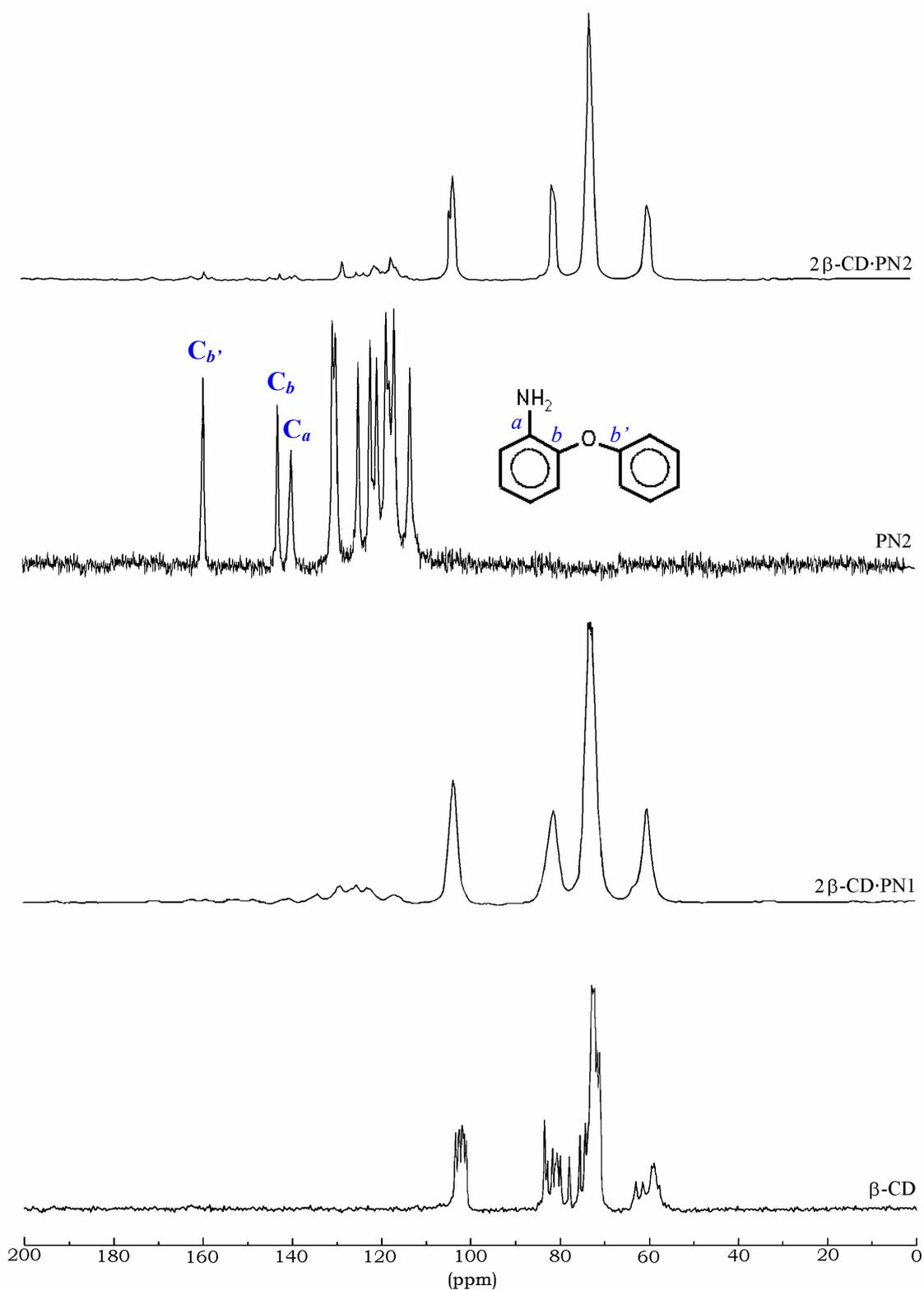
O complexo formado com o sal do Nimed é o menos cristalino de todos. Mesmo assim, é possível observar picos de difracção a ângulos semelhantes aos de  $2\beta$ -CD·PN2, pelo que poderá tratar-se igualmente duma estrutura em canal.

Finalmente, o complexo  $\beta$ -CD·SSP exibe um difractograma mais difícil de interpretar, por ser muito diferente dos observados com os restantes complexos. Mesmo assim, podem encontrar-se algumas semelhanças com o padrão da  $\beta$ -CD. Deve ainda ressaltar-se que há desvios nos valores de  $2\theta$ , revestidos de particular significado por estarem associados a picos registados a ângulos baixos, bem como alterações na intensidade de certos picos. Face a este resultado é difícil concluir acerca da estrutura de empacotamento das moléculas que constituem este complexo.

### ***Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$***

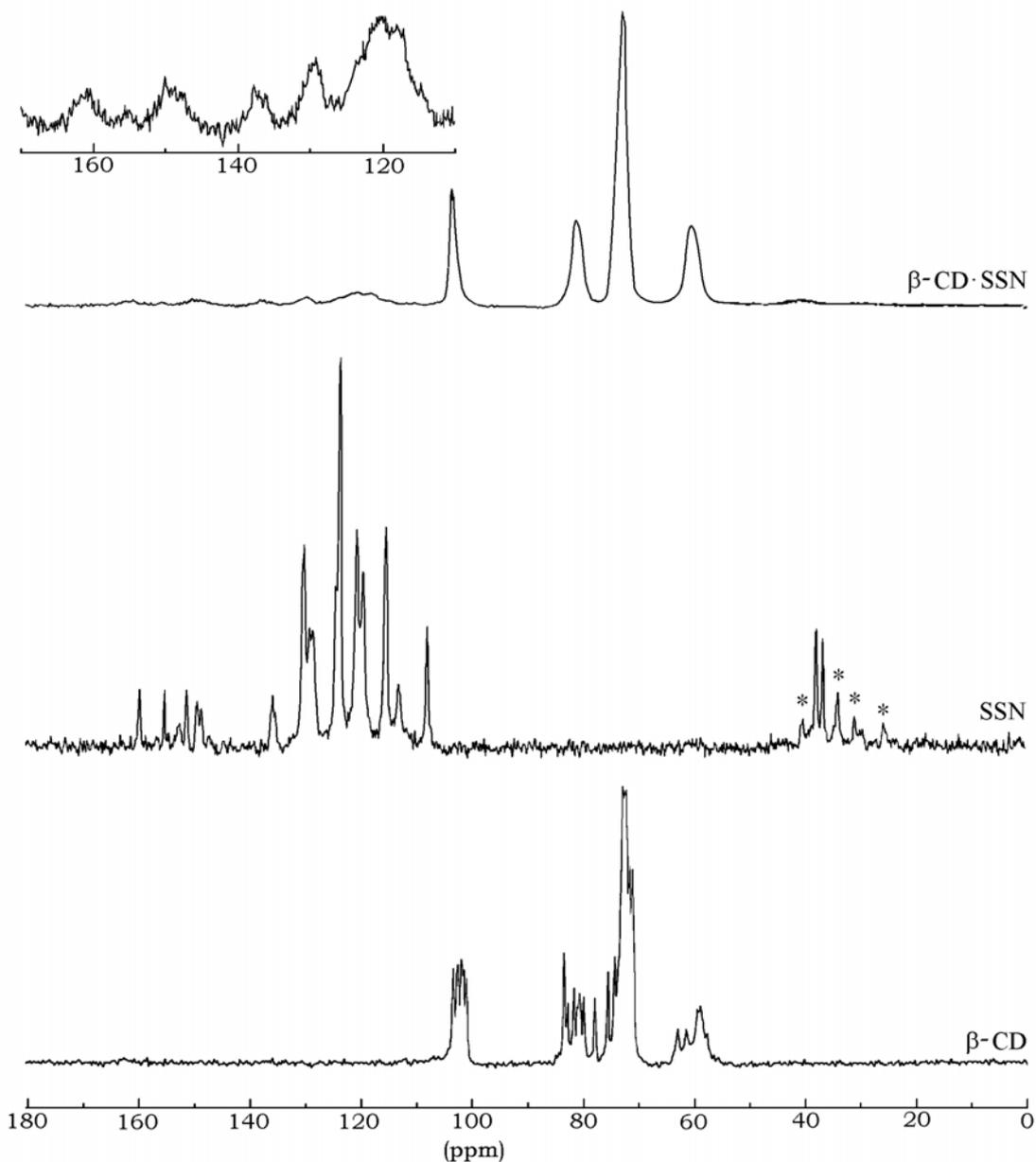
Os espectros do  $2\beta$ -CD·PN1 e do  $2\beta$ -CD·PN2 apresentam características em comum, pelo que serão discutidos em paralelo. Pode observar-se que a inclusão de ambos leva ao aparecimento de singuletos para os carbonos da  $\beta$ -CD (ver figura 4.3. na página seguinte). Conforme foi descrito nos capítulos 2 e 3, o efeito associa-se à inclusão de grupos aromáticos e a uma conseqüente redução dos valores de dispersão dos ângulos de torção em torno da ligação glicosídica e dos hidroxilos das orlas.

Relativamente aos hóspedes, não se pode comparar os sinais do PN1 com os de  $2\beta$ -CD·PN1, visto que este hóspede é um líquido. Assim, comentam-se apenas as alterações nos sinais de PN2 após a inclusão. Pode observar-se que no espectro de  $2\beta$ -CD·PN2 o carbono quaternário  $b'$  (ver esquema de contagem na figura 4.3.) origina três sinais, notando-se também multiplicidade nas ressonâncias de  $C_a$  e  $C_b$ . Este fenómeno pode estar reflectir a ocorrência de diferentes posições para o PN2 na estrutura cristalina, tal como no caso de  $2\beta$ -CD·4*p*-HB (cap. 2). Esta interpretação permite explicar a elevada desordem associada aos átomos do hóspede que foi registada nos estudos por difracção de raios X do monocristal de  $2\beta$ -CD·PN2.



**Figura 4.3.** Espectros de RMN CP-MAS  $^{13}\text{C}$  de  $\beta\text{-CD}$ ,  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{PN1}$ , PN2 e  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{PN2}$  e esquema de contagem adoptado para os carbonos quaternários do PN2. O espectro de PN1 não é apresentado, pois tratando-se de um composto líquido não pode ser comparado com espectros recolhidos a partir de produtos sólidos.

No espectros dos hóspedes na forma de sal - SSP (não apresentado) e SSN (figura 4.4) - pode observar-se que alguns carbonos originam mais do que um sinal. Este efeito não foi observado nos espectros destes compostos na forma não ionizada e poderá estar associado a um efeito de rede cristalina nos sais.



**Figura 4.4.** Espectros de RMN CP-MAS  $^{13}\text{C}$  de  $\beta\text{-CD}$ , SSN e  $\beta\text{-CD}\cdot\text{SSN}$

A inclusão dos sais SSP e SSN na  $\beta\text{-CD}$  traduz-se por um alargamento dos sinais dos seus átomos de carbono, acompanhada de desvios muito ligeiros para campo baixo (ver espectro de  $\beta\text{-CD}\cdot\text{SSN}$  na figura 4.4). Torna-se difícil determinar ao certo o número de sinais devido ao alargamento (que pode originar alguma sobreposição) e à sua fraca intensidade, com conseqüente baixa relação sinal/ruído. Relativamente aos carbonos da

$\beta$ -CD regista-se, tal como nos complexos de inclusão com PN1 e PN2, o aparecimento de singuletos.

### ***Espectroscopia Vibracional***

As bandas mais intensas no espectro de cada hóspede foram comparadas com as da mesma molécula incluída na  $\beta$ -CD. Observaram-se alterações muito subtis nas frequências vibracionais de alguns osciladores que podem ser relacionadas com a presença de um ambiente mais hidrófobo em torno da molécula incluída. Os resultados estão resumidos na tabela 4.2.

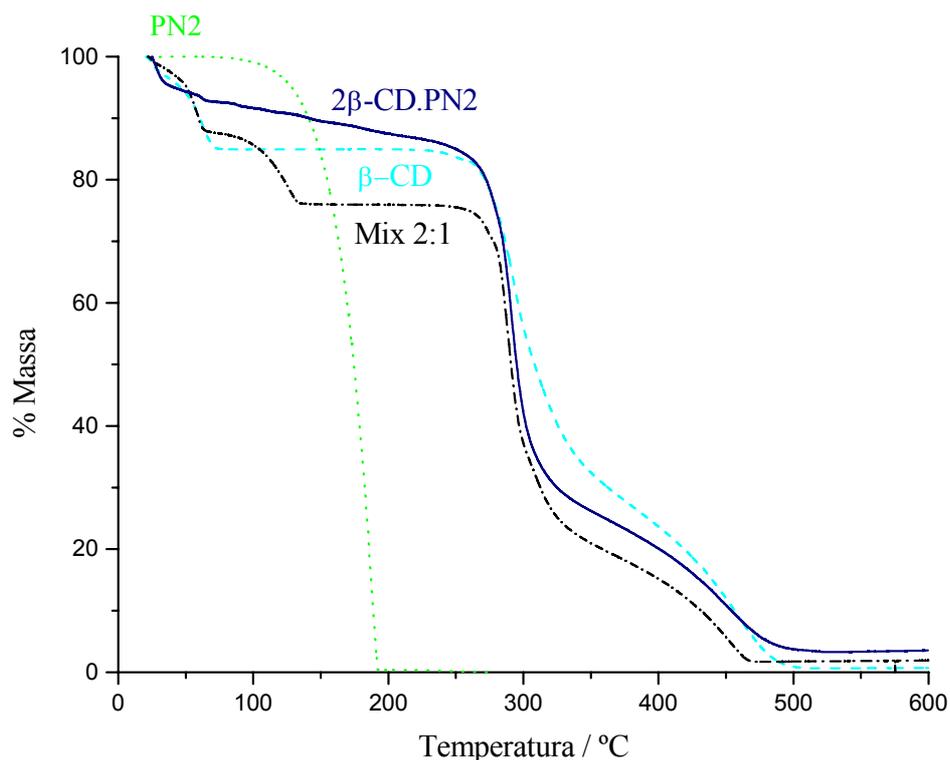
	<i><math>\nu</math> observada</i>		<i>Descrição aproximada</i>
	<i>Hóspede</i>	<i>Comp. Inclusão</i>	
<b><i>PN1</i></b>	1608	1631	$\nu$ C $\equiv$ C
	1525	1531	$\nu$ N $\equiv$ O antissimétrica
	1244	1247	$\nu$ C-O-C antissimétrica
<b><i>PN2</i></b>	1266	1271	$\nu$ C - NH <sub>2</sub>
	1214	1222	$\nu$ C - O - C antissimétrica
<b><i>SSP</i></b>	1495	1491	$\nu$ C $\equiv$ C
	1256	1251	$\nu$ C-O-C antissimétrica
<b><i>SSN</i></b>	1584	1581, 1591, 1601	$\nu$ N $\equiv$ O assimétrica
	1493	1490	$\nu$ C $\equiv$ C
	800	796	deformação angular O-N-O

**Tabela 4.2.** Frequências vibracionais (cm<sup>-1</sup>) seleccionadas para os complexos de inclusão comparadas com os valores observados nos hóspedes puros.

Embora pequenos, os desvios nas frequências apontadas na tabela mostram influência do ambiente hidrófobo da cavidade da  $\beta$ -CD sobre os hóspedes. Mesmo no caso de SSP e SSN, moléculas de maiores dimensões que não estarão totalmente dentro da cavidade, pode observar-se que há pequenas modificações em vibrações de vários osciladores, ou seja, toda a molécula está a sofrer o efeito hidrófobo da ciclodextrina. Resultados semelhantes foram encontrados em complexos descritos nos capítulos anteriores e também são relatados em vários trabalhos da literatura recente [13, 14]. Em todos os casos eles são associados a um ambiente hidrófobo da  $\beta$ -CD que se estende para além das dimensões de cada cavidade individual, constituindo uma das mais importantes características dos verdadeiros complexos de inclusão.

### ***Termogravimetria***

A análise termogravimétrica permite distinguir entre misturas físicas e complexos de inclusão verdadeiros [17] e muitas vezes também ajuda a avaliar as interações entre a  $\beta$ -CD e o seus hóspedes.



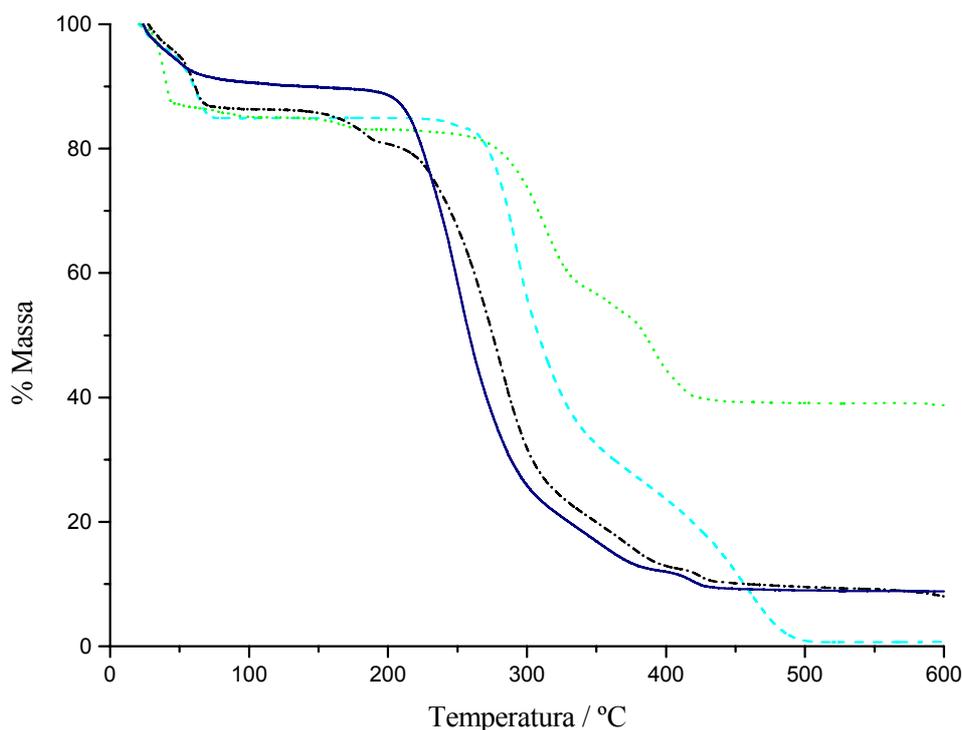
**Figura 4.5.** Termogramas de 2β-CD·PN2 (—), do hóspede PN2 (·-·-·), da β-CD (- - -) e da mistura física 2:1 de β-CD e de PN2 (- - - -)

No caso dos sistemas 2β-CD·PN1 e 2β-CD·PN2, os resultados obtidos foram bastante similares e apontam para complexos com uma forte rede de interações hóspede-hospedeiro. A comparação dos termogramas relativos à inclusão do PN2 apresentada a seguir (figura 4.5), ilustra este fenómeno.

A sublimação do PN2 inicia-se cerca dos 75 °C (ver traçado a pontado na figura 4.5), temperatura que está um pouco acima do seu ponto de fusão (aproximadamente 45 °C). Por cerca dos 190 °C todo o composto está sublimado (o ponto de ebulição é de 172-173 °C). Quando se encontra incluído na β-CD, este composto sublima de forma gradual pelo que não se encontra nenhuma quebra brusca no traçado termogravimétrico até aos 240°C, com excepção da desidratação da β-CD (entre a temperatura ambiente e os 65°C). Este comportamento indica que o complexo de inclusão é estabilizado por uma rede de interações entre a β-CD e o PN2 que se manifesta pela lenta sublimação deste hóspede. Na mistura física é possível observar quer a desidratação da β-CD e a sublimação do PN2 em degraus bem definidos, logo não há interacção entre os componentes.

Os complexos β-CD·SSP e β-CD·SSN também apresentam interações estáveis entre as suas moléculas que se traduzem pela lenta sublimação dos hóspedes. Na figura 4.6. pode observar-se este comportamento no traçado termogravimétrico de β-CD·SSP (os termogramas relativos à inclusão do SSN na β-CD não são apresentados).

Os hóspedes na forma de sal apresentam uma característica interessante em termogravimetria. Com efeito, tanto SSP (figura 4.6.) como SSN têm perdas de massa a temperaturas abaixo dos 100°C pelo que parecem conter alguma água de hidratação. Seguidamente, os sais apresentam 25% de perda de massa (intervalos de temperatura: 150–320 °C para SSP e 250–300 °C para SSN), possivelmente associada à decomposição dos seus grupos metanossulfonamida. Acima dos 300 °C há novas perdas de massa à medida que as moléculas sofrem progressiva degradação térmica.



**Figura 4.6.** Termogramas de  $\beta$ -CD·SSP (—), do sal SSP (---), da  $\beta$ -CD (— —) e da mistura física 1:1 de  $\beta$ -CD e de SSP (— - -)

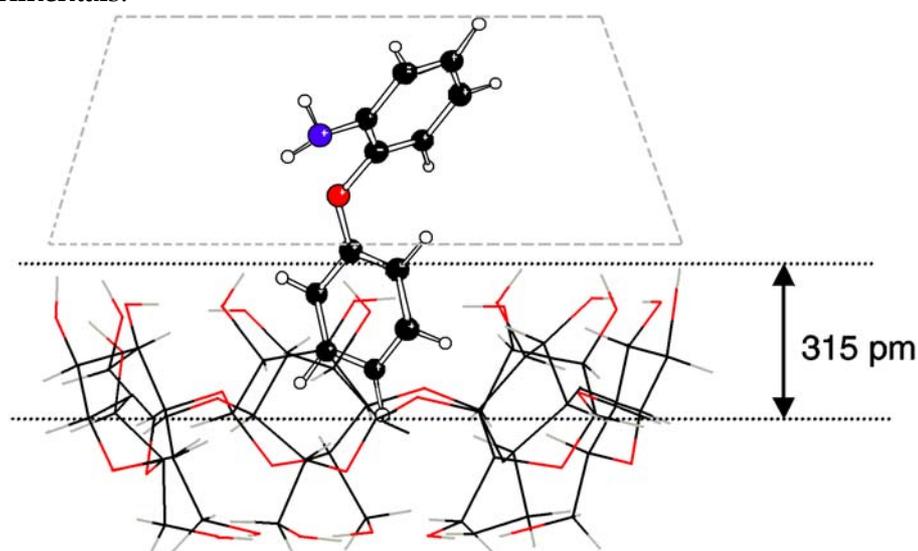
Outra característica curiosa dos compostos salinos é que a presença do sal de sódio parece promover a decomposição da  $\beta$ -CD a temperatura mais baixa. Note-se que este efeito se faz sentir não só nos complexos  $\beta$ -CD·SSP (traçado a cheio na figura 4.6.) e  $\beta$ -CD·SSN mas também nas misturas físicas.

#### 4.4. Estudos teóricos

A geometria mais estável de cada hóspede é determinada por cálculos *ab initio* (ver detalhes na secção experimental) e usada para avaliar qual a melhor estrutura para a sua interacção com a  $\beta$ -CD. As moléculas são tratadas como se estivessem em vácuo, ou seja, isoladas, caso contrário os cálculos tornar-se-iam demasiado complexos para serem executados em tempo útil. Deste modo, os resultados apresentam sempre uma

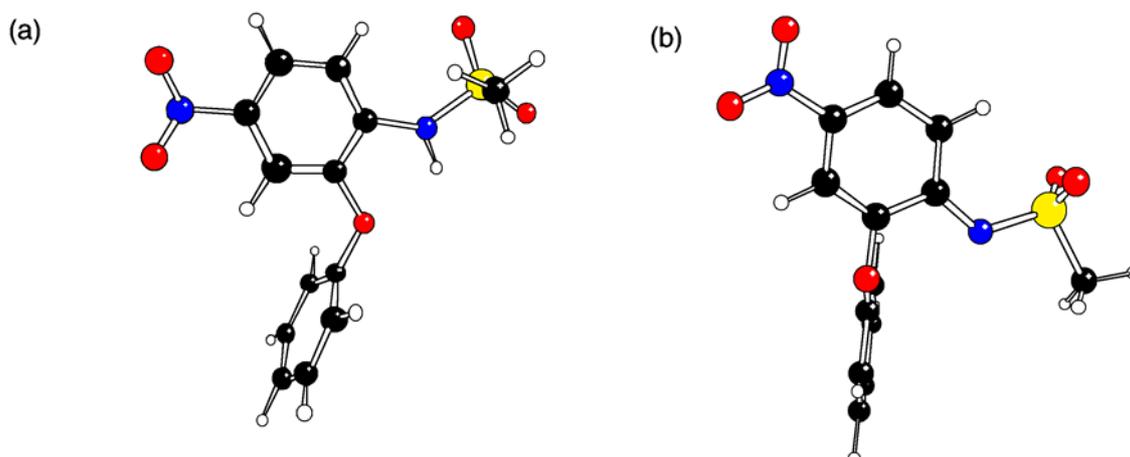
estequiometria de 1:1. Embora simples, permitem criar um modelo que, na maioria das vezes, ajuda a compreender os resultados experimentais.

Para o presente trabalho, começou-se por determinar a estrutura do hóspede PN2 (que também é representativa de PN1, visto as moléculas serem muito semelhantes) e a do  $\beta$ -CD em separado. As duas moléculas foram depois aproximadas uma da outra em diferentes posições de inclusão e calculada a energia de interacção para cada posição. Os resultados mostram que a estrutura mais estável envolve inclusão do resíduo de benzeno não substituído (ver figura 4.7). A restante parte da molécula de PN2 fica praticamente na vertical. Deste modo, torna-se possível a aproximação de uma segunda molécula de  $\beta$ -CD para formar um dímero cabeça com cabeça. Este modelo ajusta-se perfeitamente aos resultados experimentais.



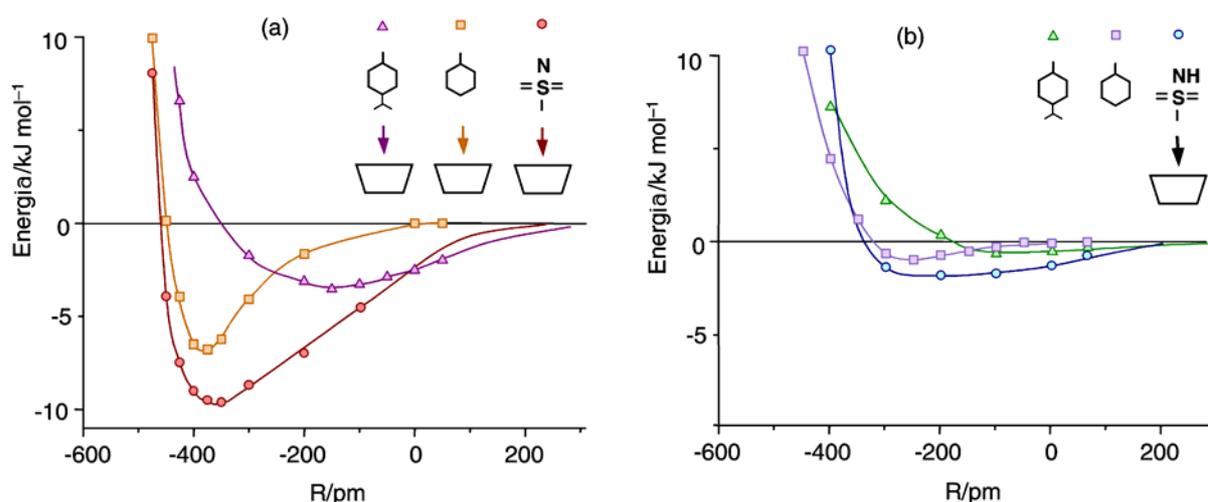
**Figura 4.7.** Representação esquemática da estrutura de mais baixa energia calculada para a inclusão da 2-fenoxianilina (PN2) na  $\beta$ -CD. Mostra-se também a profundidade de penetração do hóspede proposta por este modelo. A estrutura permite a aproximação de uma segunda molécula de  $\beta$ -CD (a tracejado indica-se o local de interacção), de modo a obter-se um complexo 2:1, conforme indicam os dados experimentais. Dada a semelhança estrutural entre os hóspedes PN2 e PN1, este modelo é também representativo da estrutura de  $2\beta$ -CD·PN1.

No que diz respeito à inclusão dos hóspedes PN3 e Nimes e dos seus respectivos sais de sódio, SSP e SSN, realizou-se um estudo que permite comparar as formas salinas com as neutras. Por se prever que os resultados sejam semelhantes para os dois hóspedes, o cálculo foi efectuado apenas para a molécula de nimesulide. Os resultados revelam geometrias diferentes para as formas neutra e ionizada (salina). Na forma neutra (ver figura 4.8.a na página seguinte), o grupo C-NH-SO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> adopta preferencialmente uma geometria *gauche*, criando um impedimento espacial que bloqueia o acesso e ancoragem da  $\beta$ -CD. Por oposição, a forma salina (4.8.b) apresenta uma geometria alongada. O fragmento C-N<sup>⊖</sup>Na<sup>⊕</sup>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> adopta a conformação *trans*, mais favorável à inclusão. Assim, será de esperar que a ciclodextrina tenha maior facilidade em incluir o composto na forma salina.



**Figura 4.8.** Estruturas optimizadas para as conformações de menor energia do nimesulide nas formas neutra (a) e aniónica (b) que corresponde ao sal de sódio do nimesulide. O ião sódio foi omitido dos cálculos.

Para calcular a energia da inclusão testaram-se várias posições de ancoragem, partindo de diferentes fragmentos da molécula para inclusão na cavidade da  $\beta$ -CD. Para cada geometria testada, calculou-se a energia de interacção na forma neutra e na ionizada. As três geometrias mais favoráveis para a interacção da  $\beta$ -CD com o Nimed ou o SSN e a energia de cada modo de inclusão estão representadas (em função da distância hóspede - hóspedeiro) na figura 4.9. Tal como se esperava, pode ver-se que a inclusão do Nimed na  $\beta$ -CD é pouco estável, seja qual for a geometria de interacção estudada (gráfico b). Este modelo teórico permite compreender melhor as dificuldades experimentais encontradas na preparação de complexos de inclusão com o Nimed e com seu precursor de estrutura semelhante, o PN3.



**Figura 4.9.** Representação da energia em função da distância hóspedeiro-hóspede calculada para a interacção do SSN (a) e do nimesulide (b) com a  $\beta$ -CD. R define-se como a distância entre o plano formado pelos átomos de hidrogénio dos grupos hidroxilo secundários da  $\beta$ -CD e o átomo de hidrogénio mais próximo do hóspede que se está a aproximar. Valores negativos de R indicam inclusão.

Para o SSN, a geometria de inclusão mais estável envolve encapsulação do grupo  $\text{SO}_2\text{CH}_3$ , com uma resultante energia de estabilização de aproximadamente  $10 \text{ kJ mol}^{-1}$ , figura 4.9.a. Esta previsão teórica pode apresentar-se um pouco desajustada, já que numa primeira abordagem parece sugerir que seria o fragmento de maior polaridade do hóspede a ficar incluído na cavidade apolar da ciclodextrina. Para esclarecer esta inconsistência, foi efectuado o cálculo da distribuição de carga eléctrica no hóspede, tendo-se verificado que a carga negativa está distribuída ao longo de toda a molécula e não concentrada no átomo de azoto. Adicionalmente, a forma salina consegue estabilizar a carga negativa de uma forma tal que o átomo de azoto do grupo  $\text{NSO}_2\text{CH}_3$  apresenta uma menor densidade de carga eléctrica do que na forma não ionizada. A outra geometria de inclusão envolve encapsulação do anel aromático não substituído, com uma energia ligeiramente inferior (*ca.*  $7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), mas na mesma ordem de grandeza. Deste modo, torna-se difícil tirar conclusões decisivas acerca da forma dominante no estado sólido para o complexo  $\beta\text{-CD}\cdot\text{SSN}$  (e, por extensão, para  $\beta\text{-CD}\cdot\text{SSP}$ ).

#### 4.5. Conclusões

A  $\beta\text{-CD}$  inclui os compostos PN1 e PN2, de dimensões e estrutura similares. Cada hóspede fica inserido dentro de um dímero de  $\beta\text{-CD}$ . Estes empacotam-se em canais, de forma semelhante aos complexos estudados nos capítulos 2 e 3.

Na sequência do processo de preparação do Nimed, existe ainda um outro precursor (PN3) de estrutura mais complexa que os anteriores pela adição de um grupo sulfoximetilo. O PN3 e o Nimed não foram incluídos na  $\beta\text{-CD}$  apesar de se terem efectuado várias tentativas. A preparação de sais destes hóspedes permitiu contornar o problema, obtendo-se precipitados cristalinos com estequiometria de 1:1. A caracterização destes compostos permitiu confirmar que são verdadeiros complexos de inclusão, com interacções hospedeiro-hóspede estáveis. Com base neles, é ainda possível propor uma estrutura em canal para  $\beta\text{-CD}\cdot\text{SSN}$ , enquanto para  $\beta\text{-CD}\cdot\text{SSP}$  é mais difícil tirar conclusões.

O recurso a cálculos *ab initio* sugere uma explicação para a dificuldade de incluir PN3 e Nimed baseada na diferença conformacional entre estas moléculas e os seus sais (SSP e SSN, respectivamente). Os sais têm o grupo  $\text{NSO}_2\text{CH}_3$  numa geometria mais estendida que facilita a aproximação do hospedeiro. Determinaram-se duas estruturas possíveis para a interacção  $\beta\text{-CD} - \text{SSP}$ , sendo a mais favorável energeticamente aquela em que o fragmento  $-\text{NSO}_2\text{CH}_3$  fica no interior da  $\beta\text{-CD}$  (figura 4.10). A outra tem uma estabilidade ligeiramente inferior e envolve inclusão do anel aromático não substituído.

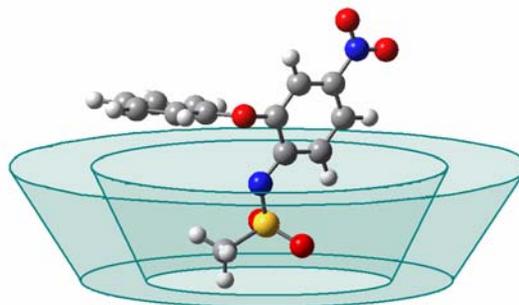


Figura 4.10.

## Referências

1. (a) L. Bicarini, L. Patoia, A. Del Favero, *Drugs Today* **24**, 23 (1988); (b) A. K. Singla, M. Chawla, A. Singh, *J. Pharm. Pharmacol.* **52**, 467-486 (2000).
2. G. Mafione, "Method of preparation of inclusion compounds of nimesulide with cyclodextrins", PCT Intl. Appl. WO 94 02, 177 (1994).
3. G. Piel, I. Delneuve, L. Delattre, *Proceedings of the 8th International Symposium on Cyclodextrins*, L. Szenté, J. Szejtli Eds., Kluwer Academic Press, Holanda, p. 487 (1996).
4. G. Piel, I. Pirrotte, I. Delneuve, P. Neven, G. Llabres, J. Delarge, L. Delattre, *J. Pharm. Sci.* **86**, 475-480 (1997).
5. (a) G. Scolari, F. Lazzarin, C. Fornaseri, V. Carbone, S. Rengo, M. Amato, D. Cicciu, D. Braione, S. Argentino, A. Morgantini, C. Bassetti, M. Tramer, G. C. Monza, *Int. J. Clinical Pract.* **53**, 345-348 (1999); (b) M. Vizzardì, C. S. Visconti, L. Pedrotti, N. Marzano, M. Berruto, A. Scotti, *Curr. Therap. Res. – Clin. Exper.* **59**, 162 (1998).
6. D. Passali, R. Balli, A. Scotti, V. Oldani, *Curr. Ther. Res.* **62**, 153-166 (2002).
7. S. Tognella, *Drugs* **46**, 275-276 (1993).
8. A. Miro, F. Quaglia, A. Calignano, F. Barbato, B. Capello, M. I. La Rotonda, *STP Pharma Sci.* **10**, 157-164 (2000).
9. 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, *Org. Biomol. Chem.* **1**, 873-878 (2003).
10. C. Roselli, B. Perly, D. Duchêne, D. Wouessidjewe, *STP Pharma Sci.* **9**, 267-271 (1999).
11. T. Backensfeld, B. W. Muller, K. Kolter, *Int. J. Pharm.* **74**, 85 (1991).
12. T. Loftsson, T. K. Gudmundsdóttir, H. Fridriksdóttir, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **22**, 401 (1996).
13. S. Makedonopoulou, I. M. Mavridis, *Acta Cryst.* **B56**, 322-331 (2000).
14. T. J. Brett, J. M. Alexander, J. J. Stezowski, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1095-1103 (1991).
15. J. A. Hamilton, M. N. Sabesan, *Carbohydr. Res.* **102**, 31 (1982).
16. W. Kraus, G. Nolze, *J. Appl. Crystallogr.* **29**, 301 (1996).
17. F. Giordano, C. Novak, J. R. Moyano, *Thermochim. Acta*, **380**, 123 (2001).



# Capítulo 5

## Capítulo 5

**Inclusões em  $\beta$ CD**

**de Omeprazole e dois precursores**

Prepararam-se complexos de inclusão entre a  $\beta$ -CD e o omeprazole e também com dois compostos que o precedem na síntese industrial com o objectivo de estudar comparativamente os produtos obtidos. O complexo entre a  $\beta$ -CD e o PrO1 (um derivado do benzimidazole) apresenta estequiometria 2:1 (hospedeiro - hóspede) enquanto que o PrO2 e o omeprazole formam complexos 1:1 com a  $\beta$ -CD embora tenham dimensões maiores. Os resultados indicam ainda que  $2\beta$ -CD·PrO1 tem estrutura semelhante à  $\beta$ -CD enquanto que  $\beta$ -CD·PrO2 se organiza em canais. A interacção da  $\beta$ -CD com o omeprazole é mais fraca do que com os outros hóspedes, formando-se uma estrutura nova para a qual ainda não foi encontrado um modelo de comparação.

## **5. Inclusões em $\beta$ -CD de Omeprazole e dois precursores**

5.1. Introdução	75
5.2. Características dos complexos de inclusão	76
Difracção de raios X de pós	77
Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$	78
Espectroscopia vibracional	80
Termogravimetria	81
5.3. Estudos teóricos	83
5.4. Conclusões	85
Referências	86

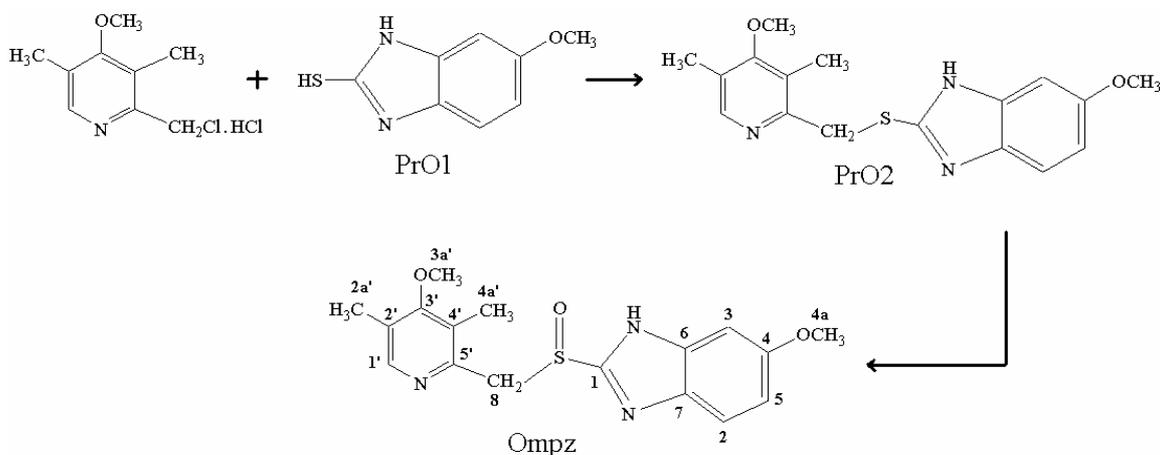
## 5.1. Introdução

O omeprazole (5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil-1H-benzimidazole, Ompz) é um medicamento anti-ácido amplamente utilizado no tratamento de doenças relacionadas com o excesso de acidez gástrica, tais como a úlcera gástrica ou duodenal, a esofagite e o refluxo gastro-esofágico. Actua por inibição da bomba de protões presente nas células da mucosa gástrica reduzindo, assim, a secreção ácida.

Tal como sucedeu com os medicamentos referidos nos capítulos anteriores, também o Ompz tem sido alvo de estudos focando novas potencialidades terapêuticas. Na realidade, foi estabelecida a sua actividade anti-inflamatória [1], nomeadamente na mucosa gástrica. O efeito protector contra a inflamação verifica-se quer esta seja causada por uma infecção pelo *H. Piloni* (bactéria patogénica presente no estômago na maioria dos doentes com úlcera) ou pela administração prolongada de anti-inflamatórios não esteróides que apresentam efeitos secundários nocivos sobre as paredes do estômago. Em face destes novos estudos, pode dizer-se que o omeprazole tem uma dupla acção no tratamento de desordens gástricas envolvendo excesso de acidez, ao reduzir a secreção ácida e também a inflamação da mucosa causada pelos agentes agressivos.

Foram efectuados estudos para investigar o mecanismo de acção do Ompz, tendo-se concluído que ele forma uma ligação covalente com a bomba de protões. Este tipo de enzima também existe nas leveduras, sendo vital para o seu metabolismo [2]. Deste modo, o omeprazole pode ser usado como um fungicida, apresentando actividade contra a levedura *Candida albicans* [3], o agente patogénico mais comum nas infecções fúngicas das mucosas.

A síntese do omeprazole envolve a formação dum tioéter através da reacção dum derivado da 2-clorometilpiridina com um composto mercaptobenzimidazólico, seguida de oxidação para formar um sulfóxido (ver figura 5.1).



**Figura 5.1.** Representação esquemática da síntese do omeprazole (Ompz) evidenciando a estrutura dos seus precursores, PrO1 e PrO2. Mostra-se também a numeração adoptada para os carbonos do Ompz.

O omeprazole é uma base fraca, estável apenas em meio alcalino. A sua sensibilidade à luz, ao calor e a meios ácidos dificulta a preparação de formulações farmacêuticas estáveis. Adicionalmente, a baixa solubilidade em água (cerca de 0.4% a 25°C) traduz-se por reduzidas taxas de dissolução e por uma conseqüente baixa biodisponibilidade [4]. Para minimizar estes problemas recorre-se à inclusão do Ompz em ciclodextrinas, nomeadamente a  $\beta$ -CD e a  $\gamma$ -CD. Estão descritos vários métodos para preparar complexos de inclusão entre o Ompz e as ciclodextrinas: co-precipitação, liofilização, malaxagem e atomização com secagem (spray-drying) [5, 6].

Neste capítulo descreve-se um estudo que procurou compreender a estrutura de inclusão do Ompz na  $\beta$ -CD usando os seus precursores de síntese – PrO1 e PrO2 – como modelo para comparação. Além das técnicas de caracterização em estado sólido, recorreu-se ainda a cálculos *ab initio* para determinar a geometria mais provável dos complexos de inclusão [7].

## 5.2. Características dos complexos de inclusão

A preparação dos complexos de PrO1, PrO2 e Ompz com a  $\beta$ -CD apresentou algumas dificuldades que podem ser tomadas como indicações iniciais da maior ou menor afinidade de cada hóspede para a  $\beta$ -CD hospedeira. Deste modo, apresenta-se a seguir uma breve descrição da sua preparação.

O composto 2-clorometil-4-metoxi-3,5-dimetilpiridina-HCl (representado no canto superior esquerdo da figura 5.1), que é condensado com o PrO1 (2-metoxi-2-mercaptobenzimidazole) para formar o PrO2, também foi considerado como potencial hóspede para a  $\beta$ -CD. Contudo, em todas as tentativas de co-cristalização realizadas apenas se obtiveram cristais de  $\beta$ -CD. A inclusão desta molécula (englobada na estrutura do omeprazole) e a  $\beta$ -CD foi conseguida em solução [8]. Porém, no estado sólido é provável esta interacção não seja estável, conforme indicam o insucesso das várias tentativas de inclusão. Pode então concluir-se que a  $\beta$ -CD inclui o resíduo de benzimidazole da molécula de Ompz e não a piridina substituída.

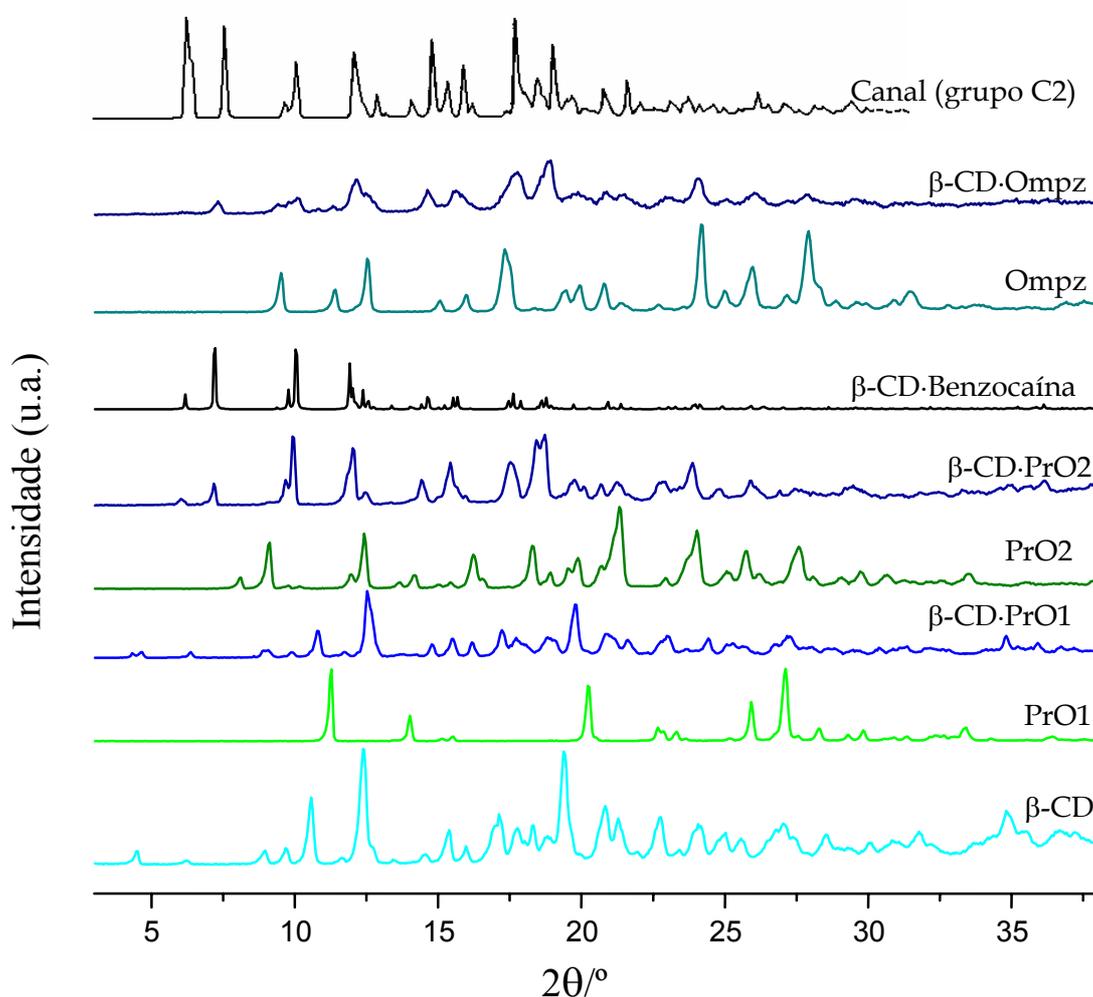
Os hóspedes PrO1 e PrO2 foram dissolvidos em soluções aquecidas de água com um co-solvente para ajudar a sua dissolução. Após adição de  $\beta$ -CD, as soluções foram arrefecidas lentamente e formaram-se pequenos cristais de  $2\beta$ -CD·PrO1 e  $\beta$ -CD·PrO2.

A inclusão do omeprazole não pode ser praticada pelo método da co-cristalização pois a presença de certos co-solventes orgânicos, o calor e a exposição prolongada à água promovem a sua degradação. Para evitar estes problemas, usou-se uma solução aquosa de NaOH a pH = 12 na qual foi dissolvida a  $\beta$ -CD e depois acrescentado o Ompz. Deste modo, pode manter-se uma agitação prolongada que permite a interacção entre o hóspede (em suspensão) e o hospedeiro (dissolvido). O produto  $\beta$ -CD·Ompz foi separado por decantação e armazenado no frigorífico.

Em todas as inclusões usaram-se de quantidades estequiométricas de hóspede e  $\beta$ -CD e obtiveram-se complexos de inclusão 1:1. Os resultados de análise elementar confirmam esta estequiometria (ver mais detalhes na secção experimental). A única exceção foi observada com o complexo  $2\beta$ -CD-PrO1, que apresenta duas ciclodextrinas para cada hóspede.

### *Difracção de Raios X de pós*

O difractograma de  $2\beta$ -CD-PrO1 é bastante semelhante ao da  $\beta$ -CD (ver figura 5.2.), notando-se alterações significativas apenas na intensidade dos picos e mudanças muito subtis nos valores de  $2\theta$ . Tal resultado sugere que neste sistema a  $\beta$ -CD se empacota da mesma forma do que quando é cristalizada em água, ou seja, em espinha de arenque.



**Figura 5.2.** Difractogramas de pós de  $\beta$ -CD, PrO1,  $\beta$ -CD-PrO1, PrO2,  $\beta$ -CD-PrO2,  $\beta$ -CD-Benzocaína (simulação), Ompz,  $\beta$ -CD-Ompz e difractograma simulado que representa complexos de inclusão na forma de canal pertencentes ao grupo espacial C2.

O difractograma calculado para  $\beta$ -CD-Benzocaína foi obtido aplicando o programa Powdercell [9] aos valores das coordenadas atômicas descritos na literatura. Para simplificar os cálculos, as coordenadas do hóspede foram omitidas.

O difractograma que representa os complexos em forma de canal com simetria C2 foi obtido a partir dum trabalho de M. R. Caira [10].

Os complexos  $\beta$ -CD·PrO2 e  $\beta$ -CD·Ompz (figura 5.2.) apresentam padrões de difracção diferentes dos exibidos pelos seus componentes. A formação destes complexos foi acompanhada pela modificação na estrutura de empacotamento da  $\beta$ -CD.

Para melhor se compreender a organização da  $\beta$ -CD nestas estruturas, utilizam-se padrões modelo. O padrão simulado para o complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD e a benzocaína apresenta coincidências notáveis com o de  $\beta$ -CD·PrO2 a ângulos de difracção baixos ( $2\theta$  entre 3 e 20°), indicando que as moléculas de  $\beta$ -CD se empacotam de modo semelhante.

O difractograma de  $\beta$ -CD·Ompz é diferente do apresentado pela  $\beta$ -CD e também do de  $\beta$ -CD·PrO2. Para a sua interpretação, recorreu-se a um trabalho de M. R. Caira que reúne padrões de difracção simulados a partir de dados cristalográficos de complexos de inclusão da  $\beta$ -CD com várias moléculas [10]. Para cada um dos grupo de simetria observados para estes complexos é apresentado um difractograma típico que permite a identificação de novos complexos por comparação. Os pós de  $\beta$ -CD·Ompz apresentam picos de difracção que, embora largos, exibem semelhanças com um padrão descrito por Caira. Este difractograma modelo representa complexos com a  $\beta$ -CD empacotada em canal pertencentes ao grupo de simetria C2. Então, pode inferir-se que o complexo  $\beta$ -CD·Ompz se organiza em canais, tal como  $\beta$ -CD·PrO2. A diferença entre os seus difractogramas é explicada pelo tipo de simetria:  $\beta$ -CD·Ompz pertence ao grupo C2 enquanto que  $\beta$ -CD·PrO2 é do grupo P1.

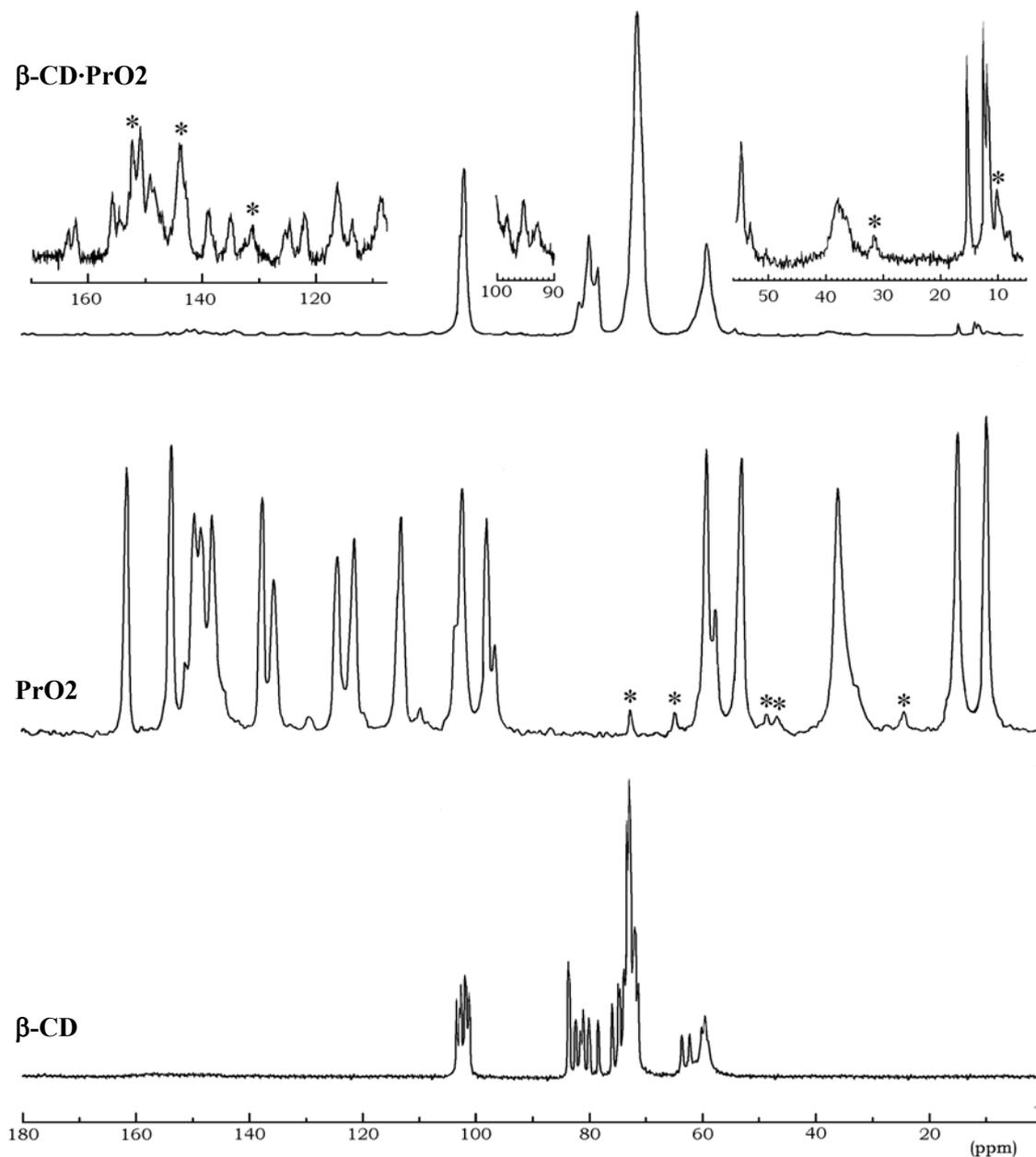
### ***Espectroscopia de RMN de $^{13}C$***

No caso do  $2\beta$ -CD·PrO1 as moléculas de  $\beta$ -CD dão origem a sinais múltiplos, semelhantes aos da ciclodextrina pura. Este resultado está em concordância com o difractograma de raios X, apontando para um sistema onde a  $\beta$ -CD praticamente não altera a sua estrutura com a inclusão do PrO1.

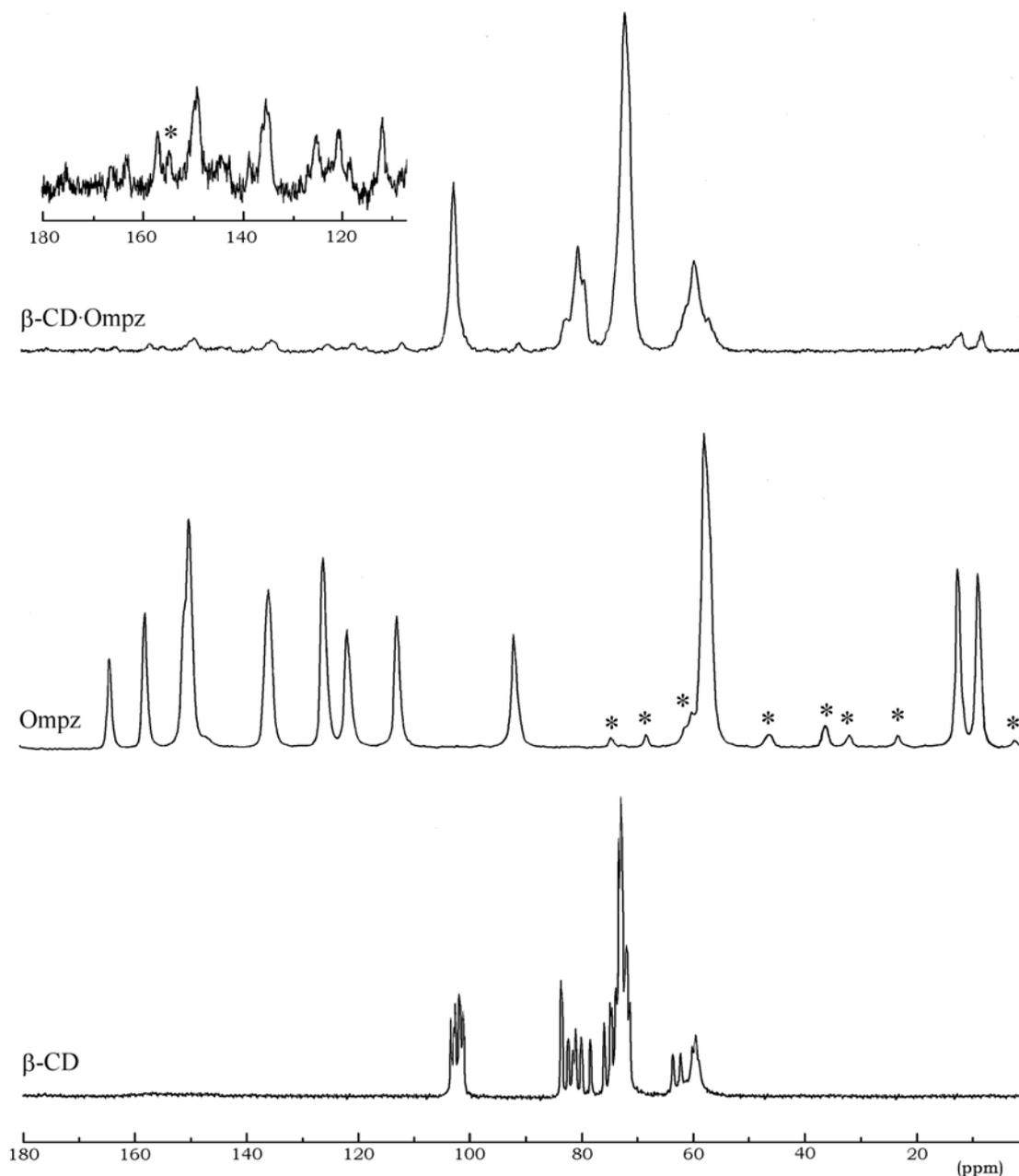
Nos complexos  $\beta$ -CD·PrO2 (ver figura 5.3.) e  $\beta$ -CD·Ompz (figura e 5.4.) os sinais da  $\beta$ -CD surgem muito mais largos e quase sempre como singuletos, indicando maior simetria conformacional no macrociclo. Conforme foi descrito anteriormente, esta característica parece estar associada à inclusão de grupos aromáticos e à associação das ciclodextrinas em forma de canal. Com base nestes resultados e nos difractograma de raios X pode-se concluir que as estruturas de  $\beta$ -CD·PrO2 e de  $\beta$ -CD·Ompz são em canal.

Relativamente aos sinais dos hóspedes, notam-se diferenças assinaláveis entre os espectros de  $\beta$ -CD·PrO2 e  $\beta$ -CD·Ompz. Os sinais relativos aos carbonos aromáticos do PrO2 incluído apresentam um aumento de multiplicidade (relativamente ao espectro do PrO2 não incluído). Este tipo de sinal pode ser associado a um encapsulamento muito justo, com estabelecimento de interacções em várias regiões da molécula incluída que restringem a rotação electrónica dos anéis aromáticos. Recorde-se que foi encontrada uma situação idêntica com o complexo  $2\beta$ -CD·Ibu (estudado no capítulo 3). Por seu turno, os

carbonos do Ompz encapsulado (figura 5.4.) dão origem a sinais praticamente idênticos aos do espectro do Ompz, o que sugere que a interacção desta molécula com a  $\beta$ -CD não é tão forte. Os resultados de espectroscopia vibracional e da análise termogravimétrica (que se apresentam mais adiante) apontam igualmente neste sentido.



**Figura 5.3.** Espectros de RMN CP-MAS  $^{13}\text{C}$  de  $\beta$ -CD, PrO2 e  $\beta$ -CD-PrO2 As bandas marcadas com asterisco (\*) são artefactos.



**Figura 5.4.** Espectros de RMN CP-MAS  $^{13}\text{C}$  de  $\beta$ -CD, Ompz e  $\beta$ -CD-Ompz. As bandas marcadas com asterisco (\*) são artefactos.

### ***Espectroscopia Vibracional***

Para monitorizar a inclusão na  $\beta$ -CD por EIV recorre-se ao estudo das bandas correspondentes a vibrações nos carbonos aromáticos, pois apresentam uma intensidade razoável. Contudo, são menos sensíveis à mudança na polaridade do ambiente como, por exemplo, um grupo carbonilo. A comparação dos espectros de  $2\beta$ -CD-PrO1 e de PrO1 permite observar pequenas alterações em duas bandas do PrO1 após a inclusão. De facto, um duplete com máximos localizados a  $1474$  e  $1464\text{ cm}^{-1}$  surge desviado para o vermelho,

com máximos a 1463 e 1455  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Estas vibrações, provavelmente associadas a deformações angulares C-H, reflectem uma forte interação com a  $\beta$ -CD.

A inclusão de PrO2 traduz-se também por alterações nas frequências de alguns modos vibracionais do hóspede, que estão resumidas na tabela 5.1.

<i>PrO2</i>		<i><math>\beta</math>-CD·PrO2</i>	<i>Descrição aproximada</i>
<i>V observada</i>	<i>V calculada</i>	<i>V observada</i>	
1636	1840	1631	$\nu$ C $\equiv$ C do benzimidazole
1594	1803	1591	$\nu$ C $\equiv$ C e $\nu$ C $\equiv$ N da piridina
1437	1616	1433	Oscilação longitudinal C-H e deformação angular CH <sub>3</sub> (carbono 4a) no anel de benzimidazole
1404	1589	1411	deformação angular H-C-H do CH <sub>2</sub> que une os dois anéis

**Tabela 5.1.** Frequências vibracionais ( $\text{cm}^{-1}$ ) seleccionadas para o PrO2 comparadas com os valores calculados e com aqueles observados em  $\beta$ -CD·PrO2. Sobre as atribuições aqui feitas, ver José J. C. Teixeira Dias, in “Espectroscopia Molecular – Fundamentos, Métodos e Aplicações” Ed Gulbenkian, 1986.

Embora pequenos, os desvios nas frequências apontadas na tabela mostram a influência do ambiente hidrófobo da cavidade da  $\beta$ -CD sobre o PrO2, principalmente no anel benzimidazólico. Este resultado aponta para uma geometria de inclusão envolvendo esta fracção da molécula. Note-se ainda que o resíduo de piridina, embora não esteja incluído na cavidade  $\beta$ -CD, também sofre alterações numa banda vibracional. Este efeito de “canal” foi também encontrado no sistema  $2\beta$ -CD·4*p*-HB (capítulo 2) e reflecte a elevada estabilidade do complexo.

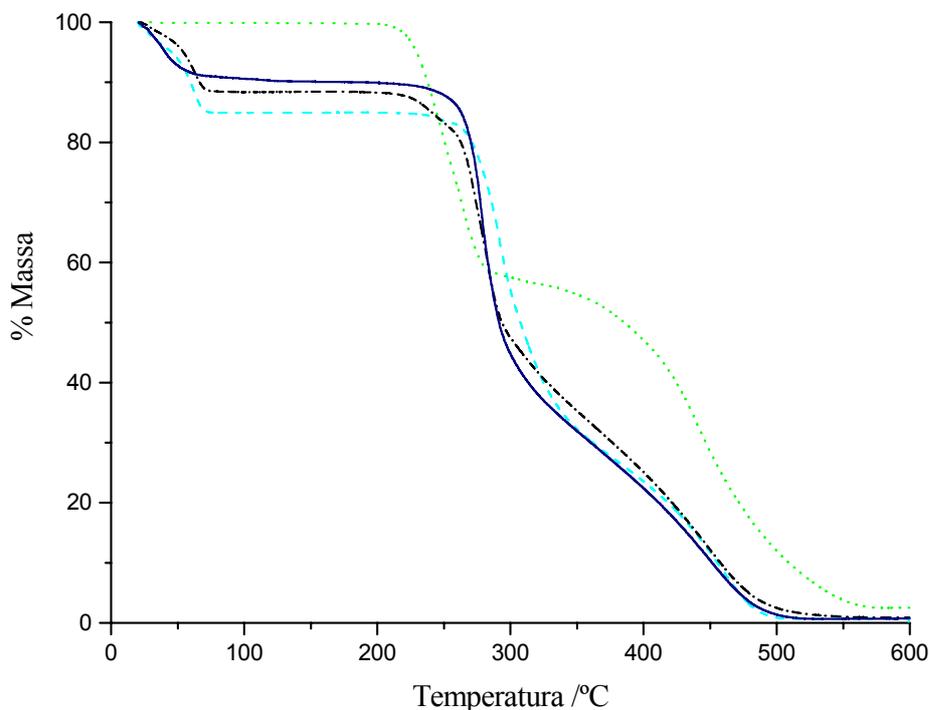
O espectro de  $\beta$ -CD·Ompz apresenta as bandas da ciclodextrina e bandas correspondentes às vibrações do Ompz, mas não se regista qualquer modificação na sua frequência. Este resultado aponta para uma interacção hóspede – hospedeiro mais fraca do que no caso de  $\beta$ -CD·PrO2, e está em concordância com o que foi observado em RMN CP-MAS de <sup>13</sup>C.

### **Termogravimetria**

O PrO1 inicia a sua decomposição cerca dos 210 °C, degradando-se em duas fases até cerca dos 550 °C. Porém, quando se encontra incluído na  $\beta$ -CD começa a decompor-se aos 170°C e o processo decorre de forma mais gradual, o que pode ser explicado pela estrutura proposta para este complexo. Cada molécula de PrO1 está isolada das suas vizinhas por uma malha formada pela  $\beta$ -CD, sendo possível a sua sublimação a temperatura inferior. Na mistura física esta fenómeno não se verifica, iniciando-se a decomposição do PrO1 praticamente à mesma temperatura do que no composto puro.

O complexo  $\beta$ -CD·PrO2 apresenta um comportamento semelhante na medida em que também se verifica a sublimação do hóspede (PrO2) a temperatura mais baixa do que no composto puro e na mistura física ( $T_{\text{subl}} \approx 200^\circ\text{C}$ ). Curiosamente, o efeito é ainda mais

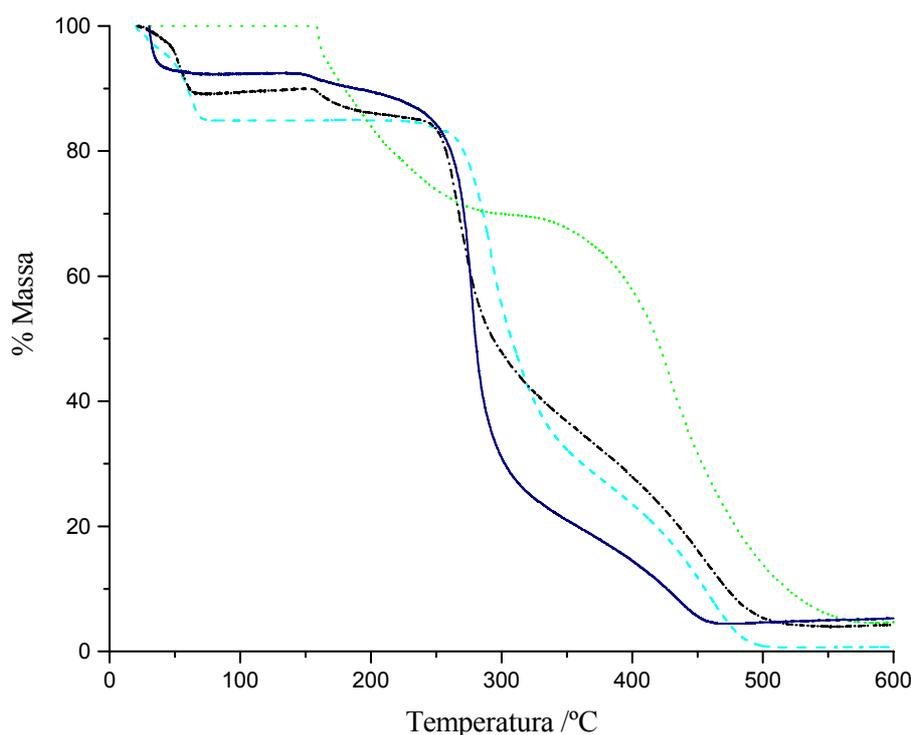
extenso do que no caso de  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{PrO1}$  (ver figura 5.5), uma vez que a perda de massa atribuída à saída de PrO2 se inicia logo após a desidratação da  $\beta\text{-CD}$ , cerca dos  $70^\circ\text{C}$ .



**Figura 5.5.** Termogramas de  $\beta\text{-CD}\cdot\text{PrO2}$  (—), do hópode PrO2 (---), da  $\beta\text{-CD}$  (- - -) e da mistura física 1:1 de  $\beta\text{-CD}$  e de PrO2 (- · - ·)

Em contraste com os termogramas anteriores, o traçado de  $\beta\text{-CD}\cdot\text{Ompz}$ , representado na figura 5.6, mostra a decomposição do omeprazole a cerca de  $155^\circ\text{C}$ . Os termogramas do Ompz puro e da mistura física mostram igualmente que a primeira perda de massa ocorre a esta temperatura.

A única diferença observável é que no complexo a perda de massa associada a esta degradação se processa de forma suave e progressiva, enquanto que na mistura física ela ocorre de forma abrupta. Em conjunto com as observações feitas a partir dos resultados de RMN e espectroscopia vibracional no IV, estes dados indicam que a interacção entre a  $\beta\text{-CD}$  e o Ompz é fraca.



**Figura 5.6.** Termogramas de  $\beta$ -CD·Ompz (—), do hóspede Ompz (---), da  $\beta$ -CD (---) e da mistura física 1:1 de  $\beta$ -CD e de Ompz (---)

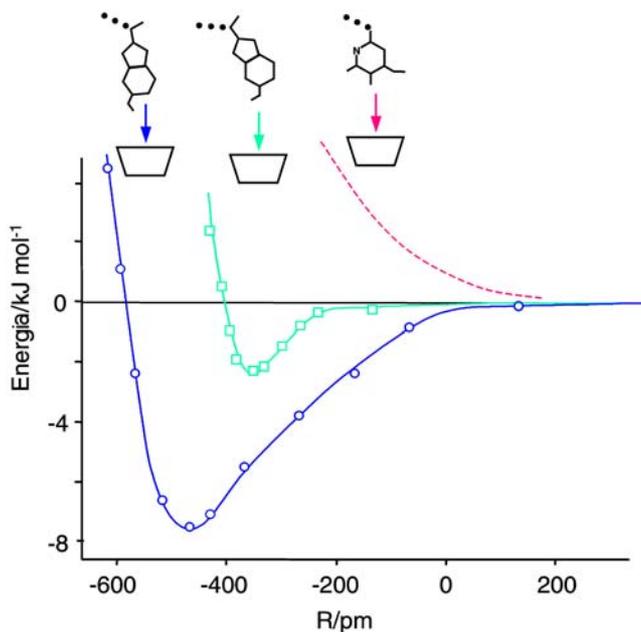
### 5.3. Estudos teóricos

O omeprazole apresenta flexibilidade de rotação em torno das ligações C1-S-C8-C5' e também orientações possíveis para os grupos metoxilo. De todas as conformações estudadas, a de mais baixa energia apresenta-se estendida e assemelha-se bastante à estrutura do Ompz determinada por DRX de monocristal [11]. A única diferença reside na orientação do metoxilo ligado ao C4. As duas estruturas foram usadas para testar a possibilidade de inclusão do Ompz na  $\beta$ -CD, calculando-se a energia de interação para cada uma. Foi ainda averiguada a possibilidade de inclusão do fragmento de piridina. Os resultados estão apresentados na figura 5.7.

Conforme se previa, a interação com o resíduo de piridina mostra-se repulsiva (esquema da direita no topo da figura 5.7). De facto, a presença de vários substituintes torna este fragmento demasiado volumoso para formar um complexo com a  $\beta$ -CD. Adicionalmente, deve recordar-se que as várias tentativas de incluir esta molécula se revelaram infrutíferas (para mais detalhes consultar a secção experimental).

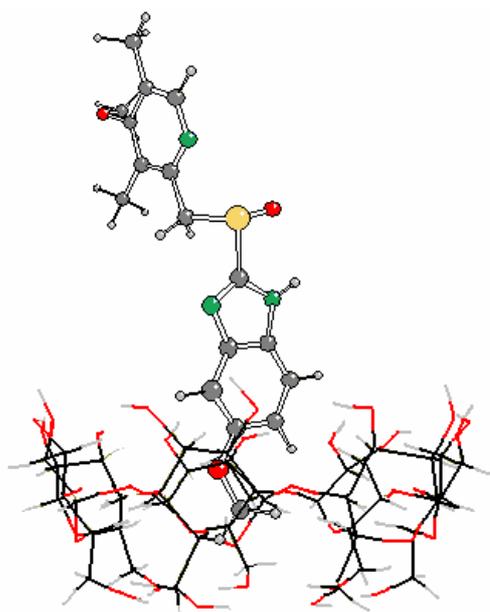
Por outro lado, a inclusão do fragmento de benzimidazole é energeticamente favorável, embora esteja dependente da orientação do grupo metoxilo em C4. Assim, se a orientação C5-C4-O-C4a for de  $180^\circ$ , o fragmento apresenta uma forma que não permite uma penetração profunda na cavidade hospedeira (esquema do centro na figura 5.7). Deste modo, a interação será fraca. A orientação C5-C4-O-C4a =  $0^\circ$  observada na

estrutura cristalina do Ompz origina uma forma mais favorável para a inclusão, com um melhor ajuste entre hóspede e hospedeiro (ver esquema da esquerda na figura 5.7. e figura 5.8).



**Figura 5.7.** Variação da energia em função da distância hóspede-hospedeiro no complexo  $\beta$ -CD-Ompz. R define a distância entre o plano formado pelos átomos de hidrogênio dos OH secundários da  $\beta$ -CD e o átomo de hidrogênio da molécula de omeprazole que mais se aproxima do plano. Valores negativos de R indicam uma inclusão.

Este resultado pode também serve de modelo para a inclusão do PrO2, visto que as suas estruturas são muito semelhantes e que a interação é feita através do fragmento comum de benzimidazole. Adicionalmente, a molécula de PrO2 apresenta maior flexibilidade em torno da ligação C1-S-C8-C5' porque o enxofre não está envolvido numa ligação S=O (caso do Ompz) que a torna mais rígida. Deste modo, a molécula poderá ajustar a orientação do fragmento de piridina para permitir uma mais estreita interação com a  $\beta$ -CD, tal como indicam os resultados experimentais.



**Figura 5.8.** Representação esquemática da estrutura de menor energia calculada para o sistema  $\beta$ -CD-Ompz

## 5.4. Conclusões

A  $\beta$ -CD inclui os compostos PrO1, PrO2 e Ompz, que formam uma série de dimensões crescentes. Curiosamente, a estequiometria hóspede : hospedeiro observada varia na função inversa. Na realidade, os dois hóspedes maiores – PrO2 e Ompz – formam complexos 1:1 enquanto que cada molécula do mais pequeno (PrO1) se complexa com duas de  $\beta$ -CD. Este resultado algo inesperado ilustra a dificuldade em estabelecer um padrão que permita prever a estequiometria com base nas dimensões da molécula hóspede.

No que diz respeito à geometria, os complexos apresentam dois diferentes tipos de estrutura. Assim, enquanto os DRX e espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  apontam para um complexo  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{PrO1}$  com uma rede organizada de forma similar à da própria  $\beta$ -CD, os sistemas  $\beta\text{-CD}\cdot\text{PrO2}$  e  $\beta\text{-CD}\cdot\text{Ompz}$  empacotam em canais formados por dímeros de ciclodextrinas. Contudo, no caso do Ompz a interacção com o hospedeiro é mais ténue. A diferença no comportamento da  $\beta$ -CD face à inclusão de duas moléculas tão semelhantes como são o PrO2 e o Ompz é difícil de explicar considerando factores estruturais e geométricos. Nesta perspectiva, a única diferença entre as duas moléculas reside na ligação entre os anéis de piridina e benzimidazole, que no PrO2 é feita por um grupo tiol enquanto no Ompz é feita por um  $>\text{S}=\text{O}$ , menos flexível. A maior estabilidade do complexo  $\beta$ -CD e PrO2 resultaria da grande liberdade rotacional em torno da ligação tiol e também da deformação do ângulo desta ligação, que lhe permitiria um maior ajuste à cavidade hospedeira. L. Cunha-Silva encontrou resultados semelhantes com a inclusão dum alcoxi-etanol denominado C12E4. A parte hidrocarbonada do C12E4 é incluída por duas CDs. Para estabilizar o complexo a cadeia fica ligeiramente curvada para aumentar os contactos H - H com as CDs [12]. Porém, no caso do Ompz parece pouco lógico que a menor flexibilidade relativamente a PrO2 seja o único factor responsável pela menor estabilidade da inclusão. Assim, deverá ressaltar-se a diferença significativa no método de preparação dos complexos. O PrO2 foi completamente dissolvido em água. Este meio permite uma boa interacção com a  $\beta$ -CD visto que também ela está em solução. No caso do Ompz a dissolução leva à degradação da molécula, tendo-se proporcionado o “encontro” com a ciclodextrina através duma fina suspensão em água. Este processo não permite uma interacção tão perfeita entre hóspede e hospedeiro, formando-se igualmente um complexo de inclusão, mas menos estável.

## Referências

1. N. Yoshida, T. Yoshikawa, Y. Tanaka, N. Fujita, K. Kassai, Y. Naito, M. Kondo, *Aliment. Pharm. Therap.* **14**, 74 (2000) e referências nele citadas.
2. D. Seto-Young, B. C. Monk, A. B. Mason, D. S. Perlin, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* **1326**, 249 (1997).
3. B. C. Monk, A. B. Mason, G. Abramochkin, J. E. Haber, D. Seto-Young, D. S. Perlin, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* **1239**, 81 (1995).
4. J. Martinez-Gorotiaga, M. J. Alfaro, M. A. Betran, M. Mendaza, *Farm. Hosp.* **16**, 33 (1992).
5. I. Kolbe, K. Csabai, L. Szente, J. Szejtli, *Proceedings of the 10th International Symposium on Cyclodextrins* (1998), Ann Arbour, MI (USA).
6. M. J. Arias, J. R. Moyano, P. Munoz, J. M. Gines, A. Justo, F. Giordano, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **26**, 253 (2000).
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 "Solid state interactions of omeprazole and precursors with  $\beta$ -cyclodextrin host molecules" *J. Incl. Phen.*, submetido (2003).
8. L. Marzocchi, J. R. Moyano, A. Rossi, P. Muñoz, M. J. Arias, F. Giordano, *Biolog. J. Armenia, special issue: Cyclodextrins*, 176-193 (2001).
9. W. Kraus, G. Nolze, *J. Appl. Crystallogr.* **29**, 301 (1996).
10. M. R. Caira, *Revue Roum. Chim.* **46**, 371-386 (2001).
11. H. Ohishi, Y. In, T. Ishida, M. Inoue, *Acta Crystallogr. Sect. C* **45**, 1921 (1989).
12. L. Cunha-Silva, J. J. C. Teixeira-Dias, *J. Phys. Chem. B* **106**, 3323-3328 (2002).

# Capítulo 6

## Capítulo 6

**Inclusão de organometálicos,  
uma questão de tamanho**

São apresentados seis compostos organometálicos, formando duas séries de núcleo metálico idêntico e estruturas semelhantes, com pequenos incrementos de dimensão dentro da mesma série. Todos eles formam complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD embora os de maiores dimensões apresentem pouca estabilidade. A maioria das estruturas obtidas apresenta empacotamento em canal. O composto  $\text{CpMo}_2$ , com um substituinte  $\text{SiMe}_3$  volumoso, não permite este tipo de organização do hospedeiro. O  $\text{FeCN}_2$ , de dimensões ainda maiores, apresenta estequiometria mal definida sendo possível a coexistência de complexos com uma ou duas  $\beta$ -CDs para cada hóspede, pelo que se torna difícil conhecer a sua estrutura. Cálculos teóricos determinam a estrutura dos ferrocianetos e permitem compreender melhor a natureza das interações entre eles e a  $\beta$ -CD com base em factores energéticos e geométricos.

## 6. Inclusão de organometálicos, uma questão de tamanho

6.1. Introdução	89
6.2. Características dos complexos de inclusão	90
Difracção de raios X de pós	91
Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$	92
Espectroscopia vibracional	94
Termogravimetria	95
6.3. Cálculos <i>ab initio</i>	96
6.4. Conclusões	98
Referências	100

## 6.1. Introdução

Os metais de transição formam complexos com uma variedade quase infinita de ligandos orgânicos. Os compostos que apresentam ligações metal - carbono são denominados *compostos organometálicos*. Muitas vezes, os ligandos estão covalentemente ligados ao centro metálico e formam a *primeira esfera* de coordenação. A capacidade de coordenação do metal pode estender-se também para além da primeira esfera, dando origem a ligações do tipo não-covalente com outras espécies químicas que constituem a *segunda esfera* de coordenação [1]. As forças mais importantes para a formação da segunda esfera são as interações fracas, como as de Van der Waals ou as interações de transferência de carga.

As ciclodextrinas apresentam características apropriadas para se coordenarem com organometálicos na segunda esfera [2]. Hóspedes contendo ligandos hidrofóbicos, como o ciclopentadienilo ( $\text{Cp} = \eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$ ), apresentam grande tendência para a inclusão. São conhecidos complexos de ciclodextrinas com ferrocenos e seus derivados [3, 4, 5], dihalogenetos de titanocenos [6], compostos aromáticos de ruténio do tipo  $\text{Cp}_2\text{Ru}$  ou  $\text{CpRuInd}$  [7], sistemas mistos tais como  $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)]\text{PF}_6$  [8] e também  $\text{FeCp}(\text{CO})_2\text{Me}$  [9, 10] e  $\text{MnCp}(\text{CO})_3$  [11], apenas para nomear alguns.

Neste capítulo descrevem-se os resultados obtidos da associação de  $\beta\text{-CD}$  com compostos de molibdénio e com ferrocianetos [12].

- ✓ Os compostos de molibdénio são do tipo  $\text{Cp}'\text{Mo}(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)(\text{CO})_2$  e denominam-se  $\text{CpMo1}$  ( $\text{Cp}' = \text{ciclopentadienilo}$ ),  $\text{CpMo2}$  ( $\text{Cp}' = \text{C}_5\text{H}_4\text{SiMe}_3$ ) e  $\text{IndMo}$  ( $\text{Cp}' = \text{indenilo}$ ), ver figura 6.1 (topo).
- ✓ Os ferrocianetos são o  $\text{FeCN1}$  ( $\text{CpFe}(\text{CO})_2\text{CN}$ ), o  $\text{FeCN2}$  ( $\text{CpFe}[\text{dppe}]\text{CN}$ ) e o  $\text{KFeCN}$  ( $[\text{K}[\text{CpFe}(\text{CO})(\text{CN})_2]]^-$ ), igualmente representados na figura 6.1 (parte de baixo).

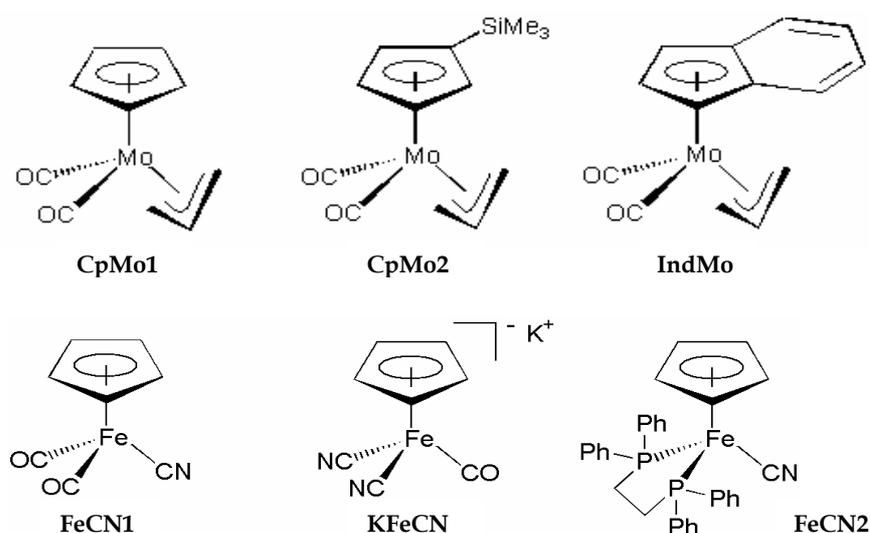


Figura 6.1. Representação esquemática dos organometálicos descritos neste capítulo.

Havendo grande afinidade entre os hóspedes organometálicos e a cavidade hidrófoba das ciclodextrinas, os complexos de inclusão resultantes são bastante estáveis e rápidos de obter. Uma possível exceção a esta tendência será a inclusão de organometálicos com substituintes muito volumosos. Este fenómeno será explorado durante o desenvolvimento do capítulo, com base na caracterização estrutural e nos resultados de cálculos computacionais.

## 6.2. Características dos compostos de inclusão

A maioria dos hóspedes estudados neste capítulo não é solúvel em água. Assim, a inclusão de CpMo1, CpMo2, IndMo, FeCN1 e FeCN2 consistiu em misturar quantidades estequiométricas de  $\beta$ -CD (dissolvida em água) e de hóspede (dissolvido em diclorometano). Após cerca de duas horas de agitação com aquecimento ligeiro (40°C) formou-se um precipitado na interface. O seu isolamento foi feito por filtração com uma ou duas lavagens. Os complexos contendo molibdénio foram armazenados em atmosfera de azoto (ver detalhes na secção experimental).

No caso de FeCN2, obteve-se apenas  $\beta$ -CD no final das lavagens. Este resultado indica uma inclusão fraca, possivelmente devido ao grande volume da molécula hóspede. Assim, a maior parte da molécula ficará necessariamente no exterior da cavidade da ciclodextrina, sendo arrastada pela lavagem com diclorometano. Para preparar  $\beta$ -CD·FeCN2 repetiu-se a inclusão aumentando o tempo de agitação para 24 horas e isolando o precipitado da interface diclorometano/água por decantação da fase aquosa. O composto  $\beta$ -CD·FeCN2 ficou como sobrenadante, tendo sido removido com uma espátula.

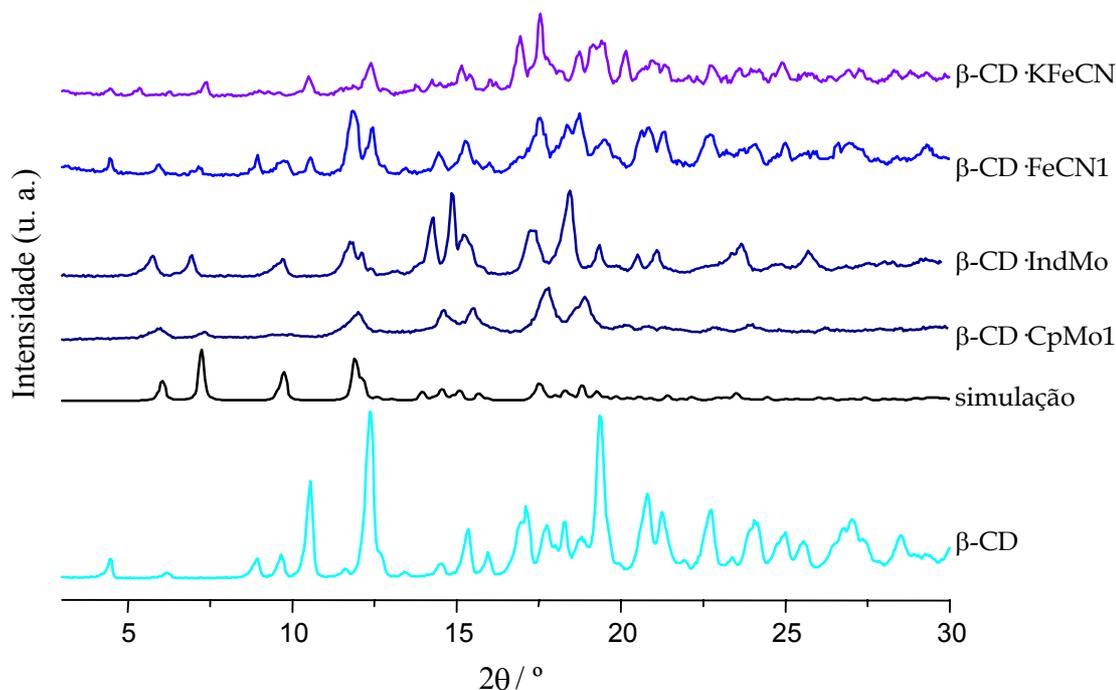
O composto KFeCN é um sal e dissolve facilmente na água. Para o incluir na  $\beta$ -CD usou-se o vulgar método de co-cristalização a partir duma solução aquosa mista.

Os produtos obtidos apresentam todos estequiometria 1:1 que foi confirmada por análise elementar e determinação do metal. Este resultado é semelhante aos que foram encontrados na literatura sobre outros organometálicos contendo ciclopentadienilo: os compostos CpFe(CO)<sub>2</sub>Me [9, 10], CpFe(CO)<sub>2</sub>X (X = Cl, I) [13] e [CpFe(CO)<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>][PF<sub>6</sub>] [14] também formam complexos 1:1 com a  $\beta$ -CD.

A única exceção ocorreu com o complexo  $\beta$ -CD·FeCN2, que não foi obtido numa forma analiticamente pura. Tal resultado constitui mais uma indicação de que a interacção entre o FeCN2 e a  $\beta$ -CD é fraca. Díaz e Arancibia, num estudo sobre a interacção da  $\beta$ -CD com o CpFe(dppe)I em solução de DMSO por espectroscopia de absorção no UV-Vis, verificaram a formação de um complexo 1:1 com uma constante de associação baixa, de valor  $K_{app} = 4.8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ . Note-se ainda que estes autores observaram uma estequiometria de inclusão 1:1 bem definida [13] ao contrário dos resultados obtidos com  $\beta$ -CD·FeCN2.

### Difracção de Raios X de pós

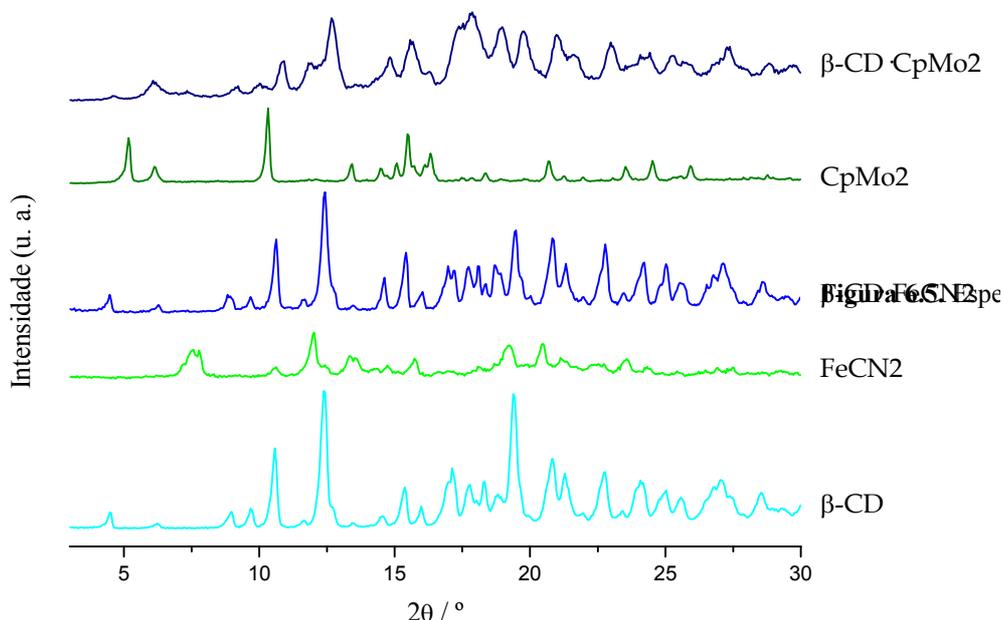
Os difractogramas de raios X obtidos para os complexos  $\beta$ -CD·CpMo1,  $\beta$ -CD·IndMo,  $\beta$ -CD·FeCN1 e  $\beta$ -CD·KFeCN, representados na figura 6.2, apresentam todos padrões diferentes dos registados para a  $\beta$ -CD e para cada hóspede (não apresentados na figura). Este fenómeno constitui uma medida indirecta da formação de verdadeiros complexos de inclusão. A figura apresenta ainda um outro difractograma, obtido por simulação a partir dos dados cristalográficos do complexo de inclusão de  $\beta$ -CD e  $[\text{CpFe}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{R})]\text{PF}_6$ , com R = bifenilo [8c]. A estrutura deste complexo determinada por difracção de raios X de monocristal apresenta canais formados por dímeros de  $\beta$ -CDs (cabeça com cabeça) empilhadas ao longo do eixo cristalográfico *c*. A posição exacta do hóspede no interior destes dímeros não pode ser determinada devido a desordem. Comparando o padrão simulado com aqueles obtidos para  $\beta$ -CD·CpMo1 e  $\beta$ -CD·IndMo (figura 6.2) nota-se uma grande semelhança, especialmente a ângulos baixos ( $2\theta$  entre 3 e 20°), sugerindo que estes complexos apresentam um empacotamento em canal.



**Figura 6.2.** Difractogramas de raios X de  $\beta$ -CD, dos complexos  $\beta$ -CD·CpMo1,  $\beta$ -CD·IndMo,  $\beta$ -CD·FeCN1,  $\beta$ -CD·KFeCN e difractograma simulado a partir das coordenadas cristalográficas do complexo  $[\text{FeCp}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{R})]\text{PF}_6$ , com R = bifenilo

Por oposição, os difractogramas obtidos para  $\beta$ -CD·CpMo2 e  $\beta$ -CD·FeCN2 apresentam um padrão muito semelhante ao da  $\beta$ -CD, como se pode ver na figura 6.3. Embora sejam semelhantes aos do hospedeiro, estes picos estão ligeiramente deslocados para valores mais elevados de  $2\theta$ . Note-se ainda que não surgem picos correspondentes aos organometálicos MoC2 e FeCN2 (ou seja, não há nem vestígios duma fase correspondente ao hóspede puro). Isto significa que os hóspedes foram incluídos na

ciclodextrina com sucesso, mas este processo que não alterou significativamente a sua estrutura de empacotamento.

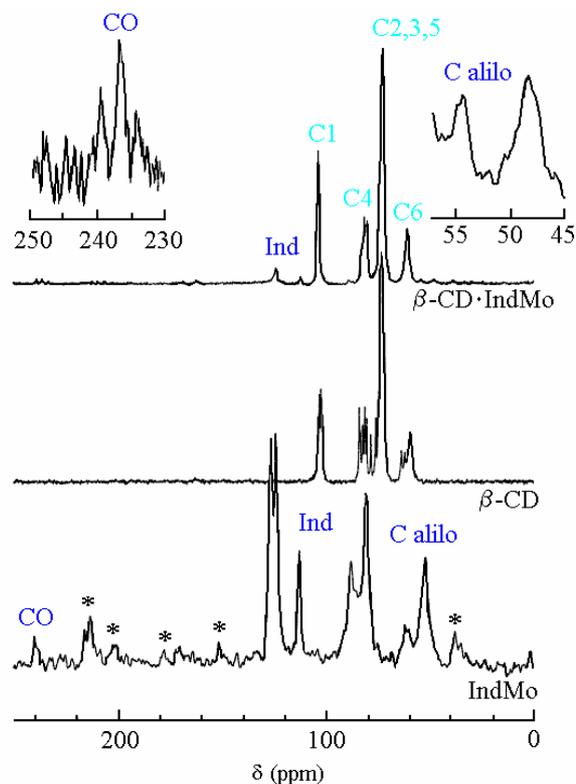


**Figura 6.3.** Difractogramas de raios X de  $\beta\text{-CD}$ , de  $\text{FeCN}_2$ ,  $\beta\text{-CD}\cdot\text{FeCN}_2$ ,  $\text{CpMo}_2$  e  $\beta\text{-CD}\cdot\text{CpMo}_2$

### *Espectroscopia de RMN*

Os espectros dos complexos  $\beta\text{-CD}\cdot\text{CpMo}_1$  (figura 6.4),  $\beta\text{-CD}\cdot\text{IndMo}$ ,  $\beta\text{-CD}\cdot\text{FeCN}_1$  (figura 6.5) e  $\beta\text{-CD}\cdot\text{KFeCN}$  têm em comum a presença de sinais largos (na maioria singuletos) na região das ressonâncias da ciclodextrina. Conseqüentemente, em todos eles o macrociclo apresenta uma conformação mais simétrica. Conforme foi descrito para a inclusão de moléculas orgânicas, este efeito pode associar-se à presença dum grupo aromático no interior da cavidade hospedeira. Adicionalmente, sugere empacotamento em canal, em concordância com os difractogramas de pó dos complexos de inclusão contendo molibdênio.

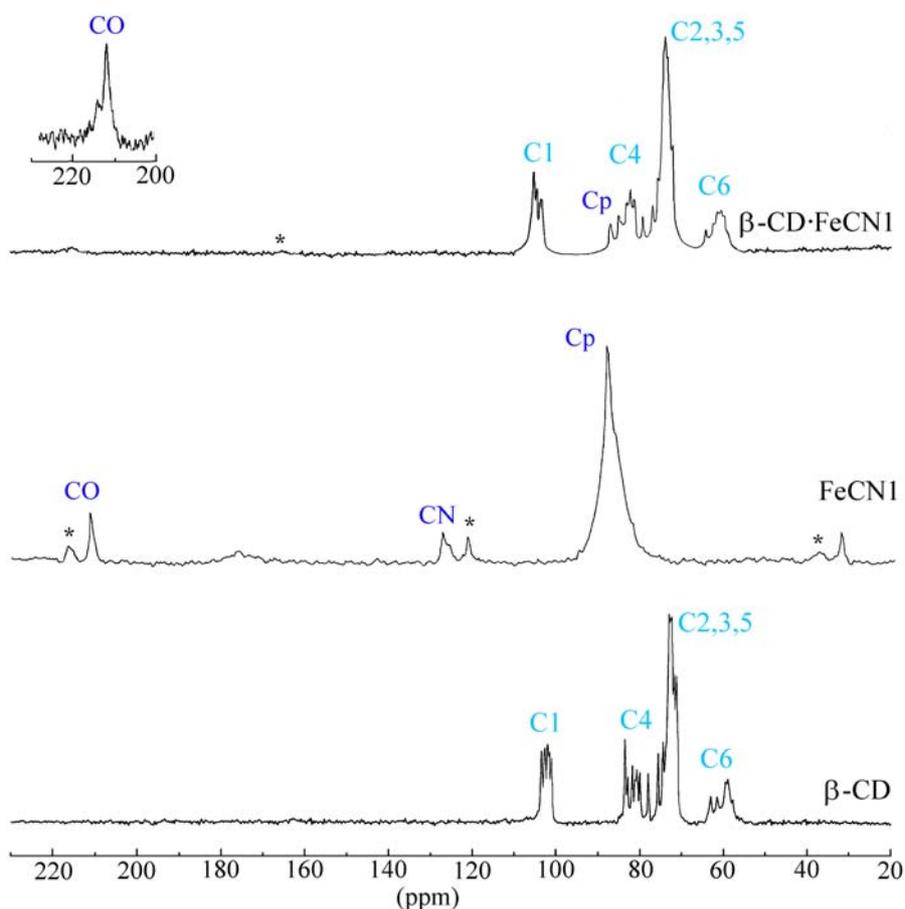
No que diz respeito às ressonâncias atribuídas aos diferentes átomos do



**Figura 6.4.** Espectros de RMN CP-MAS de  $^{13}\text{C}$  de IndMo,  $\beta\text{-CD}$  e  $\beta\text{-CD}\cdot\text{IndMo}$

hóspedes, destacam-se os sinais correspondentes aos carbonilos de CpMo1 (figura 6.4.) e IndMo. Em cada espectro, observa-se um singlete para os dois carbonilos (236,0 e 236,8 ppm, respectivamente) deslocado para campo alto em relação ao do hóspede (238,9 e 240,1 ppm) e com valor semelhante ao dos espectros de solução (CDCl<sub>3</sub>) dos organometálicos (237,1 e 237,5 ppm). Este desvio indica que nestes complexos de inclusão cada hóspede está individualizado na cavidade da β-CD.

Nos complexos β-CD·FeCN1 e β-CD·KFeCN a inclusão na β-CD resulta num efeito protector que se faz sentir particularmente sobre o ciclopentadienilo. De facto, os espectros de RMN (figura 6.5.) apresentam o Cp desviado para campo alto (85,8 ppm em β-CD·FeCN1 e 82,5 ppm em β-CD·KFeCN) quando comparados com os espectros dos hóspedes (Cp a 87,0 e 83,6 ppm, respectivamente).



**Figura 6.5.** Espectros de RMN CP-MAS de <sup>13</sup>C de β-CD, FeCN1 e β-CD·FeCN1

Os complexos β-CD·CpMo2 e β-CD·FeCN2 apresentam multipletos na região das ressonâncias da β-CD, muito semelhantes aos registados para a ciclodextrina pura. Em concordância com o que foi observado nos difractogramas de raios X, estes resultados sugerem que a estrutura hospedeira sofre poucas alterações com a inclusão.

## *Espectroscopia Vibracional*

Os hóspedes estudados neste capítulo apresentam grupos CO e CN, bons indicadores das interações hóspede-hospedeiro. A banda correspondente aos grupos CO dos compostos de molibdénio apresenta alterações de frequência, resumidas na tabela 6.1.

Composto	$\nu_{\text{CO}}^a/\text{cm}^{-1}$	$\Delta\nu_{\text{CO}}/\text{cm}^{-1}$
MoC1 <sup>b</sup>	1924, 1849	—
$\beta\text{-CD}\cdot\text{MoC1}$	1945, 1869	21, 20
MoC2 <sup>c</sup>	1923, 1849	—
$\beta\text{-CD}\cdot\text{MoC2}$	1949, 1870	26, 21
IndMo	1914, 1851	—
$\beta\text{-CD}\cdot\text{IndMo}$	1943, 1864	29, 13

**Tabela 6.1.** Frequência da vibração do C≡O nos compostos de molibdénio e respectivos complexos de inclusão. <sup>a</sup> Espectro de estado sólido (KBr). <sup>b</sup> Espectro de solução (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) apresenta CO a 1946, 1859. <sup>c</sup> Espectro de solução (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) apresenta CO a 1946, 1861.

Comparando as frequências vibracionais do CO dos organometálicos incluídos na  $\beta\text{-CD}$  com aquelas registadas em soluções de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, observam-se valores muito semelhantes. Em contraste, os compostos sólidos apresentam frequências  $\nu_{\text{CO}}$  mais baixas, com desvios de 13 a 30 cm<sup>-1</sup>. Este facto sugere a existência de uma interação intermolecular no estado sólido, que não se verifica em solução. A inclusão na  $\beta\text{-CD}$  provoca um efeito semelhante, dissociando-se as ligações intermoleculares para se encontrar cada molécula de hóspede individualizada dentro da  $\beta\text{-CD}$ .

Relativamente aos ferrocianetos, observaram-se também alterações na estrutura e na frequência vibracional do carbonilos e dos cianetos (tabela 6.2).

Composto	$\nu(\text{C}\equiv\text{O})^a/\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})^a/\text{cm}^{-1}$
FeCN1	2056, 2006	2118
FeCN1· $\beta\text{-CD}$	2045, 2003	2124
FeCN2	—	2063
FeCN2· $\beta\text{-CD}$	—	2056, 2069
KFeCN <sup>b</sup>	1952, 1972	2084, 2095
KFeCN· $\beta\text{-CD}$	1970	2050, 2092

**Tabela 6.2.** Frequência das vibrações do C≡O e do C≡N nos ferrocianetos e respectivos complexos de inclusão. <sup>a</sup> Espectro de estado sólido em KBr ( $\nu_{\text{sim}}$ ,  $\nu_{\text{assim}}$ ). <sup>b</sup> Espectro de estado sólido em KBr [15]  $\nu(\text{C}\equiv\text{O}) = 1950, 1970 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}\equiv\text{N}) = 2080 \text{ cm}^{-1}$ .

De facto, estas bandas apresentam-se mais afiladas quando os ferrocianetos estão incluídos na ciclodextrina. Nos hóspedes puros, estas vibrações observam-se como bandas largas, provavelmente devido à presença de interações intermoleculares (contactos CH<sup>⋯</sup>O e CH<sup>⋯</sup> $\pi$ , descritos em vários organometálicos com grupos carbonilo e ciclopentadienilo [16]).

A inclusão do FeCN1 na  $\beta$ -CD origina um desvio da banda  $\nu(\text{CO})$  para uma frequência menor e um aumento da frequência de alongação do grupo cianeto. Este fenómeno pode ser explicado pela presença de pontes de hidrogénio entre os carbonilos e os grupos OH da  $\beta$ -CD. O grupo cianeto não participa em pontes de hidrogénio, ficando sujeito ao ambiente apolar da cavidade da ciclodextrina. Como consequência, apresenta menor grau de polarização do que em FeCN1, o que se traduz numa maior frequência para a alongação  $\text{C}\equiv\text{N}$ .

Relativamente ao composto FeCN2  $\beta$ -CD, observa-se a presença de duas bandas de absorção para a alongação  $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ . No composto FeCN2 apenas se observa uma, o que está de acordo com a presença de um único grupo cianeto nesta molécula. O desdobramento da banda como resultado da inclusão pode ser explicado pela presença de uma mistura de produtos em FeCN2  $\beta$ -CD, provavelmente complexos de inclusão com diferentes estequiometrias hóspede :  $\beta$ -CD como 1:1 e 1:2. Este fenómeno será descrito mais em pormenor nos próximos parágrafos.

O aparecimento de desdobramento na banda do carbonilo do complexo KFeCN pode dever-se a efeitos de rede cristalina ou de ressonância de Fermi. A inclusão, acompanhada pela individualização de cada molécula de KFeCN dentro duma de  $\beta$ -CD, faz desaparecer este efeito, sendo apenas observável uma banda única para a alongação  $\text{C}\equiv\text{O}$ .

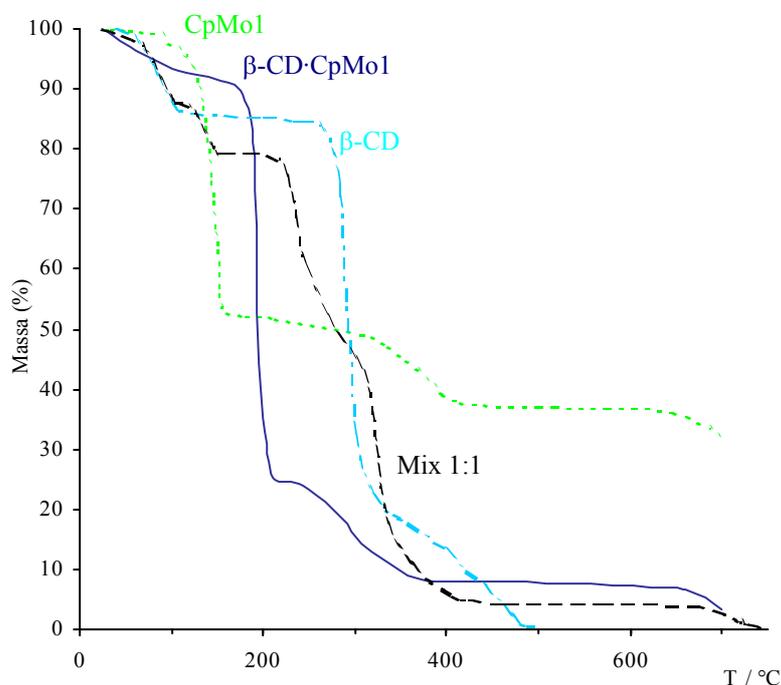
### ***Termogravimetria***

Os termogramas dos complexos de inclusão são comparados com os das respectivas misturas físicas de modo a tirar algumas conclusões sobre a afinidade entre hóspede e hospedeiro em cada um dos sistemas. Note-se que há dois padrões distintos de comportamento térmico conforme se está na presença de complexos com organometálicos de dimensões adequadas à cavidade da  $\beta$ -CD (CpMo1, IndMo, FeCN1, KFeCN) ou com hóspedes cujas dimensões não lhes permitem ficar totalmente encapsulados (caso de CpMo2 e FeCN2).

As misturas físicas de  $\beta$ -CD com os compostos CpMo1 (figura 6.6), IndMo, FeCN1, KFeCN apresentam uma perda brusca de massa nos termogramas correspondente à decomposição da  $\beta$ -CD a partir dos 220°C, 1 temperatura cerca de 40°C inferior à normalmente registada. Este fenómeno indica que o hóspede está a promover a sua decomposição precoce. O aparecimento de uma interacção entre a  $\beta$ -CD e outro composto quando se procede à sua mistura por acção mecânica, embora invulgar, está descrito para outros compostos sendo geralmente indicativo de uma grande afinidade entre o composto hóspede e a CD hospedeira.

Os complexos de inclusão apresentam a degradação do anel hospedeiro a temperatura ainda mais baixa do que na mistura física, cerca dos 180-200°C. Existe uma interacção mais forte do que na mistura, como seria de esperar em sistemas deste tipo. A

decomposição de complexos de  $\beta$ -CD a baixa temperatura promovida pelo hóspede está descrita na literatura para o sistema  $\beta$ -CD  $\cdot$  Cr( $\eta^6$ -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)(CO)<sub>3</sub> [17].

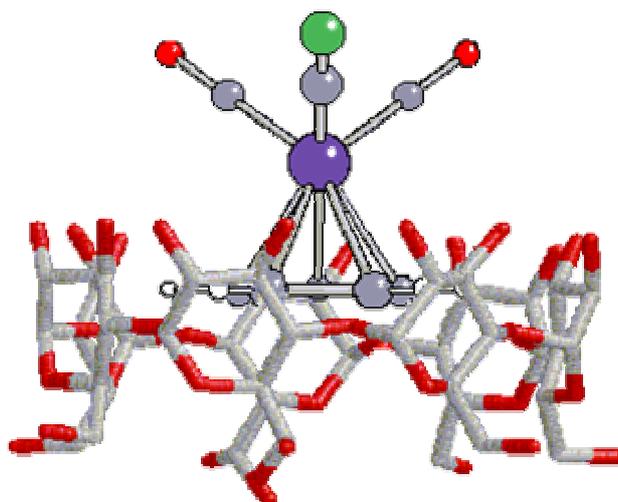


**Figura 6.6.** Termogramas de  $\beta$ -CD, CpMo1 (—), do hóspede CpMo1 (---), da  $\beta$ -CD (—) e da mistura física 1:1 de  $\beta$ -CD e de MoCl(---)

Nos complexos CpMo2  $\cdot$   $\beta$ -CD e FeCN2  $\cdot$   $\beta$ -CD há desidratação até aos 100-125°C sem mais reduções de massa até cerca dos 200°C, temperatura a que se inicia a degradação térmica da  $\beta$ -CD. Este fenómeno ocorre a mais baixa temperatura do que na  $\beta$ -CD, devido ao efeito promotor de CpMo2 e FeCN2. Contudo, O mesmo efeito, é fraco ou inexistente nas misturas físicas correspondentes, constituindo mais um sinal da baixa afinidade entre estes hóspedes volumosos e a  $\beta$ -CD.

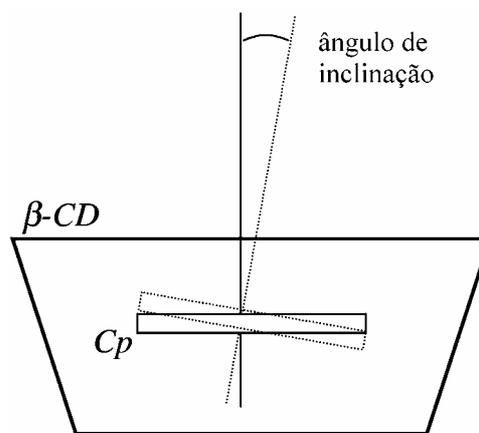
### 6.3. Cálculos *Ab Initio*

As estruturas moleculares dos organometálicos FeCN1, FeCN2 e KFeCN foram determinadas por cálculos *ab initio* e depois simulou-se a sua inclusão na  $\beta$ -CD. As moléculas de FeCN1 e KFeCN calculadas têm estrutura designada por “banco de piano” que é típica para este tipo de compostos. Os compostos de inclusão formados com estes hóspedes apresentam a geometria mais estável (ou seja, com menor energia) quando o ligando Cp está no interior da cavidade hospedeira, conforme se representa na figura 6.7. (página seguinte).



**Figura 6.7.** Estrutura do complexo de inclusão  $\beta$ -CD-FeCN1 determinada por cálculos *ab initio*

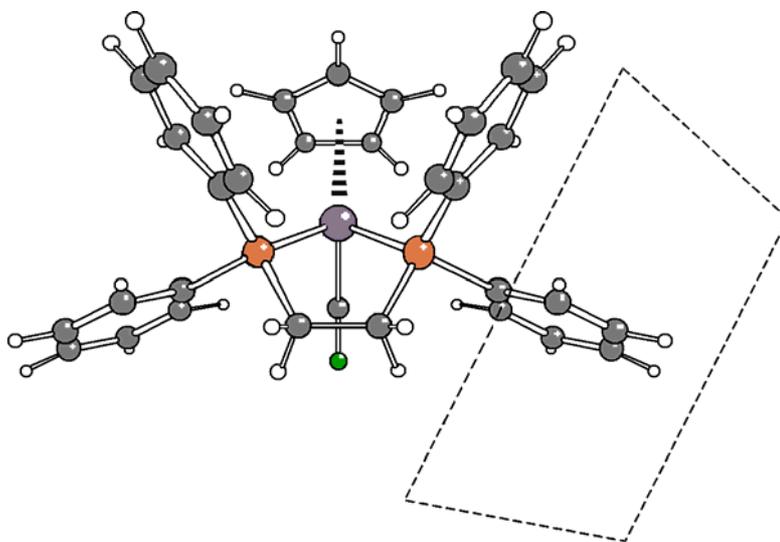
Esta estrutura é semelhante àquelas descritas para a inclusão em  $\beta$ -CD de outros organometálicos contendo Cp e também foi proposta para vários derivados de ferroceno [18, 19]. Porém, note-se que o mínimo de energia calculado para estas estruturas se situa numa zona de depressão ampla, o que significa que o hóspede apresenta alguma liberdade de movimento. De facto, se este apresentar um ângulo de inclinação de  $15^\circ$  (conforme se define na figura 6.8), o consequente aumento de energia do sistema é inferior a  $1 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Dado que o produto  $RT$  é cerca de  $2,3 \text{ kJ mol}^{-1}$  à temperatura ambiente, a orientação do hóspede no cristal pode variar permitindo-lhe ajustar-se de acordo com as interações que os seus grupos CN e CO estabelecem com as CDs vizinhas. Foi referido que as frequências das elongações destes grupos sofrem desvios aquando da inclusão, levando a supor que (pelo menos no complexo  $\beta$ -CD-FeCN1) os grupos CO estão envolvidos em pontes de hidrogénio com a  $\beta$ -CD. O movimento de inclinação previsto pelos cálculos permite ao hóspede colocar-se na orientação mais favorável para a ligação CO -  $\beta$ -CD.



**Figura 6.8.** Definição do ângulo de inclinação entre o eixo normal ao plano do anel Cp e o principal eixo de inércia que atravessa a cavidade da  $\beta$ -CD.

A estrutura calculada para FeCN2 apresenta as características gerais descritas para vários complexos contendo Fe-dppe [20, 21], com os grupos fenilo dispostos na forma de “pás de ventoíinha” e o quelato C-P-Fe-P-C com conformação em envelope. Quando se simula a inclusão com o FeCN2, a geometria da interação é muito diferente das anteriores porque a presença do substituinte dppe, muito volumoso, não permite a

inclusão do Cp. De facto, em torno do ciclopentadienilo há havendo forte repulsão estérea com a orla da  $\beta$ -CD (figura 6.9.) pela proximidade de dois grupos fenilo do dppe.



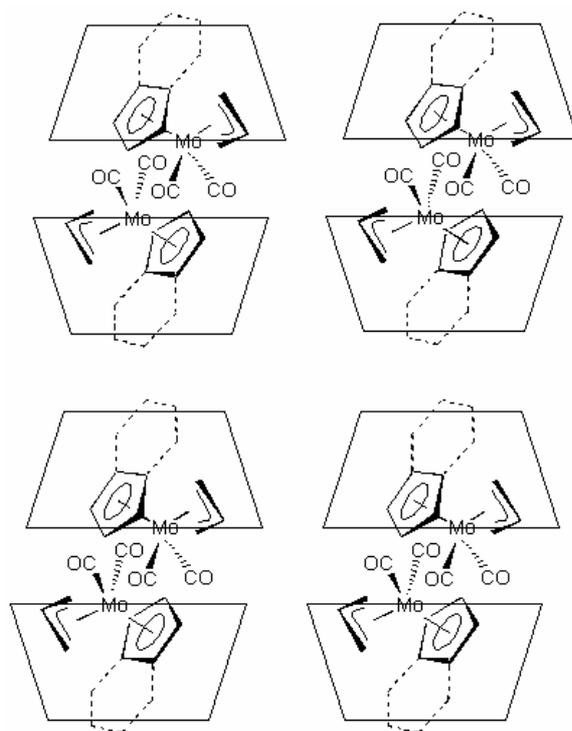
**Figura 6.9.** Estrutura de FeCN1 determinada por cálculos *ab initio* mostrando os grupos fenilo acessíveis à inclusão. No grupo da direita mostra-se a posição que a ciclodextrina-beta ocuparia ao complexar o ferrocianeto.

Contudo, a estrutura tridimensional do ligando dppe tem outros dois grupos fenilo que estão acessíveis à inclusão dentro da cavidade da  $\beta$ -CD, conforme se mostra na figura 6.10. Logo, podem formar-se complexos de inclusão com estequiometrias  $\beta$ -CD : FeCN2 de 1 : 1 ou de 2 : 1. Ainda assim, a energia calculada para esta interacção é praticamente repulsiva. Este resultado está de acordo com os dados experimentais, que atestam a parca estabilidade de  $\beta$ -CD · FeCN2.

#### 6.4. Conclusões

Os resultados dos capítulos anteriores ilustram como é difícil prever apenas com base na estrutura e dimensões de um hóspede orgânico se ele forma um complexo estável com a  $\beta$ -CD e qual a sua estequiometria e geometria. A presença de um núcleo metálico numa estrutura molecular orgânica parece aumentar grandemente as probabilidades de êxito da inclusão, estando a estabilidade do complexo relacionada com as dimensões do hóspede. Na realidade, foram incluídos na  $\beta$ -CD seis compostos contendo núcleos metálicos de ferro ou molibdénio, tendo-se verificado que todos apresentam grande afinidade para o hospedeiro. A estabilidade dos complexos é fraca apenas em dois casos, ambos envolvendo hóspedes organometálicos de grandes dimensões. Adicionalmente, a sua geometria pode criar um impedimento espacial que bloqueia o acesso aos locais de ancoragem preferidos pela ciclodextrina (grupos aromáticos, por exemplo). Então compostos de volume muito superior ao da cavidade da  $\beta$ -CD são complexados quando a sua geometria o permite mas apresentam-se instáveis, sendo o hóspede facilmente removido por lavagem, por exemplo (caso do FeCN2).

A caracterização por RMN de  $^{13}\text{C}$  e por DRX de pós sugere uma estrutura em canal para os complexos  $\beta\text{-CD}\cdot\text{CpMo1}$  e  $\beta\text{-CD}\cdot\text{IndMo}$ . Na figura 6.10, representa-se o empacotamento para eles proposto: dímeros de  $\beta\text{-CD}$  cabeça com cabeça englobam duas moléculas de hóspede; este conjuntos empilham-se uns sobre os outros para formar canais. O modelo proposto permite igualmente compreender os resultados de espectroscopia vibracional e termogravimetria.



**Figura 6.10.** Representação esquemática da estrutura em canal proposta para os complexos de inclusão  $\beta\text{-CD}\cdot\text{CpMo1}$  e  $\beta\text{-CD}\cdot\text{IndMo}$

Os compostos  $\text{FeCN1}$  e  $\text{KFeCN}$ , tal como  $\text{CpMo1}$  e  $\text{IndMo}$ , apresentam dimensões adequadas para serem totalmente incluídos na  $\beta\text{-CD}$ . A caracterização estrutural mostra uma modificação no empacotamento da  $\beta\text{-CD}$  e um aumento da simetria em torno de cada anel, o que mais uma vez aponta para a sua organização em canais com os ferrocianetos no seu interior.

Apesar das suas dimensões grandes, os organometálicos  $\text{MoC2}$  e  $\text{FeCN2}$  são capazes de formar verdadeiros complexos de inclusão com a ciclodextrina, embora mais fracos, conforme mostram os dados de TG e EIV. O seu estudo por DRX de pós e RMN de  $^{13}\text{C}$  sugere que a  $\beta\text{-CD}$  adota um empacotamento mais assimétrico do que nos casos anteriores.

## Referências

1. H. M. Colquhoun, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**, 487 (1986).
2. E. Fenyvesi, L. Szente, N. R. Russel, M. McNamara, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Eds. J. Szejtli, T. Osa, Pergamon, Oxford, Vol. 3, 305–366 (1996).
3. R. Breslow, G. Trainor, A. Ueno, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 2739 (1983).
4. Y. Odagaki, K. Hirotsu, T. Higuchi, A. Harada, S. Takahashi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1230 (1990).
5. R. Bakhtiar, A. E. Kaifer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 111 (1998).
6. I. Turel, A. Demsar, J. Kosmrlj, *J. Mol. Recogn. Macro. Chem.* **35**, 595 (1993).
7. G. Meister, H. Stoeckli-Evans, G. Süss-Fink, *J. Organomet. Chem.* **453**, 249 (1993).
8. (a) B. Klingert, G. Rihs, *Organometallics* **9**, 1335 (1990); (b) B. Klingert, G. Rihs, *J. Inclusion Phenom.* **10**, 255 (1991); (c) B. Klingert, G. Rihs, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2749 (1991).
9. M. Shimada, A. Harada, S. Takahashi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 263 (1991).
10. P. P. Patel, M. E. Welker, *J. Organomet. Chem.* **547**, 103 (1997).
11. L. Song, Q. Meng, X. You, *J. Organomet. Chem.* **498**, C1 (1995).
12. (a) S. S. Braga, I. S. Gonçalves, A. D. Lopes, M. Pillinger, J. Rocha, C. C. Romão, J. J. C. Teixeira-Dias, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2963–2968 (2000); (b) S. S. Braga, I. S. Gonçalves, P. Ribeiro-Claro, A. D. Lopes, M. Pillinger, J. J. C. Teixeira-Dias, J. Rocha, C. C. Romão, *Supramol. Chem.* **14**, 359–366 (2002).
13. C. Díaz, A. Arancibia, *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn.* **30**, 127–141 (1998).
14. D. R. Alston, M. Z. Slawin, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **24**, 786–787 (1985).
15. (a) T. S. Piper, F. A. Cotton, G. Wilkinson, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1**, 165–174 (1955); (b) D. L. Reger, *Inorg. Chem.* **14**, 660–662 (1975).
16. M. J. Calhorda, *Chem. Commun.* 801–810 (2000).
17. A. Harada, K. Saeki, S. Takahashi, *Organometallics* **8**, 730 (1989).
18. L. A. Godinez, S. Patel, C. M. Criss, A. E. Kaifer, *J. Phys. Chem.* **99**, 17449 (1995).
19. R. Isnin, C. Salam, A. E. Kaifer, *J. Org. Chem.* **56**, 35 (1991).
20. J. Ruiz, M. A. González, E. Román, M. T. Garland, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 21 (1990).
21. (a) P. E. Riley, C. E. Capshew, R. Pettit, R. E. Davis, *Inorg. Chem.* **17**, 408–414 (1978); (b) P. E. Riley, R. E. Davis, *Organometallics* **2**, 286 (1983).

# Capítulo 7

## Capítulo 7

**Influência da inclusão  
nas propriedades físico-químicas  
e anti-tumorais de  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$**

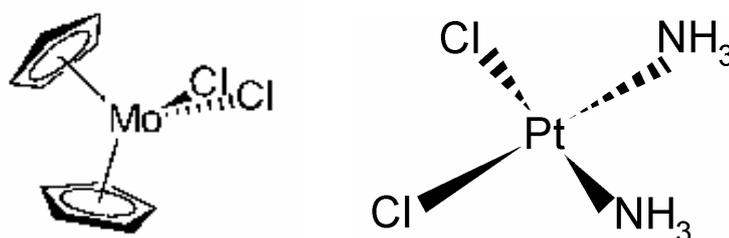
A partir de uma solução de  $\beta$ -CD e  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  foi obtido um complexo microcristalino de estequiometria 1:1. O espectro de Raman do complexo mostra que a ligação Mo-Cl, muito sensível à hidrólise, se manteve intacta durante o processo de inclusão em fase aquosa. Deste modo, demonstra-se a eficácia do método usado para a inclusão, cujo sucesso só é garantido mantendo o  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  em fase aquosa por um tempo reduzido (10 min) e congelando a solução logo em seguida. O complexo de inclusão apresenta uma estrutura nova, que se manifesta num invulgar padrão de difracção de raios X. Estudos teóricos conjugados com dados de espectroscopia de Raman mostram que a geometria mais estável envolve a penetração de um dos ciclopentadienilos na cavidade da  $\beta$ -CD, deixando os cloretos acessíveis desde o exterior da cavidade hospedeira. A ligação Mo-Cl é particularmente importante pois contribui a eficácia anti-tumoral do composto, segundo mostram os estudos efectuados com células de adenocarcinoma do colo do útero.

## **7. Influência da inclusão nas propriedades físico-químicas e anti-tumorais de $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$**

7.1. Introdução	103
7.2. Preparação e estudo do complexo de inclusão	104
Espectroscopia vibracional	104
Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$	106
Difracção de raios X de pós	106
Termogravimetria	107
7.3. Cálculos <i>ab initio</i>	108
7.4. Estudos citológicos	108
7.5. Conclusões	110
Referências	111

## 7.1. Introdução

São hoje conhecidos diversos dicloreto de metalocenos ( $Cp_2MCl_2$ , com  $M = Ti, V, Nb, Mo$ ) com propriedades anti-tumorais que abrangem uma série de tumores de ratinhos e mesmo de humanos [1 - 4]. Estes compostos têm vindo a ganhar interesse como alternativas à *cis*-platina ( $[NH_3]_2Pt Cl_2$ , ver esquema na figura 7.1.) devido à diversidade de tumores contra os quais são activos e à sua menor toxicidade. Presentemente, o titanoceno ( $Cp_2TiCl_2$ ) encontra-se na fase II de ensaios clínicos, o último estágio de testes antes de um medicamento ser lançado no mercado.



**Figura 7.1.** Estrutura do  $Cp_2MoCl_2$  (esquerda) comparada com a estrutura da *cis*-platina (direita)

Neste capítulo, descreve-se a inclusão em  $\beta$ -CD do metaloceno  $Cp_2MoCl_2$  (bis-ciclopentadienildicloreto de molibdénio, figura 7.1.) e a caracterização do complexo obtido. O  $Cp_2MoCl_2$  é dos compostos mais atractivos deste grupo de anti-tumorais. De todos eles, é o que apresenta maior estabilidade na ligação metal - Cp, seguido pelo  $Cp_2VCl_2$  e pelo  $Cp_2TiCl_2$  [5, 6]. Esta característica é de particular importância, na medida em que são os ciclopentadienos coordenados com o metal, e não na forma livre [7], que apresentam maior e mais vasta actividade anti-tumoral.

Por outro lado, a cinética de hidrólise da ligação Mo-Cl no  $Cp_2MoCl_2$  é muito rápida quando comparada com outros compostos da mesma família, nomeadamente  $Cp_2TiCl_2$  e  $Cp_2VCl_2$ . Esta característica pode explicar as suas menores citotoxicidade e bioacumulação quando comparado com  $Cp_2VCl_2$  [6]. O mesmo estudo mostrou ainda que o  $Cp_2MoCl_2$  forma ligações estáveis com as bases nucleotídicas do ADN. Análises por RMN de  $^1H$  e  $^{31}P$  em solução a pH fisiológico (pH = 7,4) com atmosfera de Árgon mostraram que o  $Cp_2Mo^{2+}$  se liga covalentemente aos grupos fosfato (a um dos átomos de oxigénio) e à base nucleotídica (átomos de azoto) dos nucleótidos, formando monómeros com dAMP -  $Cp_2Mo(5'-dAMP)$  - e dímeros com dGMP -  $[Cp_2Mo(5'-dGMP)]_2$ . Esta ligação é estável pelo que foi possível a cristalização do dímero  $[Cp_2Mo(dGMP)]_2$  sob a mesma atmosfera. A estrutura foi determinada por difracção de raios X.

Em atmosfera de oxigénio a reactividade deste composto parece ser diferente. Estudos em meio aquoso mostram que ocorre perda dos cloretos, formando-se o ião  $Cp_2Mo(OH_2)_2^{2+}$ . Este promove a hidrólise de fosfoésteres activados tais como o nitrofenilfosfato [8a] ou mesmo de fosfoésteres não activados como o dimetilfosfato [8b].

Os últimos revestem-se de particular importância na medida em que mimetizam a função diéster presente no ADN. A formação de complexos com oligonucleótidos foi observada por RMN para  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  com ATGGTA a  $\text{pD} \approx 3,0$  mas está por confirmar a pH fisiológico [9].

A inclusão de metallocenos em ciclodextrinas pode contribuir para melhorar as características farmacológicas destes compostos, alterando a sua solubilidade, cinética de hidrólise, toxicidade ou até mesmo actividade antineoplásica. Neste sentido, Turel e seus colaboradores prepararam e caracterizaram o primeiro complexo de inclusão de metalloceno em ciclodextrinas, tendo escolhido como hóspede o  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$  e como hospedeiro a  $\beta\text{-CD}$  [10].

Este capítulo mostra como a inclusão na  $\beta\text{-CD}$  permitiu tornar mais estável o composto  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  na medida em que evita perda dos cloretos por hidrólise. De facto, pode-se demonstrar, através de várias técnicas de caracterização de estado sólido, que as ligações molibdénio - cloro estão intactas no composto de inclusão [11]. Mostra-se ainda a importância destas ligações para a actividade anti-tumoral do composto.

## 7.2. Preparação e estudo do complexo de inclusão

Uma vez que o  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  tende a perder rapidamente os cloretos na presença de água, a inclusão deve ser feita o mais rapidamente possível. Por outro lado, é necessário que a ciclodextrina e o hóspede permaneçam em solução durante algum tempo para permitir que interactuem, de modo a que o rendimento da complexação não seja demasiado baixo. Assim, houve que proceder a vários ensaios de modo a encontrar uma solução de compromisso. O tempo ideal de agitação da solução contendo  $\beta\text{-CD}$  e  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  foi de 10 minutos. Após este período ela foi imediatamente congelada para evitar a hidrólise do hóspede. Seguidamente, a água foi retirada por liofilização. O produto obtido apresenta igual quantidade (número de moles) de hóspede e hospedeiro, o que foi confirmado por análise elementar (ver secção experimental).

### *Espectroscopia Vibracional*

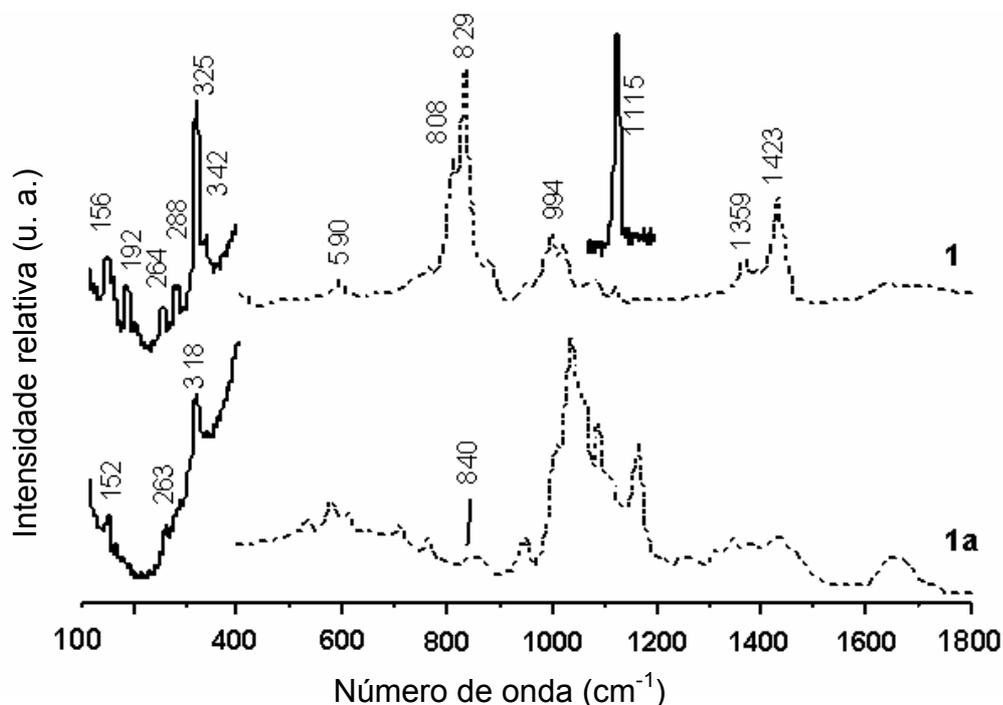
O espectro de infravermelho de  $\beta\text{-CD} \cdot \text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  apresenta as bandas de absorção típicas da  $\beta\text{-CD}$  e também um pequeno ombro a  $3110 \text{ cm}^{-1}$  e uma banda fraca a  $840 \text{ cm}^{-1}$  atribuídas respectivamente a vibrações  $\nu(\text{CH})$  e  $\pi(\text{CH})$  do hóspede. Estas vibrações ocorrem a frequências mais elevadas do que no composto  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  puro. Casos semelhantes foram encontrados noutros complexos de ciclopentadienilos de metais, sendo associados a um aumento da densidade electrónica no anel Cp [12].

O espectro de Raman de  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  apresenta várias bandas de absorção a baixas frequências que foram atribuídas a vibrações Mo-Cp e Mo-Cl (ver tabela 7.1. e figura 7.2).

Frequência calculada		Frequência observada		Descrição aproximada
Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	β-CD·Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	β-CD·Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	
343	342	—	—	Inclinação do anel Cp
302	325	318	318	Elongação Mo–Cp simétrica
284	288	—	—	Elongação Mo–Cp antissimétrica
269	264	263	263	Elongação Mo–Cl simétrica
284	192	—	—	Deformações angulares de Mo–Cp
160	156	152	152	

**Tabela 7.1.** Frequências de vibração observadas em Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> comparadas com as que foram obtidas por cálculo e com as de β-CD·Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> para a região 100 – 400 cm<sup>-1</sup>.

As atribuições foram feitas com base em cálculos *ab initio* e estão de acordo com resultados obtidos em estudos vibracionais sistemáticos realizados com complexos de metais e ligandos do tipo η<sup>5</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> [12].



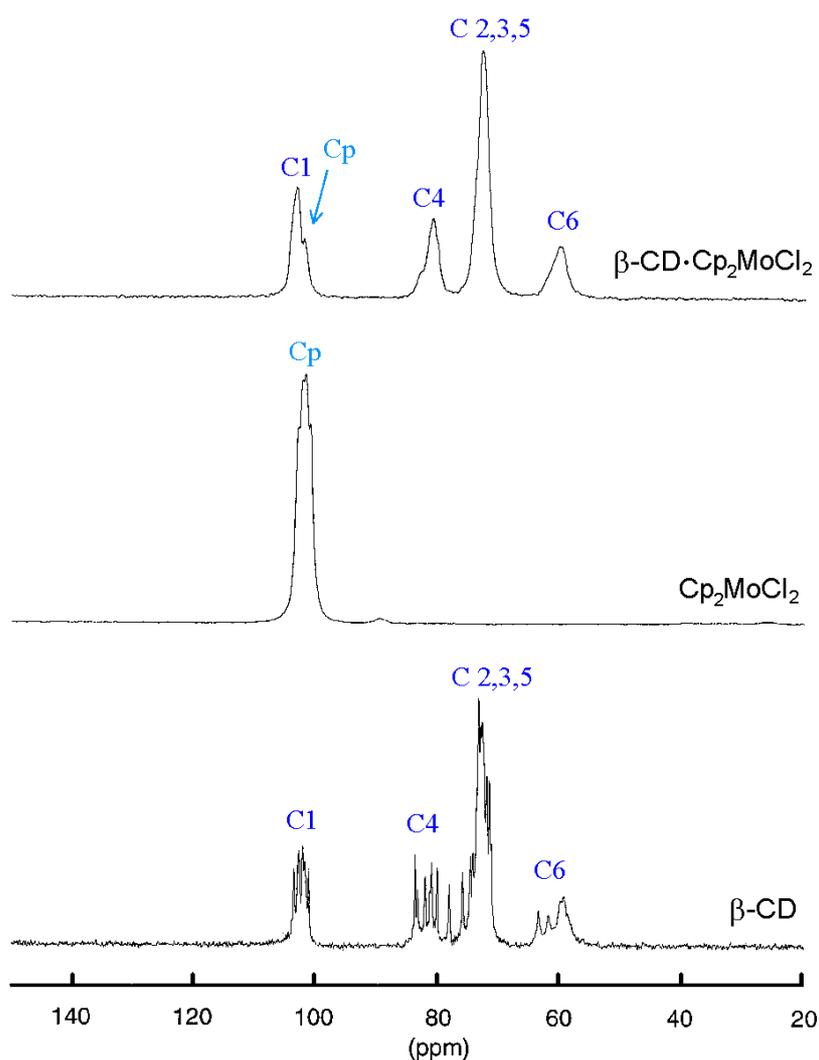
**Figura 7.2.** Espectros de Raman (a cheio) e de infravermelho (a tracejado) de Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> (**1**) e β-CD·Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> (**1a**) na região 100–1800 cm<sup>-1</sup>.

Das bandas observadas na região 100 – 400 cm<sup>-1</sup>, destacam-se as alterações nas elongações metal–ligando da molécula hóspede que reflectem a inclusão na β-CD. De facto, enquanto que o modo ν(Mo–Cl) é praticamente insensível à inclusão, o modo ν(Mo–Cp) sofre um desvio negativo (de cerca de 8 cm<sup>-1</sup>). Este comportamento pode ser correlacionado com a geometria de inclusão, conforme será discutido mais adiante.

### *Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$*

No espectro de  $\beta\text{-CD}\cdot\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$ , os carbonos da  $\beta\text{-CD}$  surgem na forma de singuletos. Como foi referido, este fenómeno associa-se à inclusão de grupos aromáticos, sugerindo que um ou mesmo os dois ciclopentadienilos estão no interior da  $\beta\text{-CD}$ .

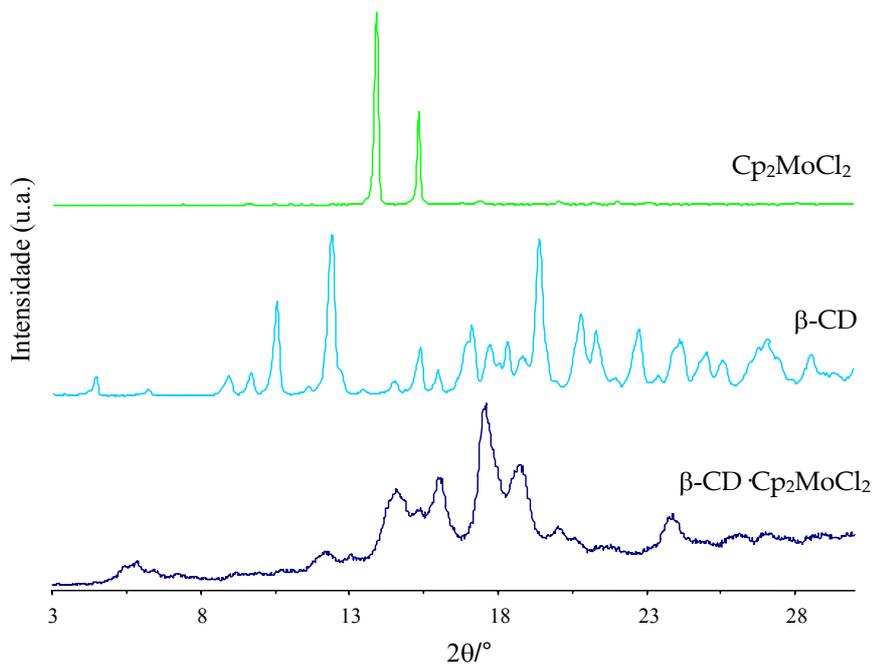
O espectro do hóspede  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  exibe um único pico atribuído aos carbonos dos grupos ciclopentadienilo. O sinal mantém-se inalterado no complexo de inclusão, surgindo como um pequeno ombro na região dos carbonos C1 da  $\beta\text{-CD}$ . É interessante notar que a inclusão não provoca desvio nesta ressonância.



**Figura 7.3** Espectro de RMN CP-MAS de  $^{13}\text{C}$  de  $\beta\text{-CD}$ ,  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  e  $\beta\text{-CD}\cdot\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$ .

### *Difracção de Raios X de pós*

Comparando os difractogramas de  $\beta\text{-CD}\cdot\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$ ,  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  e  $\beta\text{-CD}$  (figura 7.4) pode observar-se que o composto  $\beta\text{-CD}\cdot\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  apresenta um padrão de difracção bastante diferente.

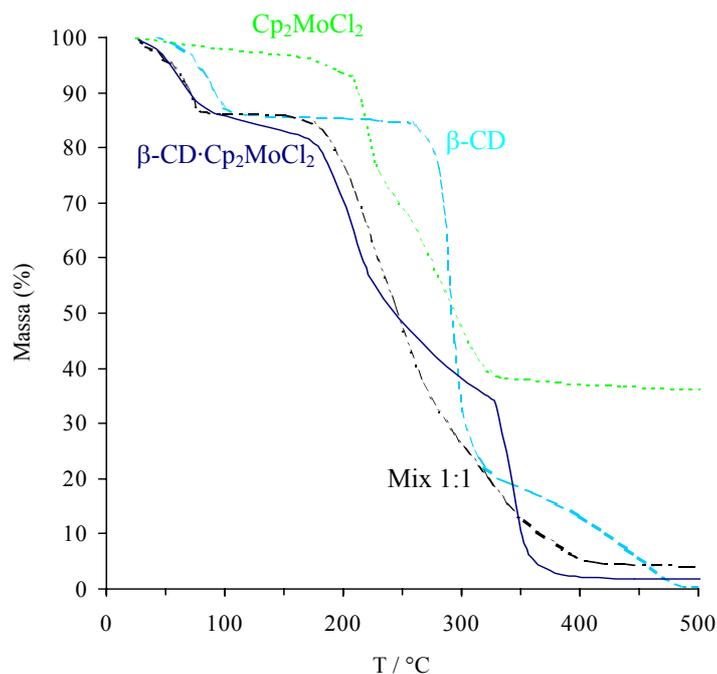


**Figura 7.4.** Difractograma de pós de  $\beta$ -CD·Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub>,  $\beta$ -CD e Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub>.

O novo padrão formado aponta para a presença de um complexo de inclusão verdadeiro [13]. Contudo, a comparação com modelos conhecidos não permite tirar conclusões definitivas quanto ao tipo de estrutura devido à baixa cristalinidade do composto.

### **Termogravimetria**

O termograma de  $\beta$ -CD·Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> está representado na figura 7.5. em comparação com os de Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub>, da  $\beta$ -CD e da mistura física 1:1 de ambos.

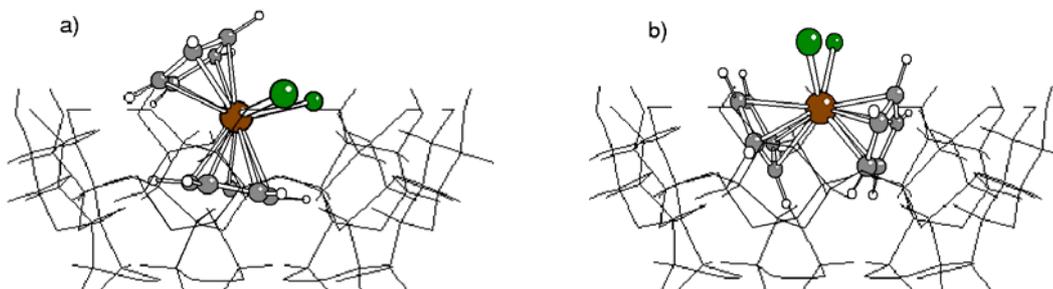


**Figura 7.5.** Termogramas de  $\beta$ -CD·Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> (—), Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> (---),  $\beta$ -CD (— —) e da mistura física 1:1 de  $\beta$ -CD e de Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> (— — —)

Note-se que  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  começa a sublimar por cerca dos 208 °C e a  $\beta$ -CD inicia a sua degradação térmica aos 260 °C, mas tanto na mistura física como em  $\beta\text{-CD}\cdot\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  os dois componentes interagem e há uma perda brusca de massa (aos 190 °C e 180 °C, respectivamente). Esta interacção com efeito promotor sobre a degradação da ciclodextrina já foi referida nos capítulos seis e parece estar associada à presença do metal. Mais uma vez, o efeito é mais intenso nos complexo de inclusão do que na mistura física.

### 7.3. Cálculos *ab initio*

Foram efectuados cálculos *ab initio* para simular a geometria do hóspede no interior da ciclodextrina e calcular as frequências vibracionais para esta molécula (referidas na tabela 7.1). Como habitualmente, testaram-se várias geometrias de inclusão possíveis por cálculo pontual e encontraram-se duas estruturas estáveis à temperatura ambiente. A primeira (ver figura 7.6.a) apresenta um dos ligandos Cp no interior da cavidade da ciclodextrina e assemelha-se a estruturas propostas para vários derivados do ferroceno [14]. A estrutura b) é menos estável em cerca de  $1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  do que a estrutura a) e assemelha-se à proposta anteriormente por I. Turel [10] para o complexo de inclusão com  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$ . O modo de inclusão consistem numa ligeira penetração dos dois grupos Cp na cavidade da  $\beta$ -CD.



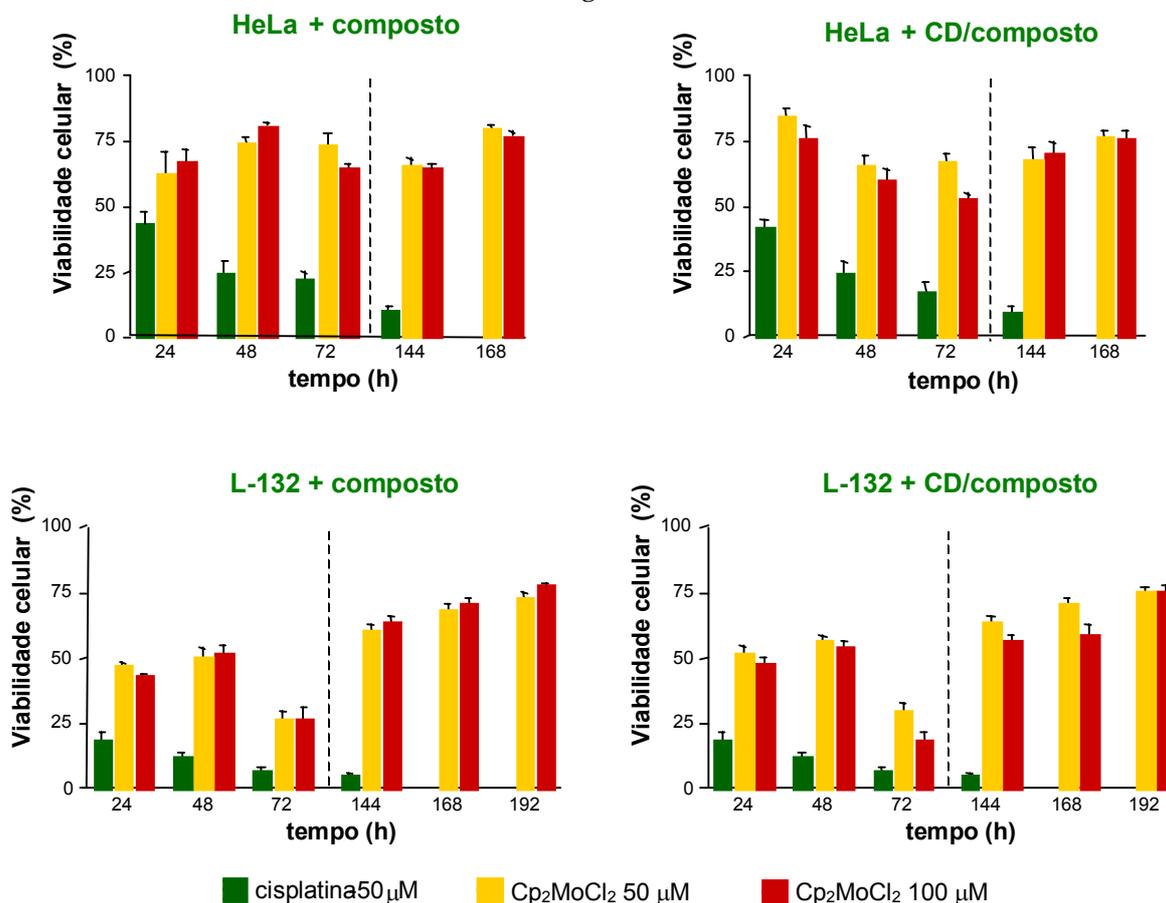
**Figura 7.6.** Estruturas obtidas por cálculos *ab initio* representando as geometrias de mais baixa energia para a inclusão de  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  na  $\beta$ -CD.

Embora pareça concebível que ambas as estruturas possam competir uma com a outra à temperatura ambiente, os dados recolhidos experimentalmente estão mais de acordo com a estrutura a). De facto, o espectro vibracional apresenta um desvio para o vermelho na frequência da elongação simétrica Mo-Cp quando se dá a inclusão, embora fosse de esperar um desvio positivo no caso da estrutura b), devido a efeitos de confinamento (impedimento estérico).

### 7.4. Estudos de citotoxicidade

Os testes de avaliação da citotoxicidade foram efectuados por Luísa Teixeira, sob a supervisão da professora Paula Marques, no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Univ. Coimbra.

A inclusão de  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  na  $\beta\text{-CD}$  permitiu torná-lo mais resistente à hidrólise o que poderá modificar as suas propriedades anti-tumorais e mesmo reduzir a sua toxicidade face às células sãs. Para investigar estas novas propriedades, testaram-se os efeitos anti-proliferativo e citotóxico em duas linhas celulares humanas, umas cancerosas e outras saudáveis. As células cancerosas são de adenocarcinoma de cérvix ou seja, do colo do útero (epitelial, de crescimento em monocamada), denominadas HeLa. As células não cancerosas são fibroblastos de tecido pulmonar embrionário, denominadas L-132. Em cada cultura celular testou-se  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$ , o complexo  $\beta\text{-CD-Cp}_2\text{MoCl}_2$  e a cisplatina (largamente utilizada em quimioterapia) para comparação dos resultados. As células foram incubadas com estes agentes por períodos de um a três dias. Depois os compostos foram retirados do meio para determinar o grau de *reversibilidade* do efeito após mais três a cinco dias. A reversibilidade da acção reflecte-se no facto de as células retomarem o seu crescimento normal após a sua eliminação do meio de cultura. Assim, o anti-tumoral ideal terá efeito irreversível sobre as células malignas e reversível sobre as células sãs.



**Figura 7.7.** Gráficos de dose-resposta em função da concentração e do tempo de incubação, para o composto  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  puro (gráficos da esquerda) e incluído na  $\beta\text{-CD}$  (gráficos da direita) face às linhas HeLa (gráficos de cima) e L-132 (gráficos de baixo). As células (numa densidade inicial de  $3 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) foram incubadas com os compostos por períodos de 24 a 72 h. A cada 24 h foram retiradas amostras e a viabilidade celular determinada através do teste colorimétrico do MTT (ver secção experimental). Após 72 h, os compostos foram removidos e o meio de cultura renovado. Depois de nova incubação por 72, 96 e 120 h, mediu-se a viabilidade celular. Os resultados expressam-se em percentagem da amostra controlo (100%) e representam a média  $\pm$  desvio médio padrão de experiências em triplicado. Para comparação, mostra-se também a actividade da cisplatina (NOTA: este composto não foi incluído na  $\beta\text{-CD}$  pelo que os gráficos da direita repetem os da esquerda)

Na figura 7.7. apresentam-se os resultados obtidos nas experiências de citotoxicidade efectuadas. Note-se que o composto  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  mostra actividade crescente ao longo do tempo quando está incluído na  $\beta$ -CD. Contrariamente, na forma livre a sua actividade diminui ligeiramente com o tempo. Note-se ainda que, em contraste com a *cis*-platina (cujo efeito é totalmente irreversível),  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  e o complexo  $\beta$ -CD  $\cdot$   $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  apresentam uma certa reversibilidade da sua acção. De facto, após três a quatro dias, as células recuperam até 75% da sua viabilidade inicial, tanto as cancerosas (linha HeLa) como as não cancerosas (células L-132).

Finalmente, saliente-se a pequena diferença entre os resultados obtidos quando se duplica a concentração de  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  (quer puro, quer incluído). Consequentemente, não é necessário utilizar concentrações elevadas do composto para se obter actividade anti-tumoral, o que constitui uma vantagem importante para uma sua possível utilização terapêutica.

## 7.5. Conclusões

Recorrendo a um processo ultra-rápido de inclusão do  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  na  $\beta$ -CD em solução aquosa com posterior congelamento e liofilização, foi obtido um novo material cristalino, de estequiometria 1 : 1. A investigação da estrutura formada permitiu mostrar que o hóspede se manteve intacto durante esta reacção, já que a ciclodextrina o protegeu de sofrer hidrólise dos ligandos cloreto em meio aquoso. Combinando resultados experimentais com cálculos *ab initio*, demonstrou-se ainda que a cavidade engloba um dos grupos ciclopentadienilo e que esta geometria confere à  $\beta$ -CD uma conformação mais simétrica.

Estudos sobre a actividade anti-proliferativa e citotóxica do composto  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$ , e do complexo  $\beta$ -CD  $\cdot$   $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  mostram que esta é superior para a espécie incluída. Este resultado é muito interessante pois, contribuindo para uma melhor compreensão das relação estrutura-actividade subjacente a este tipo de actividade biológica, permite sugerir um possível mecanismo de acção. Provavelmente, a actividade do composto estudado envolve as ligações Mo-Cl visto que na ausência do efeito protector da  $\beta$ -CD elas são facilmente hidrolisadas (com conseqüente redução de actividade anti-tumoral). Para melhor compreender este fenómeno, devem ser realizados novos estudos variando as características da molécula activa. Assim, os cloretos poderão ser substituídos por grupos não hidrolisáveis (como o metilo, por exemplo).

## Referências

1. P. Köpf-Maier, H. Köpf, *Drugs Future* **11**, 297 (1986).
2. M. L. McLaughlin, J. M. Cronan, Jr., T.R. Schaller, R. D. Snelling, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 8949 (1990).
3. M. M. Harding, G. J. Harden, L. D. Field, *Febs Letts.* **322**, 291 (1993).
4. G. Mokdsi, M. M. Harding, *J. Organomet. Chem.* **565**, 29 (1998).
5. J. H. Toney, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 947 (1985).
6. L. Y. Kuo, M. G. Kanatzidis, M. Sabat, A. L. Tipton, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9027 (1991).
7. P. Köpf-Maier, H. Köpf, *J. Organom. Chem.* **342**, 167 (1988).
8. (a) L. Y. Kuo, S. Kuhn, D. Ly, *Inorg. Chem.* **34**, 5341 (1995); (b) L. Y. Kuo, L.A. Barnes, *Inorg. Chem.* **38**, 814 (1999).
9. M. M. Harding, G. Mokdsi, J. P. Mackay, M. Prodigalidad, S. W. Lucas, *Inorg. Chem.* **37**, 2432 (1998).
10. I. Turel, A. Demsar, J. Kosmrlj, *J. Mol. Recogn. Macro. Chem.* **35**, 595 (1993).
11. S. S. Braga, I. S. Gonçalves, M. Pillinger, P. Ribeiro-Claro, J. J. C. Teixeira-Dias, *J. Organom. Chem.*, 11-16 (2001).
12. E. Diana, R. Rossetti, P. L. Stanghellini, S. F. A. Kettle, *Inorg. Chem.* **36**, 382 (1997).
13. W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19**, 344 (1980).
14. K. Prout, T. S. Cameron, R. A. Forder, S. R. Critchley, B. Denton, G. V. Rees, *Acta Crystallogr., Sect. B* **30**, 2290 (1974).



# Considerações finais

## Considerações finais



## **Considerações finais**

A importância da geometria	115
Múltiplas formas de obter complexos	115
Os complexos	116
Propriedades modificadas	118
Trabalho futuro	118

## **A importância da geometria**

Tal como se encontra amplamente descrito na literatura, os factores que determinam a inclusão de uma molécula ou de um fragmento molecular são, fundamentalmente, a dimensão, a geometria e as características de polaridade do hóspede. Ao longo do trabalho, foram seleccionadas moléculas de dimensões adequadas à cavidade da  $\beta$ -CD (7,8 Å de diâmetro na orla maior e 7,8 Å de profundidade). As moléculas de *p*-HB e S-Ibu cumprem perfeitamente estes requisitos, formando complexos cristalinos com qualidade suficiente para estudos de cristalografia de raios X. Nos estudos seguintes aumentou-se o tamanho dos hóspedes e encontraram-se algumas moléculas cuja geometria não permitia o acesso da  $\beta$ -CD. De facto, com Nimed e o seu precursor PN3 não foi possível preparar complexos no estado sólido. Contudo, outras moléculas um pouco maiores como Ompz e o precursor PrO2 foram complexados pela  $\beta$ -CD. A explicação para este diferente comportamento reside fundamentalmente nos condicionalismos geométricos.

O recurso a modelos computacionais das moléculas hóspedes permitiu a visualização tridimensional da sua geometria e ajudou a compreender como a alteração da conformação molecular pode resultar num volume superior ao da cavidade hospedeira. Um exemplo é a geometria de Nimed.

Quando um possível hóspede for manifestamente grande em relação às dimensões da cavidade da ciclodextrina hospedeira, poderá ocorrer a inclusão de um fragmento molecular desse hóspede. Tal situação ocorreu, por exemplo, com a molécula FeCN2 que possui dimensões superiores às da cavidade hospedeira, mas apresenta dois fragmentos aromáticos onde a  $\beta$ -CD se pode ancorar. Mais uma vez, esta geometria foi compreendida com o auxílio de cálculos computacionais que se revelaram constituir um precioso auxiliar na previsão da formação de complexos.

## **Múltiplas formas de obter complexos**

Quando um determinado hóspede é pouco solúvel em água, torna-se necessário modificar o processo de inclusão pois não é possível uma simples co-precipitação. Uma estratégia amplamente conhecida consiste no recurso a co-solventes, e foi também utilizada neste trabalho para a preparação de complexos com *p*-HB, PrO1 e PrO2. O recurso à formação de sais é outra forma de contornar o problema da solubilidade, descrita por vários autores em publicações recentes. No presente trabalho, os compostos PN3 e Nimed foram transformados em sais sódicos tendo-se verificado que este processo é favorável à inclusão. O modelo teórico destas moléculas na forma aniónica permite compreender o fenómeno. A formação de sais leva à modificação da conformação destas moléculas que deixam de estar dobradas sobre si para adoptarem uma forma distendida adequada à inclusão. Assim, combinando resultados teóricos e experimentais, mostrou-se

como a formação de sais permite modificar não só a solubilidade de um composto como também a sua geometria. Este recurso pode vir a ser muito útil na obtenção de novos complexos de inclusão.

O Ompz é um composto sensível ao calor e à luz. Sendo pouco solúvel em água, seria útil o recurso a co-solventes orgânicos, mas em soluções aquosas mistas observou-se tendência para uma mais rápida degradação. Adicionalmente, o contacto prolongado com a água, mesmo sem total dissolução, resulta na hidrólise de um protão (uma vez que se trata de uma base fraca) que diminui a sua actividade farmacológica. Para se poder efectuar a sua inclusão, foi necessário alterar o pH da mistura aquosa para valores ligeiramente alcalinos. Foi possível, então, aumentar o tempo de agitação para promover o máximo de contacto com a  $\beta$ -CD. Mesmo assim, o composto resultante apresenta fraca interacção hóspede-hospedeiro. Em comparação, o precursor PrO2, de geometria e dimensão praticamente idênticas, forma um complexo muito estável. Este resultado demonstra a importância das condições do meio, nomeadamente, do pH, na estabilidade dos complexos. Note-se ainda que para promover as interacções entre a  $\beta$ -CD e o seu hóspede é importante que ambos se encontrem perfeitamente dissolvidos. Só assim se proporciona o encontro entre moléculas individualizadas. Assim, na complexação de organometálicos, completamente insolúveis em água, fez-se a agitação da solução aquosa de  $\beta$ -CD com uma solução orgânica de hóspede. Embora a interacção esteja limitada à interface líquido-líquido (usaram-se solventes imiscíveis), os resultados foram positivos.

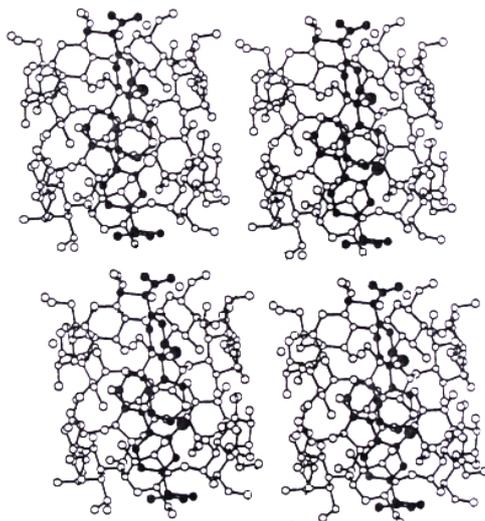
## Os complexos

Os primeiros sistemas estudados formaram complexos cristalinos cujas estruturas foram determinadas por cristalografia de raios-X. Tanto  $2\beta$ -CD  $4p$ -HB como  $2\beta$ -CD S-Ibu apresentam estruturas em canal, embora com grupos de simetria diferentes (P1 e C2, respectivamente). Na estrutura de  $2\beta$ -CD  $4p$ -HB as moléculas de  $p$ -HB formam dímeros que se organizam em duas cadeias antiparalelas e infinitas pela formação de ligações de hidrogénio, tal como foi observado para os cristais de  $p$ -HB puro. Deste modo, é o hóspede que vai servir de molde às ciclodextrinas. Estas organizam-se em dímeros que se alinham em torno das fiadas de  $p$ -HB para formar canais.

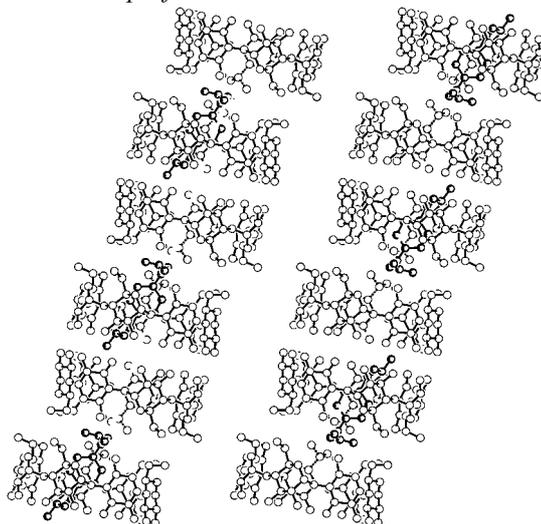
Na estrutura de  $2\beta$ -CD S-Ibu nota-se um comportamento diferente. Na realidade, tanto o hóspede S-Ibu como o hospedeiro se adaptam mutuamente para formar uma estrutura nova. Os dímeros de S-Ibu presentes no composto puro são quebrados e estabelece-se uma nova interacção entre o seu grupo carbonilo e um dos hidroxilos primários da  $\beta$ -CD. A estrutura hospedeira também muda de um empacotamento em “espinha de arenque” para empacotamento em canal, pois só assim é criado o espaço necessário para acomodar o hóspede. A forma alongada de S-Ibu leva a que parte da molécula se estenda para cima e para baixo das orlas da  $\beta$ -CD o que seria incompatível com um empacotamento em “espinha de arenque”. O complexo  $2\beta$ -CD S-Ibu constitui

ainda um exemplo de estequiometria pouco comum e ilustra a dificuldade em prever este parâmetro. De facto, compostos similares ao S-Ibu formam complexos 2:2. Comparando a estrutura obtida com a de  $2\beta\text{-CD} \cdot 2\text{S-Flurbiprofeno}$ , um composto da mesma família química do S-Ibuprofeno, pode observar-se que a estequiometria 2:2 é conseguida graças a um emparelhamento do hóspede em dímeros por interações entre um dos anéis

*2  $\beta\text{-CD} \cdot 2 \text{S-Flurbiprofeno}$*



*2  $\beta\text{-CD} \cdot \text{S-Ibuprofeno}$*



aromáticos. Como o hóspede se estende para fora da cavidade dimérica formada por duas  $\beta\text{-CD}$ s o empacotamento é feito em camadas. Na estrutura de  $2\beta\text{-CD} \cdot \text{S-Ibu}$  não há dimerização do hóspede e a estrutura em canal é possível alternando uma ciclodextrina ocupada com outra não ocupada (caso contrário haveria sobreposição de átomos de duas moléculas de S-Ibu adjacentes, conforme foi descrito no cap. 3)

Foram encontrados outros exemplos de complexos de inclusão com estequiometrias 2:1 quando se poderia prever sistemas 2:2, com dímeros de hóspede tal como no complexo formado com o S-Flurbiprofeno. No capítulo 4, a inclusão de PN1 e PN2 originou complexos com duas moléculas de  $\beta\text{-CD}$  para uma de hóspede, de forma semelhante a  $2\beta\text{-CD} \cdot \text{S-Ibu}$ . A caracterização dos complexos  $2\beta\text{-CD} \cdot \text{PN1}$  e  $2\beta\text{-CD} \cdot \text{PN2}$  sugere igualmente que a estrutura destes seja semelhante à do cristal formado com S-Ibu.

O complexo formado com PrO1 (cap. 5) é ainda mais curioso, pois não só apresenta uma estequiometria de 2:1 como parece ter as ciclodextrinas empacotadas em “espinha de arenque”, como se observa nos cristal de hidrato de  $\beta\text{-CD}$  e de complexos de inclusão com hóspedes de pequenas dimensões. Normalmente, estes complexos apresentam estequiometria 1:1. Infelizmente, a estrutura do composto  $2\beta\text{-CD} \cdot \text{PrO1}$  não pode ser determinada com rigor pois não se formaram cristais de tamanho adequado para estudos de difracção de raios X.

A maioria dos sistemas estudados apresenta estequiometria 1:1 com as moléculas de  $\beta\text{-CD}$  organizadas em canal. Este resultado está de acordo com os restantes estudos

feitos com ciclodextrinas. Na realidade, o empacotamento em canal é a forma mais vulgarmente observada nos complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD.

## Propriedades modificadas

Alguns dos hóspedes estudados neste trabalho apresentam características físico-químicas que os tornam alvos preferenciais de inclusão, com vista ao melhoramento da sua estabilidade. Assim, o omeprazole é sensível ao calor e à luz, os organometálicos com núcleo de molibdénio ( $CpMo1$ ,  $CpMo2$  e  $IndMo$ ) são facilmente degradados por contacto com o oxigénio e o metalloceno  $Cp_2MoCl_2$  tende a perder rapidamente os cloretos por contacto com a água. A inclusão destes compostos na  $\beta$ -CD permitiu aumentar a estabilidade do omeprazole e dos organometálicos por alguns dias. A encapsulação de  $Cp_2MoCl_2$  não só permitiu manter intactos os cloretos como também contribuiu para melhorar a actividade citostática e antiproliferativa deste composto. Este fenómeno parece indicar que a acção biológica está associada à ligação Mo-Cl.

## Trabalho futuro

As ciclodextrinas são capazes de formar complexos com moléculas orgânicas e organometálicas, protegendo-as do calor e das radiações ultra-violeta. Permitem ainda manter a molécula hóspede numa determinada conformação através do estabelecimento de interacções intermoleculares. No futuro, pretende-se tirar o máximo partido destas propriedades. Assim, seria interessante a inclusão de carotenóides, moléculas orgânicas presente em vegetais como a cenoura e o tomate, com acção anti-oxidante que lhes confere um potencial interesse na prevenção de vários tipos de cancro. Foi demonstrado que a sua absorção pelo organismo humano está dependente da conformação (*cis* versus *trans*) do sistemas de ligações duplas conjugadas. A inclusão na ciclodextrina poderá ser uma forma de estabilizar a conformação mais adequada à absorção, aumentando assim o seu valor como suplemento nutricional.

Dentro dos compostos com núcleos metálicos ou inorgânicos, propõe-se a continuação do estudo de sistemas com propriedades citostáticas, por modificações selectivas da molécula de  $Cp_2MoCl_2$ . Outro grupo de moléculas com grande interesse são as que possuem um núcleo de lantanídeo coordenado com ligandos orgânicos adequados de modo a apresentar propriedades fosforescentes. A sua inclusão em ciclodextrinas poderá contribuir para estabilizar a emissão de luz visível.

# Secção Experimental

## Secção Experimental

## Secção experimental

Materiais utilizados	121
Solventes	121
Reagentes	121
Técnicas de caracterização	122
Análise elementar	122
Espectroscopia vibracional	122
Termogravimetria	122
Espectroscopia de RMN em solução	122
Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$	122
Difracção de raios X de amostras pulverizadas	123
Caracterização da interacção $\beta$ -CD / <i>p</i> -HB em solução	123
Estequiometria de inclusão segundo o método de Job	123
Constante de inclusão	124
Preparação de complexos de inclusão no estado sólido	124
Cristalização de $\beta$ -CD com <i>p</i> -HB	124
Cristalização de $\beta$ -CD com R e S-Ibu	125
Complexação de $\beta$ -CD com PN1, PN2, SSP e SSN	125
Complexação de $\beta$ -CD com PrO1, PrO2 e Ompz	126
Complexação de $\beta$ -CD com CpMo1, CpMo2 e IndMo	126
Complexação de $\beta$ -CD com FeCN1, FeCN2 e KFeCN	127
Complexação de $\beta$ -CD com $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$	127
Análise elementar	128
Espectroscopia de infra-vermelho	128
Espectroscopia de RMN CP-MAS de $^{13}\text{C}$	130
Estudos cristalográficos	133
Complexo $2\beta\text{-CD} \cdot 4p\text{-HB} \cdot 9,45\text{H}_2\text{O}$	133
Complexo $2\beta\text{-CD} \cdot \text{S-Ibu} \cdot 25\text{H}_2\text{O}$	142
Estudos teóricos	146
Testes de actividade citotóxica e antiproliferativa	147
Material biológico	147
Culturas celulares	147
Determinação da viabilidade e da densidade celulares	148
Método do azul de tripano	148
Método do MTT	149
Método do azul de alamar	149
Referências	151

## **Materiais utilizados**

### ***Solventes***

A água utilizada em todas as inclusões e para a lavagem do material após utilização foi preparada a partir de água desionizada, a que se acrescentou  $\text{KMnO}_4$  (1 mg por litro) para eliminar resíduos de materiais orgânicos. Esta solução foi destilada e o destilado obtido foi novamente sujeito a destilação, obtendo-se assim água bi-destilada.

Os restantes solventes utilizados apresentam pureza analítica.

### ***Reagentes***

A  $\beta$ -CD, gentilmente cedida pela Wacker-Chemie (Alemanha), foi dissolvida em água e recristalizada antes da sua utilização. Os cristais foram pulverizados e armazenados em atmosfera com humidade controlada a 81% (média dos valores de humidade atmosférica na região de Aveiro). O *p*-HB foi fornecido pela BHD Chemicals. O S-Ibu foi fornecido pela Fluka e o R-Ibu, dos laboratórios RBL, pela Sigma-Aldrich. Os precursores 2-fenoxinitrobenzeno ou PN1 [1, 2], 2-fenoxianilina ou PN2 [3], 2-fenoximetanossulfonânida ou PN3 [3] e nimesulide (NIMED) [3] foram preparados de acordo com os procedimentos publicados na literatura.

Para preparar os sais sódicos do PN3 (SSP) e do NIMED (SSN) dissolveu-se o PN3 e o NIMED em THF, tendo em seguida sido adicionado sódio (no estado sólido) com agitação durante 4 horas. Decorrido este período de tempo, adicionou-se etanol à solução e manteve-se a agitação por mais uma hora. Finalmente, o solvente foi evaporado e o composto ressuspendido em 200 ml de diclorometano, filtrado e lavado várias vezes com diclorometano.

Os compostos 2-clorometil-4-metoxi-3,5-dimetilpiridina HCl [4], 2-metoxi-2-mercaptobenzimidazole (PrO1) [5], 5-metoxi-2-[(3,5-dimetil-4-metoxi-2-piridina)metil]tio-1H-benzimidazole (PrO2) [2, 6] e 5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]-sulfonil-1H-benzimidazole (omeprazole, Ompz) [7 - 9] foram preparados no ITQB (Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras) de acordo com os procedimentos descritos na literatura.

O meio de cultura (DMEM-HG e RPMI-1640) usado nos ensaios de toxicidade citológica, bem como o antibiótico (penicilina-estreptomicina solução 100×), o azul de Tripiano, o vermelho de fenol (fenolsulfonftaleína), os sais e ácidos inorgânicos (*pro analysis*), e os reagentes cisplatina (*cis*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), glucose, glutamina, HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-[4-butano-sulfónico]), MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), foram obtidos da Sigma-Aldrich. O soro fetal bovino foi comprado a Biochrom KG, Berlim (Alemanha). O azul de Alamar foi proveniente da Accurate Chemical&Scientific Corporation, Westbury, New York (EUA).

## **Técnicas de caracterização**

### ***Análise elementar***

As microanálises de  $\beta$ -CD-S-Ibu e  $\beta$ -CD-R-Ibu foram realizadas no Dep. Química da Universidade de Aveiro, enquanto que as de  $\beta$ -CD-FeCN1,  $\beta$ -CD-FeCN2 e  $\beta$ -CD-KFeCN foram executadas no ITQB e as de CpMo1, CpMo2, IndMo e Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub> foram feitas na Universidade Técnica de Munique por Barth e seus colaboradores.

### ***Espectroscopia vibracional***

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram registados num espectrofotómetro Unicam Mattson Mod 7000, tendo-se usado pastilhas de KBr.

Para os espectros de Raman, as amostras foram empacotadas em tubos capilares de vidro. Os espectros foram registados num sistema de Raman Jobin-Yvon t64000 equipado com um laser de Ar<sup>+</sup> (50 mW na posição da amostra) e um detector CCD (não intensificado).

### ***Termogravimetria***

Os termogramas dos compostos organometálicos, das suas misturas físicas e dos complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD foram obtidos com um sistema Mettler TA3000 com uma taxa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> em atmosfera (estática) de ar. As amostras, com massa entre 5 e 10 mg, foram colocadas num suporte de alumina de 7 mm Ø.

Os termogramas dos compostos orgânicos (*p*-HB, Ibu, Ompz, Nimesulide e precursores), das suas misturas físicas e dos complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD foram registados numa termobalança Shimadzu TGA-50, usando-se uma taxa de aquecimento de 1 °C min<sup>-1</sup> em atmosfera de ar, com um fluxo de 30 mL min<sup>-1</sup>. As amostras, com massa entre 5 e 10 mg, foram colocadas num suporte de platina de 5 mm Ø.

### ***Espectroscopia de RMN em solução***

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram registados num espectrómetro Bruker AM X 300, à temperatura de 19,5°C. O desvio dos prótons da água ( $\delta = 4.63$  ppm) foi usado como referência interna.

### ***Espectroscopia de RMN em estado sólido***

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C no estado sólido foram obtidos usando polarização cruzada e rotação segundo o ângulo mágico (CP-MAS). Usou-se um espectrómetro Bruker MSL 400P de 9,4 T com um pulso de <sup>1</sup>H de 4.5  $\mu$ s a 90°, 2ms de tempo de contacto, rotação a 9 kHz e um intervalo de 12 segundos entre cada aquisição. Trabalhou-se à temperatura de 25 °C. Os desvios químicos são apresentados em partes por milhão, usando-se o TMS como referência externa.

### ***Difracção de raios X de amostras pulverizadas***

As análises de difracção de raios X de pós foram efectuadas num difractómetro Philips X'pert, usando-se radiação de Cu ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) numa geometria de Bragg-Brentano com um monocromador de grafite no feixe difractado.

### **Caracterização da interacção $\beta$ -CD / *p*-HB em solução**

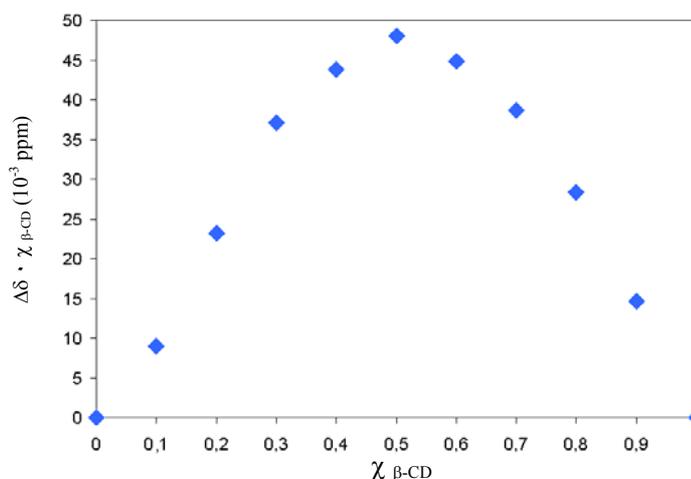
Os protões H3 e H5 da  $\beta$ -CD formam duas “coroas” internas de átomos de hidrogénio, próximas das orlas maior e menor, respectivamente. Deste modo, apresentam uma localização estratégica para assinalar a inclusão de um hóspede na cavidade da  $\beta$ -CD. Tanto os protões H3 como os H5 sofrem um desvio para campo alto devido ao efeito de blindagem anisotrópico criado pelo anel aromático do *p*-HB encapsulado. No entanto, enquanto que os protões H5 originam um sinal de RMN largo e sofrem um desvio ainda mais largo, os protões H3 originam um multiplete cujo desvio é difícil de medir devido a sobreposição com outros sinais da  $\beta$ -CD [10]. Deste modo, é habitual escolher-se o sinal de RMN do protão H5 como sonda da interacção hóspedeiro-hóspede [11].

### ***Estequiometria da inclusão segundo o método de Job***

A estequiometria do complexo  $\beta$ -CD-*p*-HB em solução de óxido de deutério foi determinada segundo o método das variações contínuas, desenvolvido por Job em 1928 [12]. Este consiste em realizar uma série de medições experimentais com soluções em que se fazem variar as concentrações iniciais de hospedeiro e hóspede a valores definidos de  $r$  (sendo  $r = [\beta\text{-CD}]_0 / ([\beta\text{-CD}]_0 + [p\text{-HB}]_0)$ ), mantendo constante a sua soma ( $[\beta\text{-CD}]_0 + [p\text{-HB}]_0 = \text{constante}$ ). Neste caso, usaram-se soluções de *p*-HB e  $\beta$ -CD a 10 mM em  $\text{D}_2\text{O}$ , que foram misturadas

- (i) mantendo constante o volume, para que  $[\beta\text{-CD}]_0 + [p\text{-HB}]_0 = 10 \text{ mM}$ , e
- (ii) com  $r$  variando entre 1/10 e 9/10, com intervalos de 1/10.

Por fim, determinou-se a estequiometria traçando o gráfico de  $\Delta\delta \cdot \chi_{\beta\text{-CD}}$  versus  $r$ , sendo  $\Delta\delta$  o desvio de RMN do protão H5 da  $\beta$ -CD (ver figura E1). Note-se que a distribuição é praticamente simétrica, e apresenta um máximo a  $r \approx 0,5$  que aponta para uma associação  $\beta$ -CD : *p*-HB com estequiometria 1:1.



**Figura E1.** Gráfico de Job para o complexo  $\beta$ -CD-*p*-HB em  $\text{D}_2\text{O}$

### Constante de inclusão

Em solução aquosa, o fenómeno de inclusão corresponde a um equilíbrio entre a  $\beta$ -CD hidratada e o *p*-HB. Ocorre uma substituição das moléculas de água que estão na cavidade da ciclodextrina pelo hóspede que é incluído. Deste modo, a constante de equilíbrio é dada por  $K = K_{app} \cdot (a_{H_2O})^w$ , onde  $a_{H_2O}$  representa a actividade da água, o expoente  $w$  traduz a quantidade de moléculas de água deslocadas e  $K_{app}$  é a constante aparente de inclusão, que mede a extensão da inclusão.

Introduzindo nesta expressão as condições que exprimem as condições iniciais, ou seja,  $[\beta\text{-CD}]_0 = [\beta\text{-CD}] + [C]$  e  $[p\text{-HB}]_0 = [p\text{-HB}] + [C]$  e considerando  $[C]/[\beta\text{-CD}]_0 = \Delta\delta/\Delta\delta_{max}$ , obtém-se [11]:

$$1/\Delta\delta = 1/\Delta\delta_{max} + ([\beta\text{-CD}]_0 K_{app} \Delta\delta_{max})^{-1} ([p\text{-HB}]_0/[\beta\text{-CD}]_0 - \Delta\delta/\Delta\delta_{max})^{-1}$$

Esta equação, aplicável apenas a equilíbrios de associações de estequiometria 1:1, representa uma função linear de  $1/\Delta\delta$  vs.  $([p\text{-HB}]_0/[\beta\text{-CD}]_0 - \Delta\delta/\Delta\delta_{max})^{-1}$ , com a ordenada na origem dada por  $1/\Delta\delta_{max}$  e de pendente  $([\beta\text{-CD}]_0 K_{app} \Delta\delta_{max})^{-1}$ . A sua solução matemática requer um processo iterativo.

Neste trabalho, as concentrações iniciais foram  $[\beta\text{-CD}]_0 = 0,5$  mM e  $[p\text{-HB}]_0 = 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 9,5$  mM. Assim,  $([p\text{-HB}]_0/[\beta\text{-CD}]_0)$  toma valores entre 10 e 19, enquanto que  $\Delta\delta/\Delta\delta_{max} < 1$ . A estimativa inicial para  $\Delta\delta_{max}$  foi obtida utilizando a aproximação  $\Delta\delta/\Delta\delta_{max} = 1$  quando  $[p\text{-HB}]_0 = 9,5$  mM.

Após a realização de três ensaios experimentais, obteve-se um valor médio de  $K_{app} = 3 - 4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ .

## Preparação de complexos de inclusão no estado sólido

### Cristalização de $\beta$ -CD com *p*-HB

Para a obtenção do complexo  $\beta$ -CD-*p*-HB na forma de cristais, dissolveram-se em quantidade estequiométrica a ciclodextrina e o hóspede, tendo-se usado três tipos de solventes: água, uma mistura de água (75%) e etanol (25%), uma mistura de água e 5% de 1, 4-dioxano. O etanol e o dioxano foram escolhidos como co-solventes por apresentarem características adequadas para favorecer a inclusão em ciclodextrinas:

- ✓ são totalmente miscíveis com a água
- ✓ formam com a água solventes mistos de baixa polaridade (tabela E1), contribuindo para uma mais fácil dissolução do hóspede
- ✓ têm reduzida afinidade para a cavidade da ciclodextrina

Água	Água e 25% etanol.	Água e 5% dioxano
80.2	~68.2	~67.4

Tabela E1. Constantes dieléctricas da água e algumas misturas aquosas.

As soluções obtidas foram aquecidas a 40°C, agitadas durante seis horas e arrefecidas muito lentamente, tendo-se obtido cristais após alguns dias.

A observação ao microscópio óptico (figura E2) não revelou diferenças significativas entre a morfologia dos cristais obtidos com os diferentes solventes. Porém, a mistura água-etanol revelou-se a mais indicada para a rápida obtenção do complexo  $\beta$ -CD-*p*-HB na forma cristalina.

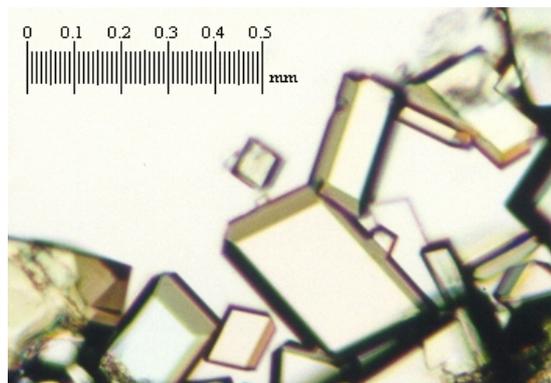


Figura E2. Cristais de  $\beta$ -CD-*p*-HB observados ao microscópio óptico

### ***Cristalização de $\beta$ -CD com R e S-Ibu***

Dissolveu-se 200 mg  $\beta$ -CD (0,152 mmol) em 10 ml de água à temperatura de 80 °C. Adicionou-se 37 mg de S-Ibu (0,152 mmol) e manteve-se a agitação durante 7 horas. A solução foi arrefecida lentamente (em frasco de Dewar), tendo-se observado a formação de cristais de  $\beta$ -CD-S-Ibu após 48 horas.

Para a obtenção de  $\beta$ -CD-R-Ibu procedeu-se da mesma forma, mas usando um tempo de agitação de 48 horas.

### ***Complexação de $\beta$ -CD com PN1, PN2, SSP e SSN***

200 mg de  $\beta$ -CD (0,15 mmol) foram dissolvidos em 10 ml de água com aquecimento a 80 °C e agitação por 30 min. A esta solução adicionou-se 26,2  $\mu$ l de PN1 (0,15 mmol) mantendo-se o calor e a agitação por mais 2 h. Após este período, a solução foi colocada arrefecer lentamente por 48 h, tendo-se obtido cristais de 0,1 a 0,2 mm, com um rendimento de 150 mg (65%).

Para a obtenção de  $\beta$ -CD-PN2 preparou-se igualmente uma solução de 200 mg de  $\beta$ -CD em 10 ml de água, a que se adicionou 28,0 mg de PN2 (0,15 mmol), usando as mesmas condições de temperatura, agitação e arrefecimento descritas para PN1. Foram obtidos cristais de 0,3 a 0,5 mm, com um rendimento de 130 mg (57%).

660 mg de  $\beta$ -CD (0,502 mmol) foram dissolvidos em 1 ml de água a 90 °C tendo-se adicionado de seguida 142,2 mg de SSP (0,502 mmol). A solução mista foi aquecida durante o tempo necessário à redução do volume de água e conseqüente precipitação de um produto rosa-esbranquiçado. O rendimento foi de 740 mg (92%).

660 mg de  $\beta$ -CD (0,502 mmol) foram igualmente dissolvidos em 1 ml de água a 90 °C e adicionados de 165,8 mg de SSN (0,502 mmol). O aquecimento manteve-se até à redução do volume de água e conseqüente precipitação de um produto amarelo vivo. O rendimento foi de 760 mg (92%).

### **Complexação de $\beta$ -CD com PrO1, PrO2 e Ompz**

Para a obtenção de  $\beta$ -CD-PrO1 dissolveram-se 200 mg de  $\beta$ -CD (0,17 mmol) em 10 ml de uma solução contendo 65% de água e 35% de etanol com aquecimento a 80 °C. A esta mistura foram adicionados 31 mg (0,17 mmol) de 2-metoxi-2-mercaptobenzimidazole (PrO1). A solução resultante foi aquecida por mais cinco horas, de modo a reduzir o seu volume até cerca de metade. Verificou-se o aparecimento de pequenos núcleos cristalinos à superfície da solução que cresceram com o arrefecimento. Deste modo obtiveram-se cristais prismáticos incolores com 0,5 - 1,5 mm e também pequenos cristais amarelos em forma de agulha. A mistura de cristais foi lavada com 2 ml de 1,4-dioxano e depois com etanol de modo a remover os cristais amarelos, purificando os cristais do complexo de inclusão. Rendimento: 160 mg (70%).

A cristalização de  $\beta$ -CD-PrO2 consistiu em dissolver 200 mg de  $\beta$ -CD (0,17 mmol) em 10 ml de uma mistura com 75% de água e 25% de etanol, aquecida a 70 °C. A esta solução adicionou-se 50 mg (0,17 mmol) do hóspede 5-metoxi-2-[(3,5-dimetil-4-metoxi-2-piridina)metiltio]-1H-benzimidazole (PrO2), mantendo a solução resultante em agitação e com aquecimento por 12 h. Após este período, a solução foi arrefecida muito lentamente, tendo-se observado a formação de cristais após uma semana. Rendimento: 110 mg (44%).

Para preparar o complexo  $\beta$ -CD-Ompz foi necessário usar uma solução alcalina, de modo a evitar a decomposição do Ompz. Do mesmo modo, não foi possível o uso de aquecimento para facilitar a dissolução dos componentes, caso contrário verificar-se-ia a degradação do Ompz. Assim, a  $\beta$ -CD (100 mg, ou seja, 0,09 mmol) foi dissolvida em 5 ml numa solução aquosa de NaOH a pH 12 à temperatura ambiente, adicionando-se de seguida 26 mg de omeprazole (0,09 mmol). A mistura obtida esteve em agitação por 20 h e seguidamente colocada no frigorífico para repousar. Por decantação foi isolado um precipitado amarelo esbranquiçado, que após a secagem foi armazenado no frigorífico. Rendimento: 40 mg (32%).

### **Complexação de $\beta$ -CD com $MoCp(\eta^3-C_3H_5)(CO)_2$ , $MoInd'(\eta^3-C_3H_5)(CO)_2$ , $Mo(C_5H_4SiMe_3)(\eta^3-C_3H_5)(CO)_2$**

A inclusão dos três compostos de molibdénio na  $\beta$ -CD consistiu em agitar por uma hora uma solução aquosa de  $\beta$ -CD saturada a 40 °C (o que corresponde a uma concentração de  $2,65 \times 10^{-2}$  M) com uma solução de hóspede em diclorometano, também na concentração de  $2,65 \times 10^{-2}$  M. Terminando a agitação, verificou-se formação de um precipitado na interface entre as duas soluções que foi isolado por filtração seguida de lavagem, primeiro com diclorometano, para remover restos de hóspede não complexado, e seguidamente com água para remover  $\beta$ -CD não complexada. Finalmente, os complexos foram secos com um vácuo ligeiro. As complexações renderam 580 mg de  $\beta$ -CD-CpMo1 (83%), 550 mg de  $\beta$ -CD-CpMo2 (74%) e 640 mg de  $\beta$ -CD-IndMo (88%).

Uma vez que todos os hóspedes são susceptíveis de se degradarem em contacto com a atmosfera, os complexos também apresentam sensibilidade ao ar, pelo que foram armazenados em tubos de Schlenck com atmosfera de azoto. Contudo, a encapsulação em  $\beta$ -CD permitiu diminuir a fragilidade dos organometálicos, uma vez que os complexos de inclusão de cor amarela-esbranquiçada se alteraram após uma semana em contacto com o ar, adquirindo uma cor verde clara. Os mesmos compostos, quando na forma não encapsulada, degradam-se mais rapidamente, mudando de cor amarelo-forte para verde-escuro em dois a três dias.

### ***Complexação de $\beta$ -CD com $CpFe(CO)_2CN$ , $CpFe(dppe)CN$ e $K[CpFe(CO)(CN)_2]$***

Os três ferrocianetos -  $FeCN_1$ ,  $FeCN_2$  e  $KFeCN$  - apresentam solubilidades diferentes, o que significa que teve de ser concebido um método diferente de inclusão com a  $\beta$ -CD para cada um deles. O composto  $KFeCN$  como é um sal dissolve facilmente na água, podendo usar-se o vulgar método de co-cristalização com a  $\beta$ -CD a partir duma solução aquosa mista. Para tal, 0,35 g (0,31 mmol) de  $\beta$ -CD e 0,074 g (0,31 mmol) de  $KFeCN$  foram dissolvidos em 10 ml água e aquecidos a 40 °C com agitação durante duas horas. Esta solução foi deixada a evaporar durante vários dias, após o que se obteve um precipitado acastanhado. Por filtração, isolou-se o complexo  $KFeCN$ - $\beta$ -CD, com um rendimento de 0,38 g (78%). Para aumentar o rendimento e a rapidez de obtenção do composto de inclusão foi ainda usada uma variante deste método, na qual a solução mista (preparada da mesma forma) foi congelada e liofilizada, tendo-se obtido um produto acastanhado, com um rendimento de 0,45 g (94%).

Os complexos  $FeCN_1$  e  $FeCN_2$  são insolúveis em água, dissolvendo bem em solventes orgânicos. Deste modo, a sua inclusão na ciclodextrina consistiu em agitar 10 ml duma solução aquosa de  $\beta$ -CD (0,31 mmol) com uma solução do organometálico (0,31 mmol) em 7 ml de diclorometano, à temperatura de 40°C. No caso de  $FeCN_1$ - $\beta$ -CD cessou-se a agitação decorridas duas horas, observando-se a formação de um precipitado amarelado na interface entre os dois solventes que foi filtrado e lavado com diclorometano e seguidamente com água, com um rendimento de 0,38 g (80%). No caso da inclusão de  $FeCN_2$ , a agitação durou 24 h, isolando-se o precipitado da interface diclorometano/água por decantação da fase aquosa, lavagem com água, centrifugação e nova decantação. O composto  $FeCN_2$ - $\beta$ -CD ficou como sobrenadante, tendo sido removido com uma espátula e seco ao ar. O rendimento final foi de 0,26 g (50%).

### ***Complexação de $\beta$ -CD com $Cp_2MoCl_2$***

67,8 mg (0,23 mmol) de  $Cp_2MoCl_2$  foram adicionados a uma solução de  $\beta$ -CD (300 mg ou seja 0,23 mmol) em 20 ml água. A solução resultante foi sujeita a agitação em banho de ultra-sons durante 10 minutos à temperatura ambiente, usando-se gelo para evitar o aquecimento do banho. Decorrido este período, foi instantaneamente congelada por imersão em azoto líquido e por fim liofilizada. O rendimento rondou os 95%.

O produto liofilizado foi re-hidratado por exposição a uma atmosfera de humidade controlada (81% de humidade relativa) durante cerca de uma hora.

## Análise elementar e determinação de metal

Nos complexos de inclusão contendo organometálicos, para além da análise elementar foi também feita a determinação da quantidade de molibdénio ou ferro por ICP com vista a facilitar o cálculo da estequiometria de complexação. Os resultados obtidos foram incluídos na tabela E2.

COMPOSTO	%C		%H		%N		%S		%Fe		%Mo	
	ESPER.	OBTIDO										
$\beta$ -CD·Ibu	42,7	43,1	6,87	7,03	—	—	—	—	—	—	—	—
$\beta$ -CD·PN1	43,4	43,7	5,86	6,00	0,93	0,44	—	—	—	—	—	—
$\beta$ -CD·PN2	41,5	41,7	6,80	6,41	0,50	0,50	—	—	—	—	—	—
$\beta$ -CD·SSP	40,3	40,6	6,52	6,65	0,85	0,69	1,95	1,38	—	—	—	—
$\beta$ -CD·SSN	40,6	40,5	6,15	6,25	1,72	1,81	2,01	1,95	—	—	—	—
$\beta$ -CD·PrO1	39,3	39,7	6,74	6,39	0,99	0,78	1,14	0,82	—	—	—	—
$\beta$ -CD·PrO2	41,3	41,5	6,87	6,73	2,45	2,31	1,87	1,71	—	—	—	—
$\beta$ -CD·Ompz	43,6	43,5	6,51	6,05	2,59	2,67	1,97	1,94	—	—	—	—
$\beta$ -CD·CpMo1	38,4	38,3	6,56	6,40	—	—	—	—	—	—	5,89	5,74
$\beta$ -CD·IndMo	38,5	38,2	6,81	6,70	—	—	—	—	—	—	5,59	5,48
$\beta$ -CD·CpMo2	40,5	40,4	6,44	6,23	—	—	—	—	—	—	5,78	6,02
$\beta$ -CD·Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	38,7	38,5	6,25	6,14	—	—	—	—	—	—	5,95	6,12
KFeCN· $\beta$ -CD	38,6	38,5	6,16	6,03	1,80	1,67	—	—	3,59	3,39	—	—
FeCN1· $\beta$ -CD	38,7	38,3	6,42	6,11	0,90	0,78	—	—	3,59	3,33	—	—
FeCN2· $\beta$ -CD	46,9	39,2	6,54	6,67	0,74	0,24	—	—	2,95	0,84	—	—

**Tabela E.2.** Resultados de análise elementar e de ICP dos complexos de inclusão estudados nesta tese. Os valores esperados foram calculados com base nas estequiometrias seguintes: 2( $\beta$ -CD)·Ibu·14H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·PN1·8H<sub>2</sub>O; 2( $\beta$ -CD)·PN2·18H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·SSP·12H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·SSN·9H<sub>2</sub>O; 2( $\beta$ -CD)·PrO1·20H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·PrO2·14H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·Ompz·8H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·CpMo1·13H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·CpMo2·13H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·IndMo·12H<sub>2</sub>O;  $\beta$ -CD·Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub>·10H<sub>2</sub>O; KFeCN· $\beta$ -CD·10H<sub>2</sub>O; FeCN1· $\beta$ -CD·12H<sub>2</sub>O; FeCN2· $\beta$ -CD·12H<sub>2</sub>O

## Espectroscopia de infra-vermelho

Os hóspedes e os seus respectivos complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD foram estudados por espectroscopia de IV. A tabela E3 apresenta uma selecção das bandas de absorção observadas.

COMPOSTO	PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO EM INFRAVERMELHO ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ )
<i>p</i> -HB	▪ 3172 vs, 3045 m, 2967 m, 2878 m, 1906 m, 1667 vs, 1648 sh, 1600 vs, 1560 sh, 1517 s, 1454 vs, 1384 s, 1317 s, 1287 vs, 1241 s, 1160 vs, 1112 m, 858 m, 834 s, 823 sh, 789 m, 708 m, 643 m, 604 s, 506 m, 456 m
$\beta$ -CD· <i>p</i> -HB	▪ 3372 vs, 2924 s, 1689 m, 1601 m, 1584 sh, 1442 m, 1383 m, 1371 m, 1335 m, 1305 m, 1235 sh, 1211 m, 1159 s, 1103s, 1079 s, 1055 vs, 1027 vs, 1002 s, 946 m, 938 m, 859 m, 837 m, 755 m, 703 m, 603 m, 576 m, 530 m
Ibu	▪ 2954 s, 2922 s, 2869 s, 1707 vs, 1509 m, 1466 m, 1418 m, 1381 m, 1301 m, 1281 m, 1266 sh, 1229 m, 1184 m, 1124 m, 1022 m, 1068 m, 1053 m, 1002 m, 950 m, 864 m, 778 m, 745 m, 692 m, 656 m, 638 m, 591 m, 525 m, 475 m, 428 m

---

β-CD·Ibu	▪ 3353 vs, 2923 m, 1757 sh, 1735 m, 1637 m, 1458 sh, 1419 m, 1384 m, 1371 m, 1333 m, 1305 m, 1244 m, 1203 m, 1158 s, 1101 m, 1081 s, 1057 s, 1029 vs, 1003 s, 944 m, 938 m, 860 m, 754 m, 703 m, 607 m, 591 sh, 575 m, 530 m
PN1	▪ 3073 m, 3041 m, 2928 m, 2873 m, 1608 s, 1588 vs, 1525 vs, 1490 vs, 1479 vs, 1457 m, 1350 vs, 1309 m, 1289 m, 1266 s, 1247 vs, 1196 s, 1162 s, 1146 sh, 1089 m, 1071 m, 1054 m, 1039 m, 1023 m, 1005 m, 952 m, 907 m, 883 s, 853 m, 843 s, 797 s, 776 s, 754 s, 743 s, 691 s, 662 m, 490 m
β-CD·PN1	▪ 3377 vs, 2925 s, 1744 m, 1638 m, 1612 m, 1589 m, 1531 s, 1492 m, 1480 m, 1411 m, 1368 m, 1348 m, 1334 m, 1302 m, 1244 m, 1198 m, 1157 s, 1100 sh, 1079 s, 1055 s, 1028 vs, 1003 sh, 945 m, 938 sh, 756 m, 704 m, 692 sh, 650 w, 607 m, 577 m, 529 m
PN2	▪ 3431m, 3384m, 3353m, 3046m, 1620s, 1584s, 1504s, 1490s, 1455m, 1301m, 1266m, 1214 vs, 1191 s, 1151 m, 1072 m, 1024 m, 934 m, 900 m, 877 s, 864 sh, 813 m, 788 m, 759s, 747s, 693s, 635w, 582w, 533m, 521m, 494m, 464m, 450m
β-CD·PN2	▪ 3385 vs, 2931 m, 1623 m, 1587 m, 1504 m, 1489 m, 1462 m, 1418 m, 1370 m, 1334 m, 1302 m, 1271 w, 1222 m, 1157 s, 1011 sh, 1079 s, 1054 s, 1027 vs, 1004 sh, 945 m, 938 sh, 862 w, 755 m, 746 sh, 704 m, 691 m, 608 m, 578 m, 529 w.
SSP	▪ 2580 w, 2095 w, 1959 w, 1623 s, 160s, 1563 m, 1495 vs, 1446 vs, 1295 vs, 1256 s, 1220 vs, 1204 vs, 1167 m, 1101 vs, 1041 m, 996 s, 957 m, 869 s, 805 s, 789 s, 746 s, 692 m, 551 s, 521 s, 460 s, 458 sh
β-CD·SSP	▪ 3367 vs, 2923 m, 1649 m, 1588 m, 1491 m, 1414 m, 1370 m, 1336 m, 1305 m, 1251 m, 1205 m, 1158 s, 1103 m, 1080 s, 1053 sh, 1028 vs, 1003 s, 946 m, 937 m, 860 m, 793 sh, 756 m, 704 m, 609 m, 574 m, 529 m, 513 sh.
SSN	▪ 3597 w, 3533 m, 3212 m, 1648 m, 1584 s, 1493 vs, 1426 w, 1328 vs, 1301 vs, 1262 s, 1245 vs, 1221 vs, 1159 w, 1107 vs, 1083 vs, 981 vs, 959 s, 877 m, 827 m, 800 s, 747 s, 690 s, 662 m, 527 s, 488 m, 465 m
β-CD·SSN	▪ 3383 vs, 2927 m, 1640 m, 1601 m, 1591 sh, 1581 m, 1490 s, 1455 m, 1415 m, 1367 m, 1324 m, 1291 s, 1220 m, 1156 s, 1101 s, 1078 s, 1054 s, 1027 vs, 1004 sh, 945 m, 862 m, 839 m, 796 m, 755 m, 704 m, 654 w, 578 m, 530 m
PrO1	▪ 3305 s, 3151 m, 3104m, 3061 s, 3006m, 2964 m, 2885 m, 2834 m, 1788 w, 1703 m, 1680 m, 1640 m, 1621 s, 1500 vs, 1407 vs, 1384 vs, 1334 vs, 1365 s, 1206 m, 1181 vs, 1154 vs, 1137 vs, 1205 vs, 973 m, 938 m, 894 m, 865 s, 779 s, 765 s, 754 s, 730 s, 626 s, 576 s
β-CD·PrO1	▪ 3401 s, 2924 m, 1642 m, 1620 m, 1496 sh, 1460 m, 1455 m 1419 m, 1383 m, 1369 m, 1336 m, 1300 m, 1258 m, 1205 m, 1156 s, 1118 sh, 1103 sh, 1081 s, 1028 vs, 1001 sh, 946 m, 939 m, 889 w, 869 m, 782 w, 757 m, 707 m, 600 m, 578 m, 529m
PrO2	▪ 3160 m, 3119 m, 3072 m, 2995 m, 2959 m, 2803 m, 1839 w, 1636 s, 1594 m, 1569 m, 1482 s, 1458 vs, 1437 vs, 1403 vs, 1345 vs, 1308 m, 1262 vs, 1222 m, 1169 m, 1156 vs, 1079 s, 1029 s, 1001 m, 967 m, 959 m, 919 m, 871 w, 836 m, 805 m, 773 m, 658 m, 643 m, 629 m, 567 m, 511 m
β-CD·PrO2	▪ 3360 vs, 2924s, 1631 m, 1591 m, 1569 m, 1450 sh, 1423 m, 1411 m, 1383 m, 1372 m, 1334 m, 1305 sh, 1265 m, 1251 m, 1234 m, 1202 m, 1158 s, 1100 sh, 1080 s, 1055 sh, 1028 vs, 1001 sh, 944 sh, 937 m, 862 m, 754 m, 703 m, 663 w, 607 sh, 574 m, 529 m.
Ompz	▪ 3057 m, 3006 m, 2986 m, 2945 m, 2904 m, 2834 m, 2803 m, 2592 w, 2567 w, 1627 s, 1586 m, 1567 m, 1510 m, 1470 m, 1428 m, 1409 s, 1311 m, 1271 m, 1253 m, 1230 m, 1204 vs, 1159 m, 1111 m, 1077 s, 1013 vs, 967 m, 885 m, 833 m, 809 s, 786 m, 757 m, 731 m, 668 m, 620 m, 581 w, 545 m, 537 m, 502 w, 478 w, 439 m, 431 m

---

$\beta$ -CD·Ompz	▪ 3374 vs, 2924 m, 1628 m, 1587 m, 1566 m, 1510 m, 1461 sh, 1428 m, 1410 m, 1384 m, 1372 sh, 1333 m, 1311 m, 1270 w, 1252 w, 1231 w, 1205 m, 1158 s, 1101 sh, 1080 s, 1056 vs, 1028 vs, 1004 sh, 967 sh, 945 m, 939 sh, 885 w, 862 m, 837 m, 822 m, 810 m, 754 m, 703 m, 670 w, 664 w, 608 w, 576 m, 530 m, 476 w, 442 w, 431 w.
CpMo1	▪ 3105 m, 1924 vs, 1849 vs, 1481 m, 1456 m, 1422 m, 1008 m, 919 m, 850 m, 808 s, 618 m, 591 m, 544 m, 534 m, 500 m, 482 m, 472 m
$\beta$ -CD·CpMo1	▪ 3378 vs, 2925 s, 2899 sh, 1945 vs, 1869 vs, 1427 m, 1416 sh, 1385 sh, 1370 m, 1334 m, 1303 m, 1157 vs, 1080 vs, 1029 vs, 947 m, 939 m, 705 s, 578 s, 531 s
CpMo2	▪ 2955 m, 2896 m, 1914 vs, 1851 vs, 1392 m, 1251 s, 1162 m, 1045 m, 837 s, 755 s
$\beta$ -CD·CpMo2	▪ 3387 vs, 2926 s, 1943 s, 1864 s, 1639 m, 1460 sh, 1415 m, 1369 m, 1157s, 1079 s, 1028 vs, 948 m, 939 sh, 757 m, 708 m, 610 m, 580 m, 533 m
IndMo	▪ 3842 s, 1942 sh, 1923 vs, 1849 vs, 1384 m, 1341 m, 824 m, 812 m, 754 m, 614 m, 597 m, 580 m, 531 m, 505 m, 483 m, 473 m, 462 m
$\beta$ -CD·IndMo	▪ 3370 vs, 2929 s, 1949 s, 1870 s, 1636 m, 1457 sh, 1412 m, 1369 m, 1337 m, 1302 m, 1156 s, 1086 s, 1053 s, 1028 vs, 947 m
Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	▪ 3097 vs, 1425 s, 1386 m, 1360 m, 1115 m, 1079 m, 1016 m, 996 m, 876 m, 830 vs, 807 s, 760 m, 589 m, 417 m
$\beta$ -CD·Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	▪ 3389 vs, 3110 s, 2928 m, 1640 m, 1415 m, 1368 m, 1334 m, 1300 m, 1243 m, 1200 m, 1156 s, 1099 sh, 1079 s, 1053 sh, 1028 vs, 1003 sh, 945 m, 857 m, 840 m, 756 m, 704 m, 650 w, 609 m, 577 m, 531 m
FeCN1	▪ 3114 m, 3100 sh, 2117 s, 2056 vs, 2006 vs, 1973 s, 1428 sh, 1421 m, 1006 m, 854 m, 614 sh, 606 s, 561 s, 539 m, 518 m, 461 m, 407 m
$\beta$ -CD·FeCN1	▪ 3386 vs, 2925 s, 2124 m, 2045 s, 2003 s, 1429 s, 1385 sh, 1383 m, 1374 m, 1334 m, 1303 m, 1201 m, 1157 vs, 1100 s, 1080 vs, 1053 s, 1029 vs, 1003 m, 945 m, 937 m, 861 m, 755 m, 702 s, 607 m, 575 s, 530 s
FeCN2	▪ 3439 vs, 3060 m, 2954 m, 2926 m, 2064 s, 1969 m, 1631 m, 1483 m, 1432 s, 1414 m, 1308 m, 1271 m, 1185 m, 1097 s, 1071 sh, 1027 m, 1012 m, 1000 m, 870 m, 815 m, 790 m, 755 sh, 745 m, 696 vs, 673 m, 534vs, 524 m, 507 m, 498 m
$\beta$ -CD·FeCN2	▪ 3386 vs, 3059 m, 2926 s, 2069 s, 2056 s, 1481 m, 1457 m, 1432 s, 1418 m, 1384 m, 1334 m, 1307 m, 1245 m, 1157 vs, 1121 m, 1097 s, 1080 vs, 1056 s, 1029 vs, 1004 m, 946 m, 938 m, 864 m, 817 m, 795 m, 756 m, 745 m, 705 s, 696 vs, 673 m, 578 m, 533 vs, 525 s, 510 m
KFeCN	▪ 3124 sh, 3111 m, 3101 sh, 2095 s, 2083 vs, 2044 w, 2029 w, 1972 vs, 1952 vs, 1915 sh, 1631 s, 1605 m, 1429 m, 1350 m, 1018 sh, 1008 m, 843 m, 826 m, 615 m, 605 m, 596 m, 586 m, 561 m, 435 m, 414 m
$\beta$ -CD·KFeCN	▪ 3390 vs, 2929 s, 2092 s, 2050 m, 1970 s, 1481 m, 1457 m, 1432 s, 1418 m, 1384 m, 1334 m, 1307 m, 1245 m, 1157 vs, 1121 m, 1097 s, 1080 vs, 1056 s, 1029 vs, 1004 m, 946 m, 938 m, 864 m, 817 m, 795 m, 756 m, 745 m, 705 s, 696 vs, 673 m, 578 m, 533 vs, 525 s, 510 m

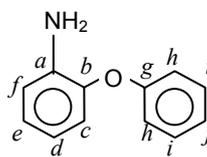
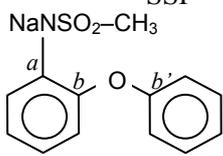
**Tabela E.3.** Bandas de absorção em espectroscopia de FTIR dos hóspedes e respectivos complexos de inclusão em  $\beta$ -CD estudados neste trabalho.

A intensidade das bandas é indicada pelo seguinte código: vs = muito forte, s = forte, m = média, w = fraca, sh = ombro

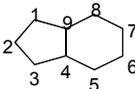
## Espectroscopia de RMN CP-MAS de <sup>13</sup>C

Os hóspedes e os seus respectivos complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD foram estudados por RMN de <sup>13</sup>C de estado sólido. Usou-se polarização cruzada e rotação

segundo o ângulo mágico (CP-MAS). A tabela E4 apresenta uma lista dos desvios químicos dos sinais observados em cada espectro.

COMPOSTO	SINAIS DE RMN CP-MAS DE $^{13}\text{C}$ (ppm)
<i>p</i> -HB	▪ 195 (C ald), 165, 138, 127, 116 (C aromáticos)
$\beta$ -CD· <i>p</i> -HB	▪ 196, 194, 193 (triplete, C ald do <i>p</i> -HB), 165, 164, 163, 139, 138, 133, 130, 129, 127, 117, 116, 115, 114 (quatro multipletos, C arom do <i>p</i> -HB), 105, 104 (duplete, C1 da $\beta$ -CD), 83, 82, 81, 80, 79 (quintuplete, C4 da $\beta$ -CD), 73, 72 (duplete, C2,3,5 da $\beta$ -CD), 60 (C6 da $\beta$ -CD)
Ibu	▪ 182 (CO), 142, 136, 131, 128, 126 (C aromáticos), 45 (C10'), ver numeração na figura 3.1.), 44 (C11'), 32, 31 (duplete, C2'), 25, 21 (C12, 13), 14 (C3')
$\beta$ -CD·S-Ibu	▪ 175 (CO), 141, 139, 138, 136, 130, 129, 127, 126 (C arom), 104 (C1 da $\beta$ -CD), 82, 81, 80 (triplete, C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 61 (C6 da $\beta$ -CD), 45 (C10'), 44 (C11'), 32, 31, 29 (triplete, C2'), 22, 25 (dois singletos, C12',13'), 14 (C3')
$\beta$ -CD·R-Ibu	▪ 175 (CO), 139, 137, 129, 127 (C arom), 104 (C1 da $\beta$ -CD), 82, 81 (C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 61, 60 (C6 da $\beta$ -CD), 46 (C10',11'), 31 (C2'), 22 (C12',13'), 19 (C3')
PN1	▪ (composto líquido)
$\beta$ -CD·PN1	▪ 154, 153, 149, 140, 134, 129, 125, 123, 117 (todos C arom do PN1), 104 (C1 da $\beta$ -CD), 81 (C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 60 (C6 da $\beta$ -CD)
PN2	▪ 160 (C <sub>g</sub> , ver esquema de contagem ao lado), 144 (C <sub>b</sub> ), 141 (C <sub>a</sub> ), 131, 132 (duplete, C <sub>i</sub> ), 126, 123, 122, 120, 119, 118, 114 (todos pertencentes aos restantes carbonos aromáticos)
	
2 $\beta$ -CD·PN2	▪ 162, 159, 157, 144, 142, 140, 139, 129, 128, 125, 124, 121, 120, 119, 117, 116, 114 (todos C arom do PN2), 104 (ombro, C1 da $\beta$ -CD), 103 (C1 da $\beta$ -CD), 81 (C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 60 (C6 da $\beta$ -CD)
SSP	▪ 162, 160, 159 (C <sub>a</sub> , b', ver esquema de contagem ao lado), 145, 144, 141 (C <sub>b</sub> ), 132, 130, 127, 125, 123, 121, 119, 118, 116, 115, 114, 113, 112 (os restantes C aromáticos), 37 (SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
	
$\beta$ -CD·SSP	▪ 161, 160, 150, 130, 123, (sinais largos, C arom do SSP), 102 (C1 da $\beta$ -CD), 81 (C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 60 (C6 da $\beta$ -CD), 39 (SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
SSN	▪ 159, 155, 152, 151, 149, 148, 135 (C quaternários), 130, 129, 128, 124, 123, 122, 121, 120, 119, 115, 114, 113, 112, 107 (C arom), 38, 36 (duplete, SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
$\beta$ -CD·SSN	▪ 161, 150, 137, 130, 120, 118 (sinais largos, C arom), 103 (C1 da $\beta$ -CD), 81 (largo, C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 60 (C6 da $\beta$ -CD), 41 (largo, SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )

---

PrO1	▪ 166, 155, 132, 125, 110, 107, 97, 57
$\beta$ -CD·PrO1	▪ 155, 151, 133, 126, 110 (todos do PrO1), 104, 103, 102, 101 (tetrapleto, C1 da $\beta$ -CD), 56 (PrO1), 85, 84, 83, 82, 81, 80, 78 (multipleteo, C4 da $\beta$ -CD), 76, 75, 74, 73, 72, 71, (multipleteo, C2,3,5 da $\beta$ -CD), 64, 62, 60, 59, 58 (quintupleto, C6 da $\beta$ -CD), 56 (C do metoxilo do PrO1)
PrO2	▪ 163, 155, 152, 151, 150, 139, 137, 126, 123, 114, 105, 104, 99, 60, 58, 54, 37, 15, 10
$\beta$ -CD·PrO2	▪ 162, 156, 155, 152, 151, 149, 139, 135, 126, 125, 122, 116, 114, 109 (todos do PrO2), 103 (C1 da $\beta$ -CD), 98, 95, 93 (PrO2), 82, 81, 79 (tripleteo, C4 da $\beta$ -CD), 72 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 60 (C6 da $\beta$ -CD), 55, 53, 38, 37, 36, 15, 12, 11 (todos do PrO2)
Ompz	▪ 164, 158, 150, 136, 126, 122, 118, 92, 58, 12, 9
$\beta$ -CD·Ompz	▪ 163, 157, 149, 137, 125, 121, 112 (todos do Ompz), 103 (C1 da $\beta$ -CD), 91 (Ompz), 83, 81, 79 (tripleteo, C4 da $\beta$ -CD), 72 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 60 (C6 da $\beta$ -CD), 57, 12, 8 (Ompz)
CpMo1	▪ 239 (CO), 93 (Cp), 68 (largo, <i>Cb</i> , ver o esquema de rotulagem dos carbonos do grupo $-C_3H_5$ ao lado), 42 (largo, <i>Ca,c</i> )
	
$\beta$ -CD·CpMo1	▪ 236 (CO do CpMo1), 104 (C1 da $\beta$ -CD), 92, 90 (dois sinais, Cp), 81, 82 (C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 68 ( <i>Cb</i> do CpMo1), 61 (C6 da $\beta$ -CD), 39 (largo, <i>Ca,c</i> do CpMo1), 36 (ombro)
CpMo2	▪ 236 (CO), 92, 88 (dois sinais afilados, <i>CpSiMe3</i> ), 69 ( <i>Cb</i> ), 41 (largo, <i>Ca,c</i> ), 1 ( <i>CpSiMe3</i> )
$\beta$ -CD·CpMo2	▪ 104, 103, 102, 101 (C1 da $\beta$ -CD), 78, 81, 82, 84 (C4 da $\beta$ -CD), 76, 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 64, 62, 61, 60 (C6 da $\beta$ -CD)
IndMo	▪ 240 (CO), 127 (C5,8 do indenilo, ver esquema de numeração ao lado), 124 (C6,7), 113 (C4,9), 88 (C2), 80 (C1,3), 52 (largo, grupo $C_3H_5$ )
	
$\beta$ -CD·IndMo	▪ 237 (CO), 124 (C5,8 e C6,7 do IndMo), 112 (C4,9 do IndMo), 104 (C1 da $\beta$ -CD), 89 (C2 do IndMo), 83 (pequeno ombro, C1,3 do IndMo), 82, 80 (C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 61 (C6 da $\beta$ -CD), 54 ( <i>Cb</i> do IndMo), 48 (largo, <i>Ca,c</i> do IndMo)
Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	▪ 102 (Cp)
$\beta$ -CD·Cp <sub>2</sub> MoCl <sub>2</sub>	▪ 103 (C1 da $\beta$ -CD), 102 (Cp), 81 (C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 60 (C6 da $\beta$ -CD)
FeCN1	▪ 211 (CO), 128 (CN), 87 (Cp)
$\beta$ -CD·FeCN1	▪ 211 (CO), 126 (largo, CN), 105, 104, 103, 102, 101 (multipleteo, C1 da $\beta$ -CD), 86 (singuleto afilado, Cp), 84, 82, 81, 80, 78 (multipleteo, C4 da $\beta$ -CD), 76, 75, 74, 73, 72, 71 (multipleteo, C2,3,5 da $\beta$ -CD), 63, 61, 60, 59 (quadrupleto, C6 da $\beta$ -CD)
FeCN2	▪ 145 (CN), 139, 137, 133, 128 (multipleteo, fenilos), 79 (Cp), 28 (CH <sub>2</sub> )

---

$\beta$ -CD·FeCN <sub>2</sub>	▪ 152 (largo, CN), 128 (largo, fenilos), 104, 103, 102, 101 (multiplete, C1 da $\beta$ -CD), 84, 83, 81, 80 (multiplete, C4 da $\beta$ -CD), 78 (C4 da $\beta$ -CD e Cp de FeCN <sub>2</sub> ), 76, 73, 72 (triplete, C2,3,5 da $\beta$ -CD), 64, 60 (duplete, C6 da $\beta$ -CD), 28 (largo, CH <sub>2</sub> )
KFeCN	▪ 220, 218 (dois sinais, CO), 152, 151, 149, 147 (quatro sinais, CN), 84 (Cp)
$\beta$ -CD·KFeCN	▪ 153 (largo, CN), 103 (C1 da $\beta$ -CD), 83 (Cp), 80, 78 (duplete, C4 da $\beta$ -CD), 73 (C2,3,5 da $\beta$ -CD), 63, 60 (duplete, C6 da $\beta$ -CD)

**Tabela E.4.** Desvio químico (em ppm relativamente ao TMS) dos máximos dos sinais de RMN CP-MAS de <sup>13</sup>C dos hóspedes e respectivos complexos de inclusão em  $\beta$ -CD. Para o PN1 foi registado o espectro de solução (por se tratar dum composto líquido) usando o CDCl<sub>3</sub> como referência externa:  $\delta$  = 155, 150, 141, 134, 130, 125, 124, 123, 120 e 118 ppm.

## Estudos cristalográficos

### *Complexo 2 $\beta$ -CD·4p-HB·9,45H<sub>2</sub>O*

Um cristal de cor amarelo claro em forma de placa, com as dimensões de 0,3×0,6×0,8 mm<sup>3</sup>, foi montado num capilar de vidro para ser lido por difracção de raios X, executada num difractómetro RT (Enraf-Nonius) Turbo-CAD4. Usou-se radiação de CuK <sub>$\alpha$</sub>  com filtro de Ni ( $\lambda$  = 1,5418 Å) proveniente dum gerador de ânodo rotativo (Enraf-Nonius FR571) operando a 40 kV e 80 mA. Foi recolhido um total de 10775 reflexões com uma resolução de 0,89 Å ( $2\theta$  = 120°). Os dados foram corrigidos de modo a eliminar os efeitos de polarização e de Lorentz, mas não o de absorção ( $\mu$  = 0,97 mm<sup>-1</sup>), ver dados cristalográficos na tabela E4.

A estrutura foi resolvida com o programa SHELXS-97 [13], que permitiu revelar a maioria das posições dos átomos (excepto os de hidrogénio) nas duas moléculas de  $\beta$ -CD e nas quatro de *p*-HB. Os restantes átomos, incluindo os oxigénios da água, foram determinados subsequentemente através dos mapas de densidade electrónica de diferença de Fourier com a ajuda do programa gráfico XTALVIEW [14]. Os refinamentos anisotrópicos foram feitos por mínimos quadrados sobre a matriz completa de  $F^2$  para todos os átomos excepto os de hidrogénio usando o programa SHELXL-97. Não foi possível determinar a posição de todos os átomos de hidrogénio, que foram calculadas supondo uma geometria ideal, de acordo com o “riding model”. Todas as posições dos grupos hidroxilo O6–H estão ocupadas na totalidade, excepto o resíduo #1 de glucose da molécula #1 de  $\beta$ -CD (denominada O61\_1, ver explicação da numeração dos átomos mais abaixo) que está desordenada em duas posições. Os quatro *p*-HBs estão totalmente ocupadas e encontram-se dentro do canal formado pelo empilhamento cabeça com cabeça das moléculas de  $\beta$ -CD. Estas foram refinadas sem quaisquer restrições. As 9,45 moléculas de água estão distribuídas por 28 posições nos interstícios entre as  $\beta$ -CDs.

O sumário dos dados cristalográficos, da geometria de inclusão das moléculas de *p*-HB nas cavidades da  $\beta$ -CD e dos parâmetros geométricos do complexo de inclusão da  $\beta$ -

CD com o *p*-HB é apresentado nas tabelas E5, E6 e E7, respectivamente. As coordenadas atômicas finais e os correspondentes factores de desvio térmico isotrópico estão depositados na base de dados do *Cambridge Crystallographic Data Center* [15]. A numeração adoptada para os átomos segue a que foi convencionada para os hidratos de carbono, ou seja, o primeiro número indica a posição no resíduo de glucose e o segundo número indica a posição da glucose no macrociclo. Adicionalmente, são usados os números suplementares 1 e 2 para indicar moléculas #1 e 2 de  $\beta$ -CD. Por exemplo, C41\_2 indica o carbono 4 da unidade #1 de glucose da  $\beta$ -CD #2. As letras A e B indicam átomos desordenados. Para as moléculas do hóspede, adoptou-se uma numeração semelhante recorrendo-se à letra P para indicar *p*-HB, por exemplo, C5P\_3 significa o C5 da molécula #3 de *p*-HB.

Fórmula química	$2(C_6H_{10}O_5)_7 \cdot 4C_7H_6O_2 \cdot 9,45H_2O$
Peso molecular	2928,28
Dimensões do cristal (mm <sup>3</sup> )	0,3 × 0,6 × 0,8
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	<i>P</i> 1
Dimensões da célula unitária	$a = 15,262(2)$ ; $b = 15,728(1)$ ; $c = 16,350(1)$ (Å) $\alpha = 92,67(1)$ ; $\beta = 96,97(1)$ ; $\gamma = 103,31(1)$ (°)
Volume (Å <sup>3</sup> )	3780,1(7)
<i>Z</i>	1
$D_x$ (g cm <sup>-3</sup> )	1,278
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0,97
$F(000)$	1554
Comprim. de onda, CuK $\alpha$ (Å)	1,5418
Temperatura (°C)	20
$\theta$ usado na recolha de dados (°)	2,73 a 59,50 (resolução de 0,89 Å)
Reflexões medidas	10775
Reflexões únicas	10370
Intervalos de indexação	$-17 \leq h \leq 0$ , $-17 \leq k \leq 16$ , $-18 \leq l \leq 18$
Reflexões únicas [ $F^2 > 2\sigma(F^2)$ ]	10157
Solução da estrutura	Métodos directos (SHELXS-97)
Método de refinamento	Mínimos quadrados sobre a matriz completa de $F^2$
Esquema de ponderação ( <i>weighting scheme</i> )	$w = [S^2(F_o^2) + (0,1579P)^2 + 1,5832P]^{-1}$ , onde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
Dados/parâmetros	10775/1973
$R$ [ $F^2 > 2\sigma(F^2)$ ]	$R^a = 0,066$ ; $wR^b = 0,184$
$R$ (todos os dados)	$R^a = 0,071$ ; $wR^b = 0,190$
Validade do ajuste	1,038
Dens. electrónica residual (e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup> )	0,60; -0,27

**Tabela E5.** Dados cristalográficos para 2 $\beta$ -CD-4*p*-HB-9,45H<sub>2</sub>O

$$^a R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

$$^b wR = \frac{\sum \{w(F_o^2 - F_c^2)^2\}}{\sum w(F_o^2)^2}^{1/2}$$

<i>p</i> -HB	1	2	3	4
<i>d</i>	3,66(1)		3,78(1)	
<i>η</i>	20,8(1)		25,0(1)	
<i>τ</i>	86,2(2)	86,5(2)	87,9(2)	88,4(2)
<i>χ</i>	0,3		0,5	

**Tabela E6.** Geometria de inclusão das quatro moléculas de *p*-HBs dentro do dímero de β-CD (distâncias em Å e ângulos em °)

*d* representa a distância entre o centro de cada anel aromático de *p*-HB, ou seja, entre *p*-HB #1 e #2 e entre #3 e #4.

*η* representa o ângulo entre a linha *d* e o plano glicosídico O4 da β-CD.

*τ* representa o ângulo entre os anéis aromáticos do *p*-HB e o plano glicosídico O4 da β-CD.

*χ* representa o ângulo entre os planos dos anéis aromáticos de *p*-HB #1, 2 ( $\chi = |\tau_1 - \tau_2|$ ) e de *p*-HB #3, 4 ( $\chi = |\tau_3 - \tau_4|$ ).

Resíduo	1	2	3	4	5	6	7
$Q^a; \theta^b$	0,57; 2 <b>0,55; 7<sup>i</sup></b>	0,57; 5 <b>0,57, 4</b>	0,56; 6 <b>0,56; 3</b>	0,57; 1 <b>0,57; 6</b>	0,55; 6 <b>0,57; 7</b>	0,56; 2 <b>0,55; 4</b>	0,55; 5 <b>0,56; 5<sup>i</sup></b>
$\phi^c; \psi^c$	115,2(5); 123,3(5) <b>116,1(5);</b> <b>125,8(5)</b>	112,4(5); 126,2(5) <b>112,7(5);</b> <b>127,4(5)</b>	117,2(5); 133,4(5) <b>112,5(5);</b> <b>124,2(5)</b>	114,1(5); 119,5(5) <b>117,0(5);</b> <b>122,1(5)</b>	108,7(5); 131,1(5) <b>119,3(5);</b> <b>129,2(5)</b>	118,8(5); 122,6(5) <b>112,9(5);</b> <b>125,1(5)</b>	111,2(5); 128,4(5) <b>112,3(5);</b> <b>127,7(5)</b>
Ângulo de inclinação <sup>d</sup>	9,4(4) <b>7,9(1)</b>	6,2(1) <b>8,8(1)</b>	7,1(1) <b>9,5(1)</b>	13,3(2) <b>5,5(1)</b>	2,8(1) <b>2,5(1)</b>	11,4(1) <b>9,5(1)</b>	7,4(1) <b>8,5(1)</b>
Ângulo O4 <sup>e</sup>	130,8(1) <b>130,3(1)</b>	129,2(1) <b>130,2(1)</b>	126,2 (1) <b>126,7(1)</b>	128,5(1) <b>127,5(1)</b>	131,1(1) <b>127,5(1)</b>	127,2(1) <b>128,9(1)</b>	126,9(1) <b>125,5(1)</b>
<i>Distâncias</i>							
Desvio O4 <sup>f</sup>	-0,03 <b>-0,04</b>	0,01 <b>-0,01</b>	0,03 <b>0,03</b>	-0,04 <b>-0,01</b>	0,02 <b>-0,03</b>	0,00 <b>0,02</b>	0,01 <b>0,03</b>
O4(n)···O4(n-1)	4,45(1) <b>4,31(1)</b>	4,35(1) <b>4,46(1)</b>	4,38(1) <b>4,37(1)</b>	4,37(1) <b>4,35(1)</b>	4,38(1) <b>4,36(1)</b>	4,44(1) <b>4,44(1)</b>	4,25(1) <b>4,37(1)</b>
O3(n)···O2(n+1)	2,77(1) <b>2,76(1)</b>	2,76(1) <b>2,82(1)</b>	2,87(1) <b>2,81(1)</b>	2,82(1) <b>2,72(1)</b>	2,81(1) <b>2,77(1)</b>	2,80(1) <b>2,82(1)</b>	2,81(1) <b>2,84(1)</b>
O3(n)_1···O2(m)_2 <sup>g</sup>	3,19(1)	3,01(1)	3,06(1)	3,26(1)	3,03(1)	3,10(1)	3,08(1)
O3(n)_1···O3(m)_2 <sup>g</sup>	2,86(1)	2,77(1)	2,85(1)	2,95(1)	2,75(1)	2,85(1)	2,77(1)
O2(n)_1···O3(m)_2 <sup>g</sup>	3,15(1)	3,02(1)	3,08(1)	3,37(1)	2,98(1)	3,17(1)	3,05(1)
O2(n)_1···O2(m)_2 <sup>g</sup>	3,00(1)	3,03(1)	2,94(1)	3,17(1)	2,89(1)	3,08(1)	2,93(1)

Resíduo	1	2	3	4	5	6	7
<i>Ângulos de torção</i>							
C4–C5–C6–O6	–174,7(24) <sup>h</sup> 48,1(9) <sup>h</sup>	55,5(6)	60,5(8)	59,3(9)	60,5(6)	50,7(8)	58,3(9)
	<b>56,3(8)</b>	<b>54,6(7)</b>	<b>57,2(10)</b>	<b>56,9(7)</b>	<b>55,3(7)</b>	<b>58,2(9)</b>	<b>54,5(7)</b>
O5–C5–C6–O6	64,9(24) <sup>h</sup> –72,3(8) <sup>h</sup>	–65,9(6)	–62,6(7)	–61,9(8)	–62,6(6)	–72,7(7)	–63,8(8)
	<b>–65,7(8)</b>	<b>–65,9(6)</b>	<b>–63,8(9)</b>	<b>–65,7(7)</b>	<b>–67,0(6)</b>	<b>–65,1(8)</b>	<b>–68,2(7)</b>

**Tabela E7.** Parâmetros geométricos de 2 $\beta$ -CD-4p-HB-9,45H<sub>2</sub>O (distâncias em Å e ângulos em °)

<sup>a</sup> Amplitude de deformação conformacional de Cremer-Pople.

<sup>b</sup> Indica o desvio em relação à conformação em cadeira (valor ideal:  $\theta = 0$ ; [16]).

<sup>c</sup> Ângulos de torção  $\phi$  e  $\psi$  do O4 glicosídico, definidos por O5( $n$ )–C1( $n$ )–O4( $n-1$ )–C4( $n-1$ ) e C1( $n$ )–O4( $n-1$ )–C4( $n-1$ )–C3( $n-1$ ), respectivamente [17].

<sup>d</sup> Ângulos de inclinação, definidos como os ângulos entre o plano O4 e os planos que atravessam C1( $n$ ), C4( $n$ ), O4( $n$ ) e O4( $n-1$ ).

<sup>e</sup> Ângulos em cada O4 glicosídico: O4( $n+1$ )–O4( $n$ )–O4( $n-1$ ).

<sup>f</sup> Desvio dos átomos O4 em relação aos mínimos quadrados do plano que atravessa os sete átomos O4.

<sup>g</sup> Pontes de hidrogénio intradiméricas entre os O2 e O3 da unidade de glucose  $n$  ( $\beta$ -CD #1) e os da unidade de glucose  $m$  ( $\beta$ -CD #2).

<sup>h</sup> Valores dos O6 desordenados com factores de ocupação de 0,25 e 0,75 para os sites A e B, respectivamente.

<sup>i</sup> Os algarismos a negrito indicam os valores da  $\beta$ -CD #2.

Átomo	$x/a$	$y/b$	$Z/c$	$U_{eq}$ (Å <sup>2</sup> )
C11_1	0,4539(4)	-0,0962(4)	0,5850(4)	0,0468(13)
C21_1	0,4034(4)	-0,0708(4)	0,5085(4)	0,0471(13)
C31_1	0,4175(4)	0,0282(4)	0,5098(3)	0,0403(12)
C41_1	0,3896(4)	0,0611(4)	0,5882(3)	0,0391(12)
C51_1	0,4427(5)	0,0325(4)	0,6627(4)	0,0480(14)
C61_1	0,4137(4)	0,0594(5)	0,7435(4)	0,077(2)
O21_1	0,4329(4)	-0,1033(3)	0,4367(3)	0,0600(11)
O31_1	0,3647(3)	0,0497(3)	0,4393(3)	0,0520(10)
O41_1	0,4103(2)	0,1547(3)	0,5921(2)	0,0368(8)
O51_1	0,4274(3)	-0,0609(3)	0,6567(3)	0,0562(11)
O61A_1 <sup>a</sup>	0,475(2)	0,035(3)	0,8049(13)	0,153(19)
O61B_1 <sup>a</sup>	0,3186(4)	0,0380(6)	0,7423(5)	0,088(2)
C12_1	0,3377(3)	0,1959(4)	0,5998(3)	0,0352(11)
C22_1	0,3341(4)	0,2564(4)	0,5313(3)	0,0373(11)
C32_1	0,4214(4)	0,3277(4)	0,5415(3)	0,0392(12)
C42_1	0,4330(4)	0,3763(4)	0,6244(3)	0,0360(11)
C52_1	0,4292(4)	0,3123(4)	0,6936(3)	0,0370(11)
C62_1	0,4276(4)	0,3571(4)	0,7776(3)	0,0428(13)
O22_1	0,3188(3)	0,2096(3)	0,4529(2)	0,0463(9)
O32_1	0,4175(4)	0,3846(3)	0,4775(3)	0,0594(12)
O42_1	0,5202(3)	0,4363(2)	0,6376(2)	0,0376(8)
O52_1	0,3487(3)	0,2432(3)	0,6774(2)	0,0383(8)
O62_1	0,3561(4)	0,4001(3)	0,7786(3)	0,0601(11)
C13_1	0,5234(4)	0,5260(4)	0,6588(3)	0,0380(11)
C23_1	0,5702(4)	0,5812(4)	0,5946(3)	0,0399(12)
C33_1	0,6665(4)	0,5729(3)	0,5972(3)	0,0360(11)
C43_1	0,7167(4)	0,6015(3)	0,6840(3)	0,0340(11)
C53_1	0,6654(4)	0,5496(4)	0,7470(3)	0,0398(12)
C63_1	0,7041(6)	0,5828(6)	0,8344(4)	0,0648(19)
O23_1	0,5203(3)	0,5537(3)	0,5158(3)	0,0501(10)
O33_1	0,7110(3)	0,6262(3)	0,5396(2)	0,0475(9)
O43_1	0,8040(3)	0,5841(3)	0,6854(2)	0,0423(8)
O53_1	0,5720(3)	0,5529(3)	0,7375(2)	0,0453(9)
O63_1	0,7010(5)	0,6702(5)	0,8508(4)	0,099(2)
C14_1	0,8814(4)	0,6487(4)	0,7202(4)	0,0461(13)
C24_1	0,9451(4)	0,6683(4)	0,6563(4)	0,0488(14)
C34_1	0,9795(4)	0,5877(4)	0,6360(4)	0,0432(12)
C44_1	1,0220(4)	0,5572(4)	0,7147(4)	0,0428(12)
C54_1	0,9551(4)	0,5430(4)	0,7784(4)	0,0475(13)
C64_1	0,9941(5)	0,5211(5)	0,8604(4)	0,074(2)
O24_1	0,9023(3)	0,6965(3)	0,5847(3)	0,0561(11)
O34_1	1,0431(3)	0,6050(3)	0,5789(3)	0,0578(11)
O44_1	1,0431(3)	0,4745(3)	0,6950(2)	0,0427(9)
O54_1	0,9242(3)	0,6214(3)	0,7917(3)	0,0535(10)
O64_1	1,0696(6)	0,5866(6)	0,8978(5)	0,121(3)
C15_1	1,1338(4)	0,4680(4)	0,7097(4)	0,0432(13)
C25_1	1,1579(4)	0,4280(4)	0,6331(3)	0,0448(13)
C35_1	1,1009(4)	0,3363(4)	0,6130(3)	0,0416(12)
C45_1	1,1154(4)	0,2827(4)	0,6860(3)	0,0360(11)
C55_1	1,0981(4)	0,3268(4)	0,7649(3)	0,0393(12)
C65_1	1,1260(4)	0,2849(4)	0,8420(3)	0,0440(13)

Átomo	$x/a$	$Y/b$	$Z/c$	$U_{eq} (\text{Å}^2)$
O25_1	1,1483(4)	0,4807(3)	0,5660(3)	0,0601(11)
O35_1	1,1256(4)	0,2976(3)	0,5421(2)	0,0538(11)
O45_1	1,0539(3)	0,1988(3)	0,6699(2)	0,0420(8)
O55_1	1,1476(3)	0,4172(3)	0,7775(2)	0,0418(8)
O65_1	1,2207(3)	0,2880(3)	0,8521(3)	0,0539(10)
C16_1	1,0881(4)	0,1231(4)	0,6815(3)	0,0423(12)
C26_1	1,0714(4)	0,0671(4)	0,6002(3)	0,0421(12)
C36_1	0,9715(4)	0,0322(4)	0,5732(3)	0,0393(12)
C46_1	0,9284(4)	-0,0171(4)	0,6416(3)	0,0382(12)
C56_1	0,9489(4)	0,0412(4)	0,7211(3)	0,0443(13)
C66_1	0,9121(6)	-0,0040(5)	0,7935(4)	0,0589(17)
O26_1	1,1150(3)	0,1167(3)	0,5398(3)	0,0459(9)
O36_1	0,9567(3)	-0,0247(3)	0,5001(2)	0,0506(10)
O46_1	0,8339(3)	-0,0445(2)	0,6179(2)	0,0392(8)
O56_1	1,0453(3)	0,0749(3)	0,7430(2)	0,0505(10)
O66_1	0,9372(5)	-0,0840(5)	0,8021(4)	0,0861(17)
C17_1	0,7916(4)	-0,1360(4)	0,6151(3)	0,0402(12)
C27_1	0,7349(4)	-0,1617(3)	0,5320(3)	0,0376(11)
C37_1	0,6625(4)	-0,1104(4)	0,5203(3)	0,0408(12)
C47_1	0,6048(4)	-0,1244(4)	0,5908(3)	0,0394(12)
C57_1	0,6658(4)	-0,1067(4)	0,6760(3)	0,0431(13)
C67_1	0,6127(6)	-0,1357(5)	0,7459(4)	0,0634(18)
O27_1	0,7914(3)	-0,1506(3)	0,4685(2)	0,0465(9)
O37_1	0,6062(3)	-0,1384(3)	0,4445(2)	0,0492(10)
O47_1	0,5491(3)	-0,0647(3)	0,5852(3)	0,0438(9)
O57_1	0,7356(3)	-0,1525(3)	0,6791(2)	0,0444(9)
O67_1	0,5692(7)	-0,2264(6)	0,7353(5)	0,118(3)
C11_2	0,8656(4)	-0,0784(4)	0,1769(3)	0,0419(12)
C21_2	0,9271(4)	-0,0628(4)	0,2593(4)	0,0436(13)
C31_2	0,9623(4)	0,0342(4)	0,2812(3)	0,0380(11)
C41_2	1,0122(4)	0,0761(4)	0,2133(3)	0,0384(12)
C51_2	0,9535(4)	0,0522(4)	0,1286(3)	0,0417(12)
C61_2	1,0073(6)	0,0756(6)	0,0574(4)	0,0622(18)
O21_2	0,8804(3)	-0,1054(3)	0,3217(3)	0,0507(10)
O31_2	1,0220(3)	0,0495(3)	0,3570(2)	0,0543(11)
O41_2	1,0343(3)	0,1687(3)	0,2295(2)	0,0364(8)
O51_2	0,150(3)	-0,0407(3)	0,1152(2)	0,0500(10)
O61_2	1,0803(7)	0,0369(7)	0,0604(5)	0,121(3)
C12_2	1,259(4)	0,2142(4)	0,2322(3)	0,0360(11)
C22_2	1,1587(4)	0,2662(4)	0,3147(3)	0,0397(12)
C32_2	1,1072(4)	0,3365(4)	0,3261(3)	0,0404(12)
C42_2	1,1198(4)	0,3943(4)	0,2547(3)	0,0371(11)
C52_2	1,0895(4)	0,3417(4)	0,1731(3)	0,0394(12)
C62_2	1,1116(3)	0,3950(4)	0,0995(4)	0,0567(16)
O22_2	1,1483(3)	0,2085(3)	0,3801(3)	0,0489(9)
O32_2	1,1409(4)	0,3868(3)	0,4020(3)	0,0568(11)
O42_2	1,0662(3)	0,4576(3)	0,2634(3)	0,0436(9)
O52_2	1,1364(3)	0,2720(3)	0,1678(2)	0,0427(8)
O62_2	1,2045(3)	0,4373(3)	0,1057(3)	0,0693(13)
C13_2	1,1083(4)	0,5477(4)	0,2628(4)	0,0474(14)

Átomo	$x/a$	$Y/b$	$Z/c$	$U_{eq}$ (Å <sup>2</sup> )
C23_2	1,0931(4)	0,5970(4)	0,3391(4)	0,0523(15)
C33_2	0,9935(4)	0,5918(4)	0,3392(4)	0,0433(12)
C43_2	0,9566(4)	0,6267(4)	0,2615(4)	0,0418(12)
C53_2	0,9783(5)	0,5792(5)	0,1853(4)	0,0523(15)
C63_2	0,9558(7)	0,6219(6)	0,1075(5)	0,087(3)
O23_2	1,1283(4)	0,5627(4)	0,4122(3)	0,0641(12)
O33_2	0,9814(3)	0,6446(3)	0,4098(3)	0,0567(11)
O43_2	0,8608(3)	0,6112(2)	0,2575(2)	0,0369(8)
O53_2	1,0732(3)	0,5823(3)	0,1918(3)	0,0568(11)
O63_2	1,0028(9)	0,7109(7)	0,1141(7)	0,178(6)
C14_2	0,8197(4)	0,6827(4)	0,2498(3)	0,0385(11)
C24_2	0,7617(4)	0,6830(4)	0,3186(3)	0,0374(11)
C34_2	0,6865(4)	0,6000(4)	0,3086(3)	0,0381(11)
C44_2	0,6317(4)	0,5948(3)	0,2247(3)	0,0363(11)
C54_2	0,6926(4)	0,6024(4)	0,1567(3)	0,0441(13)
C64_2	0,6430(5)	0,6102(5)	0,0729(4)	0,0585(17)
O24_2	0,8147(3)	0,6931(3)	0,3972(2)	0,0444(9)
O34_2	0,6302(3)	0,6013(3)	0,3713(2)	0,0525(10)
O44_2	0,5675(3)	0,5104(3)	0,2115(2)	0,0376(8)
O54_2	0,7662(3)	0,6779(3)	0,1724(2)	0,0437(9)
O64_2	0,6012(4)	0,6827(4)	0,0716(3)	0,0745(14)
C15_2	0,4740(4)	0,5074(4)	0,1954(3)	0,0397(12)
C25_2	0,4252(4)	0,4586(4)	0,2598(3)	0,0423(12)
C35_2	0,4360(4)	0,3645(4)	0,2558(3)	0,0392(12)
C45_2	0,3981(4)	0,3227(4)	0,1716(3)	0,0360(11)
C55_2	0,4412(4)	0,3768(4)	0,1054(3)	0,0389(12)
C65_2	0,3935(4)	0,3450(4)	0,0183(3)	0,0465(13)
O25_2	0,4574(3)	0,5014(3)	0,3395(2)	0,0555(11)
O35_2	0,3881(3)	0,3157(3)	0,3147(2)	0,0568(12)
O45_2	0,4171(3)	0,2371(3)	0,1657(2)	0,0438(9)
O55_2	0,4370(3)	0,4669(3)	0,1164(2)	0,0445(9)
O65_2	0,3011(3)	0,3433(4)	0,0140(3)	0,0655(13)
C16_2	0,3449(4)	0,1640(4)	0,1367(3)	0,0457(13)
C26_2	0,3315(4)	0,0998(4)	0,2033(4)	0,0468(13)
C36_2	0,4140(4)	0,0612(4)	0,2201(3)	0,0419(12)
C46_2	0,4317(4)	0,0201(4)	0,1402(3)	0,0427(13)
C56_2	0,4396(5)	0,0842(4)	0,0739(4)	0,0526(15)
C66_2	0,4458(6)	0,0446(5)	-0,0090(4)	0,081(3)
O26_2	0,3107(3)	0,1389(3)	0,2757(3)	0,0526(10)
O36_2	0,3995(4)	-0,0017(3)	0,2787(3)	0,0576(11)
O46_2	0,5135(3)	-0,0085(3)	0,1557(2)	0,0445(9)
O56_2	0,3629(3)	0,1233(3)	0,0645(3)	0,0560(11)
O66_2	0,3701(7)	-0,0250(6)	-0,0371(5)	0,136(4)
C17_2	0,5117(4)	-0,0973(4)	0,1341(4)	0,0455(13)
C27_2	0,5512(4)	-0,1361(4)	0,2078(4)	0,0453(13)
C37_2	0,6489(4)	-0,0891(4)	0,2351(3)	0,0423(13)
C47_2	0,7029(4)	-0,0941(4)	0,1622(3)	0,0395(12)
C57_2	0,6583(4)	-0,0605(4)	0,0860(3)	0,0448(13)
C67_2	0,7001(5)	-0,0759(3)	0,0108(4)	0,0568(16)
O27_2	0,4979(3)	-0,1327(3)	0,2741(3)	0,0571(11)

Átomo	<i>X/a</i>	<i>y/b</i>	<i>Z/c</i>	<i>U<sub>eq</sub></i> (Å <sup>2</sup> )
O37_2	0,6884(3)	-0,1278(3)	0,3019(3)	0,0517(10)
O47_2	0,7919(3)	-0,0412(3)	0,1856(2)	0,0436(9)
O57_2	0,5642(3)	-0,1027(3)	0,0678(2)	0,0497(10)
O67_2	0,7002(5)	-0,1651(3)	-0,0025(3)	0,0780(15)
C1P_1 <sup>b</sup>	0,7689(4)	0,1593(4)	0,8102(3)	0,0598(17)
C2P_1 <sup>b</sup>	0,7209(5)	0,1293(5)	0,8743(3)	0,071(2)
C3P_1 <sup>b</sup>	0,7575(4)	0,1528(4)	0,9565(3)	0,0652(18)
C4P_1 <sup>b</sup>	0,8439(3)	0,2080(4)	0,9717(2)	0,0597(17)
C5P_1 <sup>b</sup>	0,8942(4)	0,2404(6)	0,9098(3)	0,078(2)
C6P_1 <sup>b</sup>	0,8558(4)	0,2132(5)	0,8286(3)	0,0710(19)
C7P_1 <sup>b</sup>	0,7249(7)	0,1351(5)	0,7258(5)	0,074(2)
O1P_1 <sup>b</sup>	0,8837(4)	0,2390(5)	1,0531(3)	0,0859(17)
O2P_1 <sup>b</sup>	0,7626(6)	0,1539(5)	0,6646(4)	0,095(2)
C1P_2 <sup>c</sup>	0,6987(6)	0,3481(5)	1,0478(4)	0,090(3)
C2P_2 <sup>c</sup>	0,7574(7)	0,3898(6)	0,9955(4)	0,101(3)
C3P_2 <sup>c</sup>	0,7386(5)	0,3743(5)	0,9101(4)	0,088(3)
C4P_2 <sup>c</sup>	0,6544(4)	0,3197(5)	0,8797(3)	0,070(2)
C5P_2 <sup>c</sup>	0,5922(5)	0,2773(6)	0,9287(4)	0,081(2)
C6P_2 <sup>c</sup>	0,6152(6)	0,2948(6)	1,0137(4)	0,094(3)
C7P_2 <sup>c</sup>	0,7032(12)	0,3540(9)	1,1475(17)	0,194(11)
O1P_2 <sup>c</sup>	0,6304(6)	0,2992(6)	0,7939(3)	0,109(2)
O2P_2 <sup>c</sup>	0,7778(13)	0,3927(9)	1,1808(9)	0,201(7)
C1P_3 <sup>d</sup>	0,7690(4)	0,1688(4)	0,3088(3)	0,0579(16)
C2P_3 <sup>d</sup>	0,6750(4)	0,1459(5)	0,3048(3)	0,0676(19)
C3P_3 <sup>d</sup>	0,6353(4)	0,1291(6)	0,3763(3)	0,075(2)
C4P_3 <sup>d</sup>	0,6931(3)	0,1372(4)	0,4502(3)	0,0612(18)
C5P_3 <sup>d</sup>	0,7874(3)	0,1583(5)	0,4562(4)	0,0669(19)
C6P_3 <sup>d</sup>	0,8250(4)	0,1745(5)	0,3835(3)	0,0692(19)
C7P_3 <sup>d</sup>	0,8114(7)	0,1877(5)	0,2344(5)	0,070(2)
O1P_3 <sup>d</sup>	0,6481(4)	0,1237(4)	0,5205(3)	0,0884(18)
O2P_3 <sup>d</sup>	0,7724(5)	0,1827(4)	0,1659(3)	0,0806(16)
C1P_4 <sup>e</sup>	0,7482(4)	0,3613(5)	0,5485(3)	0,070(2)
C2P_4 <sup>e</sup>	0,8411(4)	0,3748(6)	0,5459(4)	0,076(2)
C3P_4 <sup>e</sup>	0,8775(5)	0,3869(7)	0,4722(3)	0,094(3)
C4P_4 <sup>e</sup>	0,8166(4)	0,3836(5)	0,4011(3)	0,082(3)
C5P_4 <sup>e</sup>	0,7233(4)	0,3718(5)	0,3997(4)	0,077(2)
C6P_4 <sup>e</sup>	0,6911(5)	0,3608(6)	0,4754(3)	0,084(2)
C7P_4 <sup>e</sup>	0,7093(9)	0,3478(7)	0,6242(5)	0,089(3)
O1P_4 <sup>e</sup>	0,8565(7)	0,3901(5)	0,3276(4)	0,123(3)
O2P_4 <sup>e</sup>	0,7516(7)	0,3509(5)	0,6926(4)	0,101(2)
W1 <sup>f</sup>	0,8362(6)	-0,1894(5)	0,9043(5)	0,103(2)
W2 <sup>f</sup>	0,9964(12)	-0,1622(9)	1,0098(9)	0,059(4)
W3 <sup>f</sup>	0,997(3)	-0,250(2)	0,9454(16)	0,105(9)
W4 <sup>f</sup>	1,101(2)	-0,2417(14)	0,9175(16)	0,110(8)
W5 <sup>f</sup>	1,1030(9)	-0,1097(11)	0,8191(12)	0,080(5)
W6 <sup>f</sup>	1,203(3)	-0,123(2)	0,697(3)	0,16(2)
W7 <sup>f</sup>	1,1783(7)	-0,0089(9)	0,4617(9)	0,071(4)
W8 <sup>f</sup>	1,1856(17)	-0,009(3)	0,307(4)	0,159(19)
W9 <sup>f</sup>	1,1979(9)	0,0118(12)	0,9472(10)	0,057(6)
W10 <sup>f</sup>	1,161(4)	0,014(3)	0,925(2)	0,15(2)

Átomo	<i>X/a</i>	<i>Y/b</i>	<i>Z/c</i>	<i>U<sub>eq</sub></i> (Å <sup>2</sup> )
W11 <sup>f</sup>	1,2827(9)	0,1444(7)	0,8617(5)	0,070(3)
W12 <sup>f</sup>	1,218(3)	0,524(3)	0,9416(19)	0,101(12)
W13 <sup>f</sup>	1,4135(13)	0,670(2)	1,040(2)	0,131(12)
W14 <sup>f</sup>	1,3956(17)	0,6986(11)	0,2797(14)	0,093(7)
W15 <sup>f</sup>	1,2876(10)	0,6150(9)	0,1414(11)	0,060(4)
W16 <sup>f</sup>	1,2722(16)	0,803(2)	0,349(3)	0,18(2)
W17 <sup>f</sup>	1,293(2)	0,7106(17)	0,457(3)	0,118(11)
W18 <sup>f</sup>	1,202(3)	0,734(3)	0,509(4)	0,17(2)
W19 <sup>f</sup>	1,198(2)	0,757(2)	0,136(3)	0,126(11)
W20 <sup>f</sup>	1,0305(14)	0,8313(10)	0,3871(17)	0,099(8)
W21 <sup>f</sup>	1,0290(16)	0,8260(9)	0,5369(19)	0,124(10)
W22 <sup>f</sup>	0,4811(8)	0,6931(5)	0,4467(8)	0,108(4)
W23 <sup>f</sup>	0,5434(12)	0,6916(13)	0,8757(12)	0,075(5)
W24 <sup>f</sup>	0,3950(15)	0,695(2)	0,705(3)	0,116(11)
W25 <sup>f</sup>	0,3761(14)	0,5709(10)	0,828(2)	0,104(8)
W26 <sup>f</sup>	0,3143(6)	0,5224(8)	0,4090(8)	0,075(3)
W27 <sup>f</sup>	0,3032(14)	0,516(2)	0,511(2)	0,107(12)
W28 <sup>f</sup>	0,3214(18)	0,573(3)	0,5785(19)	0,122(13)

**Tabela E8.** Coordenadas atômicas e respectivos deslocamentos isotrópicos equivalentes do complexo 2(β-CD)·4(*p*-HB)·9,45H<sub>2</sub>O.

<sup>a</sup> O factor de ocupação de O61\_1 é de 0,25 para a posição A e de 0,75 para a posição B.

<sup>b-c</sup> Moléculas de *p*-hidroxibenzaldeído totalmente ocupadas, desde a # 1 até à #4.

<sup>f</sup> Os factores de ocupação dos sites da água são 1,0 (W1); 0,3 (W2); 0,25 (W3); 0,3 (W4); 0,35 (W5); 0,25 (W6); 0,4 (W7); 0,25 (W8); 0,3 (W9); 0,25 (W10); 0,5 (W11); 0,2 (W12); 0,3 (W13); 0,3 (W14); 0,3 (W15); 0,25 (W16); 0,25 (W17); 0,25 (W18); 0,25 (W19); 0,3 (W20); 0,35 (W21); 0,7 (W22); 0,3 (W23); 0,25 (W24); 0,3 (W25); 0,5 (W26); 0,25 (W27); 0,25 (W28).

### Complexo 2β-CD·S-Ibu·25H<sub>2</sub>O

Um cristal incolor em forma de prisma, com as dimensões de 0,34×0,42×0,57 mm<sup>3</sup> foi embebido em éter perfluorado e transferido para um capilar de Lindemann para ser lido por difracção de raios X. A recolha dos dados foi executada num detector CCD Nonius Kappa colocado na janela de um gerador de ânodo rotativo Turbo-CAD4 Nonius FR591 operando a 50 kV, 60 mA e com uma potência de 3,0 kW. Usou-se radiação MoK<sub>α</sub> (λ = 0,71073 Å).

A recolha dos dados foi efectuada a -150 °C com um tempo de exposição de 60 s para cada leitura (modo rotativo, Δφ = 1,0°), sob o controlo do programa “Collect” [18]. As leituras foram processadas com o auxílio do programa “Denzo”. Os parâmetros da célula unitária foram obtidos aplicando o refinamento dos mínimos quadrados sobre a matriz completa de um total de 22688 reflexões [19] em que se minimizou Σw(F<sub>o</sub><sup>2</sup>-F<sub>c</sub><sup>2</sup>)<sup>2</sup> com o programa SHELXL-97 [13], tendo os valores convergido para um factor *R* = 0,001. A estrutura foi resolvida com base nos resultados de um sistema isomórfico e aplicação de síntese de diferença de Fourier [20]. Todos os átomos (excepto os de hidrogénio) da unidade assimétrica foram refinados usando os parâmetros de deslocamento térmico anisotrópico, com excepção dos que pertencem à molécula de ibuprofeno. Os átomos de hidrogénio foram calculados de acordo com as suas posições ideais (“riding model”). A

posição dos que pertencem às moléculas de água não pode ser determinada, nem por dados experimentais, nem por cálculo.

Os factores de dispersão dos átomos neutros de todos os átomos e as correcções da dispersão anómala de todos os átomos excepto os de hidrogénio foram retirados das tabelas internacionais de cristalografia [21]. Os restantes cálculos (incluindo os gráficos ORTEP) foram executados com o programa PLATON [22]. Todos os cálculos foram feitos num computador pessoal (Intel, Pentium II) operando em LINUX.

Fórmula química	$2(C_6H_{10}O_5)_7 \cdot C_{13}H_{18}O_2 \cdot 25H_2O$
Peso molecular	2926,61
Dimensões do cristal ( $mm^3$ )	$0,34 \times 0,45 \times 0,54$
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$C2$
Dimensões da célula unitária	$a = 19,4095(4)$ ; $b = 24,4145(5)$ ; $c = 15,8976(2)$ (Å)
	$\beta = 109,026(1)$ (°)
Volume (Å <sup>3</sup> )	$V = 7121,9(2)$
Z	2
$D_x$ ( $g\ cm^{-3}$ )	1,365
$\mu$ ( $mm^{-1}$ )	0,121
$F(000)$	3132
Comprim. de onda, MoK $\alpha$ (Å)	0,71073
Temperatura (°C)	-150±1
$\theta$ usado na recolha de dados (°)	1,67 a 25,34
Reflexões usadas	24677
Reflexões integradas	10322
Reflexões independentes	6096
Intervalos de indexação	h: -14/22, k: -15/29, l: -14/14
Reflec. independ. [ $I_o > 2\sigma(I_o)$ ]	5978
Solução da estrutura	Síntese diferencial de Fourier; estrutura isomórfica [20]
Método de refinamento	$\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2$
Esquema de ponderação ( <i>weighting scheme</i> )	$w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,1591P)^2 + 11,8185P$ , onde $P = [\text{máximo}(F_o^2 \text{ ou } 0) + 2F_c^2]/3$
Dados/parâmetros	24677/882
$R$ [ $F_o > 4\sigma(F_o)$ ]	$R^a = 0,0717$ ; $wR^b = 0,1951$
$R$ (todos os dados)	$R^a = 0,0726$ ; $wR^b = 0,1968$
Validade do ajuste	1,02
Dens. electrónica residual ( $e^- \text{ \AA}^{-3}$ )	0,58; -0,42

**Tabela E9.** Dados cristalográficos para  $2\beta\text{-CD}\cdot\text{S-Ibu}\cdot 25\text{H}_2\text{O}$

$$^a R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

$$^b wR = \frac{\sum \{w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2\}^{1/2}}$$

Átomo	$x/a$	$y/b$	$Z/c$	$U_{eq} (\text{Å}^2)$
O1	0,7281(2)	0,57971(13)	0,7749(3)	0,0271(11)
O2	0,6040(2)	0,67246(15)	0,8390(3)	0,0303(11)
O3	0,5438(2)	0,70249(15)	0,6012(2)	0,0306(11)
O4	0,6797(2)	0,64866(15)	0,6253(3)	0,0309(14)
O5	0,7351(3)	0,6560(2)	0,9765(4)	0,0642(19)
O6	0,8072(2)	0,41123(15)	0,7881(3)	0,0304(13)
O7	0,8289(2)	0,54775(15)	0,8892(3)	0,0344(14)
O8	0,8121(2)	0,58999(16)	0,6640(3)	0,0340(16)
O9	0,8432(3)	0,47499(15)	0,6602(3)	0,0356(16)
O10	0,9038(3)	0,4604(2)	1,0019(4)	0,0587(19)
O11	0,6730(3)	0,27054(18)	0,7574(3)	0,0437(16)
O12	0,8464(2)	0,33700(15)	0,8834(3)	0,0332(14)
O13	0,8506(3)	0,35864(17)	0,6590(3)	0,0436(18)
O14	0,7460(3)	0,27410(15)	0,6292(3)	0,0403(18)
O15	0,8314(3)	0,24093(16)	0,9687(3)	0,0402(16)
O16	0,4289(2)	0,25816(16)	0,6981(3)	0,0355(16)
O17	0,6133(3)	0,2217(2)	0,8378(3)	0,056(2)
O18	0,6358(3)	0,19596(18)	0,6215(3)	0,0423(16)
O19	0,4797(3)	0,20116(19)	0,5760(3)	0,0429(17)
*O20A	0,4901(16)	0,2053(8)	0,9052(14)	0,189(15)
O21	0,2613(3)	0,38031(17)	0,6609(3)	0,0412(16)
O22	0,3435(3)	0,25431(18)	0,7730(3)	0,0430(17)
O23	0,3291(3)	0,21527(18)	0,5472(3)	0,0434(16)
O24	0,2263(2)	0,30716(18)	0,5194(3)	0,0393(17)
O25	0,2448(4)	0,2935(3)	0,8461(5)	0,086(3)
O26	0,2976(2)	0,55758(13)	0,6767(3)	0,0280(13)
O27	0,2099(3)	0,4380(2)	0,7400(3)	0,0497(19)
O28	0,1543(3)	0,41199(16)	0,5021(3)	0,0399(16)
O29	0,1963(3)	0,52345(16)	0,5109(3)	0,0372(16)
O30	0,2003(8)	0,5207(5)	0,8388(9)	0,165(7)
O31	0,5021(2)	0,64287(12)	0,7238(2)	0,0258(11)
O32	0,3281(2)	0,63399(15)	0,7690(3)	0,0347(16)
O33	0,2558(2)	0,62721(14)	0,5258(3)	0,0329(13)
O34	0,3999(2)	0,66740(16)	0,5549(3)	0,0346(14)
O35	0,4322(2)	0,71127(16)	0,8771(3)	0,0387(16)
C1	0,5546(3)	0,68533(19)	0,7541(4)	0,0285(18)
C2	0,5936(3)	0,69131(19)	0,6861(4)	0,0283(18)
C3	0,6396(3)	0,64050(19)	0,6844(4)	0,0265(16)
C4	0,6895(3)	0,62953(18)	0,7777(4)	0,0265(16)
C5	0,6452(3)	0,6230(2)	0,8410(4)	0,031(2)
C6	0,6899(4)	0,6140(3)	0,9371(5)	0,047(3)
C7	0,8044(3)	0,5803(2)	0,8104(4)	0,0315(19)
C8	0,8355(3)	0,5575(2)	0,7410(4)	0,0306(19)
C9	0,8112(3)	0,4977(2)	0,7212(4)	0,0304(19)
C10	0,8361(3)	0,4659(2)	0,8068(4)	0,029(2)
C11	0,8046(4)	0,4912(2)	0,8743(4)	0,034(2)
C12	0,8283(5)	0,4640(3)	0,9634(5)	0,049(3)
C13	0,8555(4)	0,3665(2)	0,8118(4)	0,033(2)
C14	0,8386(4)	0,3302(2)	0,7301(4)	0,037(2)
C15	0,7613(4)	0,3102(2)	0,7029(4)	0,036(2)
C16	0,7499(4)	0,2809(2)	0,7827(4)	0,035(2)

Átomo	$x/a$	$y/b$	$Z/c$	$U_{eq}$ (Å <sup>2</sup> )
C17	0,7747(4)	0,3155(2)	0,8677(4)	0,035(2)
C18	0,7775(4)	0,2842(3)	0,9494(4)	0,042(2)
C19	0,6492(4)	0,2180(3)	0,7729(5)	0,050(3)
C20	0,5991(4)	0,1950(3)	0,6865(4)	0,044(2)
C21	0,5288(4)	0,2270(2)	0,6552(4)	0,0323(19)
C22	0,4949(4)	0,2275(3)	0,7274(4)	0,041(3)
*C23A	0,5494(5)	0,2544(4)	0,8099(5)	0,059(3)
*C24A	0,5189(6)	0,2574(4)	0,8877(6)	0,073(4)
C25	0,3656(4)	0,2319(2)	0,7038(4)	0,036(2)
C26	0,3067(4)	0,2384(2)	0,6159(4)	0,041(2)
C27	0,2877(4)	0,2989(2)	0,5987(4)	0,038(2)
C28	0,2672(4)	0,3229(2)	0,6741(4)	0,038(2)
C29	0,3257(4)	0,3117(3)	0,7641(4)	0,040(3)
C30	0,3020(5)	0,3253(4)	0,8412(5)	0,061(3)
C31	0,1965(4)	0,4074(3)	0,6636(5)	0,042(3)
C32	0,1693(4)	0,4424(2)	0,5807(4)	0,036(2)
C33	0,2254(3)	0,4880(2)	0,5856(4)	0,0289(19)
C34	0,2392(4)	0,5196(2)	0,6703(5)	0,036(2)
C35	0,2629(5)	0,4808(3)	0,7497(5)	0,046(3)
C36	0,2715(8)	0,5083(5)	0,8386(7)	0,098(6)
C37	0,2851(4)	0,6147(2)	0,6855(4)	0,036(2)
C38	0,3023(3)	0,64414(19)	0,6114(4)	0,0317(18)
C39	0,3819(3)	0,6365(2)	0,6208(4)	0,030(2)
C40	0,4274(3)	0,65634(19)	0,7109(4)	0,0259(16)
C41	0,4051(3)	0,6287(2)	0,7847(4)	0,0295(16)
C42	0,4424(4)	0,6534(2)	0,8770(4)	0,036(2)
*O20B	0,5750(8)	0,2898(5)	0,9559(8)	0,062(5)
*C23B	0,5494(5)	0,2544(4)	0,8099(5)	0,059(3)
*C24B	0,5189(6)	0,2574(4)	0,8877(6)	0,073(4)
*O113	0,60950	0,43940	1,03050	0,5570
O114	1/2	0,3754(15)	1	0,263(13)
*C101	0,5588(14)	0,4239(9)	0,7282(11)	0,144(12)
*C102	0,6184(11)	0,4291(9)	0,8053(15)	0,131(10)
*C103	0,6079(10)	0,4414(8)	0,8856(12)	0,122(9)
*C104	0,5378(12)	0,4485(8)	0,8888(12)	0,091(6)
*C105	0,4781(10)	0,4433(10)	0,8117(16)	0,200(19)
*C106	0,4887(12)	0,4310(10)	0,7314(12)	0,131(10)
*C107	0,5693(19)	0,4059(13)	0,640(2)	0,123(9)
*C108	0,627(2)	0,4351(17)	0,613(3)	0,158(13)
*C109	0,588(3)	0,490(2)	0,600(4)	0,23(2)
*C110	0,649(3)	0,431(2)	0,540(3)	0,203(19)
*C111	0,521(2)	0,4621(14)	0,961(2)	0,127(10)
*C112	0,545(3)	0,424(3)	1,013(5)	0,23(3)
*C115	0,510(4)	0,5158(18)	0,979(5)	0,21(2)
O36	1/2	0,0454(5)	1	0,168(8)
O37	0	0,3923(4)	1/2	0,108(5)
O38	0	0,3756(2)	1	0,040(2)
O39	0,3507(5)	0,2031(4)	0,9383(5)	0,115(4)
O40	0,0806(5)	0,4427(3)	0,8198(5)	0,099(3)

Átomo	$x/a$	$y/b$	$Z/c$	$U_{eq}$ (Å <sup>2</sup> )
O41	0,3484(10)	0,1088(5)	1,1053(15)	0,362(12)
O42	0,0448(2)	0,28593(15)	0,9191(3)	0,0373(16)
O43	0,1047(3)	0,3321(2)	0,7981(4)	0,0563(19)
O44	0,0864(3)	0,29091(18)	0,5265(3)	0,0474(16)
O45	0,5136(15)	0,1083(8)	0,8590(18)	0,399(15)
O46	0,0235(4)	0,3099(3)	1,3386(4)	0,075(3)
O47	0,5886(5)	0,0998(3)	0,5405(8)	0,138(5)
O48	0,0147(5)	0,4597(4)	1,3632(7)	0,128(5)
O49	0,4521(16)	0,0906(8)	0,6374(13)	0,325(16)

**Tabela E10.** Coordenadas atômicas e respectivos deslocamentos isotrópicos equivalentes do complexo 2( $\beta$ -CD)·S-Ibu·25H<sub>2</sub>O.

$U_{eq}$  = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

Oa átomos assinaldos com asterisco apresentam um S.O.F inferior a 1.0

## Estudos teóricos

Para alguns compostos de inclusão foram determinadas por cálculos *ab initio* as estruturas com a geometria mais estável de cada hóspede e da  $\beta$ -CD. Seguidamente calculou-se a estrutura da interacção entre hóspede e ciclodextrina de menor energia, o que permitiu determinar a possível geometria de inclusão do complexo.

Todos os cálculos *ab initio* foram executados num computador Pentium, com velocidade de 830 MHz e 320 Mb de memória RAM, recorrendo ao programa GAUSSIAN98w [23].

A geometria otimizada para a ciclodextrina-beta foi calculada usando o nível HF com a base de potenciais efectivos do cor, de Stevens/Basch/Krauss [24]

A estrutura dos hóspedes orgânicos (sal de nimesulide, omeprazole e alguns dos precursores) foi otimizada ao nível HF/6-31G\* [25], tendo como ponto de partida várias geometrias diferentes. A estrutura dos compostos organometálicos (ferrocianetos e Cp<sub>2</sub>MoCl<sub>2</sub>) foi otimizada ao nível B3LYP, tendo-se usado a base de valências de duplo zeta de Dunning/Huzinaga [26] Para elementos do primeiro período. para os átomos de ferro e de molibdénio usou-se a base de potenciais efectivos do cor de Los Alamos [27].

Foram também calculadas, ao mesmo nível, as frequências das vibrações harmónicas destes compostos usando segundas derivadas. Para efeito de comparação com os valores experimentais, os números de onda calculados foram multiplicados por um factor de escala de 0,9.

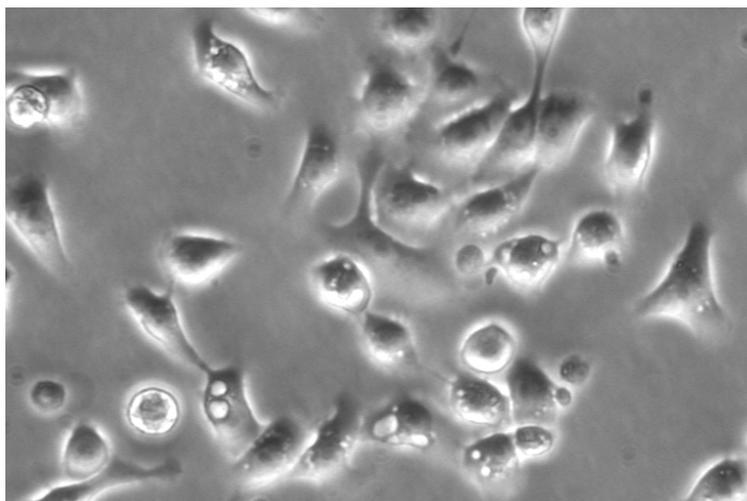
No que diz respeito aos complexos de inclusão, foram testadas diferentes geometrias de inclusão possíveis para cada sistema hóspede /  $\beta$ -CD e calculada a energia de interacção para cada situação. A estruturas calculadas previamente para os hóspedes e para a ciclodextrina são aproximadas uma da outra e a energia é calculada segundo a aproximação em duas camadas de Morokuma *et al.* (comando ONIOM do GAUSSIAN98) [28]. Quando se efectua esta operação, as duas bases (do hóspede e da  $\beta$ -CD) são usadas no cálculo. Deste modo, a base de funções usada para o cálculo do complexo é mais

completa do que as bases usadas para calcular a energia quer do hóspede, quer do hospedeiro. Usando uma base de funções mais ampla, a energia de interação calculada apresenta um valor mais baixo (ou seja, mostra uma inclusão mais estável do que ela na realidade é). Para corrigir este efeito, introduziram-se cálculos de correção do erro de sobreposição de bases (basis set superposition error, BSSE), usando a opção MESSAGE do GAUSSIAN98.

## Testes de actividade citotóxica e antiproliferativa

### *Material biológico*

Foram usadas linhas celulares humanas cancerosas e não cancerosas. As primeiras provém de adenocarcinoma de cérvix (colo) uterino do tipo epitelial, com crescimento em monocamada - *HeLa* (figura E3) e foram adquiridas à ECACC (European Collection of Cell Cultures), Reino Unido. As células não cancerosas são fibroblastos de tecido pulmonar embrionário - *L-132* - e foram gentilmente cedidas pelo Centro de Medicina Experimental e Cirurgia do Hospital Universitário Gregorio Marañon, Madrid (Espanha).



**Figura E3.** Imagem de uma cultura de células HeLa obtida com uma ampliação de 100×, num microscópio Olympus IX70 com uma câmara COHU High Performance, munido de um detector de CCD, acoplado a um computador com o programa Scion Image.

### *Culturas celulares*

As diferentes linhas celulares foram mantidas no respectivo meio de cultura: DMEM-HG (4500 mg/l) contendo vermelho de fenol e suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% (v/v), glutamina (1,168 g/l), antibióticos (100 unidades ml<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina), HEPES (25 mM) e bicarbonato de sódio (25 mM). As células cresceram em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (*Costar Corporation*, Cambridge, MA) mantidos numa incubadora a uma temperatura de 37°C e em atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. A densidade celular em cultura foi mantida a

aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por mililitro. A subcultura foi realizada de três em três dias, tendo sido usado meio de dissociação para a dispersar as células aderentes, (composto por  $136,9 \times 10^{-3}$  M de NaCl;  $2,7 \times 10^{-3}$  M de KCl;  $8,2 \times 10^{-3}$  M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $1,5 \times 10^{-3}$  M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $4,0 \times 10^{-4}$  M de sal dissódico dihidratado de EDTA – ácido etilenodiaminotetracético) com o pH ajustado a 7,4 e contendo 400  $\mu\text{l}$  de uma solução a 1% de vermelho de fenol (m/v).

### ***Determinação da viabilidade e da densidade celulares***

Nos estudos efectuados utilizou-se uma densidade celular inicial de  $5 \times 10^5$  células/ml. 500  $\mu\text{L}$  desta suspensão celular foram colocados em cada poço da placa de cultura. Cada placa contém 24 poços (*Costar Corporation*, Cambridge, MA). A determinação celular – densidade e/ou viabilidade – foi levada a cabo na fase logarítmica do crescimento celular (normalmente três dias após o início da cultura).

Os diferentes compostos em estudo foram diluídos em PBS (tampão fosfato salino, composta por  $132,0 \times 10^{-3}$  M de NaCl;  $4,0 \times 10^{-3}$  M de KCl;  $1,2 \times 10^{-3}$  M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $1,4 \times 10^{-3}$  M de  $\text{MgCl}_2$ ;  $6,0 \times 10^{-3}$  M de glucose;  $1,0 \times 10^{-2}$  M de HEPES), e as soluções esterilizadas por filtração (filtros estéreis, diâmetro de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , *Schleicher&Schuell*). Após 24 h de incubação, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  das diferentes diluições a cada um dos poços, de modo a que as células fossem expostas a concentrações finais de 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ . As células foram mantidas e analisadas de 24 em 24 horas durante um período de 72 h (três dias). Para testar a reversibilidade do efeito da droga, removeu-se a mesma e adicionou-se meio de cultura fresco no último dia de incubação, determinando-se a viabilidade celular passados mais 3, 4 e 5 dias de incubação (respectivamente 144, 168 e 192 h após a adição do composto).

A viabilidade e a densidade celulares foram determinadas por três métodos distintos em cada ensaio: o método de exclusão azul de Tripano, o azul de Alamar e o MTT. Deste modo são obviadas as limitações de cada um. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados comparados com amostras controlo (não expostas às substâncias analisadas) e com amostras expostas a cisplatina (CDDP), anticancerígeno usado como termo de comparação.

### ***Método do Azul de Tripano***

O parâmetro utilizado como medida de proliferação celular foi a variação da densidade em função do tempo de incubação com os diferentes compostos em estudo. As células foram incubadas com cada um dos compostos separadamente e em concentrações finais que variaram entre 50 e 100  $\mu\text{M}$ , e por períodos de tempo de 24, 48 e 72 horas. Terminado cada período de incubação, adicionou-se o corante (usado como uma solução a 0,04% (m/v) em PBS) e foram recolhidas amostras, após ter-se procedido à sua desagregação das células aderentes usando meio de dissociação. Adicionalmente, a reversibilidade do efeito dos compostos investigados foi determinada medindo a

capacidade proliferativa das células após exposição prolongada a estes agentes e subsequente incubação em meio de cultura fresco, na ausência dos mesmos.

Após a mistura da suspensão celular com o corante, procedeu-se à contagem num hemocitómetro. A densidade celular pode ser expressa em número de células vivas/ml ou em percentagem, quando se pretenda fazer uma comparação constante, para cada tempo de incubação, com a amostra controlo. Este foi o procedimento escolhido na representação dos resultados obtidos. Para a determinação da viabilidade celular recorreu-se à seguinte fórmula de cálculo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = [\text{cél.vivas}/(\text{cél.vivas}+\text{cél.mortas})] \times 100$$

### **Método do MTT**

O MTT foi preparado em solução de PBS (contendo  $1,0 \times 10^{-3}$  M de  $\text{CaCl}_2$ ), numa concentração de  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  e filtrado, de modo a esterilizar e remover pequenas quantidades de resíduos insolúveis eventualmente presentes [29]. Concluído o período de incubação das células (24, 48 ou 72 h) com as diferentes soluções em estudo, adicionaram-se  $50 \mu\text{l}$  de solução de MTT a cada amostra e incubou-se novamente a  $37^\circ\text{C}$  durante cerca de 4 h. Findo este período, juntou-se a cada poço isopropanol ácido ( $100 \mu\text{l}$  de HCl  $0,04 \text{ N}$  em isopropanol) de modo a dissolver os cristais azul-escuros formados (*formazan*). A absorvância a  $570 \text{ nm}$  foi medida num leitor ELISA (*Mediators pH*L) e a determinação da viabilidade celular feita através da equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Abs}_{\text{cel.teste}}/\text{Abs}_{\text{cel.contr.}}) \times 100$$

onde  $\text{Abs}_{\text{cel.teste}}$  representa a quantidade de *formazan* determinada para as células expostas às diferentes drogas e  $\text{Abs}_{\text{cel.contr.}}$  a quantidade de *formazan* determinada para as amostras controlo.

### **Método do Azul de Alamar**

À medida que as células crescem em cultura, da sua actividade metabólica resulta a redução química do ambiente que as rodeia. O crescimento continuado mantém o meio na forma reduzida, enquanto que a inibição do crescimento mantém o meio na forma oxidada. A redução relacionada com o crescimento altera o indicador redox da forma oxidada (azul, não fluorescente) para a forma reduzida (vermelho, fluorescente) [30]. Não deve esquecer-se que os tempos de incubação podem variar na dependência da velocidade metabólica das linhas celulares testadas, para uma dada densidade celular. O tempo máximo de incubação pode ser determinado aquando da redução do indicador pelas células controlo (passagem da forma oxidada azul para a totalmente reduzida que é vermelha). As medidas relativas a este método são levadas a cabo usando instrumentação

baseada na fluorescência (monitorizada no comprimento de onda de excitação de 560 nm e no de emissão de 590 nm) ou na absorvância (monitorizada a 570 e 600 nm).

As células foram colocadas em placas multi-poços a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  e o corante azul de Alamar foi adicionado a cada poço (10% do volume de meio de cultura, não esquecendo um ensaio em branco contendo apenas meio de cultura e azul de Alamar). A cultura manteve-se na incubadora a  $37^\circ\text{C}$  por 3 a 4 h (intervalo de tempo determinado especificamente para as linhas celulares analisadas neste trabalho). Em seguida, a absorvância foi medida a 570 e 600 nm (leitura/referência).

$$\% \text{ redução (viabilidade)} = (\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_2} \cdot A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_1} \cdot A_{\lambda_2} / (\epsilon_{\text{red}})_{\lambda_1} \cdot A'_{\lambda_2} - (\epsilon_{\text{red}})_{\lambda_2} \cdot A'_{\lambda_1} \times 100$$

sendo

$\epsilon_{\text{ox}}$  = coeficiente de extinção molar da forma oxidada do azul de Alamar;

$\epsilon_{\text{red}}$  = coeficiente de extinção molar da forma reduzida do azul de Alamar;

$(\epsilon_{\text{red}})_{\lambda_1} = 155,677$ ;  $(\epsilon_{\text{red}})_{\lambda_2} = 14,652$ ;  $(\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_1} = 80,586$ ;  $(\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_2} = 117,216$ ;

A = absorvância dos poços teste;

A' = absorvância do branco;

$\lambda_1 = 570 \text{ nm}$ ;

$\lambda_2 = 600 \text{ nm}$ .

Por exemplo, uma percentagem de 62% significa que a redução do azul de Alamar na amostra teste é 62% em relação à amostra controle ou, por outras palavras, que o crescimento celular é inibido em 38% quando comparado com o controle.

## Referências

1. A. C. Fernandes, J. E. R. Borges, M. F. B. M. S. Pereira, C. C. Romão, L. M. B. Correia, P. B. Correia, *Patente Portuguesa* 102315 Z (1999).
2. A. C. Fernandes, M. F. B. M. S. Pereira, C. C. Romão, P. B. Correia, *Patente Portuguesa*, 102361 E (1999).
3. G. G. I. Moore, J. K. Harrington, US Patent 3,840,597 (1974).
4. A. E. Brändström, B. R. Lamm, *U.S. Patent*, 4,544,750 (1985).
5. J. A. Van Allan, B. D. Deacon, *Org. Synth. Coll.* **4**, 569 (1963).
6. A. C. Fernandes, J. E. R. Borges, M. F. B. M. S. Pereira, C. C. Romão, *Patente Portuguesa* 102114 N (1998).
7. A. C. Fernandes, J. E. R. Borges, M. F. B. M. S. Pereira, C. C. Romão, L. M. B. Correia, R. Tavares, M. C. Costa, F. Teixeira, *Patente Portuguesa* 102317 A (2000).
8. A. C. Fernandes, J. E. R. Borges, M. F. B. M. S. Pereira, C. C. Romão, *Patente Portuguesa* 102116 R (2000).
9. A. C. Fernandes, J. E. R. Borges, M. F. B. M. S. Pereira, C. C. Romão, L. M. B. Correia, R. Tavares, M. C. Costa, F. Teixeira, *Eur. Patent*, PCT/IB00/1057, (2000).
10. J. Redondo, J. Frigola, A. Torrens, P. Lupón, *Mag. Reson. Chem.* **33**, 104 (1995).
11. A. S. Moreira, J. Empis, J. J. C. Teixeira-Dias, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **33**, 81 (1999).
12. P. Job, *Ann. Chimie.* **9**, 113 (1928).
13. G. M. Sheldrick, "SHELXL-97", Universidade de Göttingen, Göttingen, Alemanha, (1997).
14. D. E. McRee: *Practical Protein Crystallography*, Academic Press, San Diego, EUA (1993).
15. Cambridge Crystallographic Data Center, publicação suplementar nº CCDC-167931. Para obter cópias gratuitas, escrever para CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2, IEZ, Reino Unido, (fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
16. D. Cremer, J. A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354 (1975).
17. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Symbols for specifying the conformation of polysaccharide chains, Recommendations 1981, *Eur. J. Biochem.* **131**, 5 (1983).
18. Data Collection Software for Nonius Kappa CCD devices, Delft, Holanda (1997).

19. Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods in Enzymology* **276**, 307 (1997).
20. I. M. Mavridis, E. Hadjoudis, G. Tsoucaris, *Carbohydr. Res.* **220**, 11 (1991).
21. International Tables for Crystallography, Vol. C, Tabelas 6.1.1.4 (pp. 500-502), 4.2.6.8 (pp. 219-222), e 4.2.4.2 (pp. 193-199), Ed. A. J. C. Wilson, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda (1992).
22. A. L. Spek, "PLATON", Universidade de Utrecht, Utrecht, Holanda, (2000).
23. Gaussian 98 (Revisão A.1); M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery, R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B.G. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA (1998).
24. (a) W. Stevens, H. Basch, J. Krauss, *J. Chem. Phys.* **81**, 6026 (1984); (b) W. Stevens, M. Krauss, H. Basch, P. G. Jasien, *Can. J. Chem.* **70**, 612 (1992).
25. P. C. Hariharan, J. A. Pople, *Theor. Chim. Acta* **28**, 213 (1973).
26. T. H. Dunning Jr. e P. J. Hay, em: *Modern Theoretical Chemistry*, Ed. H.F. Schaefer, Vol. 3, p 1, Plenum Press, Nova Iorque, EUA (1976)
27. W. R. Wadt, P. J. Hay, *J. Chem. Phys.* **82**, 284 (1985).
28. (a) S. Humbel, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Chem. Phys.* **105**, 1959 (1996); (b) T. Matsubara, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Quantum Chem.* **60**, 1101 (1996); (c) M. Svensson, S. Humbel, R. D. J. Froese, T. Matsubara, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Phys. Chem.* **100**, 19357 (1996).
29. (a) T. F. Slater, B. Sawyer, U. D. Strauli, *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 383 (1963); (b) T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983); (c) J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, J. B. Mitchell, *Cancer Res.* **47**, 936 (1987); (d) R. Ramanathan, N. P. Das, C. H. Tan, *Free Radical Biol. Med.* **16**, 43-48 (1994); (e) C. V. Rao, A. Rivenson, B. Simi, R. Simi, S. Bandaru, *Cancer Res.* **55**, 259-266 (1995).
30. (a) G. R. Nakayama, M. C. Caton, M. P. Nova, Z. Parandoosh, *J. Immunol. Methods* **204**, 205-208 (1997); (b) J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* **267**, 5421-5426 (2000).