

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDOS DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE  
INCLUSÃO EM CICLODEXTRINAS**

**ROSANE MARIA BUDAL**

Florianópolis/SC

2003

**ROSANE MARIA BUDAL**

**ESTUDOS DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE  
INCLUSÃO EM CICLODEXTRINAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Santa Catarina,  
para obtenção do grau de Doutor em Química  
Orgânica.

**Orientador: Prof. Dr. Rosendo A. Yunes (DQ- UFSC)**

**Co-orientadoras: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Graça Nascimento (DQ- UFSC)**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aida Jover Ramos (DQF-USC/Espanha)**

Florianópolis/SC

2003

**ROSANE MARIA BUDAL**

**ESTUDOS DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM  
CICLODEXTRINAS**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 01 de dezembro de 2003.

---

Prof. Faruk José Nome Aguilera  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação

**BANCA EXAMINADORA**

---

Rosendo Augusto Yunes  
Orientador

---

Maria da Graça Nascimento  
Co-orientadora

---

Ademir Farias Morel

---

Auréa Echevarria Aznar

---

Marcus César Mandolesi Sá

---

Ricardo José Nunes

---

Miguel Soriano Balparda Caro

*Em especial aos meus queridos pais  
Jarcy (in memoriam) e Amélia, e minha  
querida filha Flávia, pelo amor, apoio,  
compreensão e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por Sua bondade e poder infinitos, dando sabedoria, coragem e serenidade para enfrentar os momentos difíceis desta jornada.

Aos professores Dr. Rosendo A. Yunes (orientador) e Dra Maria da Graça Nascimento (co-orientadora), pelas orientações e valiosas sugestões prestadas durante todas as etapas deste trabalho. Pelo incentivo, apoio e amizade oferecidos durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr José Vázquez Tato, Diretor do Grupo de Investigação do Departamento de Química - Física da Universidade de Santiago de Compostela/Espanha, proporcionando a realização deste trabalho junto a este grupo de pesquisa, dando apoio, sugestões, orientações e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dra Aida Jover Ramos (co-orientadora), pela amizade, apoio, colaboração e dedicação constantes durante todo o período e após a realização do trabalho na Universidade de Santiago de Compostela.

Aos professores e colegas do Departamento de Química- Física/USC, Mercedes, Wajih, Meijide e Pedro.

Às companheiras cubanas Haydée e Minerva pela amizade e constantes palavras de estímulo.

Aos professores pertencentes ao Departamento de Ciências Farmacêuticas pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Química da UFSC.

Aos companheiros de laboratório em geral, pela amizade e incentivo.

À Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio institucional.

À CAPES pela oportunidade e apoio financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>XVI</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XVIII</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 - CICLODEXTRINAS	3
1.1.1 - Estrutura	3
1.1.2 - Complexos de inclusão	6
1.1.3 - Aplicações das ciclodextrinas na área farmacêutica	8
1.1.4 - Métodos de obtenção de complexos de Inclusão.	16
1.1.5 - Complexação de Esteróides	17
1.1.6 - Caracterização dos complexos de inclusão	22
1.1.7 - Equilíbrio de formação do complexo de inclusão e a constante de estabilidade	24
1.2 - SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE PARA ESTUDO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO	25
1.2.1 - Furoato de diloxanida	25
1.2.2 - Fusidato de sódio	27
1.2.3 - Helvolato de potássio	29
1.2.4 - CHAPS e CHAPSO	31
<b>2 - JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>3 - MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS</b>	<b>35</b>
3.1 - DIAGRAMA OU ISOTERMA DE SOLUBILIDADE	35
3.2 - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	39
3.2.1 - RMN na determinação da estrutura do complexo	39
3.2.2 - Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear no estudo de Processos de Inclusão: estequiometria e constantes de associação.	41
3.3 - MÉTODO CINÉTICO	49

<b>4 - PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>54</b>
4.1 - MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FUROATO DE DILOXANIDA: $\beta$ -CD	55
4.2 - AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS HELVOLATO DE POTÁSSIO, FUSIDATO DE SÓDIO, CHAPS E CHAPSO EM $\beta$ - E $\gamma$ - CD POR RMN.	57
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
5.1 - ESTUDO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO FUROATO DE DILOXANIDA: $\beta$ -CD.	59
5.1.1 - Diagrama ou Isoterma de Solubilidade	59
5.1.2 - Método Cinético	61
5.1.3 - Fluorescência	70
5.1.4 - Ressonância Magnética Nuclear	71
5.2 - RESOLUÇÃO DOS ESPECTROS POR RMN DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$	74
5.2.1 - Helvolato de potássio	75
5.2.2 - Fusidato de sódio	84
5.2.3 - CHAPS	94
5.2.4 - CHAPSO	98
5.2.5 - Espectros de RMN de $\beta$ - e $\gamma$ -CD	103
5.3 - ESTUDO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO POR RMN	106
5.3.1 - Complexos Fusidato de Sódio e Helvolato de Potássio : $\gamma$ -CD	107
5.3.2 - Complexos Fusidato de Sódio e Helvolato de Potássio : $\beta$ -CD	114
5.3.3 - Complexos CHAPS e CHAPSO: $\gamma$ -CD	120
5.3.4 - Complexos CHAPS e CHAPSO: $\beta$ -CD	127
<b>6 - CONCLUSÕES</b>	<b>151</b>
<b>7 - PERSPECTIVAS DE TRABALHO</b>	<b>155</b>
<b>REFERÊNCIA</b>	<b>156</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>176</b>
ANEXO A - OUTROS ESTUDOS SOBRE AGREGAÇÃO DE SAIS BILIARES	177
ANEXO B – CÁLCULO POR INTEGRAÇÃO DE ÁREAS PARA AJUSTE DOS SINAIS EM RMN	182
PRODUÇÃO CIENTÍFICA (PERÍODO AGO/1997-2003)	196

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Ciclodextrinas naturais _____	4
Figura 1.2 - Representação esquemática das ciclodextrinas. _____	4
Figura 1.3 - Estrutura e dimensões das ciclodextrinas. _____	4
Figura 1.4 - Estrutura funcional da $\beta$ -ciclodextrina _____	5
Figura 1.5 - Principais tipos de complexos de inclusão _____	7
Figura 1.6 - Estrutura dos complexos 1:1 NaC/ $\beta$ -CD e 1:2 NaDC/ $\beta$ -CD. _____	19
Figura 1.7 - Estrutura anfifílica dos ácidos biliares. _____	21
Figura 1.8 - Estrutura do furoato de diloxanida _____	26
Figura 1.9 - Estrutura do fusidato de sódio _____	27
Figura 1.10 - Íons fusidato e colato: a (Fus) e b (NaC), fórmulas estruturais; c (Fus) e d (NaC), modelos espaciais com posição dos grupos polares na cor vermelha; e (Fus) e f (NaC), interface ar-água ou óleo-água. (Carey, 1971). _____	28
Figura 1.11 - Estrutura do helvolato de potássio. _____	29
Figura 1.12 - Modelos espaciais da molécula de helvolato de potássio com todos os grupos polares direcionados à face $\alpha$ _____	30
Figura 1.13 - Estrutura do CHAPS (R=H) e CHAPSO (R=OH). _____	31
Figura 3.1 - Tipos de diagrama de solubilidade. _____	36
Figura 3.2 - Espectro ROE do complexo ácido 6-(p-toluidin) naftalen-2-sulfônico (TNS): $\beta$ -CD em D <sub>2</sub> O. _____	40
Figura 3.3 - Representação esquemática da formação dos complexos 1:1 e 2:1 para o sistema $\beta$ -CD: TNS, deduzido a partir do experimento ROESY. _____	41

Figura 3.4 - Sinais observados em RMN. _____	42
Figura 3.5 - Variação do deslocamento químico de um determinado núcleo da ciclodextrina em função da fração complexada _____	44
Figura 3.6 - Representação de Job para um complexo 1:1 em função da fração molar de ciclodextrina ou de hóspede. _____	45
Figura 5.1 - Diagrama de solubilidade do furoato de diloxanida em $\beta$ -CD com valor de $K_c = 427,4 \text{ M}^{-1}$ ; $S_o = 1,35 \times 10^{-4}$ ; $r = 0,9959$ . _____	60
Figura 5.2 - Logaritmo da constante de velocidade de primeira ordem em função do pH para a hidrólise do furoato de diloxanida em água, $\beta$ -CD e $\beta$ -CD sulfatada, à 37°C. _____	62
Figura 5.3 - Variação da constante de velocidade de primeira ordem em função de concentrações crescentes de $\beta$ -CD para a hidrólise do furoato de diloxanida ( $6,66 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) em pH 10,75, $\mu = 0,5 \text{ M}$ (KCl), $\lambda = 260 \text{ nm}$ e 37°C; $k_o = 1,76 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . _____	63
Figura 5.4 - Variação da constante de velocidade de primeira ordem em função de concentrações crescentes de $\beta$ -CD sulfatada para a hidrólise do furoato de diloxanida ( $6,66 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) em pH 10,0, $\mu = 0,5 \text{ M}$ (KCl), $\lambda = 260 \text{ nm}$ e 37°C; $k_o = 3,16 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . _____	65
Figura 5.5 - Espectros de UV para a reação de hidrólise do furoato de diloxanida por 7 dias, a pH 7,0 e à 37°C. _____	66
Figura 5.6 - Perfil de $[\beta\text{-CD}]/(k_o - k_{obs})$ versus $[\beta\text{-CD}]$ para a hidrólise do furoato de diloxanida ( $6,66 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), pH= 10,75, $\mu = 0,5 \text{ M}$ (KCl), $\lambda = 260 \text{ nm}$ à 37°C. ____	68
Figura 5.7 - Espectros de Fluorescência do furoato de diloxanida ( $3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ e 0,2% de etanol) e $\beta$ -CD ( $1,2 \times 10^{-2} \text{ M}$ ); $\lambda_{Ex} = 338 \text{ nm}$ . _____	70
Figura 5.8 - Espectro de $^1\text{H}$ do furoato de diloxanida e $\beta$ -CD (4mM) em metanol/água, 300MHz. _____	72
Figura 5.9 - Espectro de $^{13}\text{C}$ do furoato de diloxanida e $\beta$ -CD (10mM) em acetoneitrila/água, 75MHz. _____	72

Figura 5.10 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ , furoato de diloxanida (4mM) e $\beta$ -ciclodextrina (4mM) em proporções 10:0, 8:2, 6:4, 4:6 e 2:8 em sistema $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (50:50), 300MHz. _____	73
Figura 5.11 - Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ de $\beta$ -CD/FD (10mM) em sistema $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ (40:60), 75MHz. _____	74
Figura 5.12 - Procedimento relativo ao assinalamento completo dos espectros de RMN. ____	75
Figura 5.13 -Espectros monodimensionais do helvolato de potássio 10mM: (a) $^{13}\text{C}$ ; (b) DEPT 135; (c) DEPT 45; (d) DEPT 90; soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz. _____	76
Figura 5.14 -Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do helvolato de potássio 10mM em $\text{D}_2\text{O}$ , 500MHz. ____	77
Figura 5.15 -Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY do helvolato de potássio 10mM em $\text{D}_2\text{O}$ . _____	79
Figura 5.16 -Espectro parcial de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY do helvolato de potássio 10mM em $\text{D}_2\text{O}$ . ____	80
Figura 5.17 -Espectro de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ do Helvolato de potássio 10mM em $\text{D}_2\text{O}$ . ____	81
Figura 5.18 -Espectro ROESY do complexo helvolato de potássio- $\beta$ -CD 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ , 500MHz. _____	82
Figura 5.19 - Espectros monodimensionais do fusidato de sódio 10mM: (a) $^{13}\text{C}$ ; (b) DEPT 135; (c) DEPT 90; (d) DEPT 45, em $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz. _____	85
Figura 5.20 - Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do fusidato de sódio 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz. ____	86
Figura 5.21 - Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY do fusidato de sódio 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ . _____	87
Figura 5.22 - Espectro bidimensional COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do fusidato de sódio 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ . _____	88
Figura 5.23 - Espectro de correlação $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ do fusidato de sódio 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ . _____	89
Figura 5.24 - Espectro J-resolvida do fusidato de sódio 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ . _____	91
Figura 5.25 - Espectro Noesy $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do fusidato de sódio 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ . _____	92
Figura 5.26 - Espectros monodimensionais do CHAPS 10mM: (a) DEPT 135; (b) DEPT 90; (c) DEPT 45; (d) $^{13}\text{C}$ , em $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz. _____	94
Figura 5.27 - Espectro de $^1\text{H}$ do CHAPS 10mM em $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz. _____	95
Figura 5.28 - Espectro bidimensional de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY do CHAPS 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ . ____	97

Figura 5.29 - Espectro parcial bidimensional $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY do CHAPS 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ . __	97
Figura 5.30 - Espectro de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ do CHAPS 10 mM, em $\text{D}_2\text{O}$ ._____	98
Figura 5.31 - Espectro monodimensional de $^1\text{H}$ do CHAPSO 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz. _____	99
Figura 5.32 - Espectro bidimensional $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY do CHAPSO 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ ._____	100
Figura 5.33 - Espectro de correlação $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ do CHAPSO 10mM, em $\text{D}_2\text{O}$ ._____	102
Figura 5.34 - Espectro de $^1\text{H}$ -RMN da $\beta$ -CD em solução (10mM), $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz, com supressão do solvente. _____	105
Figura 5.35 - Espectro de $^{13}\text{C}$ da $\beta$ -CD em $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz. _____	105
Figura 5.36 - Curva de Job obtida com os deslocamentos químicos dos carbonos da $\gamma$ -CD para o complexo (a) helvolato: $\gamma$ -CD e (b) fusidato: $\gamma$ -CD; [helvolato/fusidato] $_o$ = [ $\gamma$ -CD] $_o$ = 10mM); 75 MHz. _____	108
Figura 5.37 - $\Delta\delta_{\text{obs}}$ para diferentes átomos de carbono da $\gamma$ -CD complexada com helvolato de potássio. [helvolato] $_o$ = [ $\gamma$ -CD] $_o$ = 10mM. _____	109
Figura 5.38 - $\Delta\delta_{\text{obs}}$ para diferentes átomos de carbono da $\gamma$ -CD complexada com fusidato sódico . [fusidato] $_o$ = [ $\gamma$ -CD] $_o$ = 10mM. _____	110
Figura 5.39 - Espectro ROESY referente ao complexo de inclusão helvolato: $\gamma$ -CD em $\text{D}_2\text{O}$ 10mM, 500 MHz. _____	113
Figura 5.40 - Modelos espaciais teóricos do complexo (helvolato) $_1$ : ( $\gamma$ -CD) $_1$ , com vistas laterais (a) e (b) e frontais (c) e (d). _____	114
Figura 5.41 - Curva de Job para os cinco carbonos de uma unidade de glicose de $\beta$ -CD para o complexo (a) helvolato: $\beta$ -CD e (b) fusidato: $\beta$ -CD. [helvolato/fusidato] $_o$ = [ $\beta$ -CD] $_o$ = 10mM, 75 MHz. _____	115
Figura 5.42 - $\Delta\delta_{\text{obs}}$ para diferentes átomos de carbono da $\beta$ -CD complexada com helvolato de potássio; (a) ajuste para complexo 1:1, (b) ajuste para complexo 1:2 _____	117

Figura 5.43 - $\Delta\delta_{\text{obs}}$ para diferentes átomos de carbono da $\beta$ -CD complexada com fusidato de sódio; (a) ajuste para complexo 1:1, (b) ajuste para complexo 1:2. _____	117
Figura 5.44 - Estruturas esquemáticas para os complexos formados entre (a) fusidato de sódio e $\gamma$ -CD; (b) helvolato de potássio e $\gamma$ -CD; (c) helvolato de potássio e $\beta$ -CD; e (d) fusidato de sódio e $\beta$ -CD. _____	120
Figura 5.45 - Curva de Job obtida com os deslocamentos químicos dos carbonos da $\gamma$ -CD para o complexo (a) CHAPS: $\gamma$ -CD e (b) CHAPSO: $\gamma$ -CD. ([CHAPS]=[CHAPSO]=[ $\gamma$ -CD]=10mM; 75 MHz. _____	121
Figura 5.46 - $\Delta\delta_{\text{obs}}$ para diferentes átomos de carbono da $\gamma$ -CD complexada com (a) CHAPS e (b) CHAPSO. _____	122
Figura 5.47 - Espectro ROESY do complexo CHAPS: $\gamma$ -CD, em D <sub>2</sub> O, 500MHz. _____	124
Figura 5.48 - Espectro ROESY do complexo CHAPSO: $\gamma$ -CD, em D <sub>2</sub> O, 500 MHz. _____	124
Figura 5.49 - Representação espacial do complexo CHAPS: $\gamma$ -CD. _____	126
Figura 5.50 - Representação espacial do complexo CHAPSO: $\gamma$ -CD. _____	127
Figura 5.51 - Espectros de <sup>13</sup> C com diferentes concentrações de (a) CHAPS ou (b) CHAPSO e $\beta$ -CD, na seguinte ordem: 10 mM $\beta$ -CD e 0 mM CHAPS, 7 mM $\beta$ -CD e 3 mM CHAPS, 5 mM $\beta$ -CD e 5 mM CHAPS, 1 mM $\beta$ -CD e 9 mM CHAPS; soluções em D <sub>2</sub> O, pH natural (5,0-6,0), 75MHz. _____	130
Figura 5.52 - Espectros de <sup>1</sup> H com diferentes concentrações de (a) CHAPS e (b) CHAPSO com concentrações nos espectros em ordem decrescente de 10mM, 5 mM e 2 mM; soluções em D <sub>2</sub> O, pH natural (5,0-6,0), 300MHz. ____	131
Figura 5.53 - Espectros de <sup>1</sup> H sobrepostos de CHAPS 10 mM (vermelho) em solução, com a $\beta$ -CD 10 mM (preto) (soluções em D <sub>2</sub> O, pH natural; 500 MHz). ____	132
Figura 5.54 - Espectros de <sup>1</sup> H com diferentes concentrações de CHAPS e $\beta$ -CD: azul escuro: 1 mM $\beta$ -CD e 9 mM CHAPS; azul claro: 3 mM $\beta$ -CD e 7 mM CHAPS, verde: 5 mM $\beta$ -CD e 5 mM CHAPS; vermelho: 8 mM $\beta$ -CD e 2 mM CHAPS. Soluções em D <sub>2</sub> O, pH 5-6 (natural da solução), 500 MHz. ____	133

Figura 5.55 - Espectros de $^1\text{H}$ com diferentes concentrações de CHAPS 1mM e $\beta$ -CD 9mM (vermelho), CHAPS 5 mM e $\beta$ -CD 5 mM (verde), CHAPS 7 mM e $\beta$ -CD 3 mM (azul claro) e CHAPS 10 mM (azul escuro). Soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural (5,0-6,0), 500 MHz. Os símbolos “L” indicam hidrogênios da substância livre e “C” complexada. _____	134
Figura 5.56 - Espectros de $^1\text{H}$ parciais sobrepostos de CHAPS 2 mM e $\beta$ -CD 8 mM (vermelho), CHAPS 5 mM e $\beta$ -CD 5 mM (azul escuro), CHAPS 7 mM e $\beta$ -CD 3 mM (azul claro) e CHAPS 8mM e $\beta$ -CD 2 mM (verde); soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural (5,0-6,0), 500 MHz. _____	134
Figura 5.57 - Curvas de Job das áreas dos hidrogênios de CHAPS (a) 18, 25 e 12 complexados, (b) 19 complexado e (c) 5 complexado da $\beta$ -CD; soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural, 500 MHz. _____	137
Figura 5.58 - Curvas de Job das áreas dos hidrogênios de CHAPSO (a) 18 e 25 complexados, (b) 19 complexado e (c) 5 complexado da $\beta$ -CD; soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural, 500 MHz. _____	137
Figura 5.59 - ROESY de uma solução 10 mM de $\beta$ -CD e 10mM de CHAPS (soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural ) 500 MHz. _____	138
Figura 5.60 - ROESY de uma solução 10 mM de $\beta$ -CD e 10mM de CHAPSO (soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural); 500MHz. _____	139
Figura 5.61 - Curvas experimentais e teóricas da área dos hidrogênios do CHAPS (a) e CHAPSO (c) região da cadeia lateral, CHAPS (b) e CHAPSO (d) região do anel A; soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural. _____	143
Figura 5.62 - Curvas experimentais e teóricas da área do hidrogênio 5 da $\beta$ -CD complexada com (a) CHAPS e (b) CHAPSO; soluções em $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural (5,0-6,0). _____	145
Figura 5.63 - Formação de um complexo 1:2 de um hóspede ditópico a partir de dois possíveis complexos 1:1. _____	146
Figura 5.64 - Representação espacial do complexo CHAPS: $\beta$ -CD. _____	149
Figura 5.65 - Representação espacial do complexo CHAPSO: $\beta$ -CD. _____	150

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Exemplos de alguns fármacos em forma de complexos de inclusão. _____	9
Tabela 3.1 - Posição do máximo de Job para alguns complexos de inclusão. _____	46
Tabela 4.1 - Variáveis utilizadas na Preparação das Soluções para o Estudo de Complexação por RMN. _____	58
Tabela 5.1 - Dados de absorbância e diferentes concentrações de furoato de diloxanida (FD) e de $\beta$ -CD para construção do diagrama de solubilidade; T= 37°C, pH 7,0, $\lambda$ = 260 nm. _____	60
Tabela 5.2 - Logaritmo da constante de velocidade de primeira ordem em função do pH para a reação de hidrólise do furoato de diloxanida em água, $\beta$ -CD e $\beta$ -CD sulfatada; [FD]= $6,66 \times 10^{-5}$ M; $\lambda$ = 260 nm; T= 37 °C; $\mu$ = 0,5 M (KCl) _____	61
Tabela 5.3 - Constantes de velocidade de primeira ordem em função da concentração de $\beta$ -CD no estudo da reação de hidrólise do FD em pH 10,75 e 37°C. _____	62
Tabela 5.4 - Constantes de velocidade de primeira ordem em função da concentração de $\beta$ -CD sulfatada no estudo da reação de hidrólise do FD em pH 10,0 e 37°C. _____	63
Tabela 5.5 - Perfil $[\beta\text{-CD}]/(k_o - k_{obs})$ vs $[\beta\text{-CD}]$ para estudo da reação de hidrólise do furoato de diloxanida a pH 10,75 e 37 °C. _____	67
Tabela 5.6 -Deslocamentos químicos dos espectros de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do helvolato de potássio 10mM em D <sub>2</sub> O, pH 7,5. _____	83
Tabela 5.7 - Deslocamentos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do Fusidato de sódio 10mM, em D <sub>2</sub> O. _____	93
Tabela 5.8 - Deslocamentos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do CHAPS e CHAPSO 10mM, em D <sub>2</sub> O, pH 5-6. _____	103
Tabela 5.9 - Valores de $\Delta\delta_{\max}$ obtidos para os átomos de carbono da $\gamma$ -CD na complexação com fusidato de sódio e helvolato de potássio. _____	111

Tabela 5.10 - Experimento ROE com as interações entre os prótons (Pn) do helvolato ou fusidato e os prótons (Hn) das ciclodextrinas $\beta$ - ou $\gamma$ -CD. _____	112
Tabela 5.11 - Valores de $\Delta\delta_{\max}$ obtidos para os átomos de carbono da $\gamma$ -CD após complexação com CHAPS e CHAPSO. _____	123
Tabela 5.12 - Interações observadas no ROESY (soluções 10 mM de $\gamma$ -CD e 10mM de CHAPS ou CHAPSO, em D <sub>2</sub> O, pH natural ) entre prótons (Pn) do CHAPS ou CHAPSO e prótons (Hn) da $\gamma$ -CD. _____	125
Tabela 5.13 - Relação entre as áreas dos sinais das metilas nas posições 18 e 19 com a área dos prótons situados na cadeia lateral do CHAPS (31 e 32) e CHAPSO (próton 12). _____	129
Tabela 5.14 - Interações observadas no espectro ROESY (solução em D <sub>2</sub> O, pH natural, 10 mM de $\beta$ -CD e 10 mM de CHAPS/CHAPSO), entre prótons (Pn) de CHAPS e CHAPSO e prótons (Hn) da $\beta$ -CD. _____	140
Tabela 5.15 - -Resultados dos ajustes das áreas de prótons do CHAPS e CHAPSO, no qual descreve um comportamento de complexo 1:1. _____	142
Tabela 5.16 - Resultados dos ajustes das áreas dos prótons do CHAPS e CHAPSO na qual descreve comportamento do pseudo-complexo 1:1. _____	145

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 - Processo de absorção do complexo no trato gastrointestinal. _____	11
Esquema 3.1 - Equilíbrios sólido-líquido para a formação de um complexo de inclusão. __	36
Esquema 3.2 - Mecanismo cinético de hidrólise do furoato de diloxanida na presença e ausência de ciclodextrina (CD) _____	50
Esquema 5.1 - Representação do mecanismo de catálise nucleofílica envolvendo o centro reativo do furoato de diloxanida e a $\beta$ -CDSO <sub>3</sub> Na. _____	64
Esquema 5.2 - Reação de hidrólise do furoato de diloxanida (FD) versus complexação. ____	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	-	ciclodextrina
$\alpha$ -CD	-	alfa ciclodextrina
$\beta$ -CD	-	beta ciclodextrina
$\gamma$ -CD	-	gama ciclodextrina
$\beta$ -CDSO <sub>3</sub> Na	-	beta ciclodextrina sulfatada
FD	-	furoato de diloxanida
<sup>1</sup> H-RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H
<sup>13</sup> C-RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C
COSY	-	Espectrometria bidimensional de correlação
NOE	-	Nuclear Overhauser Effect
ROE	-	Rotating-frame nuclear OverhauserEffect
DEPT	-	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
J	-	constante de acoplamento (Hz)
$\delta$	-	deslocamento químico (ppm)
$\Delta\delta_{\text{obs}}$	-	variação de deslocamento químico observado
$\Delta\delta_{\text{max}}$	-	variação máxima observada de deslocamento
$K_{11} / K_c$	-	constante de estabilidade ou equilíbrio de formação do complexo de inclusão
$f_{\text{CD}} / f_c$	-	frações de ciclodextrina livre e complexada
$C_n / C_{11} / C_{12}$	-	complexo de inclusão 1:1 / 1:2
$RM_{\text{CD}} / X_{\text{CD}}$	-	relação ou fração molar de ciclodextrina
CHAPS	-	1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]
CHAPSO	-	hidroxi derivado de 1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]

## RESUMO

Ciclodextrinas são um grupo de oligossacarídeos cíclicos, os quais têm sido reconhecidos como excipientes farmacêuticos de grande utilidade. Apresentam uma cavidade central hidrofóbica, cuja estrutura permite formar complexos de inclusão estáveis. Neste trabalho, foram utilizados métodos de solubilidade e cinético para estudo do complexo de inclusão furoato de diloxanida/ $\beta$ -ciclodextrina, bem como as técnicas de RMN e de fluorescência. Estudos cinéticos e de solubilidade demonstraram estequiometria 1:1 para o complexo FD/ $\beta$ -CD. Os estudos de complexação dos antibióticos, fusidato de sódio e helvolato de potássio, bem como dos compostos 1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio] (CHAPS) e seu hidróxi-derivado (CHAPSO) com as  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD foram feitos por técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (mono e bidimensionais). Estes hóspedes com estruturas esteroidais em comum, formaram complexos 1:1 com a  $\gamma$ -CD. Na presença de  $\beta$ -CD, fusidato de sódio e helvolato de potássio formaram complexos 1:1 e 1:2, enquanto que com CHAPS ou CHAPSO ocorreu formação de dois complexos 1:1 distintos em solução. Ambos os antibióticos fusidato de sódio e helvolato de potássio, comportaram-se como hóspedes monotópicos e ditópicos quando complexados com  $\gamma$ - e  $\beta$ -CD, respectivamente. CHAPS e CHAPSO na presença de  $\gamma$ - e  $\beta$ -CD, demonstraram comportamentos diferenciados de intercâmbio do hóspede em relação à escala de tempo de RMN. Assim, com a  $\gamma$ -CD verificou-se um intercâmbio rápido enquanto que com a  $\beta$ -CD foi lento. Foram apresentados e analisados os espectros ROESY, os quais permitiram definir as interações existentes entre as moléculas hóspedes e as ciclodextrinas. No caso dos quatro compostos esteroidais, as constantes de equilíbrio foram discutidas em termos das estruturas propostas para os complexos. Foram revisados os espectros de RMN do fusidato de sódio e apresentados os assinalamentos completos do helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO, através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

## ABSTRACT

Cyclodextrins are a group of cyclic oligosaccharides which have recently been recognized as useful pharmaceutical excipients. They present an hydrophobic central cavity whose structure allows the formation of stable inclusion complex. In this work, solubility and kinetic methods, as well NMR and fluorescence techniques were used for studying the inclusion complex of diloxanide furoate /  $\beta$ -cyclodextrin. Kinetics and solubilities studies showed stoichiometry 1:1 for the FD/ $\beta$ -CD complex. The complexation studies of two steroid antibiotics, sodium fusidate and potassium helvolate, as well as the compounds 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulphonate (CHAPS) and its hydroxy derivative (CHAPSO) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD were by  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR techniques (mono and bidimensional). These guests with steroid structures in common, formed 1:1 complexes by  $\gamma$ -CD. In the presence of  $\beta$ -CD, sodium fusidate and potassium helvolate formed 1:1 and 1:2 complexes, while with CHAPS and CHAPSO were through two distinct 1:1 complexes in solution. Both the antibiotics, sodium fusidate and potassium helvolate, behaved as monotopic and ditopic guests when they complexed by  $\gamma$ - and  $\beta$ -CD, respectively. CHAPS and CHAPSO showed different behaviors of interchange guest in relation to NMR time scale to both  $\gamma$ - and  $\beta$ -CD. Therefore, with  $\gamma$ -CD a fast interchange was observed while by  $\beta$ -CD it was slow. The ROESY spectra were also presented and analysed, which permitted to define the interactions between the guests and cyclodextrins. The obtained equilibrium constants were discussed in terms of the proposed structures for the complexes to the four steroid compounds. NMR spectra of sodium fusidate were revised, and a full assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra was presented for potassium helvolate, CHAPS and CHAPSO.

## 1 - INTRODUÇÃO

A procura por novos excipientes e tecnologias, tem levado a indústria farmacêutica e a comunidade científica à pesquisa por novas formulações que resultem em preparações mais estáveis e melhoras terapêuticas. As ciclodextrinas na forma de complexos de inclusão têm sido um dos principais recursos empregados dentro da área farmacêutica nestes últimos anos. Sua conformação espacial em forma de cone, com características hidrofílicas em sua parte externa e cavidade interna relativamente apolar, permite a formação de complexos de inclusão com várias moléculas. Na área farmacêutica, o encapsulamento molecular de princípios ativos é sem dúvida a aplicação das ciclodextrinas que mais tem sido explorada. Muitos trabalhos têm demonstrado as diversas aplicações em termos de modificação das características físico-químicas intrínsecas das moléculas “hóspedes”, no que se refere à solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade, proteção contra a oxidação, redução, racemização, isomerização, polimerização, hidrólise e/ou decomposição do princípio ativo, assim como conversão de substâncias líquidas em microcristalinas, redução das irritações gastrointestinais ou oculares e outros efeitos secundários, além da prevenção a uma decomposição enzimática.<sup>1-4</sup>

Apesar da importância da utilização das ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica, é escasso o conhecimento das vantagens quanto à utilização destes complexos moleculares. É normal observar dentro da classe médica, o desconhecimento das melhorias nas propriedades físico-químicas destes complexos, como é o caso dos antiinflamatórios não esteroidais, Brexin® e Cicladol® (complexos de piroxicam com  $\beta$ -ciclodextrina), comparados ao princípio ativo piroxicam (Feldene®). Inúmeros trabalhos demonstram os benefícios na complexação do piroxicam por  $\beta$ -ciclodextrina, podendo-se citar melhora da hidrosolubilidade, biodisponibilidade e redução dos efeitos irritantes sobre a mucosa gastrointestinal.<sup>5-11</sup>

Dentro deste contexto, cabe ressaltar que os princípios ativos indicados como objetos de análise desta tese de doutorado, apresentam características peculiares que os colocam como

sistemas apropriados ao estudo de complexação em ciclodextrinas, em concordância aos objetivos deste trabalho. Entre estas, destacam-se:

i) Os problemas de solubilidade e instabilidade em água apresentados pelo furoato de diloxanida, o que limita a possibilidade do alcance deste no fluido intestinal e provável eliminação do local onde deveria exercer seu efeito terapêutico.<sup>12, 13</sup>

ii) Efeitos secundários apresentados pelo ácido fusídico, relacionados com transtornos do trato gastrointestinal.<sup>14</sup>

iii) Efeitos tóxicos apresentados pelo ácido helvólico no retardamento do crescimento de gramíneas,<sup>15</sup> assim como a ação inibitória do epitélio ciliar respiratório humano.<sup>16</sup>

iv) Os sais biliares triidroxílicos e dihidroxílicos ao serem complexados por  $\beta$ -CD, comportam-se como hóspedes monotópicos e ditópicos, respectivamente.<sup>17</sup> Esta característica tem sido utilizada para demonstrar a formação de conglomerados supramoleculares.<sup>18-21</sup> Estes estudos sugerem a busca por novos hóspedes ditópicos, a fim de obter-se complexos com a  $\beta$ -CD mais estáveis que com os sais biliares. Os possíveis efeitos estéricos oriundos da presença da primeira molécula de  $\beta$ -CD devem ser minimizados para que favoreça a complexação por parte da segunda  $\beta$ -CD. Estes fatores estéricos impostos pela estrutura espacial de ambas as moléculas de ciclodextrina contribuem negativamente na formação destes complexos. A prevenção a estes efeitos estéricos definidos por Connors et al.<sup>22, 23</sup> através de parâmetros de cooperação, podem ser obtidos através da utilização de hóspedes esteróides, cujos anéis C e D apresentem um baixo grau de inclusão e os anéis A e B (segunda posição da complexação), estejam suficientemente livres para serem complexados pela segunda ciclodextrina. Esta condição pode ser alcançada com os esteróides ácidos fusídico e helvólico, cujas cadeias laterais rígidas e hidrofóbicas, permitem o livre acesso à complexação por parte da segunda molécula de ciclodextrina. Do mesmo modo, é aplicável às moléculas CHAPS e CHAPSO, por possuírem cadeias laterais alongadas em relação aos sais biliares. Cabe enfatizar que a cooperatividade é um processo de relevância nas interações moleculares fármaco-proteína, o que justificaria o uso destes sistemas como modelos para os processos de reconhecimento molecular.<sup>24</sup>

v) As características estruturais apresentadas pelos quatro esteróides e cujas estruturas estão apresentadas no item 1.2 p.25 (ácidos fusídico e helvólico, CHAPS e CHAPSO), permitem classificá-los como ótimos sistemas para realização de uma análise global dos deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Sabe-se que a RMN é uma técnica instrumental bastante utilizada para a determinação da estrutura, estequiometria e constante de equilíbrio de formação dos complexos de inclusão. No entanto, as publicações existentes mostram uma série de deficiências relacionadas à análise dos dados experimentais. Nestes casos, a análise fica centrada unicamente em um único sinal (próton ou carbono) ou quando em mais de um é feita de maneira independente, o que conduz muitas vezes a valores inconsistentes. Em se tratando de estequiometrias múltiplas, como no caso de hóspedes ditópicos, a análise individual não permite a determinação de mais de uma constante de equilíbrio envolvida em um único processo de complexação.

O presente trabalho vem contribuir com o estudo dos complexos de inclusão de substâncias de interesse em ciclodextrinas, através da análise destes quanto à estequiometria, estrutura e constante de formação de equilíbrio, utilizando as técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (mono e bidimensionais), bem como através de métodos cinético e de solubilidade.

## 1.1 - Ciclodextrinas

### 1.1.1 - Estrutura

As ciclodextrinas são um grupo de moléculas naturais cíclicas constituídas por unidades de glicopiranosose unidas por ligações  $\alpha$  (1,4). Estes oligossacarídeos são obtidos por degradação enzimática do amido sob ação da enzima glicosiltransferase (CGT amilase do *Bacillus macerans*), que produz uma reação intramolecular sem a participação de uma molécula de água. Foram descobertas em 1891 por Villiers e os primeiros detalhes de sua preparação foram descritos por Schardinger em 1903.<sup>25</sup>

As ciclodextrinas naturais são macromoléculas contendo um número de unidades de glicose compreendidas entre 6 e 8, denominando-se respectivamente,  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD (Figura 1.1). A Figura 1.2 apresenta a representação esquemática das ciclodextrinas mais usuais.

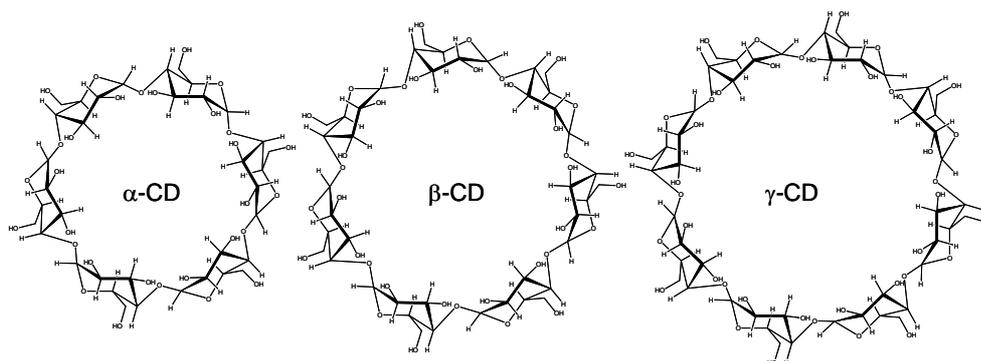


Figura 1.1 - Ciclodextrinas naturais

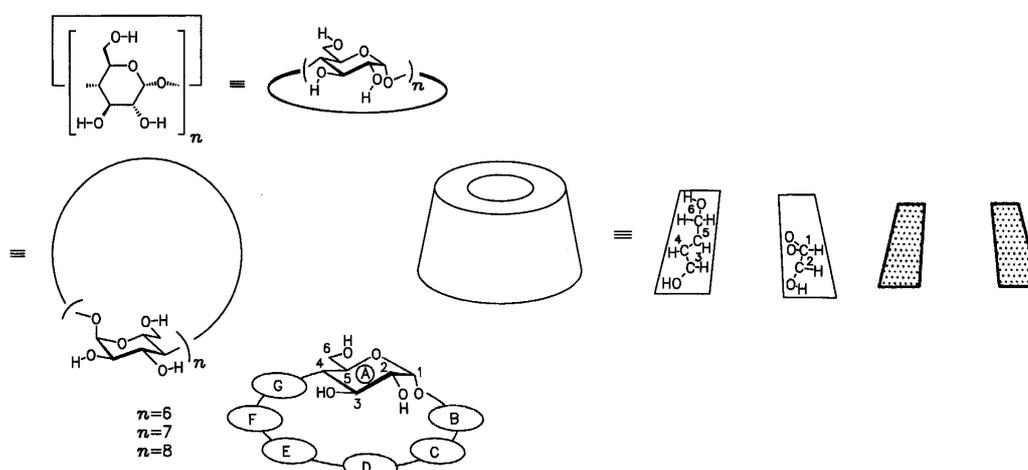


Figura 1.2 - Representação esquemática das ciclodextrinas.

Mediante difração de raios X, se determinou que as ciclodextrinas possuem uma estrutura cônica truncada (Figura 1.3).

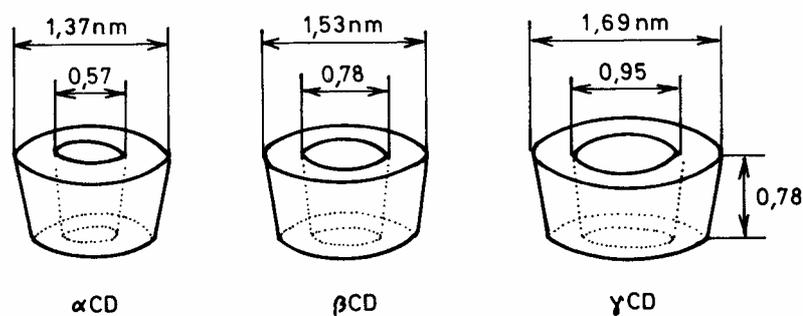
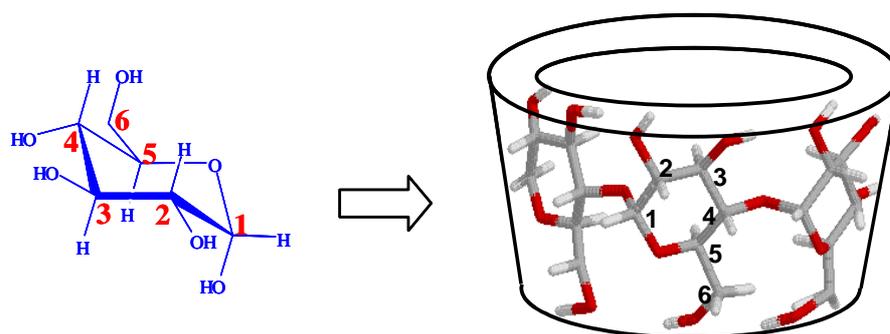


Figura 1.3 - Estrutura e dimensões das ciclodextrinas.

As unidades de glicopiranosose estão unidas em conformação  $\alpha$  1-4 glicosídica, estando todos os grupos  $\text{-OH}$  secundários situados na parte mais larga, enquanto que os grupos  $\text{-OH}$  primários na parte mais estreita (Figura 1.4). O interior da cavidade está constituído por hidrogênios  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_5$  e  $\text{H}_6$  e oxigênios glicosídicos. Os pares de elétrons não-ligantes destes oxigênios pertencentes a ligação glicosídica, se encontram orientados em direção ao interior da cavidade, o que origina uma alta densidade eletrônica, deixando a molécula com características de base de Lewis.



**Figura 1.4** - Estrutura funcional da  $\beta$ -ciclodextrina

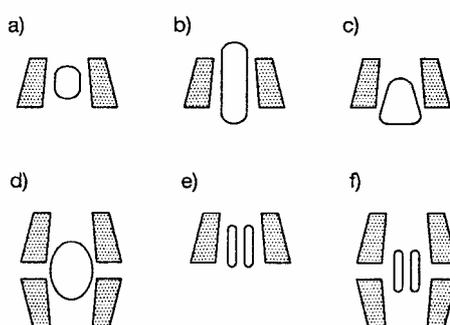
Os grupos hidroxilas secundários  $\text{OH}(2)$  e  $\text{OH}(3)$  estão em posição equatorial, porém com o  $\text{OH}(2)$  apontando para o interior e o  $\text{OH}(3)$  para o exterior da cavidade, bem como a hidroxila primária  $\text{OH}(6)$ . Isto faz com que exista o dobro de grupos  $\text{OH}$  voltados para fora do que para dentro da cavidade, o que leva a um momento dipolar da molécula relativamente grande.<sup>26</sup> Devido à distribuição dos grupos funcionais que formam a ciclodextrina, a parte externa adquire caráter hidrofílico e a interna hidrófoba ou de natureza apolar. O grupo  $\text{OH}(C2)$  de uma unidade de glicopiranosose pode formar pontes de hidrogênio com o  $\text{-OH}(C3)$  da unidade adjacente. No caso da  $\beta$ -ciclodextrina, estas ligações formam um cinturão secundário completo, o que lhe confere uma estrutura bastante rígida. Esta é uma possível explicação da menor solubilidade da  $\beta$ -ciclodextrina com relação as restantes. No caso da  $\alpha$ -ciclodextrina, o cinturão formado a partir das ligações de pontes de hidrogênio não é completo, pois uma das moléculas das unidades de glicopiranosose está em uma posição distorcida, de maneira que, somente quatro das seis possíveis uniões através de pontes de hidrogênio podem ser estabelecidas. No caso da  $\gamma$ -ciclodextrina, esta possui uma estrutura não coplanar, o que a torna mais flexível e portanto a mais solúvel das três.<sup>26</sup>

### 1.1.2 - Complexos de inclusão

Devido a sua cavidade hidrofóbica, na qual substratos podem ser “aprisionados” para formarem complexos de inclusão, as ciclodextrinas podem hospedar distintos compostos, cuja estequiometria mais usual é 1:1. A química do fenômeno de inclusão molecular demonstra um sistema de complexidade estrutural dentro da química supramolecular, onde a ciclodextrina é o hospedeiro (em inglês, “host”) e o substrato é o hóspede (em inglês, “guest”), os quais se mantêm juntos principalmente através de forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio.<sup>26, 27</sup> A formação do complexo de inclusão facilita em alguns casos, a solubilização de substâncias pouco solúveis e em outros, precipita algum componente em solução ou suspensão. No primeiro caso tem-se como exemplo a solubilização do naproxeno,<sup>28</sup> já a formação do complexo colesterol- $\beta$ -CD,<sup>29</sup> conduz à uma precipitação em solução aquosa, característica que tem sido utilizada para extração do colesterol em alimentos. Esta característica peculiar de formação de complexos de inclusão estáveis, tem levado a diversas aplicações, como por exemplo na indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética, biotecnologia, química analítica, agricultura e tecnologia ambiental.<sup>26, 30, 31</sup> Em solução, a molécula hóspede vai estar localizada, inteira ou parcialmente, dentro da cavidade da ciclodextrina, estando o complexo solvatado ou rodeado por moléculas do solvente, geralmente a água. No estado cristalino, a molécula hóspede pode estar localizada, não somente dentro da cavidade da ciclodextrina, mas também nos espaços intersticiais formados pela rede cristalina do complexo. As moléculas incluídas normalmente ficam orientadas de modo que se alcance o máximo contato entre a parte hidrofóbica da molécula hóspede e a cavidade da ciclodextrina de natureza apolar.<sup>26</sup>

Quando em uma solução aquosa de ciclodextrina se adiciona um composto menos polar que a água, tendo ambos forma e dimensão compatíveis, as moléculas de água que preenchem a cavidade da ciclodextrina, estando em um estado energeticamente menos favorável, são substituídas pela nova molécula. A cavidade central da ciclodextrina vai atuar então como uma molécula “hospedeira”, podendo alojar uma molécula “hóspede” total ou parcialmente, caso haja compatibilidade para formar o complexo de inclusão.<sup>26</sup>

As ciclodextrinas formam complexos de inclusão com substâncias que possuem tamanho, polaridade e forma geométrica compatíveis com a dimensão de sua cavidade. Alternativas para a formação de complexos com moléculas significativamente maiores que sua cavidade, poderão ser através de uma interação parcial do hóspede ou mediante a formação de complexos ciclodextrina-hóspede de estequiometria diferente de 1:1. Conforme Figura 1.5, os complexos de inclusão são classificados em: <sup>32</sup>



**Figura 1.5** - Principais tipos de complexos de inclusão

- Completa: quando a molécula hóspede é de tamanho pequeno e entra totalmente na cavidade da ciclodextrina (Figura 1.5 a).
- Parcial: quando a molécula somente entra parcialmente na cavidade da ciclodextrina (Figura 1.5 c).
- Axial: quando a molécula hóspede é de tamanho longo e estreito e se estende através do eixo mediano da ciclodextrina (Figura 1.5 b).
- Tipo “sandwich”: quando a molécula hóspede é muito grande e necessita de duas moléculas de ciclodextrina para formar o complexo (Figura 1.5 d).
- Complexos de estequiometria superior: são exemplificados pela inclusão 1: 2, onde duas moléculas hóspede interagem com uma ciclodextrina (Figura 1.5 e) ou duas moléculas hóspedes para duas ciclodextrinas (Figura 1.5 f).

Outros compostos formam complexos de ordem superior, podendo-se mencionar: rotaxanos e polirrotaxanos, <sup>33</sup> catenanos, <sup>34</sup> estruturas tubulares, <sup>35</sup> éteres coroas, <sup>36</sup> polímeros supramoleculares de inclusão, <sup>19, 20</sup> dendrímeros, etc. <sup>18, 37</sup>

### 1.1.3 - Aplicações das ciclodextrinas na área farmacêutica

Nos últimos anos têm havido um grande interesse na melhoria da qualidade das formulações farmacêuticas. A pesquisa de formulações que melhorem a eficácia de novos princípios ativos, assim como de alguns fármacos já conhecidos, têm levado à aplicação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. A razão para o crescimento do número de publicações e patentes dentro da área farmacêutica também se deve ao custo bastante baixo na obtenção das  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas. O tamanho favorável do diâmetro interno da cavidade das ciclodextrinas permite a formação de complexos de inclusão com a maioria dos fármacos, cuja melhoria das suas propriedades físico-químicas<sup>26, 31, 38</sup> estão expressas pelas seguintes vantagens:

- compostos líquidos transformados em formas cristalinas sólidas
- eliminação de incompatibilidades entre o princípio ativo e os outros constituintes da formulação
- estabilidade química e/ou física
- aumento da velocidade de dissolução e biodisponibilidade
- melhora da solubilidade de fármacos pouco solúveis
- redução dos efeitos secundários
- eliminação de maus odores e sabores
- redução da volatilidade de certos princípios ativos

Algumas das aplicações mais freqüentes na área farmacêutica são apresentados na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1** - Exemplos de alguns fármacos em forma de complexos de inclusão.

Propriedade	Princípio ativo	ciclodextrina	referências
Aumento da solubilidade	Gliclazide	$\beta$ -CD	39
	Glibornuride	$\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -CD	40
	Albendazol	$\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -CD e HP- $\beta$ -CD	41
	Mebendazol	$\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -CD e HP- $\beta$ -CD	42
Melhora da biodisponibilidade	Naproxeno	$\beta$ -CD	43
	Ketoprofeno	$\beta$ -CD	44
		HP- $\beta$ -CD	
Diminuição de efeitos secundários	Piroxicam	$\beta$ -CD	45
	Naproxeno	$\beta$ -CD	46
	Pilocarpina	HP- $\beta$ -CD	47
		DM- $\beta$ -CD	
Inibição da degradação	Melfalano e carmustina	SBE- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD	48
	Prostaciclina	$\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -CD	49
	Indometacina	$\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD	50
	Doxorubicina	HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD e $\gamma$ CD	51
		HP- $\beta$ -CD	
Aumento da degradação	Espironolactona	$\beta$ - , $\gamma$ -CD e derivados	53
	Antibióticos $\beta$ lactâmicos	DM- $\beta$ CD, HP- $\beta$ CD e HP- $\gamma$ CD	54

As ciclodextrinas podem ser administradas a seres humanos ou animais, fazendo parte de medicamentos ou alimentos, seja na forma livre ou como complexos de inclusão. Se a ciclodextrina é administrada por via oral, fazendo parte do complexo, ocorre sua dissociação no trato gastrointestinal, sendo processos separados, a absorção da molécula hóspede e da ciclodextrina. Estas por sua vez, são degradadas a açúcares absorvíveis no cólon intestinal pela microflora, e finalmente excretadas como dióxido de carbono e água.<sup>31</sup>

### *Biodisponibilidade*

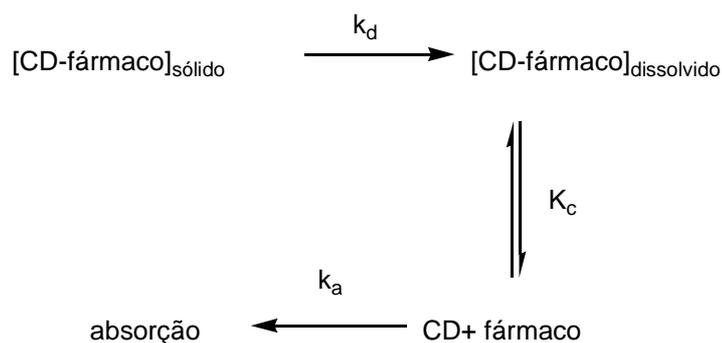
O termo biodisponibilidade é definido através do grau e da velocidade de absorção de um fármaco a partir de sua forma farmacêutica para dentro da circulação sanguínea. De acordo com esta definição, a absorção de um fármaco administrado através da via intravenosa

é rápida e completa. No entanto, por razões de conveniência e estabilidade, muitos fármacos são administrados por via oral, e portanto o grau e a velocidade de absorção não são precisamente conhecidos.<sup>55</sup>

Há vários fatores físico-químicos que podem afetar a biodisponibilidade total de um fármaco. Entre eles, cita-se a solubilidade, estabilidade, tamanho da partícula,  $pK_a$ , pH e coeficiente de partição.<sup>55</sup>

Quando um fármaco é administrado por via oral em uma forma farmacêutica sólida, é indispensável que ocorra sua solubilização nos fluidos biológicos, como passo inicial a etapa de absorção. Se a velocidade de dissolução ( $k_d$ ) é bastante alta, com relação a velocidade de absorção ( $k_a$ ), não se recomenda o uso de complexos de inclusão, já que a biodisponibilidade deste princípio ativo não será limitada pelo processo de dissolução. No entanto, um grande número de fármacos apresentam baixa biodisponibilidade, precisamente por apresentarem problemas de solubilidade ( $k_d \ll k_a$ ) e, nestes casos justifica-se a utilização destes complexos.<sup>31, 55, 56</sup>

Uma vez que o complexo de inclusão se encontra no fluido biológico, antes de haver absorção para a corrente sangüínea, deve sofrer um processo de dissociação, considerando que somente o fármaco livre é capaz de atravessar as membranas biológicas. Portanto, a absorção vai depender tanto da velocidade de dissolução ( $k_d$ ), como da dissociação do complexo formado, determinado pela constante de estabilidade ( $K_c$ ). O complexo dissolvido vai estar em equilíbrio com as formas dissociadas, ciclodextrina e fármaco não complexados. O esquema 1.1, se refere ao processo de absorção para os complexos de inclusão no trato gastrointestinal.<sup>31, 55</sup>



**Esquema 1.1** - Processo de absorção do complexo no trato gastrointestinal.

Portanto, é esperada uma rápida absorção do fármaco, se o valor da constante de estabilidade do complexo for baixa. Com complexos muito estáveis, ou valores da constante de estabilidade ou formação do complexo muito elevados, a concentração do fármaco livre absorvido é baixa e, nestes casos esta é a etapa limitante de velocidade.<sup>31</sup>

A velocidade de absorção de fármacos pode assim ser acelerada ou diminuída através da avaliação prévia do valor da constante de equilíbrio do complexo. Complexos com baixos valores da constante de estabilidade (inferiores a  $200 \text{ M}^{-1}$ ), conduzem a uma liberação rápida e prematura do princípio ativo, podendo ocasionar sua precipitação no fluido biológico, o que irá diminuir sua absorção. Por outro lado, se os valores da constante são superiores a  $5000 \text{ M}^{-1}$  ou existe uma concentração excessiva de ciclodextrina, o equilíbrio vai ser deslocado em direção a formação do complexo de inclusão, diminuindo assim a liberação da forma livre do fármaco e conseqüentemente sua absorção.<sup>26, 31</sup>

### *Solubilidade*

Em geral, supõe-se que a formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas, leva ao aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução de princípios ativos lipofílicos, o que pode refletir em um aumento de sua biodisponibilidade ou em diminuição de seus efeitos secundários.<sup>2, 43, 46, 47</sup>

Geralmente, a solubilidade de um fármaco aumenta com a quantidade de ciclodextrina adicionada. O aumento da solubilidade parece estar relacionado com a solubilidade intrínseca

do hóspede, bem como com a habilidade de inclusão da molécula hospedeira em água, onde estes fatores estarão refletindo na magnitude da constante de estabilidade do complexo.<sup>55</sup>

Ahn et al., estudaram a influência que haveria sobre a velocidade de dissolução do fármaco antiinflamatório não esteroideal ketoprofeno, após formação de complexos de inclusão na presença de algumas ciclodextrinas. Foi observado que o perfil de dissolução deste fármaco foi consideravelmente favorável na presença tanto de  $\beta$ -CD bem como de HP- $\beta$ -CD, o que reflete de forma positiva em sua biodisponibilidade.<sup>44</sup>

Gliclazida, fármaco alternativo utilizado no tratamento de diabetes mellitus, é caracterizado por sua baixa solubilidade nos fluidos gástricos e, portanto baixa velocidade de dissolução e biodisponibilidade. A formação do complexo gliclazida- $\beta$ -CD, foi avaliada através de estudos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e de solubilidade. Os autores mostraram a formação do complexo, com uma constante de estabilidade de  $1094 \text{ M}^{-1}$  e estequiometria 1:2.<sup>39</sup>

Torres Labandeira et al., através de estudos de solubilidade e  $^1\text{H}$ -RMN na complexação de glibornurida com  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, mostraram que a solubilidade deste fármaco melhora significativamente na presença de ciclodextrinas.<sup>40</sup>

Díaz et al., estudaram a complexação e a solubilidade de albendazol e mebendazol, devido a baixa solubilidade destes fármacos no trato gastrointestinal. Estudos de solubilidade mostraram que as ciclodextrinas aumentam a solubilidade do mebendazol no fluido intestinal simulado.<sup>42</sup> Estudos de velocidade de dissolução do albendazol, mostraram uma melhora em presença de diferentes ciclodextrinas.<sup>41</sup>

### *Estabilidade*

Princípios ativos quando presentes em solução aquosa, estão sujeitos muitas vezes, à reações de degradação, os quais são levados a uma diminuição de atividade terapêutica ou mesmo formação de produtos de degradação indesejáveis e prejudiciais à saúde. Quando fazem parte de um complexo de inclusão, poderão estar protegidos das situações de degradação ou instabilidade. Do ponto de vista da área farmacêutica, os fármacos devem permanecer suficientemente estáveis, não somente durante a estocagem, mas também nos

fluidos biológicos, já que nas reações que resultam em produtos farmacologicamente inativos ou menos ativos, terão sua efetividade terapêutica reduzida.<sup>31,55</sup>

O aumento da temperatura tem influência direta na estabilidade física de muitas formas farmacêuticas tais como soluções, emulsões, suspensões e supositórios. Estas alterações incluem desde modificações reológicas, o que vai interferir significativamente na viscosidade, assim como desestabilização de sistemas emulsionados. Favorece também a evaporação de solventes voláteis, contribuindo assim para uma provável recristalização.<sup>57</sup> Foram observados que certos fármacos, ao formarem complexos de inclusão com ciclodextrinas, aumentam sua estabilidade com relação a temperatura, reduzindo-se assim perdas em sua forma farmacêutica, ocasionadas por uma sublimação ou volatilização.<sup>58</sup>

Geralmente, não são observados os processos de fusão, evaporação, sublimação ou decomposição do princípio ativo, até que se produza a decomposição da ciclodextrina (250-300°C).<sup>31</sup>

O processo de oxidação de uma substância cristalina, frente ao oxigênio atmosférico, é em geral bastante lento e poderá ser acelerada se for aumentada sua superfície de contato. Por outro lado, a formação de complexos de inclusão, permite estabilizar alguns compostos insaturados, tais como os ácidos graxos, aldeídos e vitaminas lipossolúveis. Este resultado é de extrema importância para as indústrias de alimentos e cosmética, permitindo a estabilização de substâncias bastante utilizadas nesta área.<sup>31</sup>

A decomposição fotoquímica é decorrente da absorção de luz ou energia radiante pela molécula do fármaco fotossensível. Parece claro que, esse tipo de alteração depende da facilidade com que a luz se propaga no meio no qual está contido o fármaco. Formas farmacêuticas tais como soluções, xaropes e elixires são mais susceptíveis às alterações que as suspensões, emulsões, pós e comprimidos.<sup>57</sup>

A felodipina, fármaco antihipertensivo, apresenta problemas de baixa solubilidade e decomposição fotoquímica. Através de estudos de estabilidade, as ciclodextrinas foram utilizadas para melhorar suas propriedades físico-químicas.<sup>59</sup>

A digoxina, um dos potentes glicosídeos cardíacos, é susceptível a hidrólise em meio ácido e, como resultado, sua eficiência terapêutica bem como sua biodisponibilidade oral

podem ser diminuídas. No decorrer da degradação da digoxina, a prevenção ao aparecimento da digoxigenina, pode ser clinicamente importante, porque a cardioatividade da digoxigenina é aproximadamente 1/10 da digoxina. Na presença de ciclodextrinas, a hidrólise ácida da digoxina é evitada na ordem que vai de  $\beta$ - >  $\gamma$ - >  $\alpha$ -ciclodextrina, onde a  $\beta$ -CD inibe a conversão do digoxídeo a digoxigenina quase completamente.<sup>60</sup>

### *Efeitos secundários*

Quando o princípio ativo está incluído dentro da cavidade da ciclodextrina, se reduz a possibilidade de seu contato direto com os componentes biológicos e desta maneira os efeitos secundários.

Um dos grupos terapêuticos mais amplamente estudados é o dos antiinflamatórios não esteroidais, devido a sua potente ação ulcerogênica. Esta ação desfavorável tem sido amenizada através da formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas, como no caso do naproxeno em  $\beta$ -CD.<sup>46</sup>

As ciclodextrinas também protegem os eritrócitos das mudanças morfológicas ocorridas com subsequente hemólise, induzidas por vários fármacos perturbadores de membrana. Esta redução vai depender da quantidade de fármaco que se encontra na forma livre e, portanto, dependerá da magnitude da constante de estabilidade do complexo. Exemplos são os complexos de clorpromazina e ácido flufenâmico, onde a inibição da hemólise se produz na seguinte ordem  $\beta$ - >  $\gamma$ - >  $\alpha$ -ciclodextrina. Neste caso, a ação protetora das ciclodextrinas é devida à menor disponibilidade de união do fármaco com as membranas dos eritrócitos.<sup>55</sup>

A pilocarpina é usado topicamente para controle da pressão intraocular elevada, associada ao glaucoma, porém sua biodisponibilidade ocular é baixa devido a perda rápida da área precorneal. Apesar da existência de um pró-fármaco (diéster do ácido pilocárpico) que apresenta melhor absorção ocular com prolongada duração de ação, foram observados problemas de fortes irritações oculares, impedindo assim seu uso clínico. Com o uso de derivados de ciclodextrina, como a 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina e sulfobutil- $\beta$ -

ciclodextrina, observou-se um decréscimo da irritação oftálmica deste pró-fármaco, com nenhum decréscimo na sua ação terapêutica.<sup>61</sup>

Montassier et al., efetuaram estudos com a tretinoína, substância usada no tratamento da acne, com características de forte poder de irritação cutânea, elevada instabilidade na presença de oxigênio, luz e calor, assim como baixa solubilidade em água. A fim de melhorar suas características, os autores propuseram a formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas ( $\beta$ -CD, hidroxipropil- $\beta$ -CD e dimetil- $\beta$ -CD).<sup>62</sup>

### *Toxicidade*

Nos últimos anos têm sido realizados numerosos estudos com o objetivo de avaliar a toxicidade das ciclodextrinas, observando-se que a doses consideráveis, podem interagir com compostos endógenos, tais como os ácidos biliares, fosfolípídeos de membranas e colesterol, o que depende em grande parte, do tamanho da cavidade da molécula.<sup>63,64</sup>

Considerando que os efeitos aos danos celulares, são uma conseqüência da complexação da ciclodextrina com componentes da parede celular, tais como colesterol e fosfolípídeos, foi verificado que a  $\beta$ -CD e particularmente seus derivados mais hidrofóbicos, como a dimetil- $\beta$ -CD, são consideradas as mais tóxicas. No entanto, a dimetil- $\beta$ -CD apresenta alta capacidade de solubilização, o que leva a sua utilização em baixas dosagens, por exemplo em gotas nasais, cuja toxicidade desaparece. A  $\gamma$ -CD, cuja toxicidade é bastante baixa, pode ser usada através das vias parenteral e oral em altas dosagens, embora muitos de seus complexos com fármacos apresentem uma solubilidade limitada. A hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD), por sua vez, é bastante solúvel e apresenta boa capacidade de solubilização, porém a solubilização e transporte do colesterol para o interior do rim, poderá gerar sérias conseqüências, em tratamentos por longos períodos de tempo.<sup>65</sup>

#### 1.1.4 - Métodos de obtenção de complexos de Inclusão.

Para a grande maioria dos substratos, as técnicas de complexação utilizadas são procedimentos simples e a escolha do método experimental, depende fundamentalmente das características do substrato que se está trabalhando e, se é preparado em escala laboratorial ou industrial.

Na bibliografia são descritos diversos métodos de preparação dos complexos de inclusão, entre os que se pode destacar: <sup>26, 66</sup>

**Complexos em Solução:** Um método bastante freqüente é através da dissolução de ambos, hóspede e ciclodextrina em um solvente comum, à temperatura ambiente ou através do aquecimento, com agitação durante um tempo suficiente para garantia do estado de equilíbrio, geralmente de 24 a 48 horas. Para obtenção do complexo, se faz então a remoção do solvente mediante evaporação, liofilização, refrigeração ou spray-drying. A presença de água é absolutamente necessária, pura ou em um sistema contendo solvente orgânico, onde este será utilizado para solubilização da molécula hóspede. São usados como cosolventes, álcoois de cadeia curta como metanol, etanol, isopropanol ou em certos casos, a acetona.

**Complexos em Suspensão:** Neste caso, as ciclodextrinas não necessitam estar completamente dissolvidas, agitando o hóspede em uma suspensão aquosa de ciclodextrina, o complexo é formado em um intervalo de 2 a 24 horas em temperatura ambiente. Este procedimento é considerado o mais recomendado para processos em grande escala e tem sido utilizado para complexação de óleos essenciais, terpenos, aromas e fragâncias lipofílicas. Um exemplo é a fendilina, óleo viscoso de baixa solubilidade em água. Pode formar um complexo 2:1  $\beta$ -ciclodextrina/fendilina, por adição de 30g desta base oleosa, dissolvidos em 100mL de etanol em uma suspensão de 300g de  $\beta$ -ciclodextrina em 100 mL de água, com uma agitação vigorosa no intervalo de 12 horas, onde se obtém o produto através de filtração e secagem a uma temperatura de 40°C.

**Complexos por maceração:** Consiste em misturar quantidades estequiométricas do substrato e ciclodextrina, com adição de uma pequena quantidade de água ou solução hidroalcoólica. A mistura é então macerada até que se evapore a fase líquida, formando-se uma pasta que irá ser submetida a uma secagem até a eliminação total do solvente.

**Coprecipitação:** Consiste na adição de um excesso de substância ativa a uma solução saturada de ciclodextrina. Em alguns casos, este simples procedimento pode levar à formação do complexo de inclusão, porém freqüentemente recorre-se a métodos adicionais como agitação, ultrassom ou aquecimento da solução para precipitação do produto final.

**Liofilização:** Consiste no método em solução, onde se submete ao processo de liofilização, a solução na qual substrato e ciclodextrina encontram-se em concentrações estequiométricas. Pode-se empregar algum solvente, com a finalidade de obter ambas as substâncias totalmente dissolvidas. As condições nas quais se procede a liofilização, vai influir de forma determinante nas características do produto final. Assim, por exemplo, a velocidade de congelamento prévia à liofilização, condiciona a estrutura do complexo. Um rápido congelamento na presença de nitrogênio líquido, geralmente favorece a formação de produtos amorfos, enquanto que um congelamento mais lento leva a produtos cristalinos.

### 1.1.5 - Complexação de Esteróides

A interação entre esteróides, entre os quais os hormônios,<sup>67, 68</sup> colesterol,<sup>29, 69- 75</sup> sais biliares<sup>20, 76</sup> e ciclodextrinas, tornou-se um assunto de grande interesse, devido a diversas razões:

i) por um lado, a grande importância dos esteróides e por outro, a crescente utilização das ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Foram demonstrados em estudos “in vivo”, os efeitos sobre o metabolismo dos sais biliares em animais submetidos a dietas especiais contendo quantidades variadas de ciclodextrinas.<sup>77, 78</sup> Em seus estudos, Nakanishi et al.<sup>79</sup> demonstraram que as interações entre sais biliares e a  $\beta$ -CD influíram na absorção do fármaco sulfametiazol administrado por via oral em forma de complexos de inclusão.

ii) têm sido utilizadas colunas cromatográficas com ciclodextrinas para separação de epímeros de esteróides, cuja solução não pode ser conseguida mediante colunas tradicionais.<sup>80</sup> A adição de ciclodextrinas à fase móvel, também promove uma melhora da separação<sup>81, 82</sup> e a combinação de ciclodextrinas/esteróides (principalmente os sais biliares) está sendo utilizada em procedimentos cromatográficos e eletroforéticos para separação quiral.<sup>83, 84, 85</sup> Por outro lado, métodos cromatográficos estão sendo utilizados para determinação das constantes de associação e estequiometria de hormônios esteroidais com ciclodextrinas.<sup>86- 90</sup>

iii) devido às características de bioadaptabilidade, os esteróides com ciclodextrinas podem ser administrados através de várias vias.<sup>61, 91</sup> Assim, derivados de ciclodextrinas permitem a administração oral de esteróides<sup>92</sup> e promovem melhora de sua biodisponibilidade.<sup>93</sup> As ciclodextrinas também reduzem os efeitos secundários dos esteróides<sup>94</sup> e aumentam sua liberação.<sup>95, 96, 97</sup> No caso de nebulizadores<sup>98</sup> e formulações sublinguais<sup>99</sup> tem sido sugerido como alternativa de tratamento aos esteróides, o uso na forma de complexos de inclusão.

iv) as ciclodextrinas podem ser utilizadas para extração do colesterol de monocamadas de eritrócitos humanos.<sup>100, 101</sup> Por outro lado, o complexo ciclodextrina-colesterol tem sido proposto como padrão primário para a análise química.<sup>72</sup>

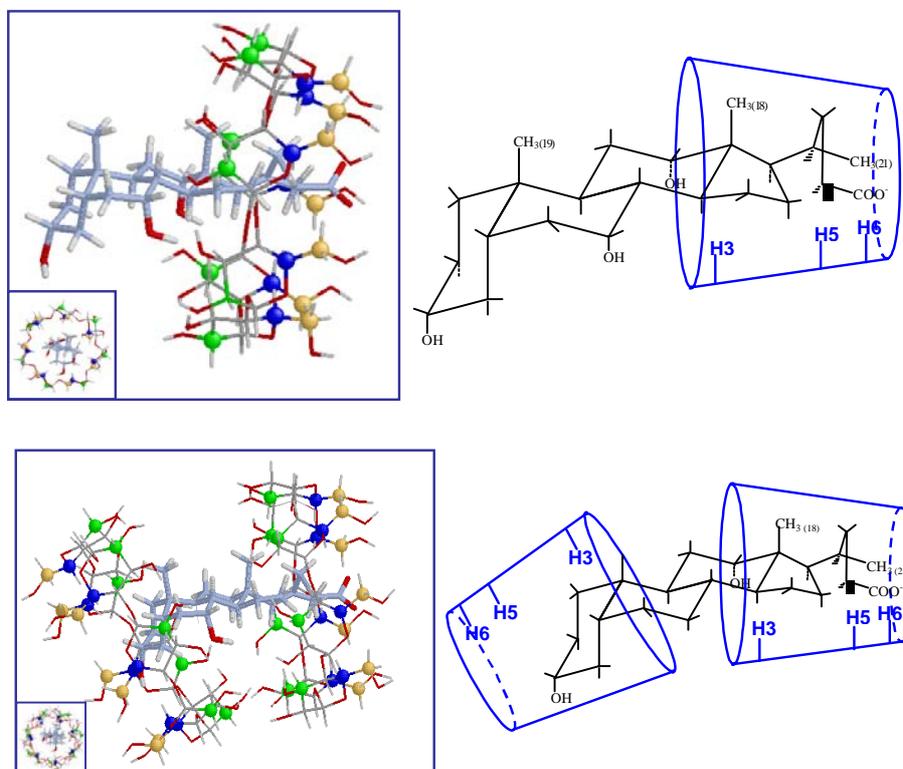
v) a interação esteróide/ciclodextrina tem sido utilizada como modelo para os processos de reconhecimento celular por parte das interações esteróide-proteína.<sup>24</sup>

vi) finalmente, o colato e o desoxicolato de sódio ao serem complexados por  $\beta$ -CD, comportam-se como hóspedes monotópicos e ditópicos, respectivamente. Esta diferença é originária da distinta polaridade existente entre os sais biliares tri- e dihidroxílicos. Esta característica tem sido utilizada para demonstrar a formação de conglomerados (oligômeros e polímeros) supramoleculares.<sup>18-21</sup>

Por sua importância para o presente trabalho, cabe aqui mostrar as estruturas do colato (NaC) e desoxicolato de sódio (NaDC), as quais poderão servir como modelos aos demais sais biliares. Na Figura 1.6, observa-se o colato de sódio/ $\beta$ -CD com estequiometria 1:1, e o desoxicolato de sódio/ $\beta$ -CD com 1:2.<sup>17</sup>

Alguns dos hóspedes, objetos de estudo da presente tese de doutorado (em particular, fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO, cujas propriedades estão descritas no item 1.2), possuem dupla característica. Por um lado, seu núcleo fundamental constituído pelo sistema estrutural tetracíclico do perhidrociclopentanofenantreno, comum a todos os esteróides. Por outro, em solução aquosa comportam-se como agentes tensoativos (exceção ao helvolato de potássio), formando agregados conhecidos comumente por micelas. Sendo os sais biliares, a família de compostos mais próxima aos sistemas estudados neste trabalho de tese e sobre o qual existe maior informação na bibliografia científica a respeito de

complexos de inclusão em ciclodextrinas, cabe aqui apresentar uma revisão das características físico-químicas destes compostos esteroidais.



**Figura 1.6** - Estrutura dos complexos 1:1 NaC/ $\beta$ -CD e 1:2 NaDC/ $\beta$ -CD.

Os ácidos biliares são produtos finais do metabolismo do colesterol e seus sais sódicos são amplamente solúveis em água. Nos mamíferos, os sais biliares possuem um hidrogênio em configuração  $5\beta$ , resultado da configuração cis apresentada pelos anéis A e B. Os grupos funcionais substituintes no núcleo esteroidal ficam quase que exclusivamente limitados aos grupos hidroxilas e a um ácido carboxílico terminal presente no final da cadeia lateral isopentanóica. Possuem ainda, grupos metila nas posições C-10 e C13. Do mesmo modo, estão presentes grupos hidroxila na posição C-3 (proveniente do colesterol) e outro grupo hidroxila em C-7. Usualmente, está presente um terceiro grupo hidroxila, podendo encontrar-se na posição C-12 ou C-6. A partir do fígado, os ácidos biliares são excretados no intestino delgado, onde durante o processo digestivo, irão solubilizar os ácidos graxos provenientes da dieta. Os ácidos biliares são praticamente reabsorvidos a partir do intestino delgado, onde

através da circulação enterohepática e sob ação de bactérias intestinais são biotransformados. Exemplos típicos dos ácidos biliares são o ácido cólico e seu derivado 7-desoxi e o ácido desoxicólico, os quais estão presentes em muitas espécies de mamíferos.<sup>102</sup>

Os ácidos biliares conjugados com os aminoácidos glicina e taurina são mais solúveis ao pH do intestino delgado, resistentes à precipitação por íons  $\text{Ca}^{2+}$  e impermeáveis à membrana. Estas propriedades permitem que os ácidos biliares conjugados estejam presentes em elevadas concentrações na secreção biliar e no trato intestinal.

Os ácidos biliares são estruturas anfifílicas planas, possuindo uma parte hidrófoba (face  $\beta$ , sem a presença de grupos hidroxila) e parte hidrófila (face  $\alpha$ , contendo os grupos hidroxila) (Figura 1.7).<sup>103</sup> Em água se associam para formar multímeros acima de uma concentração denominada de “concentração micelar crítica” (cmc).<sup>104</sup> Alguns autores consideram que a ligação de hidrogênio está envolvida na formação destes agregados<sup>105</sup>, as quais segundo outros autores, são as responsáveis pela estrutura helicoidal.<sup>106</sup> A ligação de hidrogênio também estaria participando da formação da estrutura cristalina dos ácidos biliares.<sup>107, 108</sup> Na formação destas ligações de hidrogênio participam os grupos hidroxilas pertencentes ao esqueleto esteroidal e o grupo carboxílico da cadeia lateral. Tais grupos podem atuar como agentes doadores e/ou receptores da ligação de hidrogênio.<sup>108</sup>

Dependendo do número de grupos hidroxila, os sais biliares são classificados em:

- sais biliares trihidroxílicas: exemplo mais característico é o colato de sódio, que apresenta seus três grupos  $-\text{OH}$  nas posições  $3\alpha$ ,  $7\alpha$  e  $12\alpha$ .
- sais biliares dihidroxílicas: tem-se como exemplo o desoxicolato de sódio, cujos grupos  $-\text{OH}$  se encontram nas posições  $3\alpha$  e  $12\alpha$ .
- sais biliares monohidroxilados: o litocolato de sódio é o mais abundante, apresentando o grupo  $-\text{OH}$  na posição  $3\alpha$ .

São pequenas as mudanças que ocorrem nas dimensões moleculares dos diferentes sais biliares com a presença de um, dois ou três grupos hidroxilas, constituindo assim uma família de moléculas de forma e tamanho praticamente idênticas. No entanto, estas pequenas diferenças são refletidas na polaridade da molécula e expressas pelo balanço hidrófilo-lipófilo (BHL) existente entre as faces  $\alpha$  e  $\beta$ . Assim, a existência de vários grupos polares na face  $\alpha$

vai refletir numa maior diferença de polaridade com relação à  $\beta$ . Portanto, o BHL dos sais biliares trihidroxílicos é maior que o dos dihidroxílicos e estes por sua vez, maior que o dos sais biliares monohidroxílicos. A amidação do grupo carboxílico com aminoácidos como glicina ou taurina também contribui com a polaridade, e assim os tauroderivados são mais hidrofílicos que os glicoderivados, os quais por sua vez são mais que os sais originais.<sup>109</sup>

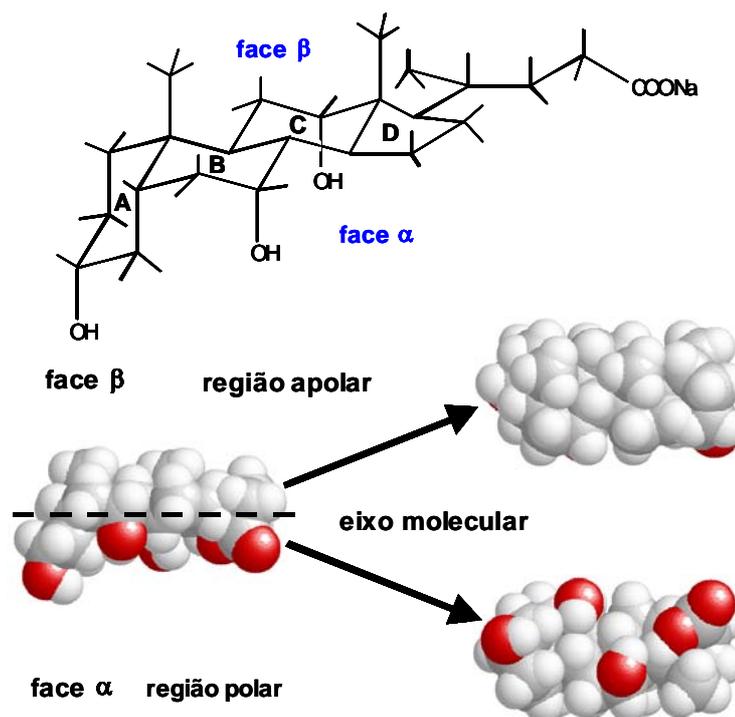


Figura 1.7 - Estrutura anfifílica dos ácidos biliares.

Os sais biliares são moléculas que por sua estrutura anfifílica apresentam um comportamento de auto-associação, formando agregados em solução aquosa. É interessante conhecer este comportamento a fim de predizer em que condições experimentais se encontram, se sob a forma de íons livres (monômeros) ou de agregados. Este fato é importante nos processos de complexação dos sais biliares por ciclodextrinas, pois se tornam simplificados quando predominam os monômeros em solução. Deste modo, os sais biliares se comportam como tensoativos, com tendência a permanecer na superfície do solvente (interface água-ar), a fim de reduzir as interações desfavoráveis existentes entre a parte hidrofóbica destas moléculas e as da água. Ao mesmo tempo, permitem que as fortes interações existentes entre as moléculas de água da superfície sejam substituídas em parte, por

interações sal biliar-água de natureza mais débil, diminuindo assim a tensão superficial do solvente. Esta propriedade foi utilizada nos estudos dos processos de inclusão em ciclodextrinas.<sup>17</sup> A formação de micelas em uma solução de sais biliares será espontânea sempre que sua concentração estiver acima de um valor mínimo de concentração que se denomina de **cmc** (concentração micelar crítica) e a temperatura do sistema seja superior a um determinado valor denominado de **cmt** (temperatura micelar crítica). Outros estudos relacionados à agregação de sais biliares estão sendo apresentados no Anexo A.

### 1.1.6 - Caracterização dos complexos de inclusão

Não é garantido, que um pó obtido da mistura da ciclodextrina e algum substrato em solução, ou suspensão, ou como pasta, seja um verdadeiro complexo de inclusão. Muitos compostos não podem ser complexados, outros formam complexos de inclusão em solução, mas não no estado sólido. O produto sólido final pode ser uma mistura de hóspede e hospedeiro, hóspede não complexado e ciclodextrina hidratada.

Vários métodos têm sido usados para detectar a formação de complexos de inclusão. No estado sólido, os compostos de inclusão se comportam como espécies estáveis, com estequiometria bem definida. Nestes casos, os métodos de detecção e caracterização mais comumente utilizados são a análise térmica, difração de raios-X, espectroscopia infravermelho e ressonância magnética nuclear.<sup>1, 26, 31</sup>

O método de análise através da difração de raios-X, pode ser empregado para a detecção dos compostos de inclusão, devido a que os padrões de difração dos complexos obtidos são claramente diferentes dos obtidos a partir dos componentes individuais. O emprego desta técnica se baseia na comparação dos difratogramas das substâncias puras e do complexo.<sup>26, 31</sup>

A calorimetria diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) são métodos térmicos, que permitem observar claramente a existência de um complexo de inclusão. Quando uma molécula se encontra dentro da cavidade da ciclodextrina, as modificações ocasionadas pela variação da temperatura (fusão, sublimação, degradação e inclusive mudanças de transição

polimórfica), desaparecem ou não são observadas, até que se produza a degradação da ciclodextrina (250–300°C).<sup>31</sup>

A espectroscopia infravermelho (IV), é um método indispensável para a caracterização de compostos orgânicos, pois permite detectar grupos funcionais, cuja presença pode ser difícil através de outros métodos. Quando se forma o complexo, pequenos deslocamentos das bandas das ciclodextrinas poderão mascarar a do hóspede, se este último estiver presente em pequenas quantidades. No entanto, se o hóspede apresentar grupos funcionais característicos, como no caso do grupo carbonila, a banda será significativamente encoberta e deslocada após complexação por ciclodextrina.<sup>31</sup>

A caracterização de complexos em solução, se baseia na investigação da interação molecular entre a ciclodextrina e hóspede, determinação da constante de estabilidade e estequiometria do complexo. São utilizadas as determinações relacionadas com mudanças espectrais, como no caso da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia por ultravioleta e fluorescência, além de estudos de solubilidade e métodos cinéticos.<sup>1, 26, 31</sup> A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), é muito utilizada para a caracterização dos complexos de inclusão, através da observação das mudanças que ocorrem com os sinais de próton ( $^1\text{H}$ ) ou de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) pertencentes na molécula da ciclodextrina ou no hóspede, ao estarem complexados.<sup>110</sup>

As mudanças que ocorrem no espectro de UV, devido a formação do complexo, são geralmente deslocamentos batocrômicos e/ou alargamento das bandas. O deslocamento do máximo de absorção no UV, pelo efeito da formação do complexo pode ser explicado através da proteção parcial dos elétrons excitáveis e cromóforos presentes na cavidade da ciclodextrina. Quando a formação do complexo é manifestada através de mudanças significativas, com decréscimo da absorbância, ao variar a concentração de ciclodextrina e mantendo-se constante a concentração do hóspede, pode-se determinar o valor da constante de estabilidade com o uso da equação de Benesi-Hildebrand.<sup>26, 110</sup>

A fluorescência é provocada pela absorção de energia radiante e reemissão de parte desta energia sob a forma de luz. Na fluorescência, a absorção e a emissão ocorrem dentro de um intervalo de tempo curto, na ordem de  $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  segundos. A fluorescência de um composto depende da estrutura molecular e na maioria das vezes está associada a sistemas  $\pi$ .

A adição de ciclodextrina a uma solução aquosa, freqüentemente vai resultar em uma melhora significativa do espectro de fluorescência. A mudança que ocorre com a adição de ciclodextrina, é semelhante à observada quando o fármaco é dissolvido em solventes menos polares, tais como dioxano e etanol, sugerindo assim que este foi transferido de um ambiente aquoso à cavidade apolar da ciclodextrina. Portanto, um aumento na intensidade da fluorescência é freqüentemente observado para as moléculas que são totalmente encapsuladas dentro da cavidade da ciclodextrina.<sup>26</sup>

As técnicas por diagrama ou isoterma de solubilidade, método cinético e RMN serão abordados com mais detalhes no item 3.

### 1.1.7 - Equilíbrio de formação do complexo de inclusão e a constante de estabilidade

Um complexo de inclusão em solução está sempre em equilíbrio termodinâmico com seus componentes livres, de acordo com a equação 1.1,



onde CD = ciclodextrina, H = hóspede (substrato) e  $CD_nH_m$  ou  $C_{nm}$  = complexo de inclusão.

Este equilíbrio é descrito quantitativamente mediante a constante de estabilidade ( $K_{mn}$  ou  $K_c$ ), definida de acordo com a equação 1.2,

$$K_{mn} = \frac{[CD_nH_m]}{[H]^m [CD]^n} \quad (1.2)$$

Em soluções diluídas, a estequiometria 1:1 prevalece, mas também são observadas estequiometrias 1:2, 2:1 ou 2:2, quando se tem concentrações mais elevadas ou hóspedes específicos. Por exemplo, pirenosulfonato de sódio forma complexos 1:1 de baixa estabilidade na presença de  $\beta$ -CD e 2:1 com  $\gamma$ -CD de elevada estabilidade em solução aquosa.<sup>26, 31</sup>

Os parâmetros são significativamente afetados pelas condições experimentais tais como diluição ou concentração, mudanças na temperatura, pH e polaridade do solvente. Se um terceiro componente é adicionado ao sistema, vai competir pela cavidade da ciclodextrina resultando em um decréscimo na concentração original do complexo.<sup>111</sup> No caso de hóspedes

ionizáveis, uma mudança do pH da solução, vai deslocar o equilíbrio em direção onde a forma não ionizada é predominantemente incluída na cavidade. Isto é devido a inclusão favorável do hóspede de natureza hidrofóbica, comparado com o de natureza hidrofílica. Assim, substâncias de caráter ácido são incluídas mais facilmente na cavidade da ciclodextrina em uma região ácida, enquanto que se dissociam em uma região alcalina. A força iônica também exerce seu efeito na formação do complexo, porque o efeito hidrofóbico tem um papel importante no processo de interação.<sup>55, 111</sup>

Considerando que a formação do complexo é usualmente um processo exotérmico, a dissociação será facilitada pela elevação da temperatura.<sup>111</sup>

O requisito para a complexação, é que o grupo hidrofóbico da molécula a ser incluída se ajuste total ou parcialmente na cavidade da ciclodextrina. No caso do complexo prostaglandina (PG)-ciclodextrina (CD), a  $\alpha$ -CD devido a sua cavidade menor, inclui preferencialmente a cadeia alifática da molécula da prostaglandina, enquanto que a  $\beta$ -CD acomoda melhor o anel de 5 membros pertencente a estrutura. Por sua vez, a maior cavidade da  $\gamma$ -CD, é capaz de incluir a molécula da prostaglandina, de tal forma que, toda a estrutura incorpora-se na cavidade.<sup>111</sup>

Portanto, uma vez conhecidos os parâmetros tais como constante de estabilidade, estequiometria e parâmetros termodinâmicos, o comportamento do sistema é quantitativamente reproduzível, desde que o processo de complexação envolva o equilíbrio nas mesmas condições.<sup>55</sup>

## 1.2 - Substâncias de interesse para estudo dos complexos de inclusão

### 1.2.1 - Furoato de diloxanida

O furoato de diloxanida (Furamida, FD), quimicamente é o **2-furoato de 4-(N-metildicloroacetamida) de fenila** (Figura 1.8). No estado sólido é um pó branco, inodoro e com um ponto de fusão entre 114-116° C. É ligeiramente solúvel em água, etanol (1g/100mL) e clorofórmio (1g/2,5 mL). É fotossensível e deve ser protegido da luz. Seu efeito adverso

mais comum durante o tratamento é a flatulência, podendo ocorrer ocasionalmente vômitos, prurido e urticária.<sup>112, 113</sup>

É um amebicida da luz intestinal com atividade principalmente no intestino delgado e utilizado no tratamento da amebíase cística assintomática caracterizada pela presença de *E. histolítica*. Em pacientes com amebíase invasiva, faz-se necessário sua administração associado à amebicidas tissulares tais como o metronidazol e tinidazol.<sup>112</sup>

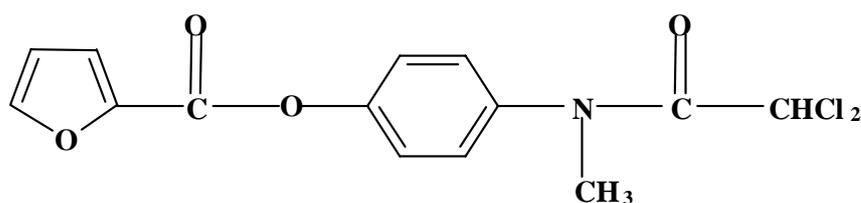


Figura 1.8 - Estrutura do furoato de diloxanida

Considerando a importância apresentada pelo coeficiente de partição lipídeo/água e a união dos fármacos aos lipídeos do sangue, Sengupta et al. determinaram o coeficiente de partição n-octanol/água (logP) para o furoato de diloxanida (FD), hidrocloreto de emetina (HE) e metronidazol (MZ) e desenvolveram um método que permitiu esclarecer o mecanismo de ação do furoato de diloxanida. Estes autores consideraram que o elevado valor do coeficiente de partição do furoato de diloxanida limita a molécula a permanecer na luz intestinal. Sua união aos fosfolipídeos da membrana dos oocistos provoca a desintegração de sua matriz lipídica, com conseqüente ruptura e morte do microorganismo.<sup>114</sup>

O elevado valor do coeficiente de partição, assim como a pouca solubilidade em água, permite explicar a aplicação do furoato de diloxanida na terapêutica da amebíase intestinal aguda e a limitada ação na forma crônica ou invasiva desta enfermidade.<sup>114, 115</sup> O fármaco uma vez dissolvido no trato gastrointestinal, é susceptível à hidrólise formando a diloxanida, cuja efetividade é menor que sua forma éster, já que possui uma lipossolubilidade moderada.<sup>13</sup>

Nieto Reyes demonstrou em seus estudos biofarmacêuticos, que o FD apresenta melhora da velocidade de dissolução e de solubilidade na presença de  $\beta$ -CD em soluções contendo suco gastrointestinal simulado (pH 1,2 e 6,8). Em estudos de estabilidade “*in situ*”, verificou que a constante de velocidade de degradação do furoato de diloxanida foi

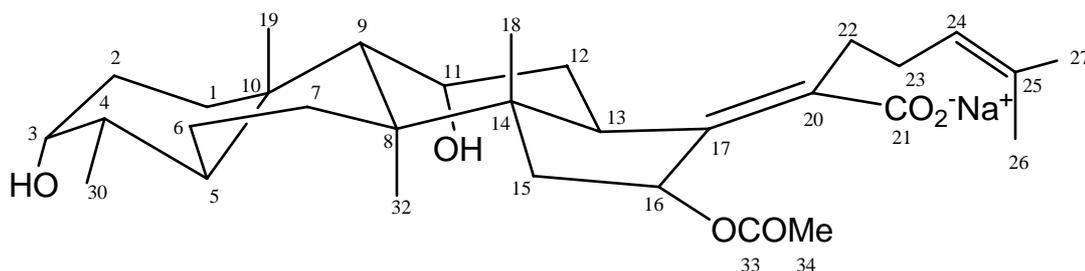
significativamente menor, demonstrando uma maior estabilidade do fármaco quando complexado.<sup>12</sup> Nos estudos “*in vivo*”, foi demonstrado que com o uso do complexo de inclusão FD/ $\beta$ -CD, ocorreu uma diminuição significativa na intensidade da infecção em ratos neonatos com oocistos de *Cryptosporidium parvum*.<sup>12, 116</sup>

Os problemas de solubilidade e instabilidade em água apresentado pelo furoato de diloxanida, limita a possibilidade do alcance deste no fluido intestinal, assim como uma provável eliminação do local onde deveria exercer seu efeito terapêutico. Portanto, a  $\beta$ -CD estaria protegendo o composto da ação das esterases presentes na porção do trato gastrointestinal.

### 1.2.2 - Fusidato de sódio

O ácido fusídico (**ácido 3 $\alpha$ , 11 $\alpha$ - dihidroxi-16 $\beta$ -acetoxifusida-17(20)-[16-21-cis], 24-dien-21-óico**) (Figura 1.9) apresenta estrutura esteroidal e pertence ao grupo de antibióticos fusidanos.<sup>103</sup> Apresenta baixa solubilidade em água, em contraste com seu sal de sódio que é bastante solúvel. Relacionado estruturalmente ao ácido helvólico, inibe a síntese de proteínas, tanto em células procarióticas como em eucarióticas.<sup>117, 118</sup>

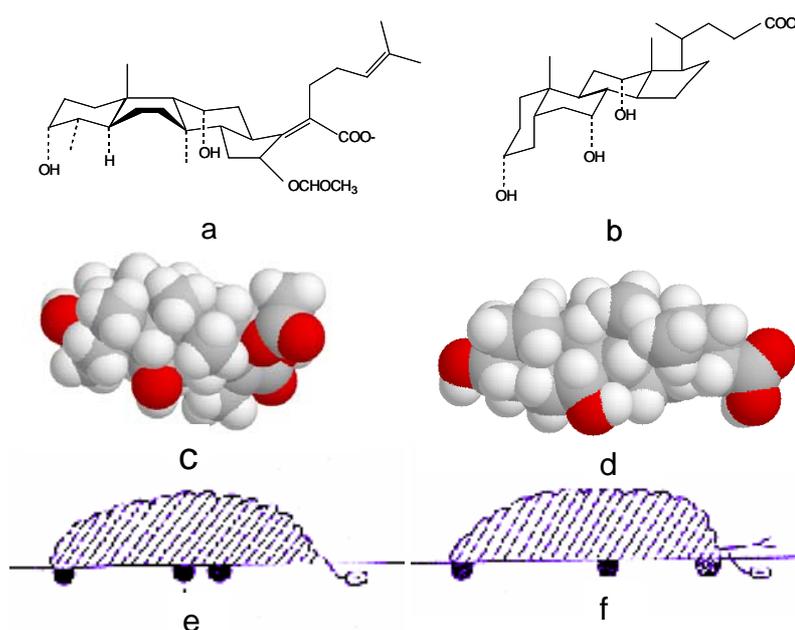
Foi isolado a partir de culturas de *Fusidium coccineum* e sua atividade antimicrobiana está indicada para a maioria dos patógenos mais comuns existentes na pele, incluindo *Staphylococcus aureus*, contra o qual é um dos antibióticos mais potentes.<sup>119</sup>



**Figura 1.9** - Estrutura do fusidato de sódio

Quimicamente pertence ao grupo de triterpenos tetracíclicos e como esteróide da família dos fusidanos, representam uma classe de compostos anfifílicos solúveis, os quais apresentam similaridade estrutural com os sais biliares.<sup>120</sup> Uma comparação da estrutura do fusidato com o colato de sódio (NaC) por exemplo, mostra a semelhança estrutural, porém

com uma estereoquímica diferente. A Figura 1.10 mostra a analogia existente entre o fusidato (Fus) e o colato de sódio (NaC), em termos de fórmula estrutural (**a e b**), modelo espacial (**c e d**), e representação das moléculas numa interface ar-água ou óleo-água (**e e f**). Há que se destacar, que suas propriedades em solução aquosa são comparáveis aos dos sais biliares. É o caso da propriedade de solubilização das soluções de fusidato de sódio com lecitina e monoleína como micelas mistas, comparadas à capacidade de solubilização dos sais biliares para estes mesmos lipídios.<sup>121, 122</sup>



**Figura 1.10** - Íons fusidato e colato: a (Fus) e b (NaC), fórmulas estruturais; c (Fus) e d (NaC), modelos espaciais com posição dos grupos polares na cor vermelha; e (Fus) e f (NaC), interface ar-água ou óleo-água. (Carey, 1971).

Entre os efeitos do fusidato de sódio, cabe mencionar: i) **potencializador de absorção**, em que o taurodihidrofusidato de sódio mostra-se eficaz e seguro na potencialização da absorção intranasal da insulina;<sup>123</sup> ii) **ação bacteriostática**, com atividade dirigida aos *Staphylococcus* e algumas espécies anaeróbicas gram-negativas. Mostra atividade “*in vitro*” contra *Neisseria sp* e *Bordetella pertussis*;<sup>124</sup> iii) **dermatologia**, sendo indicada para a maioria dos patógenos mais comuns da pele, incluindo *Staphylococcus aureus*. É utilizado no tratamento de infecções da pele, como nos casos de impetigo, foliculite, furunculoses e abscessos. É recomendável como alternativa de tratamento para a acne tipo “fulminans”, caracterizada por lesões inflamatórias e dolorosas. Seu elevado grau de

penetração similar ao dos esteróides, garante uma alta concentração do fármaco no local da infecção; <sup>125</sup> iv) **propriedades imunossupressoras** similares às ciclosporinas, sendo de grande utilidade em pacientes com enfermidade de “Crohn”, cujo tratamento convencional não é efetivo; <sup>126</sup> v) **outras ações**, como no tratamento da colite causada por *Clostridium difficile* e infecções estafilocócicas em pacientes portadores de fibrose cística. <sup>127</sup>

Normalmente o ácido fusídico é bem tolerado e apresenta poucos efeitos secundários graves. Em estudos mais recentes com pequenos grupos de pacientes, foram verificados que os principais estavam relacionados com transtornos do trato gastrointestinal, diarreia e dor de cabeça. Casos relacionados com hepatotoxicidade foram publicados a partir de 1972. Raramente são verificados efeitos secundários relacionados com granulocitopenia, trombocitopenia e espasmos venosos. <sup>14</sup>

### 1.2.3 - Helvolato de potássio

O ácido helvólico (**ácido 6 $\alpha$ , 16 $\beta$ -diacetoxifusida-1-en-3,7-diona-17(20)-[16,21-cis],24-dien-21-óico**) (Figura 1.11), apresenta uma estrutura semelhante ao ácido fusídico. Pertence também ao grupo dos fusidanos. Em sua forma ácida é ligeiramente solúvel em água, metanol e etanol, sendo mais solúvel em clorofórmio, acetato de etila, acetona e piridina. Apresenta absorção máxima em etanol em 231nm ( $\log \epsilon = 4,24$ ) sendo  $\epsilon$  a absorvidade molar. <sup>128</sup> Como faz parte do grupo dos fusidanos, apresentará propriedades de agregação similares às moléculas pertencentes a este grupo como o fusidato de sódio e também a dos sais biliares.

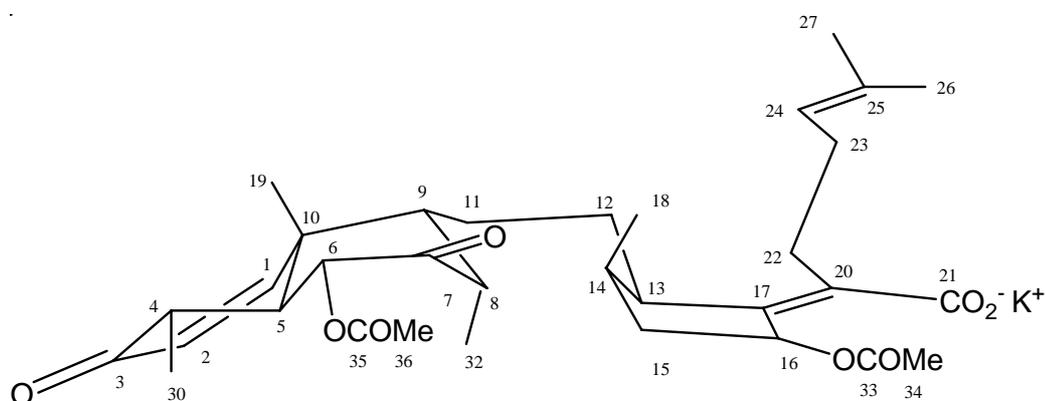
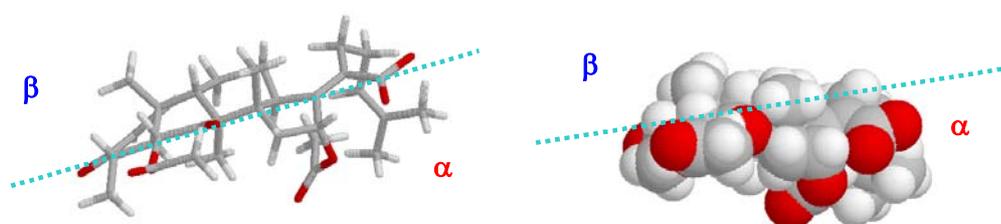


Figura 1.11 - Estrutura do helvolato de potássio.

É produzido a partir do *Aspergillus fumigatus* e de cultivo de *Cephalosporium caerulens*.<sup>129</sup> Okuda et al.<sup>130</sup> estudaram a estrutura do ácido helvólico a partir de ensaios químicos e espectroscópicos, propondo o mesmo esqueleto que o do ácido fusídico. Produzido de forma aeróbia em cultivos de *Acrocyldrium oryzae*,<sup>131</sup> foi possível a introdução de funções oxigenadas no esqueleto dos fusidanos.

O helvolato de potássio pertence também ao grupo dos triterpenos tetracíclicos, o que confere similaridade estrutural com os sais biliares, da mesma forma que o fusidato de sódio. No caso do helvolato de potássio (Figura 1.12), não se tem tanta diferença de polaridade entre as duas regiões, devido à existência em solução de diferentes epímeros nas posições 6 e 16, já que os ésteres podem estar tanto na face  $\alpha$  como na  $\beta$ , enquanto que os grupos cetona e ácido sempre se encontram na face  $\alpha$  da molécula.



**Figura 1.12** - Modelos espaciais da molécula de helvolato de potássio com todos os grupos polares direcionados à face  $\alpha$

Trata-se de um metabólito microbiano com atividade antibiótica contra as bactérias gram-positivas, o qual inibe a síntese de proteínas nas células procarióticas.<sup>118</sup> Vários experimentos demonstraram que o ácido helvólico é um novo inibidor de acidificação de lisossomas e endossomas, sendo o primeiro composto esteroideo com esta ação. Esta atividade pode explicar sua habilidade em inibir o metabolismo do colesterol LDL oxidado em células do macrófago J774. Portanto, este ácido pode ser uma ferramenta útil para a busca de mecanismos bioquímicos do colesterol e outros metabolismos celulares.<sup>117</sup>

Estudos demonstraram os efeitos tóxicos apresentados pelo ácido helvólico na semeadura de gramíneas com retardamento no crescimento,<sup>15</sup> bem como ação inibitória do epitélio ciliar respiratório humano.<sup>16</sup>

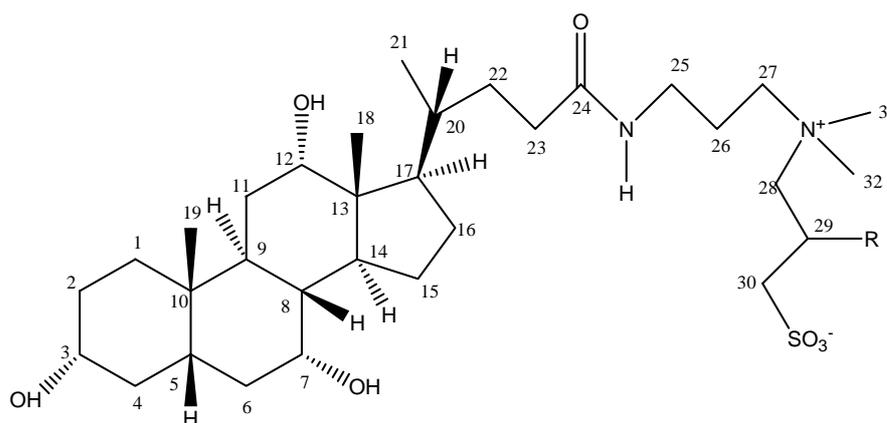
A aplicação do ácido helvólico na área dermatológica foi mencionada por Freeman,<sup>132</sup> onde faz referência a atividade desta substância contra patógenos mais comuns da pele (*Staphylococcus* e *Bacillus anthracis*). Também são citadas atividades nas infecções oculares e de ouvido produzidas pelo patógeno *Proteus vulgaris* e nas infecções produzidas pela *Escherichia coli* presentes no trato urinário.

#### 1.2.4 - CHAPS e CHAPSO

CHAPS (1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]) e CHAPSO (29-hidroxi derivado) (Figura 1.13), são derivados zwiteriônicos dos sais biliares. São compostos cuja estrutura lhes confere ação detergente comparável aos sais biliares devido a mesma topologia hidrófoba/hidrofílica. Estes surfactantes têm sido amplamente utilizados em estudos biológicos, como no caso da solubilização e reconstituição de proteínas em membranas.<sup>133- 135</sup>

CHAPS foi designado em princípios dos anos oitenta, para a purificação de proteínas de membrana.<sup>134</sup> Na cromatografia tem sido utilizado como agente eluente para melhorar a seletividade ou mesmo evitar a adsorção nos materiais de coluna.<sup>136, 137</sup> A micelização do CHAPS talvez seja a característica do tensoativo mais estudada, em que a cmc tem sido avaliada através de diferentes técnicas e em amplo intervalo de condições experimentais.<sup>138-</sup>

144



**Figura 1.13** - Estrutura do CHAPS (R=H) e CHAPSO (R=OH).

Estudos realizados com relação a algumas das características físico-químicas destas substâncias, envolvendo propriedades de adsorção e formação de micelas são de importância considerável quando se refere à ação dos fármacos, uma vez que os requisitos estruturais para a atividade superficial e formação de micelas são, muitas vezes, similares àqueles relacionados com a interação de um determinado princípio ativo com seus sítios receptores, proteínas séricas ou mesmo componentes da própria membrana.<sup>145</sup>

CHAPS e CHAPSO, assim como os esteróides da família dos antibióticos fusidanos, ácidos fusídico e helvólico, representam uma classe de substâncias solúveis anfifílicas, os quais são estruturalmente análogos aos sais biliares, biodetergentes presentes nos vertebrados.<sup>120</sup>

A similaridade estrutural destes compostos com sais biliares, sugerem um merecedor trabalho de pesquisa como modelos para uma ação detergente, nos casos de síndrome de deficiência de sais biliares e possível reposição.<sup>146-148</sup>

## 2 - JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Considerando as justificativas apresentadas para estudo de complexos de inclusão, entre as quais:

- 1) Os problemas de solubilidade e instabilidade em água apresentados pelo furoato de diloxanida.
- 2) Efeitos secundários apresentados pelo ácido fusídico relacionados com transtornos do trato gastrointestinal.
- 3) Efeitos tóxicos apresentados pelo ácido helvólico no retardamento do crescimento de gramíneas, assim como ação inibitória do epitélio ciliar respiratório humano.
- 4) Características estruturais apresentadas pelos quatro esteróides, os quais permitem classificá-los como ótimos sistemas para realização de uma análise global dos deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .
- 5) Busca por novos hóspedes ditópicos a fim de obter-se complexos com  $\beta$ -CD mais estáveis que com os sais biliares.
- 6) Estudo de novos sistemas esteróides/ciclodextrina, os quais sirvam de modelo para a resolução de sistemas complexos em que coexistem mais de uma estequiometria.

Conduzem aos objetivos gerais deste trabalho:

- Estudar o fenômeno de inclusão do furoato de diloxanida, através dos métodos cinético e de solubilidade, assim como através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e fluorescência.
- Estudar o fenômeno de inclusão das substâncias com estruturas esteroidais: fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ).

A partir dos objetivos gerais, tem-se como objetivos específicos:

- Estudar a reação de hidrólise do furoato de diloxanida (FD) em meio básico e na presença de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e  $\beta$ -ciclodextrina sulfatada.
- Determinar a constante de associação ou estabilidade do complexo FD/ $\beta$ -CD através dos métodos cinético e de solubilidade.
- Avaliar o fenômeno de inclusão do complexo FD/ $\beta$ -CD através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e de fluorescência.
- Caracterizar as estruturas de: fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO através das técnicas de RMN monodimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT) e bidimensionais (NOESY, ROESY, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , J-resolvida).
- Determinar a estequiometria dos complexos através das técnicas de RMN monodimensionais e do método das variações contínuas ou método de Job, para os complexos fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO em  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD.
- Determinar as constantes de estabilidade ou formação dos complexos de inclusão: fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO em  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, com os dados obtidos a partir das técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (mono e bidimensionais).
- Elucidar a estrutura dos complexos de inclusão fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO em  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, através da técnica de RMN bidimensional ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

### 3 - MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Entre as várias técnicas para determinar a constante de equilíbrio de formação do complexo, também denominada de constante de estabilidade, associação ou de formação, será dada ênfase neste item, aos métodos por diagrama ou isoterma de solubilidade, ressonância magnética nuclear (RMN) e método cinético.

#### 3.1 - Diagrama ou isoterma de solubilidade

A maioria dos estudos relacionados com o cálculo da constante de formação, se baseia na determinação das mudanças que ocorrem na solubilidade do substrato quando na presença de diferentes concentrações de ciclodextrina. Mediante este procedimento, é possível determinar a formação do complexo de inclusão, tipo de complexo e calcular sua constante.

Os diagramas de solubilidade foram propostos por Higuchi e Connors.<sup>149</sup> É construído, representando graficamente a solubilidade da molécula hóspede (substrato), no eixo vertical, com relação à concentração da molécula hospedeira (ciclodextrina), no eixo horizontal (Figura 3.1).

A solubilidade total aparente do substrato hóspede ( $S_t$ ) aumenta linearmente devido a formação do complexo de inclusão solúvel. No entanto, no ponto **A**, a solubilidade do complexo alcança seu limite. A  $S_t$  da molécula hóspede é constante entre os pontos **A** e **B**, já que os três equilíbrios apresentados no esquema 3.1, se mantêm inalterados nesta região. Depois do ponto **B**, uma vez que se consumiu todo o substrato sólido, com a adição de maior quantidade de ciclodextrina, ocorre diminuição da concentração do substrato não complexado em solução, por formação do complexo e precipitação concomitante de complexo insolúvel. Isto se traduz em uma diminuição da solubilidade até um valor constante que corresponde a solubilidade inerente do complexo de inclusão ( $S_c$ ).

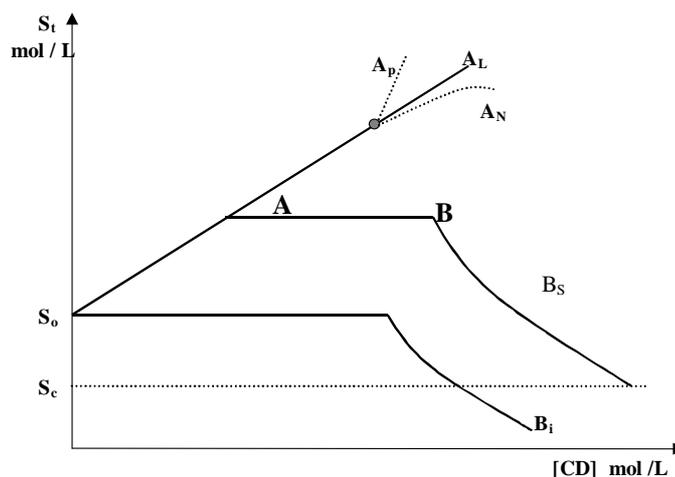
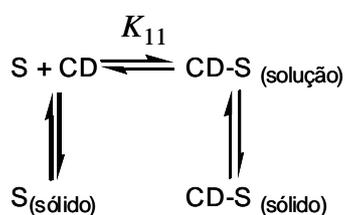


Figura 3.1 - Tipos de diagrama de solubilidade.



Esquema 3.1 - Equilíbrios sólido-líquido para a formação de um complexo de inclusão.

Estes autores propuseram então, a existência de dois tipos de perfís (diagramas do tipo A e B), nos quais poderão haver certas modificações.

- **Tipo A:** quando se forma um complexo de inclusão solúvel.
- **Tipo B:** quando se forma um complexo com solubilidade definida.

**Diagramas do tipo A:** estes indicam a formação de complexos solúveis a qualquer concentração de agente complexante, apresentando os distintos comportamentos:

1. **Tipo A<sub>L</sub>:** mostra uma dependência linear da solubilidade total do substrato ( $S_t$ ) com a concentração de ciclodextrina (CD), obtendo-se assim complexos de primeira ordem com relação a concentração de ciclodextrina.

2. **Tipo A<sub>P</sub>**: apresentam um desvio positivo da linearidade a concentrações elevadas de ciclodextrina e correspondem a formação de complexos de maior ordem molecular.
3. **Tipo A<sub>N</sub>**: se distingue através de um desvio negativo da linearidade a concentrações elevadas de ciclodextrinas, é um dos sistemas que menos frequentemente são observados na prática e sua ocorrência pode ser explicada devido a interações complexas soluto-soluto e soluto-solvente.

**Diagramas do tipo B:** indicam a formação de complexos de inclusão com solubilidade limitada e bem definida:

1. **Tipo B<sub>S</sub>**: pode-se diferenciar nitidamente três fases, primeiramente um aumento linear da solubilidade, relacionado com a formação do complexo. Em uma segunda etapa, se observa um platô, que corresponde a máxima solubilidade e finaliza quando o substrato que se encontra no estado sólido é consumido. A fase descendente corresponde a diminuição de todo substrato não complexado em solução, por formação de complexo de inclusão insolúvel.
2. **Tipo B<sub>i</sub>**: é interpretado da mesma forma, com a diferença de que o complexo que se forma é tão insolúvel que o aumento inicial na solubilidade do substrato não é detectável.

A partir dos diagramas de solubilidade, pode-se calcular a constante de estabilidade ou de formação do complexo de inclusão, tomando-se como critério a etapa inicial ascendente do gráfico.

Supondo o caso mais simples e freqüente, que é a obtenção de compostos de inclusão com uma relação molar 1:1, pode-se propor o esquema 3.1.

Considera-se S o substrato ou também denominado por H (hóspede), CD a ciclodextrina e CD-S ou C o complexo de inclusão.

Fazendo-se o balanço de massas, tem-se as equações (3.1) e (3.2);

$$[CD]_o = [CD] + [C] \quad (3.1)$$

$$[S]_{dis} = [S] + [C] \quad (3.2)$$

e portanto,

$$K_{11} = \frac{[C]}{[CD][S]} \quad (3.3)$$

Analisando o comportamento linear da  $[S]_{dis}$ , com relação a variação da  $[CD]$ , nos diagramas de solubilidade, tem-se a equação (3.4);

$$[S]_{dis} = a + b[CD]_o \quad (3.4)$$

onde  $a = S_o$  e  $S_o$  = concentração do substrato em água e  $b$  = inclinação da curva

Substituindo a equação (3.2) na (3.4) e considerando  $a = S_o$  tem-se a equação (3.5):

$$[C] = S_o + b[CD]_o - [S] \quad (3.5)$$

Supondo que a  $[S]$  se mantém constante, devido ao excesso de substrato no estado sólido, então  $[S] = S_o$  e obtém-se a equação (3.6):

$$[C] = b[CD]_o \quad (3.6)$$

Substituindo (3.6), (3.1) e (3.5) em (3.3), finalmente obtém-se a equação (3.7):

$$K_{11} = \frac{b}{S_o(1-b)} \quad (3.7)$$

$S_o$  representa o limite de solubilidade do substrato e a inclinação é obtida da parte linear do gráfico.

No caso de que os complexos de inclusão apresentam um diagrama com um perfil  $B_S$ , a estequiometria do complexo pode ser calculada a partir do platô, mediante a resolução da equação (3.8):

$$\text{Razão molar} = \frac{S_T - S_A}{CD_{(A-B)}} \quad (3.8)$$

onde,  $S_T$  corresponde ao substrato total adicionado ao sistema,  $S_A$  a quantidade de substrato em solução no ponto A e  $CD_{(A-B)}$  a quantidade de ciclodextrina correspondente a região do platô. A estequiometria assim calculada pode ser comparada e confirmada com a

obtida através de outras técnicas, como espectroscopia UV-Vis, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e fluorescência.<sup>26, 110</sup>

### 3.2 - Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta instrumental bastante poderosa já que: i) mediante experimentos ROE, permite a detecção das interações espaciais existentes entre os prótons do hóspede e hospedeiro, levando à determinação da estrutura do complexo formado com suficiente precisão das regiões do hóspede e hospedeiro envolvidos no processo; ii) através da análise dos deslocamentos químicos dos sinais dos espectros monodimensionais de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , permite determinar as constantes de associação e estequiometria dos complexos das ciclodextrinas com diferentes hóspedes; iii) através do assinalamento completo dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das moléculas hóspedes, permite determinar sua estrutura. Este assinalamento foi possível, graças à realização dos espectros monodimensionais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 45, 90 e 135, assim como espectros bidimensionais de correlações homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e NOE. Tratando-se de experimentos de uso rotineiro e não tendo sido realizado nenhum tratamento específico dos dados, não serão abordados aspectos e fundamentos teóricos destes processos acima mencionados.

Já no caso dos experimentos ROE, estes são considerados de relevância na determinação da estrutura do complexo, o que implica em uma maior reflexão destes espectros bidimensionais.

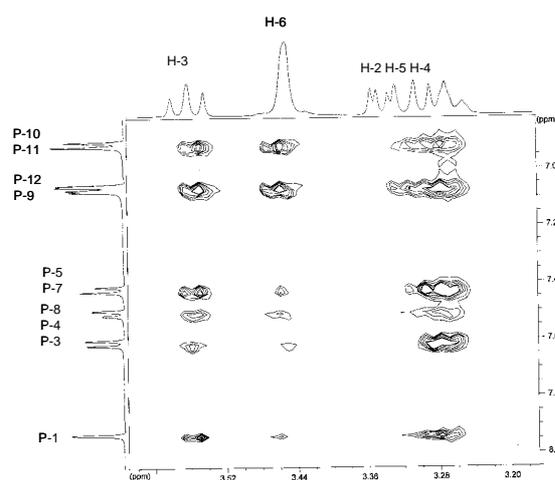
#### 3.2.1 - RMN na determinação da estrutura do complexo

##### *Efeito Nuclear de Overhauser (NOE)*

Baseia-se na relaxação nuclear via interação dipolar através do espaço de espécies homo ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) ou heteronucleares ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) na mesma ou em diferentes moléculas. Várias interações intra e intermoleculares são consideradas como sistemas de contribuição a estes mecanismos de relaxação, entre as quais as dipolares. Na relaxação dipolar, o regresso ao estado fundamental se dá através de interações dipolares entre núcleos que se encontram a

uma distância de até 4 Å. Destas interações pode-se obter conclusões referentes à conformação de uma dada espécie ou entre diferentes moléculas.<sup>150, 151</sup> Experimentos NOE tornam-se impróprios para moléculas com massas moleculares intermédias (entre 1000 e 3000). No caso dos complexos de inclusão em ciclodextrinas, com massa molecular situada na faixa de 1500-2000, recorre-se aos experimentos ROE como alternativa de elucidação estrutural.<sup>152</sup>

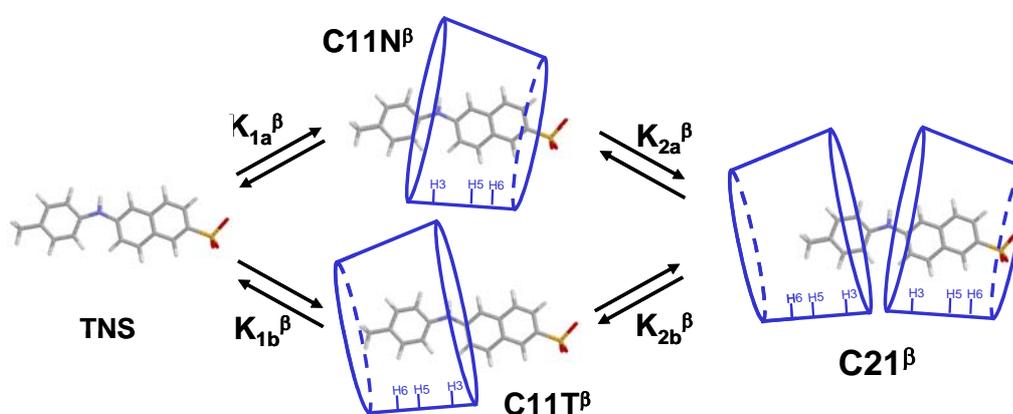
O experimento ROE permite a determinação das interações dos hidrogênios da ciclodextrina que se encontram em direção ao interior, com os do hóspede incluídos dentro da cavidade. A informação obtida a partir do espectro revela qual a estrutura do complexo formada. Na Figura 3.2, se pode observar uma secção de um espectro ROESY realizado para o complexo ácido 6-(p-toluidin) naftalen-2-sulfônico (TNS):  $\beta$ -CD em D<sub>2</sub>O.<sup>153</sup>



**Figura 3.2** - Espectro ROE do complexo ácido 6-(p-toluidin) naftalen-2-sulfônico (TNS):  $\beta$ -CD em D<sub>2</sub>O.

Em cada eixo é representado o espectro de RMN monodimensional do complexo. A partir da análise das interações intermoleculares entre os hidrogênios H-3, H-5 e H-6 da  $\beta$ -CD com os pertencentes aos grupos toluidino e naftalensulfonato do TNS (considerando a concentração do complexo 2:1 desprezível), se deduz que existem dois tipos diferentes de complexos 1:1. Um deles é formado pela inclusão do grupo toluidino no interior da ciclodextrina (interações dos hidrogênios H-3, H-5 e H-6 da  $\beta$ -CD com os P-10 ao P-14 do TNS), enquanto que o outro implica na complexação do grupo naftalensulfonato (interações dos H-3, H-5 e H-6 da  $\beta$ -CD com os P-1 ao P-8 do TNS). Das interações consideradas fortes

entre o H-3 com os hidrogênios P-5 e P-7 e P-10, P-11, P-13 e P-14, é possível concluir que a inclusão em ambos os casos, ocorre através da face secundária da ciclodextrina. O grupo naftalensulfonato se encontra totalmente complexado no interior da ciclodextrina (interações do H-6/P-1), com o grupo sulfonato estando na parte externa da cavidade, possivelmente formando pontes de hidrogênio com as hidroxilas primárias. Por outro lado, o grupo toluidino se encontra totalmente complexado no interior da ciclodextrina (interações fortes e médias do H-3 e H-5 com todos os hidrogênios do anel aromático e interação fraca do H-6 com o grupo metila). A partir destas interações, Alvarez Parrilla et al.,<sup>153</sup> propuseram a estrutura representada na Figura 3.3 .



**Figura 3.3** - Representação esquemática da formação dos complexos 1:1 e 2:1 para o sistema  $\beta$ -CD: TNS, deduzido a partir do experimento ROESY.

### 3.2.2 - Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear no estudo de Processos de Inclusão: estequiometria e constantes de associação.

Considerando o processo de formação de um complexo de inclusão entre uma molécula hóspede (substrato) e  $n$  unidades de ciclodextrina;



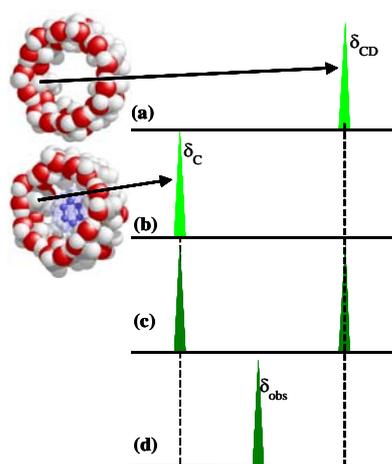
em que  $C_n$  é o complexo formado. O processo é caracterizado por uma constante de equilíbrio  $K_n$ , representada pela equação (3.10):

$$K_n = \frac{[C_n]}{[H][CD]^n} \quad (3.10)$$

É possível encontrar uma relação entre a composição de equilíbrio descrita pelas equações (3.9) e (3.10) e o deslocamento químico de alguns dos núcleos atômicos da molécula da ciclodextrina ou do hóspede.

Durante o processo de complexação, os átomos situados em direção ao interior da cavidade da ciclodextrina vão sofrer uma mudança considerável em torno de seu ambiente, causado basicamente pela saída de moléculas de água e entrada de uma molécula de caráter apolar. O mesmo vai suceder com os núcleos da molécula hóspede que vão ser incluídos no interior da ciclodextrina, passando de um meio polar (solução) para um de caráter apolar (cavidade da ciclodextrina). Portanto, os sinais de RMN tanto da ciclodextrina como da molécula hóspede, terão uma variação de deslocamento químico, por estarem envolvidos no processo de complexação.<sup>154</sup>

A variação de deslocamento químico dos diferentes núcleos nos espectros de RMN, é observada de forma distinta em função da velocidade com que ocorre o processo de complexação quando comparado com a escala de tempo de RMN. Assim, as possíveis situações observadas em RMN para o processo de complexação em ciclodextrina estão representadas na Figura 3.4:<sup>154</sup>



**Figura 3.4** - Sinais observados em RMN.

- (a) Sinal característico de um determinado núcleo de ciclodextrina livre.
- (b) Sinal característico deste mesmo núcleo complexado.
- (c) Espectro observado sob regime de intercâmbio lento.
- (d) Espectro observado sob regime de intercâmbio rápido

Se o processo está sob regime de intercâmbio rápido (caso d), o processo de entrada e saída da molécula hóspede é bastante rápida em comparação com a escala de tempo de RMN. Portanto, somente se detecta um único sinal, cuja posição é um ponto médio das espécies presentes, ciclodextrina livre e complexada.<sup>110</sup>

Assim, a posição de um sinal observada experimentalmente ( $\delta_{obs}$ ) será dada pela equação (3.11),<sup>110</sup>

$$\delta_{obs} = f_{CD}\delta_{CD} + nf_c\delta_c \quad (3.11)$$

onde  $f_{CD}$  e  $f_c$  representam as frações de ciclodextrina livre e complexada e ambos os termos satisfazem a condição,

$$f_{CD} + nf_c = 1 \quad (3.12)$$

Não é frequente utilizar valores absolutos de deslocamento químico ( $\delta_{obs}$ ), mas a variação observada para a posição do sinal com relação a ciclodextrina livre ( $\delta_{CD}$ ). Assim, substituindo a equação (3.12) na (3.11) e reordenando, obtém-se como resultado a equação (3.13):

$$\Delta\delta_{obs} = nf_c\Delta\delta_{max} = \frac{n[C_n]}{[CD]_o}\Delta\delta_{max} \quad (3.13)$$

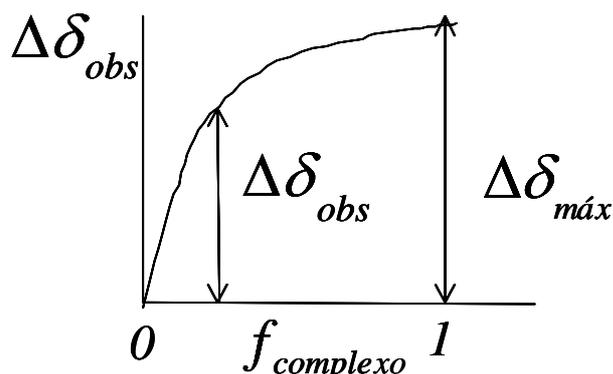
considerando que

$$\Delta\delta_{obs} = \delta_{obs} - \delta_{CD} \quad (3.14)$$

e

$$\Delta\delta_{max} = \delta_c - \delta_{CD} \quad (3.15)$$

Da equação (3.13) se pode obter informações referentes à composição de equilíbrio do sistema. Ao aumentar a fração de ciclodextrina complexada obtém-se um aumento linear no valor do deslocamento químico observado. Quando a ciclodextrina estiver saturada,  $\Delta\delta_{obs}$  alcança seu valor máximo (Figura 3.5).



**Figura 3.5** - Variação do deslocamento químico de um determinado núcleo da ciclodextrina em função da fração complexada

#### *Determinação da estequiometria do complexo de inclusão. Método de Job*

O método das variações contínuas ou método de Job<sup>17, 155, 156</sup> é válida para qualquer técnica experimental em que se mede uma magnitude diretamente proporcional a concentração do complexo formado. Se baseia no fato de que qualquer função que dependa diretamente da concentração do complexo, apresenta um máximo com relação a fração molar de um dos componentes que formam este complexo. Da posição de seu máximo pode-se obter o coeficiente estequiométrico. Do ponto de vista experimental, consiste em realizar uma série de experimentos em que se varia a relação molar de ciclodextrina e de hóspede, porém a quantidade total de moles é mantida constante (M), isto é,

$$[CD]_o + [H]_o = M \quad (3.16)$$

A forma de satisfazer esta condição, é misturando diferentes volumes de duas soluções de concentrações idênticas (uma de ciclodextrina e outra de hóspede), mantendo-se constante o volume total de amostra. É recomendável que a relação entre os moles de cada um dos componentes varie de zero a um (0 a 1) com intervalos pequenos, onde se obterá os espectros de RMN de cada uma destas soluções, identificando em cada um a posição do sinal pertencente a um determinado núcleo da ciclodextrina ou hóspede.<sup>155</sup>

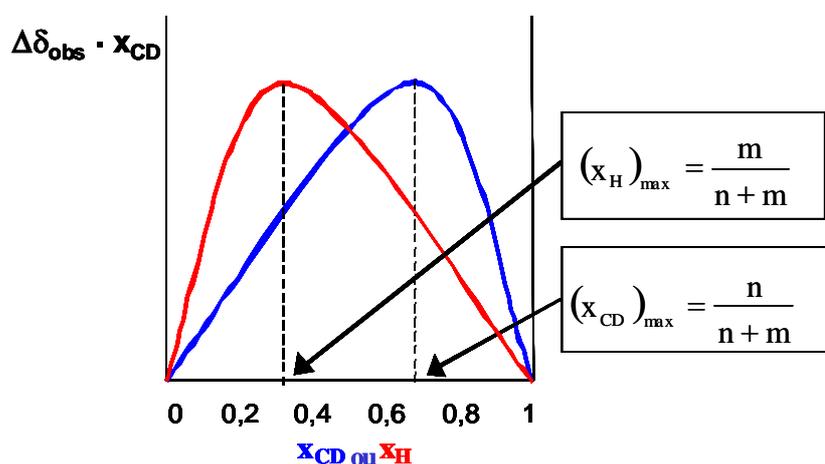
A partir da equação de equilíbrio geral de formação de complexos de inclusão entre m moléculas hóspede e n moléculas de ciclodextrina, conforme equação (1.2), onde  $C_n$  ou  $C_{nm}$  representa o complexo, e considerando que em RMN sob regime de intercâmbio rápido, existe uma relação entre o deslocamento químico observado para um determinado núcleo e a fração

de ciclodextrina complexada em solução conforme a equação (3.13), uma vez que se mantém constante a quantidade total de ciclodextrina e hóspede, multiplicam-se ambos os termos da equação (3.13) pela relação molar ( $RM_{CD}$ ) ou fração molar ( $X_{CD}$ ) de ciclodextrina (CD) ( $X_{CD} = n_{CD}/(n_{CD} + n_H)$ ). Desta maneira, obtém-se as equações (3.17) e (3.18), onde são expressas as frações molares de ciclodextrina e hóspede no máximo,

$$(X_{CD})_{\max} = \frac{[CD]_{\max}}{[CD]_{\max} + [H]_{\max}} = \frac{1}{1 + \frac{m}{n}} = \frac{n}{n + m} \quad (3.17)$$

$$(X_H)_{\max} = \frac{[H]_{\max}}{[CD]_{\max} + [H]_{\max}} = \frac{\frac{m}{n}}{1 + \frac{m}{n}} = \frac{m}{n + m} \quad (3.18)$$

Desta forma, fica demonstrado que uma representação da função considerada ( $X_{CD} \cdot \Delta\delta_{\text{obs}}$ ) com relação a fração molar de ciclodextrina ( $X_{CD}$ ) ou de hóspede ( $X_H$ ) apresentará um máximo que é obtido pelas expressões (3.17) ou (3.18) respectivamente, de acordo com a Figura 3.6 e a Tabela 3.1.



**Figura 3.6** - Representação de Job para um complexo 1:1 em função da fração molar de ciclodextrina ou de hóspede.

Assim, a partir de uma série de soluções em que se varia a fração molar dos componentes que formam o complexo de inclusão, pode-se obter a estequiometria do mesmo.

155

**Tabela 3.1** - Posição do máximo de Job para alguns complexos de inclusão.

complexo	n	m	$(X_{CD})_{max}$	$(X_H)_{max}$
$CD_1H_1$	1	1	0,5	0,5
$CD_2H_1$	2	1	0,67	0,33
$CD_1H_2$	1	2	0,33	0,67
$CD_2H_2$	2	2	0,5	0,5

Apesar da grande importância na determinação da estequiometria para estudos dos complexos de inclusão, o método de Job apresenta algumas limitações. Entre estas podem ser citadas:

1. Não se obtém valores absolutos, mas uma relação n/m. Desta forma, complexos com estequiometria 1:1, 2:2, 3:3 (ou 1:2, 2:4, 3:6, etc) apresentam o máximo na mesma posição.
2. Somente se estabelece a existência de um único tipo de complexo sem verificar a coexistência em solução de outros tipos. Por exemplo, para um sistema que apresenta estequiometria 1: 2, primeiro se formará um complexo 1:1 e posteriormente o complexo 1: 2 e sempre existirá uma fração de ambos em solução.
3. O método vai perdendo sensibilidade à medida que aumenta a relação dos coeficientes estequiométricos, de tal forma que para relações n:m superiores a 1:3, torna-se difícil determinar com exatidão a posição do máximo da curva.
4. Se a interação entre a ciclodextrina e a molécula hóspede apresenta uma constante de equilíbrio pequena (caráter fraco), a curva apresentará um máximo pouco definido.

#### *Determinação da constante de estabilidade do complexo.*

Os diferentes métodos utilizados para a determinação da constante de estabilidade, se baseiam na relação que existe entre a concentração do complexo no equilíbrio e a variação observada para o deslocamento químico dos núcleos da ciclodextrina ou do hóspede.<sup>17, 20, 21,</sup>

110, 157, 158, 159

### Complexos de estequiometria 1:1

A equação que descreve a posição do sinal observado em RMN para um determinado núcleo de ciclodextrina sob um regime de intercâmbio rápido em uma estequiometria do tipo 1:1, cujo equilíbrio é descrito na equação (3.19) é,



$$\Delta\delta_{obs} = \left( \frac{\Delta\delta_{max}}{2[CD]_0} \right) \left( \frac{1}{K} + [CD]_0 + [H]_0 - \sqrt{\left( \frac{1}{K} + [CD]_0 + [H]_0 \right)^2 - 4[CD]_0[H]_0} \right) \quad (3.20)$$

Para obter o valor da constante de associação, se realiza um ajuste não linear global em um programa “Origin 6.0”, considerando a concentração do hóspede e de ciclodextrina de cada experimento como variáveis independentes e os deslocamentos no espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN dos núcleos de cada série ( $\Delta\delta_{obs}$ ) como variáveis dependentes. A equação (3.20) é aplicada ao programa “Origin 6.0”, somando ao segundo termo um parâmetro  $\Delta\delta_{offset}$ , que leva em consideração a determinação do valor de  $\delta_{CD}$ .

### Complexos de estequiometria 1: 2

No caso de que uma molécula hóspede seja complexada por duas unidades de ciclodextrina, deve-se estabelecer dois processos de equilíbrio sucessivos,



e as constantes de equilíbrio são fornecidas pelas expressões,

$$K_{11} = \frac{[C_{11}]}{[H][CD]} \quad (3.23)$$

$$K_{12} = \frac{[C_{12}]}{[C_{11}][CD]} \quad (3.24)$$

A ciclodextrina está presente em solução nas três diferentes espécies: sem complexar (CD), complexo de estequiometria 1:1 ( $C_{11}$ ) e complexo de estequiometria 1:2 ( $C_{12}$ ). Nestas condições e sob um regime de intercâmbio rápido, a posição que apresentará o sinal de um determinado núcleo da ciclodextrina em um espectro de RMN é fornecida pela equação (3.25);

$$\delta_{obs} = f_{CD}\delta_{CD} + f_{C_{11}}\delta_{C_{11}} + 2f_{C_{12}}\delta_{C_{12}} \quad (3.25)$$

que pode ser transformada em,

$$\Delta\delta_{obs} = f_{C_{11}}\Delta\delta_{max1} + 2f_{C_{12}}\Delta\delta_{max2} \quad (3.26)$$

onde  $f_{C_{11}}$  e  $f_{C_{12}}$  representam a fração de complexos 1:1 e 1:2 respectivamente e  $\Delta\delta_{max1}$  e  $\Delta\delta_{max2}$ , o deslocamento máximo que corresponde a cada um dos dois tipos de complexos.

Para calcular as concentrações de equilíbrio, estabelece-se em primeiro lugar os correspondentes balanços de massa para as espécies presentes em solução, que combinadas com as equações (3.23) e (3.24), obtém-se uma equação de terceiro grau que relaciona as constantes de associação com a concentração de ciclodextrina,

$$K_{11}K_{12}[CD]^3 + K_{11}\{2K_{12}[H]_0 - K_{12}[CD]_0 + 1\}[CD]^2 + \{K_{11}[H]_0 - K_{11}[CD]_0 + 1\}[CD] - [CD]_0 = 0 \quad (3.27)$$

Através de um programa matemático realizado no Origin 6.0, é possível encontrar uma solução a esta equação de terceiro grau. Uma vez conhecida a concentração de equilíbrio de ciclodextrina livre, é possível conhecer também a dos complexos  $C_{11}$  e  $C_{12}$  e conseqüentemente as frações dos complexos 1:1 ( $f_{C_{11}}$ ) e 1:2 ( $f_{C_{12}}$ ), as quais serão utilizadas na equação (3.26). Com os resultados dos experimentos em que se varia a concentração de ciclodextrina e/ou hóspede, realizando-se um ajuste por mínimos quadrados não linear, obtém-se os valores otimizados de  $K_{11}$ ,  $K_{12}$ ,  $\Delta\delta_{max1}$  e  $\Delta\delta_{max2}$  para cada um dos núcleos da molécula de ciclodextrina.<sup>160</sup>

### 3.3 - Método cinético

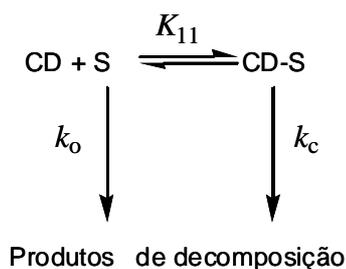
Em estudos de estabilidade, onde devem ser investigados os efeitos da concentração de ciclodextrina na velocidade de degradação de uma determinada substância, deve-se procurar realizar estudos cinéticos. Neste caso, a constante de estabilidade ou de formação do complexo, poderá ser determinada através dos efeitos de estabilização ou desestabilização, exercida pela molécula de ciclodextrina sobre o substrato.<sup>1, 2, 26, 110</sup>

A habilidade em estabilizar alguns e desestabilizar outros, tem sido explicada através das diferenças ocorridas na formação da estrutura do complexo. Pode haver aumento da velocidade de degradação do substrato, se a parte lábil da molécula se localizar próxima aos grupos hidroxilas da molécula de ciclodextrina. Se o substrato interagir mais profundamente dentro da cavidade, a parte lábil da molécula poderá estar protegida e resultará em sua estabilização.<sup>1, 2</sup>

Portanto, as ciclodextrinas poderão diminuir, acelerar ou não exercer nenhum efeito sobre a reatividade de uma determinada reação, podendo exibir um comportamento cinético comparável às reações enzimáticas, isto é, através da formação complexo-substrato, inibição competitiva, saturação e interação estereoespecífica.<sup>1, 2, 26, 27, 61</sup>

Devido a cinética de saturação, a constante de velocidade de primeira ordem observada para a reação ( $k_{obs}$ ), vai se aproximar de um valor máximo (catálise) ou mínimo (inibição), com o aumento da concentração de ciclodextrina.<sup>1, 2</sup>

A constante de velocidade de primeira ordem para a degradação do substrato (hóspede) na presença de ciclodextrina ( $k_c$ ) e a constante de estabilidade ou de formação, podem ser determinadas através de métodos análogos a análise de Michaelis-Menten, utilizados na cinética enzimática.<sup>161</sup> Os estudos cinéticos são normalmente feitos com soluções diluídas, supondo-se formação de complexos 1:1. Considerando o Esquema 3.2:



**Esquema 3.2** - Mecanismo cinético de hidrólise do furoato de diloxanida na presença e ausência de ciclodextrina (CD)

Onde:  $[\text{CD.S}]$  é a concentração do complexo 1:1 formado na reação entre ciclodextrina (CD) e substrato (S);  $k_o$  é a constante de velocidade para a reação não catalisada;  $k_c$  é a constante de velocidade da reação em presença de CD;  $K_{11}$  é a constante de estabilidade ou formação do complexo formado entre CD e S, considerando estequiometria 1:1.

No caso da constante de equilíbrio da equação (3.3), onde  $[\text{CD.S}]$  ou  $[C]$  é a concentração do complexo 1:1 e considerando,  $[\text{CD}]_o \gg [\text{S}]_o$ , então  $[\text{CD}_o] \cong [\text{CD}]$ . O balanço de matéria exige que,

$$[\text{S}]_o = [\text{S}] + [\text{C}] \quad (3.28)$$

Isolando  $[\text{S}]$  da equação de equilíbrio (3.3), tem-se:

$$[\text{S}] = \frac{[\text{C}]}{K_{11}[\text{CD}]} \quad (3.29)$$

Substituindo (3.29) em (3.28) e isolando  $[\text{C}]$  obtém-se,

$$[\text{C}] = \frac{K_{11}[\text{S}]_o[\text{CD}]}{1 + K_{11}[\text{CD}]} \quad (3.30)$$

A constante de velocidade de primeira ordem observada na degradação do substrato ( $k_{obs}$ ) é considerada a média das constantes  $k_o$  e  $k_c$ , onde:

$$\frac{d[\text{S}]_o}{dt} = k_{obs}[\text{S}]_o = k_o[\text{S}] + k_c[\text{C}] \quad (3.31)$$

Isolando  $[S]$  e  $[C]$  das equações (3.28)-(3.30), e substituindo-as em (3.31) obtém-se,

$$k_{obs} = \frac{k_c K_{11} [CD] + k_o}{1 + K_{11} [CD]} \quad (3.32)$$

E finalmente, rearranjando e considerando o inverso, de acordo com o método de Lineweaver-Burk,<sup>26</sup> chega-se a equação (3.33):

$$\frac{1}{k_o - k_{obs}} = \frac{1}{(k_o - k_c) K_{11} [CD]} + \frac{1}{k_o - k_c} \quad (3.33)$$

Na equação (3.33), assume-se que a  $[CD]$  é a concentração total no meio reacional, isto é, a ciclodextrina livre e na forma de complexo. Para isto ser justificado, esta concentração deve ser ao menos dez vezes maior que a do substrato. O valor de  $k_o$  é obtido quando nenhuma ciclodextrina está presente no meio reacional;  $k_{obs}$  é determinado a três ou quatro concentrações de ciclodextrina e os valores de  $k_c$  e  $K_{11}$  são calculados a partir da interseção e inclinação do gráfico  $1/(k_o - k_{obs})$  versus  $1/[CD]$ , que fornece uma linha reta (se a suposição do complexo de estequiometria 1:1 estiver correta). A baixas concentrações, a maioria dos complexos substrato-ciclodextrina são de estequiometria 1:1.<sup>1, 2, 31</sup>

Alguns trabalhos sugerem o método cinético como o mais aplicável para avaliação do valor de  $K_{11}$ , quando existem problemas de instabilidade química por parte do substrato (hóspede) e quando o valor de  $K_{11}$  não puder ser determinado de outra maneira.<sup>1, 48, 53</sup> No estudo do fármaco espironolactona, antagonista da aldosterona, a degradação foi devida ao uso da  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD e alguns derivados, sugerindo uma atividade catalítica das ciclodextrinas. Neste trabalho foi estudada a complexação da espironolactona (SP) em ciclodextrinas e o efeito do pH na reação de deacetilação catalisada por  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD),  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) e sulfobutileter- $\gamma$ -ciclodextrina (SBE- $\gamma$ -CD). Estes estudos foram realizados através de métodos cinéticos, diagrama de solubilidade e Ressonância Magnética Nuclear.<sup>53</sup> No estudo da estabilidade química dos fármacos melfalano e carmustina, dois agentes antineoplásicos bastante instáveis, foi verificado uma diminuição da velocidade de hidrólise de ambos os fármacos na presença de concentrações crescentes das ciclodextrinas estudadas. Os dois agentes antineoplásicos, melfalano e carmustina, foram avaliados do ponto de vista de

estabilidade e solubilidade, com o uso de derivados de ciclodextrinas, sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.<sup>48</sup>

Loftsson et al., estudaram o efeito das ciclodextrinas na solubilidade e estabilidade dos fármacos acetato de medroxiprogesterona e megestrol em solução aquosa. Dos resultados cinéticos obtidos a partir do estudo da reação de degradação, foi constatado que em presença dos derivados, hidroxipropil- $\beta$ -CD e metil  $\beta$ -CD, estes fármacos apresentavam uma melhora na sua estabilidade química.<sup>162</sup>

Doxorubicina e daunorubicina, drogas antineoplásicas usadas na quimioterapia do câncer, são instáveis em solução aquosa, podendo sofrer hidrólise, com perda da estabilidade e atividade. Bekers et al., estudaram o comportamento destas substâncias com relação às ciclodextrinas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -, observando que na região ácida, as velocidades de degradação de ambas as substâncias decresce na presença de  $\gamma$ -CD, enquanto que nenhum efeito foi observado em meio ácido e alcalino frente a  $\alpha$ - e  $\beta$ -CD. Acima de pH 4, a degradação da daunorubicina é acelerada através da  $\gamma$ -CD, enquanto que para a doxorubicina este efeito é observado somente em soluções fortemente alcalinas.<sup>163</sup>

A indometacina é um antiinflamatório não-esteroidal, com ação inibitória da biossíntese da prostaglandina (inibição da ciclooxigenase), e portanto com atividade analgésica, antipirética e antiinflamatória. É pouco solúvel em água e instável em solução aquosa. Esta substância foi estudada do ponto de vista da estabilidade, através do efeito da  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas, assim como os derivados hidroxipropil e hidroxietil-CD. Os autores verificaram que a velocidade de hidrólise de indometacina em solução alcalina é altamente suprimida por  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas, enquanto que em  $\alpha$ -ciclodextrina ocorre o oposto.<sup>50</sup>

Prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) é um potente agente terapêutico no tratamento da trombose e relaxamento da musculatura lisa vascular. Entretanto, este composto é hidrolisado facilmente em solução aquosa, com perda da atividade em poucos minutos. Na presença de ciclodextrinas, a velocidade de hidrólise da  $\text{PGI}_2$  diminuiu na ordem de  $\beta$ - >  $\alpha$  ->  $\gamma$ -CD. Esta afirmação é consistente com a magnitude da constante de estabilidade do complexo determinado cineticamente, indicando que a relação entre as moléculas hóspede e hospedeiro é importante na mudança de velocidade.<sup>49</sup>

No estudo da velocidade de hidrólise da benzocaína em solução aquosa, foi demonstrado que este fármaco interage com a  $\beta$ -CD para formar um complexo 1:1, levando a uma inibição de sua velocidade quando em meio alcalino. Similarmente, estudos da hidrólise de procaína, atropina, aspirina e fenilbutazona em solução aquosa, mostraram uma diminuição na velocidade na presença de  $\beta$ -CD. <sup>164</sup>

## 4 - PARTE EXPERIMENTAL

O furoato de diloxanida (FD) foi de procedência do Lab. Knoll S.A., o ácido helvólico procedente da Sigma, fusidato de sódio do Laboratório Leo Pharmaceutical Products e CHAPS e CHAPSO da ICN Biomedicals Inc.

As ciclodextrinas  $\beta$ - (doadas por Roquette, França) ,  $\gamma$ - (Wacker, Alemanha) e  $\beta$ -CD sulfatada (Cerestar, USA) eram de pureza 98%, o que não exigiam nenhum processo prévio de purificação para eliminação de impurezas. No entanto, quando necessário, estas eram submetidas a um processo de dupla recristalização em água com posterior secagem em estufa (Gallenkamp) aumentando gradualmente a temperatura de 40-200°C, até peso constante. Os pesos moleculares das ciclodextrinas para a  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\beta$ -CD sulfatada são de 1153 g.mol<sup>-1</sup>, 1297 g.mol<sup>-1</sup> e 2563 g.mol<sup>-1</sup> , respectivamente . O grau de substituição para a  $\beta$ -CD sulfatada igual a 14.

D<sub>2</sub>O (99%) foi fornecida por SDS, França. A acidez do meio foi ajustado quando necessário, com KOD 10<sup>-4</sup> M (Aldrich, 40% em D<sub>2</sub>O).

As medidas de RMN foram realizadas em um espectrômetro da BRÜKER modelo AMX 500, pertencente ao Centro de Ressonância Magnética Nuclear de Galícia do Campus de Santiago de Compostela da Universidade de Santiago de Compostela (Espanha), com uma frequência de trabalho de 500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C e um espectrômetro BRÜKER modelo AC 300, pertencente ao Serviço Geral de Apoio à Investigação Físico-Química e Tecnologia de Alimentos do Campus de Lugo, pertencente à Universidade de Santiago de Compostela (Espanha), com uma frequência de operação de 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75 MHz para <sup>13</sup>C.

Para as medidas de fluorescência foi usado um equipamento da Edimburgh Instruments Modelo F900.

As medidas cinéticas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIS Varian DMS-80, acoplado a um microcomputador IBM-XT.

#### **4.1 - Métodos de avaliação de formação do complexo furoato de diloxanida: $\beta$ -CD**

##### *Diagrama de Solubilidade*

Os diagramas de solubilidade foram elaborados segundo o método proposto por Higuchi e Connors.<sup>149</sup>

Em tubos apropriados para análise, foram adicionadas quantidades em excesso do fármaco, correspondente à 1,0 mM e soluções aquosas de  $\beta$ -CD nas concentrações entre 0,0 e 22,0 mM. As amostras foram mantidas durante um período de 07 (sete) dias em agitação e temperatura de 37°C. Para cada uma das amostras foram feitas triplicatas. Após este período, procedeu-se a filtração do sobrenadante, utilizando-se membranas de filtro de acetato de celulose (Milipore), cujo diâmetro do poro era de 0,45  $\mu$ m. Com o filtrado realizaram-se diluições 1/10, procurando manter a temperatura constante. A concentração de fármaco dissolvida foi determinada por espectrofotometria UV, no mesmo comprimento de onda na qual foi obtida a curva de calibração.

##### *Curva de Calibração*

Preparou-se uma solução aquosa do furoato de diloxanida com concentração de  $6,1 \times 10^{-2}$  mM. Foi mantida em agitação à 37°C por aproximadamente 24 horas. A partir desta solução e por diluição, foram preparadas soluções cujas concentrações estavam entre 6,1 e  $6,1 \times 10^{-3}$  mM. As absorbâncias foram medidas a 260 nm, que corresponde ao comprimento de onda máximo do furoato de diloxanida. Graficando os valores de absorbância versus concentração do FD, obtém-se a curva de calibração, sendo os parâmetros;  $Abs = -0,0088 + 18162 X$ , com um coeficiente de correlação  $r = 0,9999$ .

### *Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$*

Considerando que a solubilidade do fármaco é muito baixa em água, procurou-se realizar medidas em misturas de solventes como água/metanol e água/acetoneitrila em diferentes proporções (20:80, 30:70, 40:60 e 50:50).

No caso da técnica de  $^1\text{H}$ -RMN, prepararam-se separadamente duas soluções com misturas de solventes nas proporções de 50:50 metanol/água deuterados em iguais concentrações, isto é, 4mM de furoato de diloxanida (hóspede) e 4mM de  $\beta$ -CD. Estas foram mantidas em banho-maria e ultrasom por aproximadamente duas horas, para completa solubilização.

No caso da técnica de  $^{13}\text{C}$ -RMN, prepararam-se soluções de  $\beta$ -CD 10mM em mistura de  $\text{CH}_3\text{CN}$ :  $\text{D}_2\text{O}$  40:60 e de furoato de diloxanida (FD) e  $\beta$ -CD em iguais concentrações, sendo de 10mM na mistura  $\text{CH}_3\text{CN}$ :  $\text{D}_2\text{O}$  40:60.

### *Fluorescência*

Para evidenciar a formação do complexo furoato de diloxanida- $\beta$ -CD, foram utilizados feixes de excitação e emissão de 3,0 e 5,0 mm respectivamente, com um  $\lambda$  máximo de excitação de 338 nm. A concentração de furoato de diloxanida foi de  $3,0 \times 10^{-5}$  M (0,2% de etanol) e a de  $\beta$ -CD de  $1,2 \times 10^{-2}$  M.

### *Estudo cinético*

As medidas cinéticas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIS Varian DMS-80, acoplado a um microcomputador IBM-XT e a um banho termostatizado, calibrado a uma temperatura de 37°C.

As determinações cinéticas foram realizadas em solução aquosa (0,4% de etanol), 37°C, força iônica 0,5M (KCl), através do monitoramento da hidrólise do furoato de diloxanida (FD) ( $6,66 \times 10^{-5}$  M) a 260 nm.

## 4.2 - Avaliação de formação dos complexos helvolato de potássio, fusidato de sódio, CHAPS e CHAPSO em $\beta$ - e $\gamma$ - CD por RMN.

### *Resolução dos espectros*

Foram feitos estudos de RMN monodimensionais de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , DEPT 45, 90 e 135, e bidimensionais 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . A referência externa utilizada foi o tetrametilsilano (TMS).

As soluções dos ácidos fusídico e helvólico foram neutralizados com NaOD e KOD respectivamente, a fim de se obter o fusidato de sódio e helvolato de potássio totalmente ionizados e assim uma melhor solubilização destas substâncias na presença de  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD.

Foram preparadas soluções de fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO e das ciclodextrinas ( $\beta$ - e  $\gamma$ -CD) em uma concentração de 10 mM em  $\text{D}_2\text{O}$ . A temperatura foi mantida em aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ , o pH das soluções dos compostos CHAPS e CHAPSO em 5,0-6,0 (pH natural) e do helvolato de potássio e fusidato de sódio em pH 7,0-8,0.

### *Estudos de Formação dos Complexos de Inclusão*

Foram preparadas soluções das amostras, fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO e das ciclodextrinas ( $\beta$ - e  $\gamma$ -CD) nas mesmas condições que foram utilizadas para a caracterização dos espectros.

Para determinação da estequiometria dos complexos através do método de Job, foram preparadas soluções diretamente em tubos de RMN, através da mistura de diferentes volumes, de ciclodextrina ( $\beta$ - ou  $\gamma$ -CD) e de hóspede (fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS ou CHAPSO), variando a relação molar (RM) de CD e hóspede de idênticas concentrações (10mM), e mantendo sempre o mesmo volume final, conforme Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** - Variáveis Utilizadas na Preparação das Soluções para o Estudo de Complexação por RMN.

<b>Tubos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>V<sub>H</sub>(mL)</b>	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45
<b>V<sub>CD</sub> (mL)</b>	0,5	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05
<b>RM<sub>H</sub><sup>a</sup></b>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
<b>RM<sub>CD</sub><sup>b</sup></b>	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1

<sup>a</sup> RM<sub>H</sub> = relação molar de hóspede (H), <sup>b</sup>RM<sub>CD</sub>= relação molar de ciclodextrina (CD)

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item são apresentados resultados referentes ao estudo do complexo de inclusão do amebicida furoato de diloxanida em presença de  $\beta$ -CD, envolvendo estudos cinéticos, de solubilidade, técnicas de fluorescência e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Também são apresentados estudos cinéticos referentes ao furoato de diloxanida em presença de  $\beta$ -CD sulfatada ( $\beta$ -CDSO<sub>3</sub>Na).

Constam também resoluções dos espectros e estudos de complexação do fusidato de sódio e helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO em  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, através das técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mono ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT) e bidimensionais ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , ROESY, NOESY) e método de Job.

### 5.1 - Estudo do Complexo de Inclusão Furoato de diloxanida: $\beta$ -CD.

#### 5.1.1 - Diagrama ou Isoterma de Solubilidade

A maioria dos estudos relacionados com o cálculo da constante de formação, se baseia na determinação das mudanças de solubilidade do fármaco observadas na presença de diferentes concentrações de ciclodextrina.

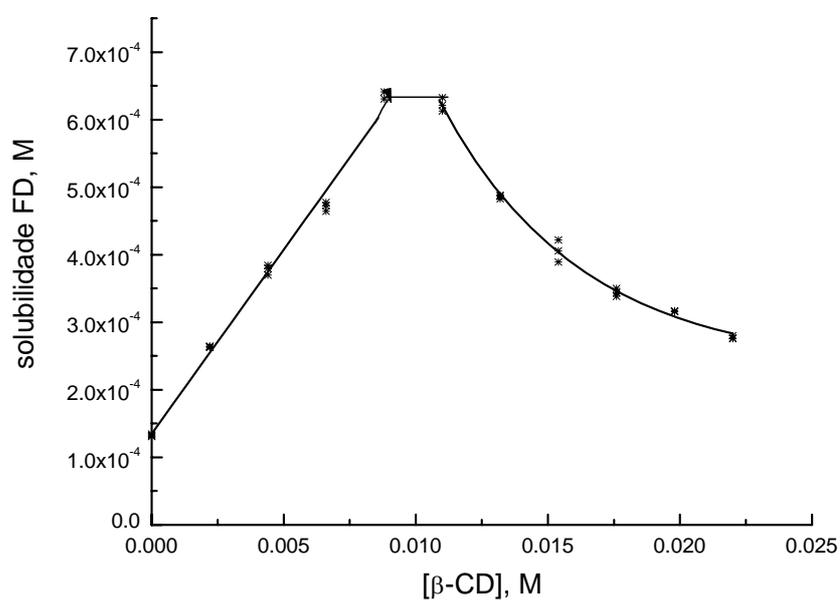
De acordo com a Tabela 5.1 e Figura 5.1, pode-se observar o diagrama de solubilidade do furoato de diloxanida em  $\beta$ -CD. Para as determinações analíticas se fez uso da reta de calibração, cujo coeficiente de absorvidade molar de 18.162 serviu para a determinação das concentrações de fármaco dissolvidas em cada um dos tubos contendo diferentes concentrações de  $\beta$ -CD no diagrama de solubilidade. Estas concentrações são expressas pela “solubilidade FD, M” no referido diagrama. As medidas foram realizadas segundo a técnica de Higuchi e Connors<sup>149</sup>, pH 7,0, 37°C e agitação durante 7 dias.

O furoato de diloxanida apresentou um perfil B<sub>s</sub>, no qual existe um aumento linear da solubilidade relacionada com a formação do complexo com a ciclodextrina. Em uma segunda etapa, observou-se um platô que corresponde a máxima solubilidade e finalmente uma fase

descendente que corresponde à diminuição da concentração do furoato de diloxanida livre em solução, por formação de complexo de inclusão insolúvel. Neste caso, a constante de estabilidade obtida foi de  $427,4 \text{ M}^{-1}$  ( $r = 0,9959$ ). Este valor foi coincidente com o obtido por Nieto Reyes.<sup>12</sup>

**Tabela 5.1** - Dados de absorvância e diferentes concentrações de furoato de diloxanida (FD) e de  $\beta$ -CD para construção do diagrama de solubilidade;  $T = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7,0$ ,  $\lambda = 260 \text{ nm}$ .

Absorvância <sub>260 nm</sub>	$10^4 \times [\text{FD}]/\text{M}$	$[\beta\text{-CD}]/\text{M}$
0,2411	1,327	0,0
0,4791	2,638	0,0022
0,6863	3,778	0,0044
0,8565	4,716	0,0066
1,1548	6,358	0,0088
1,1300	6,222	0,011
0,8823	4,858	0,0132
0,7368	4,057	0,0154
0,6249	3,441	0,0176
0,5749	3,165	0,0198
0,5041	2,776	0,022



**Figura 5.1** - Diagrama de solubilidade do furoato de diloxanida em  $\beta$ -CD com valor de  $K_c = 427,4 \text{ M}^{-1}$ ;  $S_0 = 1,35 \times 10^{-4}$ ;  $r = 0,9959$ .

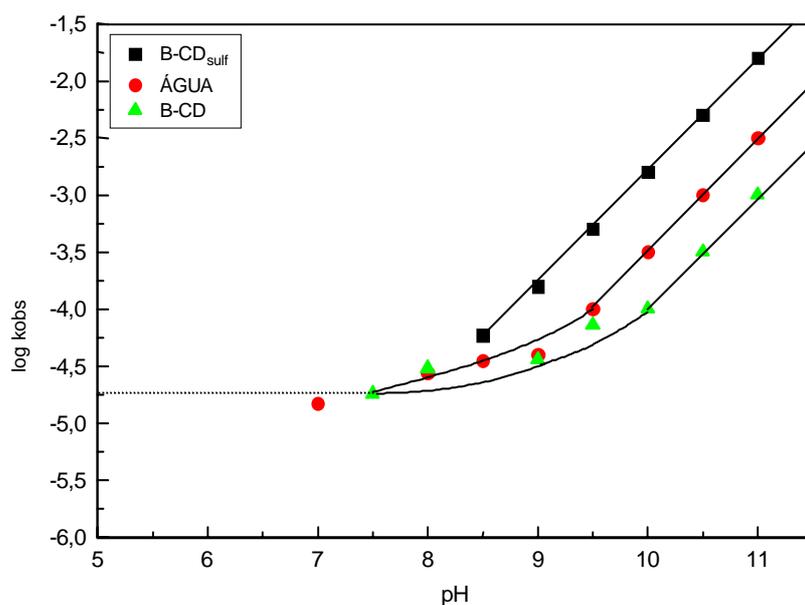
### 5.1.2 - Método Cinético

Em estudos de estabilidade, onde devem ser investigados os efeitos da concentração de ciclodextrina na velocidade de degradação de uma determinada substância, deve-se realizar estudos cinéticos. Neste caso, a constante de estabilidade ou de formação do complexo, poderá ser determinada através dos efeitos de estabilização ou desestabilização exercida pela molécula de ciclodextrina sobre o fármaco.<sup>1, 2, 26, 110</sup>

Figura 5.2 mostra o perfil do logaritmo da constante de velocidade de primeira ordem ( $k_{obs}$ ) em função do pH, no estudo da hidrólise do furoato de diloxanida em água,  $\beta$ -CD e  $\beta$ -CD sulfatada ( $\beta$ -CDSO<sub>3</sub>Na). Dados encontram-se na Tabela 5.2. O perfil de velocidade em função do pH para a reação de hidrólise do furoato de diloxanida (FD) indicam comportamentos diferenciados na ausência e presença da  $\beta$ -CD e  $\beta$ -CDSO<sub>3</sub>Na. A reação de hidrólise foi observada na faixa de pH básico enquanto que abaixo de 7,0 não foi constatada reação nas condições experimentais em estudo. Observa-se nesta região de pH básico, que a  $\beta$ -CD inibe a reação de hidrólise, enquanto que a  $\beta$ -CDSO<sub>3</sub>Na acelera. A inibição de velocidade no caso da  $\beta$ -CD, pode ser explicada pelo fato de que esta protege o substrato do ataque da água durante a reação. No perfil  $\log k_{obs}$  versus pH são mostradas linhas paralelas com inclinação próxima de 1,0, sugerindo assim uma catálise básica.

**Tabela 5.2** - Logaritmo da constante de velocidade de primeira ordem em função do pH para a reação de hidrólise do furoato de diloxanida (FD) em água,  $\beta$ -CD e  $\beta$ -CDSO<sub>3</sub>Na; [FD]=  $6,66 \times 10^{-5}$  M;  $\lambda$ = 260 nm; T= 37 °C;  $\mu$ = 0,5 M (KCl)

pH	$\log k_{obs}$		
	H <sub>2</sub> O	$\beta$ -CD	$\beta$ -CDSO <sub>3</sub> Na.
7,0	-4,83	--	--
7,5	--	-4,74	--
8,0	-4,56	-4,52	--
8,5	-4,45	--	-4,23
9,0	-4,4	-4,44	-3,8
9,5	-4,0	-4,14	-3,3
10,0	-3,5	-4,0	-2,8
10,5	-3,0	-3,5	-2,3
11,0	-2,5	-3,0	-1,8

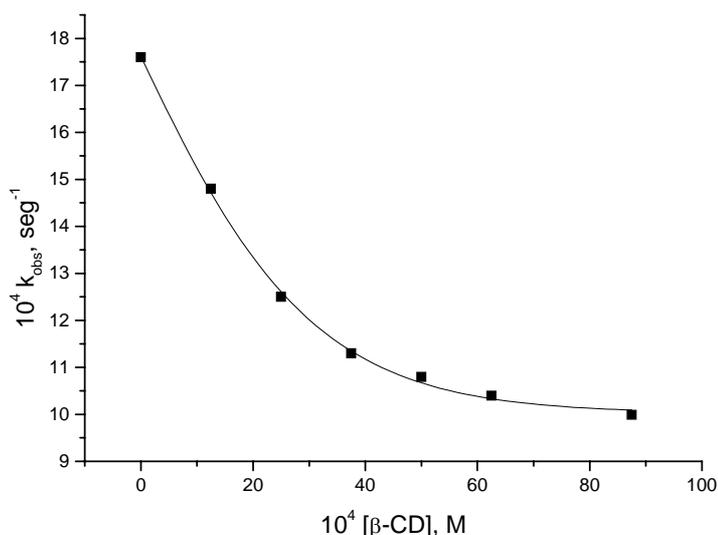


**Figura 5.2** - Logarítmo da constante de velocidade de primeira ordem em função do pH para a hidrólise do furoato de diloxanida em água,  $\beta$ -CD e  $\beta$ -CD sulfatada, à 37°C.

Através do método cinético, observou-se que a  $\beta$ -CD inibiu a degradação do fármaco furoato de diloxanida em pH básico, sendo que a pH 10,75 ocorreu uma diminuição na velocidade de hidrólise com o aumento da concentração de  $\beta$ -CD. Neste caso, observou-se inibição da reação, com um perfil de cinética de saturação, característico de reações enzimáticas (Tabela 5.3 e Figura 5.3).

**Tabela 5.3** - Constantes de velocidade de primeira ordem em função da concentração de  $\beta$ -CD no estudo da reação de hidrólise do FD em pH 10,75 e 37°C.

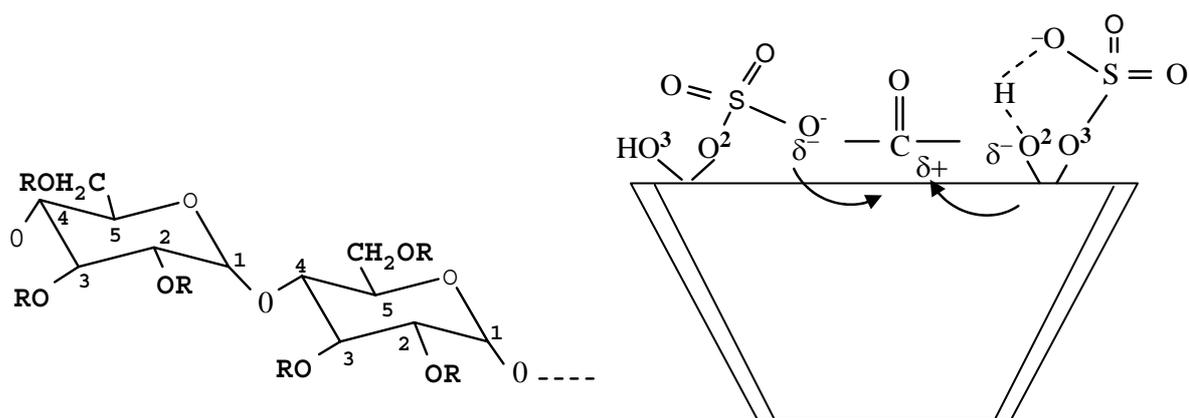
$10^4 \times [\beta\text{-CD}]/\text{M}$	$10^4 \times k_{obs}/\text{s}^{-1}$
0	17,6 ( $k_0$ )
12,5	14,8
25,0	12,5
37,5	11,3
50,0	10,8
62,5	10,4
87,5	9,99



**Figura 5.3** - Variação da constante de velocidade de primeira ordem em função de concentrações crescentes de  $\beta\text{-CD}$  para a hidrólise do furoato de diloxanida ( $6,66 \times 10^{-5} \text{M}$ ) em pH 10,75,  $\mu = 0,5 \text{ M}$  (KCl),  $\lambda = 260 \text{ nm}$  e  $37^\circ \text{C}$ ;  $k_0 = 1,76 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

Por outro lado, quando se observa a influência da  $\beta\text{-CDSO}_3\text{Na}$  na reação de hidrólise, constata-se um efeito oposto ao da  $\beta\text{-CD}$ , isto é, ao aumentar a concentração de  $\beta\text{-CDSO}_3\text{Na}$ , ocorre aumento de velocidade de reação de hidrólise. Neste caso, os grupos sulfatos ligados à ciclodextrina devem facilitar o ataque da água, através provavelmente de um mecanismo de catálise nucleofílica (Tabela 5.4 e Figura 5.4).

Vários mecanismos de reações de hidrólise com diversos substratos, com envolvimento de estruturas de complexos de inclusão com a  $\beta\text{-CDSO}_3\text{Na}$  tem sido descritos na literatura.<sup>165-167</sup> Em analogia a estes mecanismos, o Esquema 5.1 demonstra que na presença da  $\beta\text{-CDSO}_3\text{Na}$ , a catálise nucleofílica pode ocorrer tanto pelos grupos sulfatos substituídos no O-2, como pelos grupos hidroxilas secundários auxiliados pelos sulfatos substituídos no O-3 da ciclodextrina, e que através de pontes de hidrogênio deixa o oxigênio O-2 mais nucleofílico. O grupo carbonila pertencente ao furoato de diloxanida está sendo representado nas proximidades da cavidade da ciclodextrina, a fim de demonstrar a interação dos grupos sulfatos da ciclodextrina com o carbono eletrofílico. Esta proposta é válida desde que o grau de substituição por grupos sulfatos é de 14, distribuídos nos oxigênios 2, 3 e 6.<sup>168,</sup>

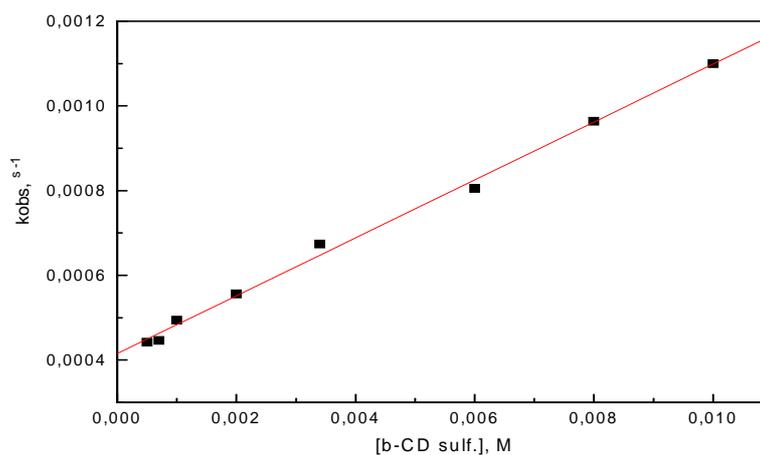


R=H ou  $\text{SO}_3^-$

**Esquema 5.1** - Representação do mecanismo de catálise nucleofílica envolvendo o centro reativo do furoato de diloxanida e a  $\beta\text{-CD}\text{SO}_3\text{Na}$ .

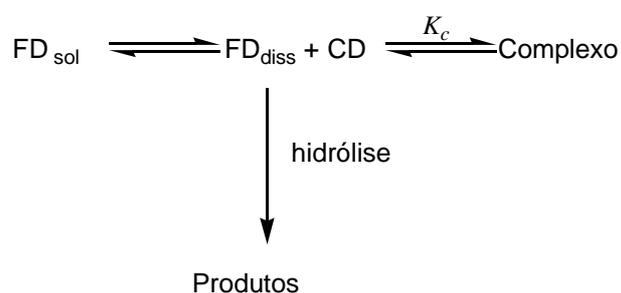
**Tabela 5.4** - Constantes de velocidade de primeira ordem em função da concentração de  $\beta\text{-CD}$  sulfatada no estudo da reação de hidrólise do FD em pH 10,0 e  $37^\circ\text{C}$ .

$10^4 \times [\beta\text{-CD}_{\text{sulf.}}] / \text{M}$	$10^4 \times k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
0,0	3,16 ( $k_o$ )
10,0	4,94
20,0	5,56
34,0	6,74
60,0	8,05
80,0	9,64
100,0	11,0

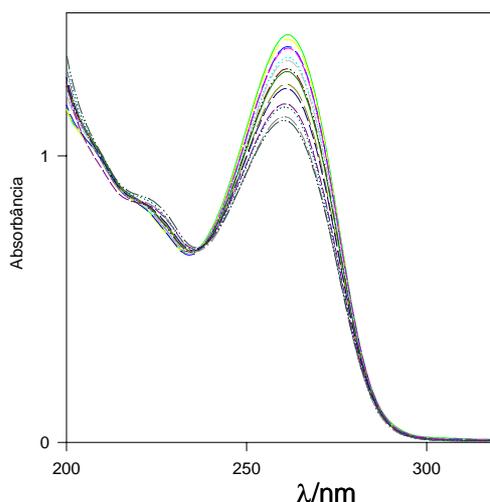


**Figura 5.4** - Variação da constante de velocidade de primeira ordem em função de concentrações crescentes de  $\beta$ -CD sulfatada para a hidrólise do furoato de diloxanida ( $6,66 \times 10^{-5}$  M) em pH 10,0,  $\mu = 0,5$  M (KCl),  $\lambda = 260$  nm e  $37^\circ\text{C}$ ;  $k_0 = 3,16 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

Dados cinéticos demonstraram que a pH 7,0, após 07 dias e à  $37^\circ\text{C}$  (iguais condições experimentais para avaliação da constante de estabilidade do complexo pelo método de Higuchi,<sup>149</sup> tem-se a hidrólise do furoato de diloxanida, conforme observado na Figura 5.5. Segundo o Esquema 5.2, a reação de hidrólise compete com a de complexação e altera portanto a solubilidade aparente do fármaco.



**Esquema 5.2** - Reação de hidrólise do furoato de diloxanida (FD) versus complexação.



**Figura 5.5** - Espectros de UV para a reação de hidrólise do furoato de diloxanida por 7 dias, a pH 7,0 e à 37°C.

Nos estudos de ensaio de estabilidade “*in vitro*”, Nieto Reyes demonstrou a pH 9,0 um efeito catalisador da  $\beta$ -CD na hidrólise do furoato de diloxanida. Por outro lado, através de ensaios “*in situ*” com animais de laboratório, foi verificado por esta mesma autora que a constante de degradação do furoato de diloxanida que forma parte do complexo de inclusão FD/ $\beta$ -CD é significativamente menor comparado ao mesmo ensaio sem a presença da  $\beta$ -CD.<sup>12</sup> Em nossos estudos, observou-se inibição da velocidade de hidrólise na região de pH básico na presença de  $\beta$ -CD, corroborando com os ensaios “*in situ*” realizados por Nieto Reyes. Portanto, a  $\beta$ -CD estaria protegendo o composto da ação das esterases presentes na porção do trato gastrointestinal.

A constante de velocidade de primeira ordem para a hidrólise do furoato de diloxanida (FD) na presença de  $\beta$ -CD e a constante de estabilidade ou equilíbrio podem ser determinadas através de métodos análogos aos de Michaelis-Menten para a cinética enzimática,<sup>161</sup> de acordo com o apresentado no Esquema 3.2. A partir da equação 3.33 pode-se escrever a equação 5.1, cuja aplicação é demonstrada na Figura 5.6 e Tabela 5.5, já que graficando  $[CD]/(k_o - k_{obs})$  versus  $[CD]$ ,  $K_{11}$  e  $k_c$  poderão ser calculados a partir dos valores da

interseção e coeficiente angular, se a suposição do complexo 1:1 estiver de acordo com a formação de uma reta.<sup>1, 2, 48</sup>

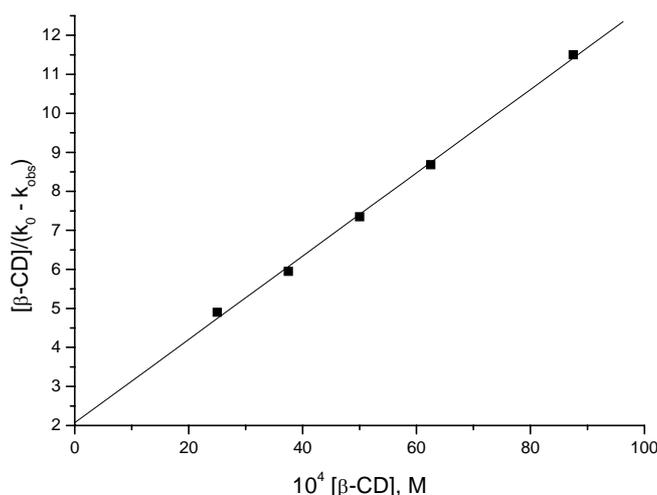
$$\frac{[CD]}{k_o - k_{obs}} = \frac{1}{(k_o - k_c)K_{11}} + \frac{[CD]}{k_o - k_c} \quad (5.1)$$

Foram observadas relações lineares para a formação dos complexos FD/ $\beta$ -CD e FD/ $\beta$ -CD sulfatada, confirmando a formação de complexo 1:1. O valor de  $K_{11}$  foi de 517,0 e 116,8  $M^{-1}$  respectivamente para a  $\beta$ -CD e  $\beta$ -CD sulfatada.

O maior valor da constante para a  $\beta$ -CD em relação a  $\beta$ -CD sulfatada, pode ser explicado pela maior interação da  $\beta$ -CD com o referido fármaco, onde provavelmente neste caso, ocorra uma maior proteção do grupo éster ao ataque da água, constatado através da inibição da reação de hidrólise.

**Tabela 5.5** - Perfil  $[\beta\text{-CD}]/(k_o - k_{obs})$  vs  $[\beta\text{-CD}]$  para estudo da reação de hidrólise do furoato de diloxanida a pH 10,75 e 37 °C.

$10^4 \times [\beta\text{-CD}]/M$	$[\beta\text{-CD}]/(k_o - k_{obs})/M.s$
0	--
12,5	4,46
25,0	4,90
37,5	5,95
50,0	7,35
62,5	8,68
87,5	11,5



**Figura 5.6** - Perfil de  $[\beta\text{-CD}]/(k_0 - k_{obs})$  versus  $[\beta\text{-CD}]$  para a hidrólise do furoato de diloxanida ( $6,66 \times 10^{-5} \text{ M}$ ),  $\text{pH} = 10,75$ ,  $\mu = 0,5 \text{ M}$  (KCl),  $\lambda = 260 \text{ nm}$  à  $37^\circ \text{C}$ .

O efeito do aumento na concentração de sais inorgânicos poderá ocasionar tanto aumento quanto diminuição da constante de estabilidade na formação do complexo.<sup>26</sup> A fim de avaliar a influência da força iônica (0,5M de KCl) no processo de formação do complexo FD/ $\beta$ -CD, realizou-se o estudo de complexação na ausência de KCl, mantendo-se as mesmas condições experimentais utilizadas em presença de KCl. Os estudos demonstraram então que o valor da constante de formação do complexo FD/ $\beta$ -CD na ausência de KCl foi de  $509,0 \text{ M}^{-1}$  ( $r = 0,9861$ ).

No estudo do efeito da força iônica na velocidade de degradação do agente antineoplásico doxorrubicina, Brewster et al. verificaram que o aumento na velocidade estava relacionado com a formação de um estado de transição polar.<sup>51</sup> Hirayama e Uekama<sup>170</sup> verificaram um aumento da velocidade com adição de certos cátions e ânions, no estudo da catálise de inclusão de ciclodextrinas na isomerização da prostaglandina  $A_1$ . No caso de sistemas tais como KI,  $\text{KClO}_3$  e  $\text{KBrO}_3$ , a velocidade de isomerização foi significativamente diminuída, indicando uma competição entre os sais e a molécula hóspede pela inclusão na ciclodextrina.

A diferença no valor obtido para a constante de equilíbrio através do método cinético comparado ao de solubilidade, pode ser explicado considerando que no período de 07 dias, que foi o tempo utilizado neste último método, parte do furoato de diloxanida pode ter sido

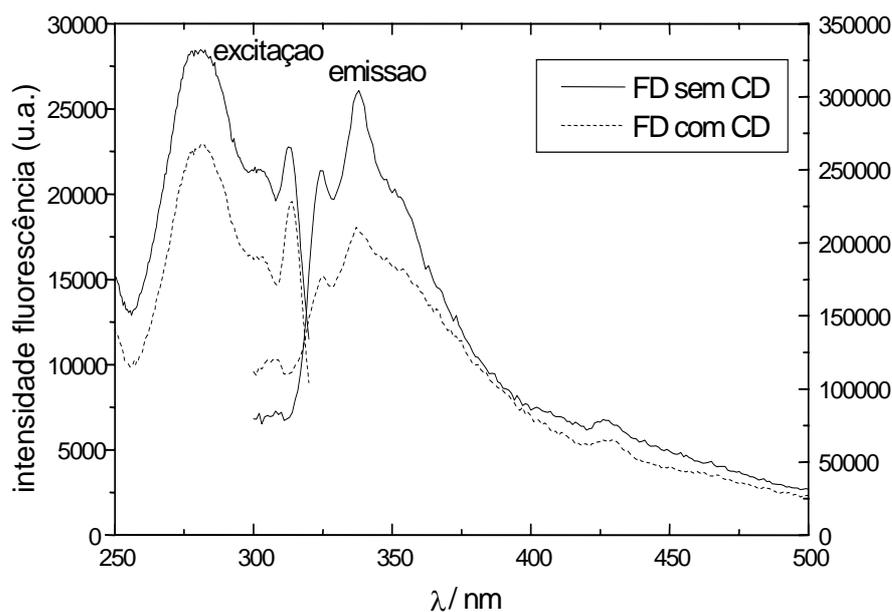
hidrolisado, levando a consideráveis erros na determinação da constante de formação do complexo. Os produtos de hidrólise do furoato de diloxanida, ácido furóico e diloxanida, podem competir com o furoato de diloxanida pela complexação com a  $\beta$ -CD. Desta forma diminui a solubilidade aparente do furoato de diloxanida e o valor da constante de formação do complexo será menor quando determinado pelo método de solubilidade.

Este fato também foi observado na determinação da constante de formação do complexo do fármaco antineoplásico melfalano com sulfobutil éter- $\beta$ -CD ([SBE]7m- $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD). Após 24 horas, houve a formação de dois produtos de degradação, hidroximelfalano e dihidroximelfalano, os quais competiam pela complexação com as ciclodextrinas, diminuindo a solubilidade aparente do melfalano.<sup>48</sup>

### 5.1.3 - Fluorescência

A adição de ciclodextrina a uma solução aquosa, normalmente resulta em melhora significativa no espectro de fluorescência. A mudança é semelhante àquela observada para compostos dissolvidos em solventes menos polares, tais como dioxano e etanol, sugerindo assim que o composto foi transferido de um ambiente aquoso à cavidade apolar da ciclodextrina.<sup>26</sup> O aumento da intensidade de fluorescência produzida pelo processo de complexação em ciclodextrina, foi avaliado também qualitativamente no trabalho desenvolvido por Ma et al.<sup>48</sup> com os agentes antineoplásicos melfalano e carmustina.

Porém, neste trabalho não foram observadas diferenças significativas nos espectros de excitação e emissão do furoato de diloxanida na presença e ausência da  $\beta$ -CD nas condições experimentais testadas. Postula-se que esta pequena diferença se deve à baixa solubilidade em água e pouca fluorescência do furoato de diloxanida (Figura 5.7).



**Figura 5.7** - Espectros de Fluorescência do furoato de diloxanida ( $3,0 \times 10^{-5} \text{M}$  e 0,2% de etanol) e  $\beta$ -CD ( $1,2 \times 10^{-2} \text{M}$ );  $\lambda_{\text{EX}} = 338 \text{ nm}$ .

### 5.1.4 - Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), também tem sido muito utilizada para a caracterização dos complexos de inclusão, através da observação das mudanças que ocorrem com os sinais de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) ou de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) da molécula da ciclodextrina ou hóspede, ao estarem complexados.<sup>110</sup> Vários trabalhos<sup>17, 20, 21, 171, 172</sup> reportaram o uso desta técnica, pois trata-se de uma ferramenta útil nos estudos de formação de complexos de inclusão. Este processo vai sempre ocorrer quando existir compatibilidade geométrica e de polaridade entre a ciclodextrina e a molécula hóspede.<sup>26</sup>

Através de experimentos preliminares (Figuras 5.8 e 5.9) e pelas estimativas teóricas de deslocamento de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Programa ChemOffice 6,0), pode-se situar os hidrogênios e carbonos pertencentes à molécula de furoato de diloxanida dentro do intervalo de  $\delta$  respectivamente de 2,5 a 8,0 ppm e de 30,0 a 155,0 ppm. No espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 5.8), observam-se somente 6 (seis) sinais dentro do intervalo de  $\delta$  de 6,2 a 8,0 ppm, com possibilidade de sobreposição do singlete (b) com o metanol utilizado como solvente. Os sinais correspondentes à  $\beta$ -CD somente são observados no espectro de  $^1\text{H}$  no intervalo de 3,0 e 5,0 ppm (Figura 5.10). No espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 5.9), onde deveriam ser observados 12 (doze) sinais, apenas 7 (sete) são mostrados dentro do intervalo de  $\delta$  de 40,0 a 132,0 ppm, estando os C2, C7, C8 e C12 deslocados do intervalo de deslocamento de  $^{13}\text{C}$  observado neste espectro. Também são mostrados os sinais correspondentes à molécula de  $\beta$ -CD dentro do intervalo de  $\delta$  de 63,0 a 105,0 ppm.

Com a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (Figura 5.10) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 5.11), agora com variações nas proporções de furoato de diloxanida e de  $\beta$ -CD, não foram observadas mudanças significativas nos deslocamentos químicos e isto provavelmente se deve à baixa solubilidade do fármaco em água e a mistura de solventes utilizadas (água-metanol e água-acetonitrila) proporcionar um ambiente mais hidrofóbico que desfavorece a complexação. Portanto, esta técnica não foi suficientemente sensível para detectar a complexação nas condições experimentais testadas.

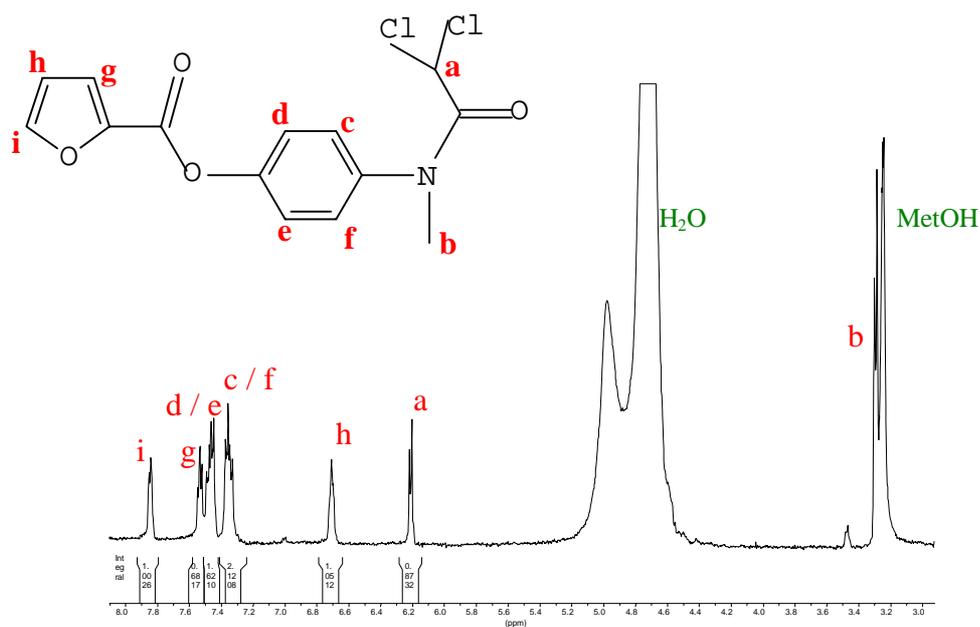


Figura 5.8 - Espectro de  $^1\text{H}$  do furoato de dioxanida e  $\beta$ -CD (4mM) em metanol/água, 300MHz.

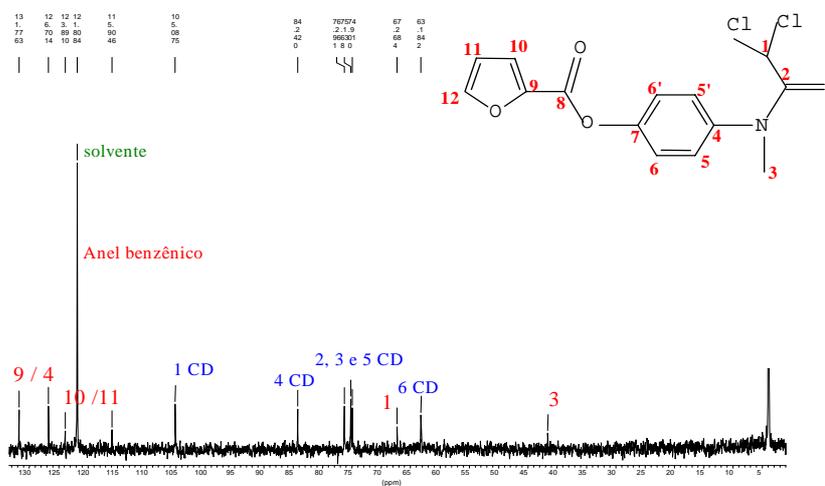
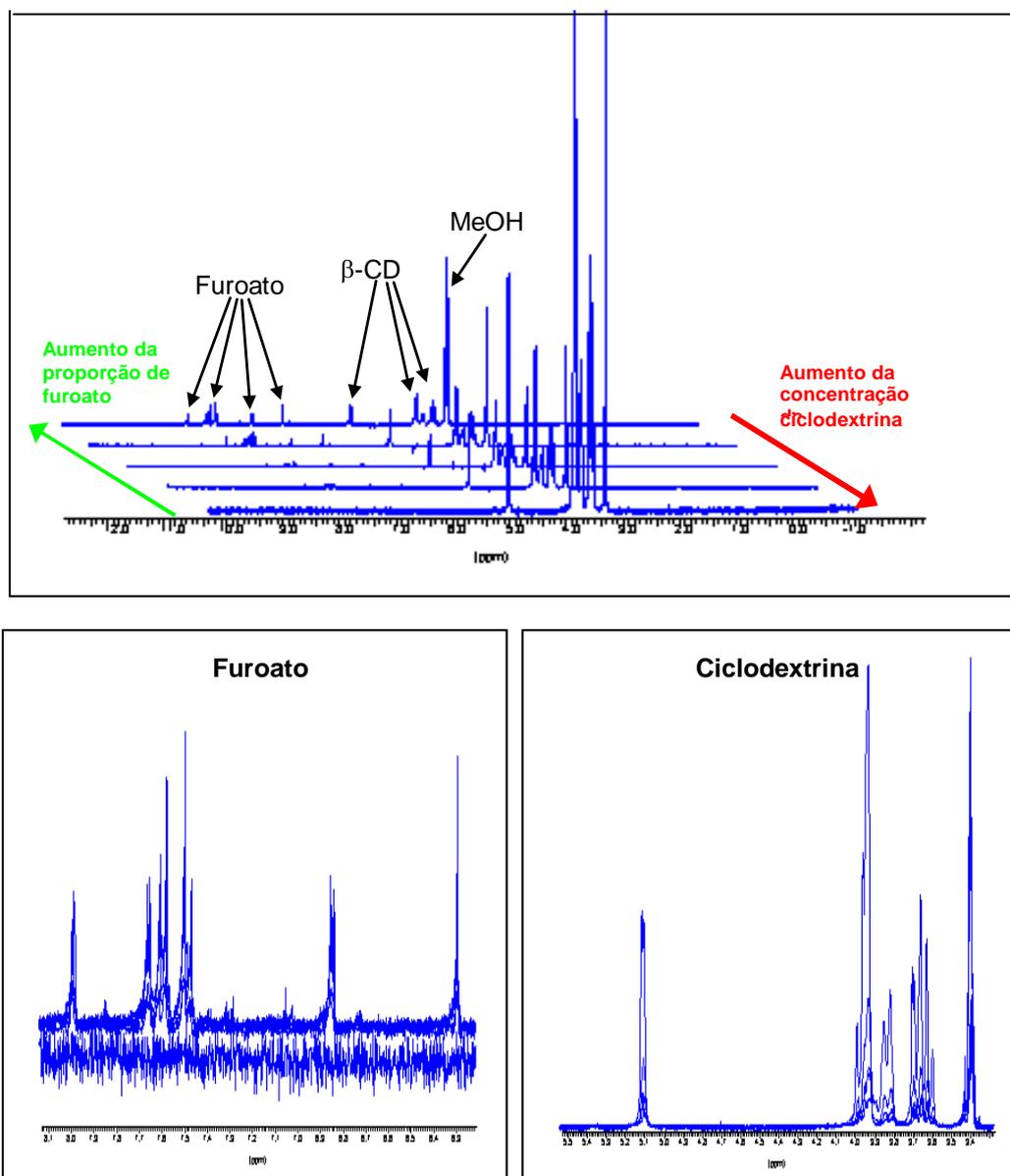


Figura 5.9 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  do furoato de dioxanida e  $\beta$ -CD (10mM) em acetonitril/água, 75MHz.



**Figura 5.10** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , furoato de diloxanida (4mM) e  $\beta$ -ciclodextrina (4mM) em proporções 10:0, 8:2, 6:4, 4:6 e 2:8 em sistema  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (50:50), 300MHz.

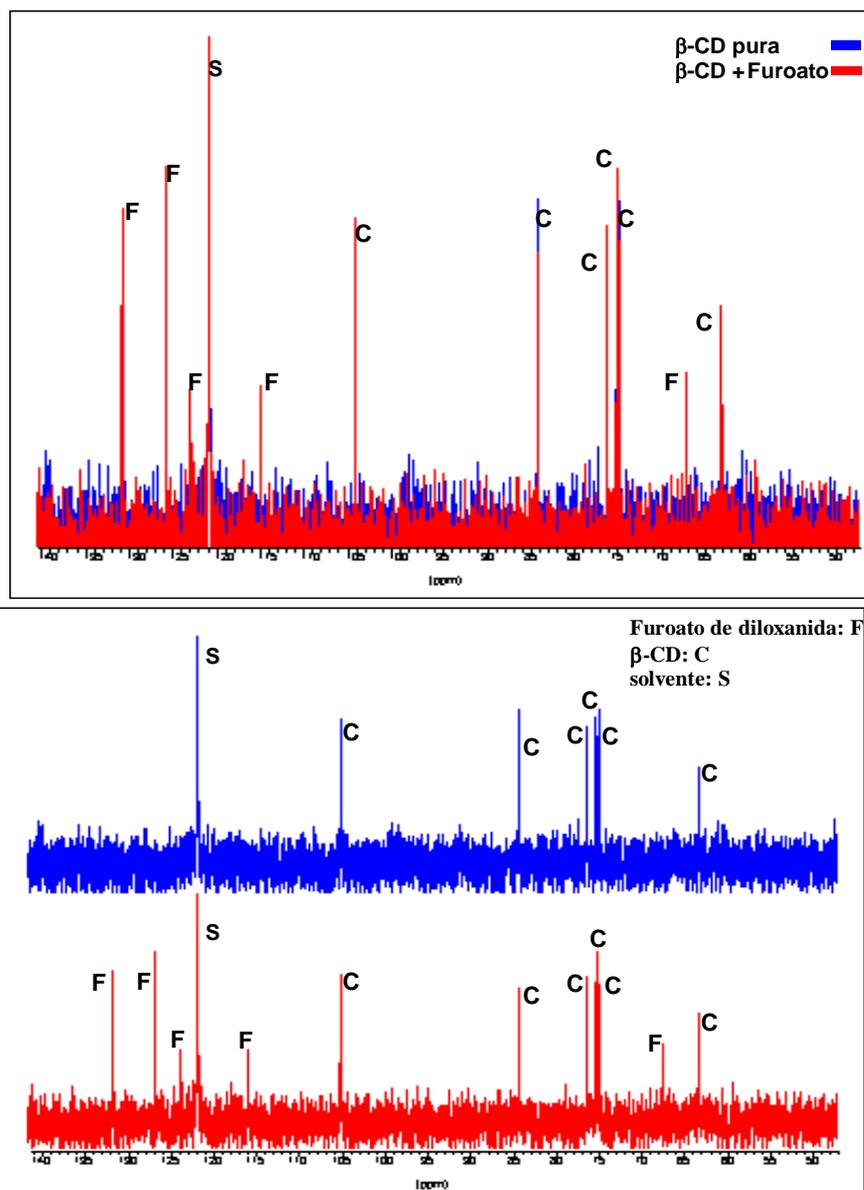


Figura 5.11 - Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\beta$ -CD/FD (10mM) em sistema  $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$  (40:60), 75MHz.

## 5.2 - Resolução dos espectros por RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Com o auxílio de programas computacionais “Brücker WINNMR 1D e 2D”, ChemOffice 6.0 e modelos espaciais, procedeu-se ao assinalamento dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , de acordo com a Figura 5.12.

Através do programa computacional “Brücker WINNMR 2D, foi possível realizar o assinalamento dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , porém as representações nos espectros bidimensionais são apenas ilustrativas e não possibilitam a identificação dos sinais neste trabalho de tese.

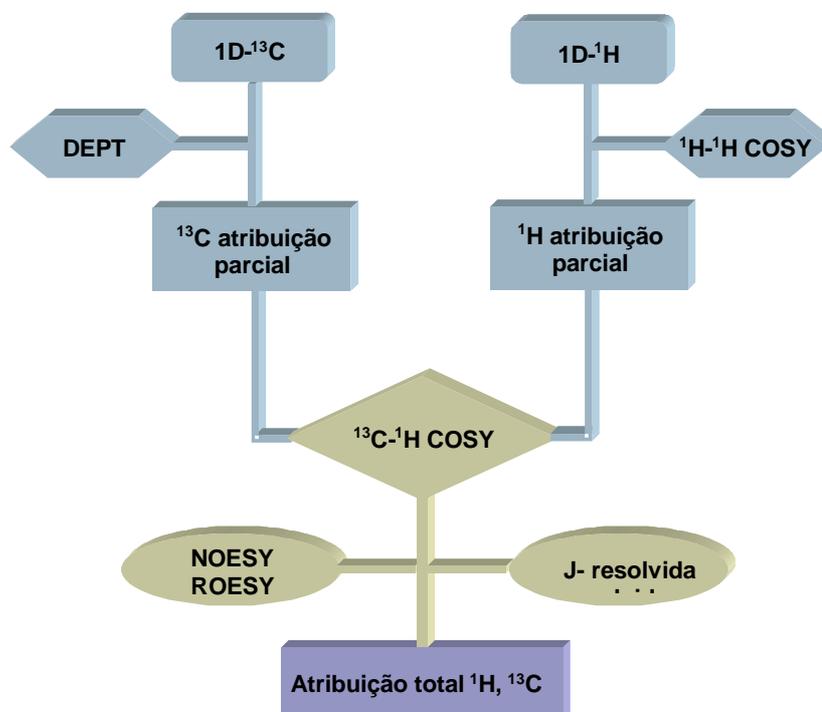


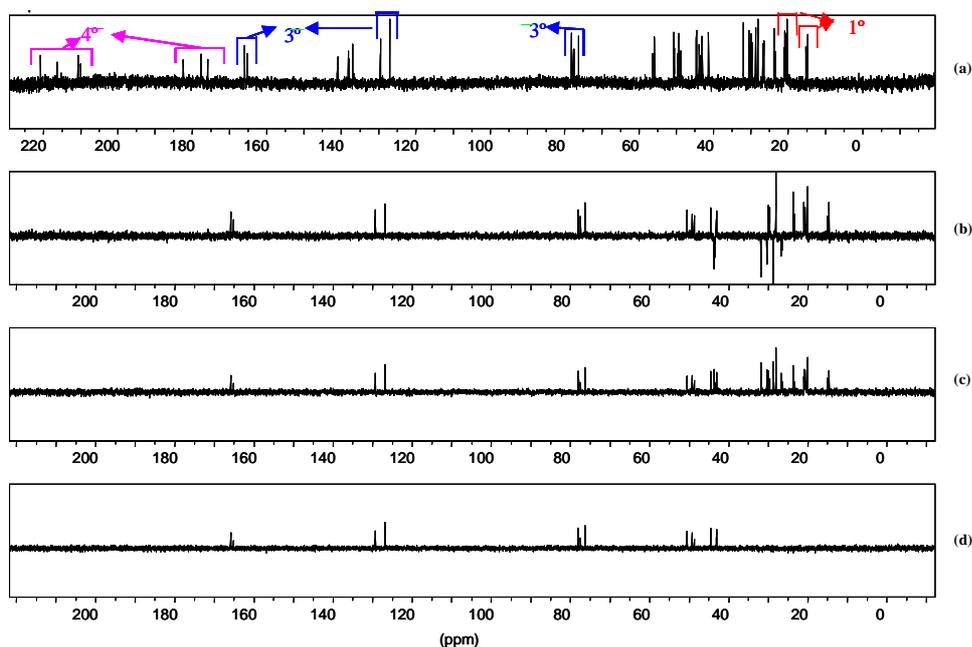
Figura 5.12 - Procedimento relativo ao assinalamento completo dos espectros de RMN.

### 5.2.1 - Helvolato de potássio

De acordo com Iwasaki et al.,<sup>173</sup> a estrutura do ácido helvólico apresenta dois grupos cetona nos C3 e C7, três duplas ligações entre C1-C2, C17-C20 e C24-C25, dois grupos acetatos nos C6 e C16 e um carboxilato no C20. Há oito grupos metila (C18, C19, C26, C27, C30, C32, C34 e C36), cinco metilenos (C11, C12, C15, C22 e C23), nove metínicos (C1, C2, C4, C5, C6, C9, C13, C16 e C24) e onze carbonos quaternários (C3, C7, C8, C10, C14, C17, C20, C21, C25, C33 e C35). Os grupos acetatos em C6 e C16 são vicinais aos grupos cetona (C7) e vinílico (C17-C20), respectivamente. Portanto, estes dois átomos de carbono podem facilmente mudar suas configurações e originar uma mistura de quatro diastereoisômeros em solução. O símbolo “//” indica os sinais pertencentes aos diastereoisômeros relacionados.

### *Espectro monodimensional de $^{13}\text{C}$ e DEPT*

Nos espectros DEPT (Figura 5.13) são observados diferentes átomos de carbono, permitindo identificar no espectro de  $^{13}\text{C}$  alguns dos carbonos quaternários, terciários, secundários e primários. Pode-se localizar os carbonos C7 e C3 correspondentes aos grupos cetona, na região do espectro mais deslocados à esquerda, entre  $\delta$  210-220 ppm. O C21 correspondente ao grupo carboxilato em torno de  $\delta$  180-185 ppm e os quaternários pertencentes aos grupos acetato C6 e C16, com valores de  $\delta$  entre 170-175 ppm.



**Figura 5.13** -Espectros monodimensionais do helvolato de potássio 10mM: (a)  $^{13}\text{C}$ ; (b) DEPT 135; (c) DEPT 45; (d) DEPT 90; soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz.

### *Espectro Monodimensional de $^1\text{H}$*

Pelas estimativas teóricas de deslocamento de  $^1\text{H}$  realizadas em um programa ChemOffice 6.0, pode-se situar a posição de alguns hidrogênios, como observado na Figura 5.14. Os H(1) e H(2) com  $\delta$  de 6,57 e 6,07 ppm, estão em campo baixo. Depois localizam-se os H(24), H(6) e H(16), cujos valores teóricos de deslocamento de  $^1\text{H}$  são 5,20, 4,68 e 4,64 ppm respectivamente. Pela integração observa-se que a estes sinais lhes confere, da esquerda para a direita, os valores de integração de 1,0 ( $\delta$  7,46 ppm), 1,0 ( $\delta$  5,71 ppm), 1,0 ( $\delta$  5,42 ppm), 1,0 ( $\delta$  5,07 ppm) e dois sinais a 4,95 e 3,86 ppm, cuja soma das integrações é igual a

1,0. Os dados obtidos a partir do Programa ChemOffice 6.0 servem de base na estimativa dos deslocamentos químicos dos sinais, devendo levar-se em consideração suas limitações. Ao analisar a estrutura da molécula de helvolato de potássio, verifica-se que ocorrem diferenças no número de sinais quando são comparados dados teóricos e experimentais, devendo-se neste caso à existência dos carbonos quirais C6 e C16 e diferentes diastereoisômeros em solução.

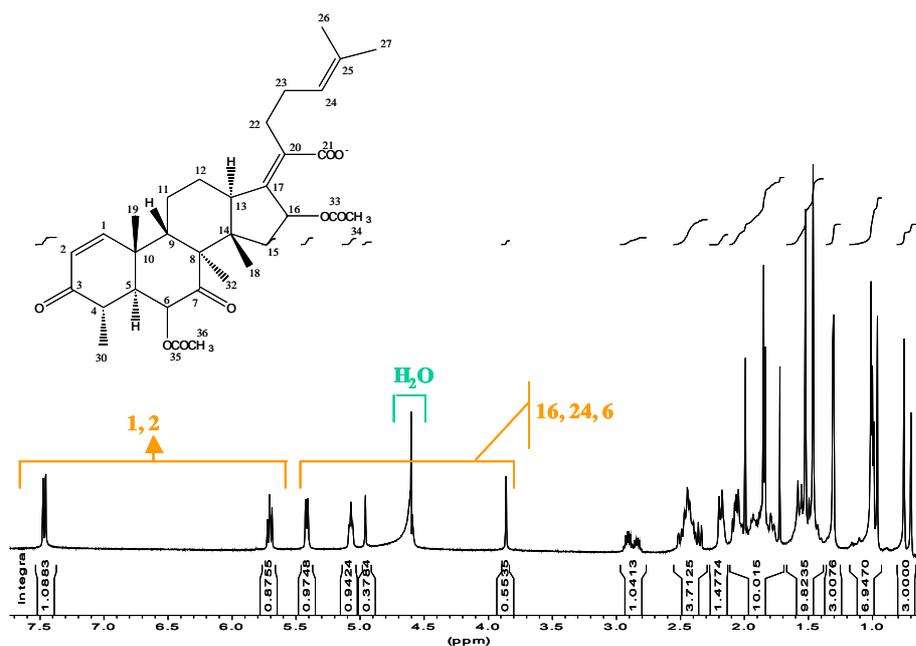


Figura 5.14 -Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do helvolato de potássio 10mM em  $\text{D}_2\text{O}$ , 500MHz.

### Espectro Bidimensional de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY

Para proceder com o assinalamento, a molécula é dividida em cinco fragmentos, os quais são separados através dos átomos de carbono quaternário C3, C7, C10, C14, C17, C20 e C25. O primeiro fragmento é constituído por uma ligação dupla entre C1-C2 e os hidrogênios envolvidos devem aparecer a campo baixo com um único sinal relacionando-os entre si. Somente os sinais em  $\delta$  7,465 e 5,706 ppm no espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obedecem esta condição e portanto devem corresponder aos H(1) e H(2), respectivamente. Tal fato corrobora com a localização do H(1) mais à esquerda e H(2) à direita e, com uma significativa diferença de deslocamento químico devido à proximidade do H(2) com a carbonila e possibilidade de conjugação desta com a dupla  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturada.

O segundo fragmento é constituído pelos C4-C6 e C30. O grupo metila C(30)H<sub>3</sub> apresenta interação a três ligações com o H(4), com dois sinais idênticos a  $\delta$  2,908//2,838 ppm e integrando por 1,0. Os dois sinais correspondentes ao H(4) a  $\delta$  2,908// 2,838 ppm levam a dois sinais H(5) a  $\delta$  2,348// 2,187 ppm, os quais integram por 1,0 e interagem entre si (2,187 com 2,908 e 2,348 com 2,838). Cada H(5) correlaciona com um dos dois sinais correspondentes ao H(6) a  $\delta$  4,958// 3,860 ppm, cujos sinais também integram por 1,0. O maior número de sinais que o esperado na molécula do helvolato, corroboram com a existência de diastereoisômeros em solução. Observa-se que quanto mais próximo do átomo de carbono quiral C6, maior é a diferença entre os dois valores de deslocamento dos diastereoisômeros relacionados, observados nos dois H(4) e H(5), cuja representação se faz através do símbolo “//”. Este acréscimo entre os dois valores de  $\delta$  pode ser atribuída à diferença de ambiente eletrônico.

Na faixa de  $\delta$  3–7 ppm, somente dois sinais permanecem sem identificação. Eles devem corresponder aos prótons vinílicos H(24) e aos H(16) vizinhos a dupla ligação C17-C20. H(24) apresenta acoplamento a quatro ligações com as metilas em C26 e C27, como o que é demonstrado no espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY com os sinais em  $\delta$  1,462 e 1,523 ppm respectivamente. O assinalamento foi feito a partir do experimento Roesy, no qual evidencia interações entre H(24) e H(27). Assim o sinal em  $\delta$  5,073 ppm corresponde ao H(24) e em 5,416 ppm ao H(16). Espera-se para o H(16) interações com os H(15), uma vez que estão a três ligações. Embora somente dois sinais deveriam ser esperados, o espectro bidimensional claramente mostra na direção do H(16) três interações em distintos locais, localizando os H(15) a  $\delta$  1,559 e 1,486 ppm e outro sinal mais amplo, cujo centro localiza o outro H(15) a  $\delta$  2,069 ppm. Isto sugere a existência de diastereoisômeros em solução devido à mudança de configuração no C16 e neste caso se esperaria quatro sinais. No entanto, a vizinhança do H(16), seja qual for sua orientação, não é suficientemente diferente para que os sinais estejam separados e assim menos sinais que o previsto são observados ( $\delta$  2,069 e 1,486//1,559 ppm, os quais correspondem aos H15 $\alpha$  e 15 $\beta$ , respectivamente). O grupo metila C(18)H<sub>3</sub> também é afetado pela mudança na configuração do C16 e os dois sinais com soma das integrações igual a 3,0 em  $\delta$  0,752// 0,698 ppm concordam com este fato. A existência de duas interações H(15)-H(15) observadas no espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY também confirma a presença de dois C16 diastereoisômeros.

A identificação dos H(23) em  $\delta$  1,840 e 1,901//1,921 ppm e dos H(22) em  $\delta$  2,046 e 2,405 ppm é feita diretamente, uma vez que o H(24) já foi assinalado.

O ponto de partida do quinto fragmento se localiza na metila C(18)H<sub>3</sub>, a qual permite o assinalamento do H(13) em  $\delta$  2,444//2,459 ppm através de interação a quatro ligações. Este assinalamento permite identificar os H(12) em  $\delta$  1,582 e 2,169//2,186 ppm, H(11) em  $\delta$  1,416//1,456 e 1,778//1,807 ppm e H(9) em  $\delta$  2,459//2,502 ppm. Observa-se que as mudanças na configuração nos C6 e C16 afetam claramente o ambiente eletrônico destes hidrogênios, porém com menos intensidade nos H(12).

A Figura 5.15 mostra interações referentes aos fragmentos envolvendo C1-C2 na cor verde, C4-C6, C4-C30 na cor laranja e C24-23, C24-26 e 27 na cor azul. A Figura 5.16 mostra interações referentes ao quinto fragmento na coloração laranja, da metila C(18)H<sub>3</sub> localizada em  $\delta$  0,752 e 0,698 ppm com os H(13), levando por sua vez aos H(12), H(11) e finalmente ao H(9). Observa-se também interação da metila C(18)H<sub>3</sub> com os H(15) já identificados.

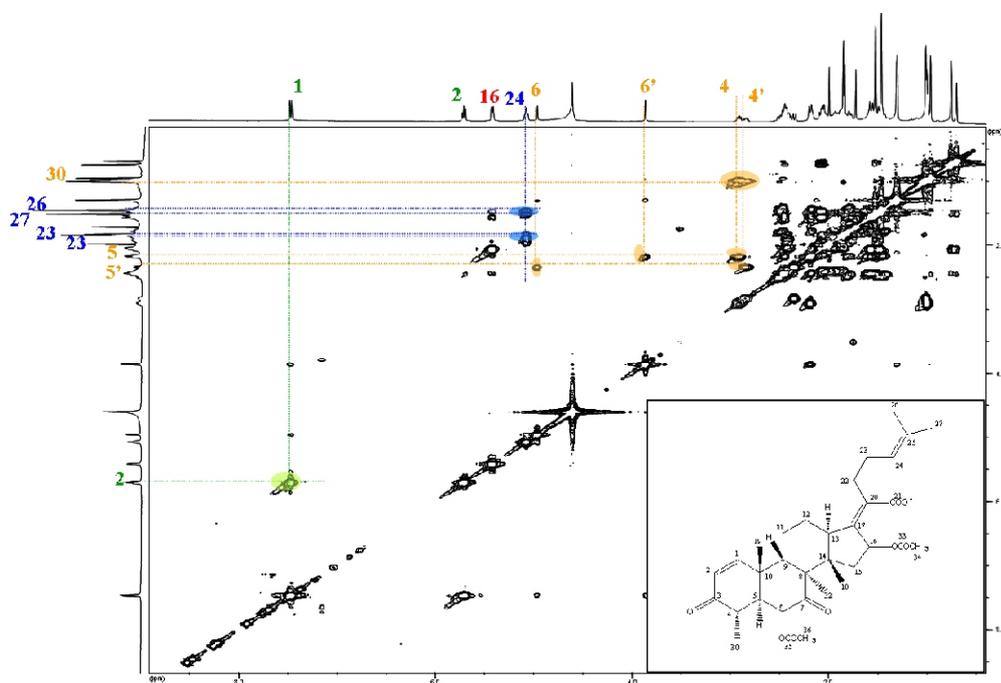
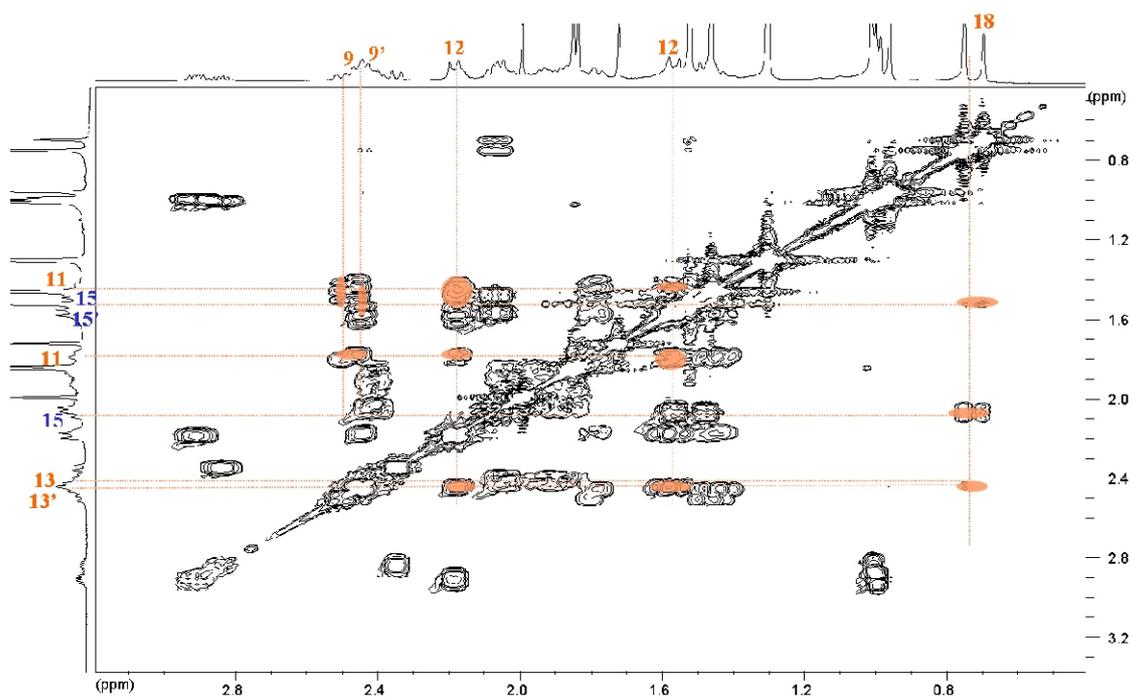


Figura 5.15-Espectro de 1H-1H COSY do helvolato de potássio 10mM em D2O.



**Figura 5.16** -Espectro parcial de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY do helvolato de potássio 10mM em  $\text{D}_2\text{O}$ .

*Espectro bidimensional de correlação de deslocamentos heteronucleares  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HMQC)*

No espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , é possível identificar facilmente os grupos metila, os quais aparecem na tonalidade laranja na Figura 5.17. Estão sendo representados também alguns dos carbonos secundários na coloração azul tais como os C22, C23, C12 e C11. Observa-se que em ambos os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  existem mais sinais correspondentes aos grupos  $-\text{CH}_3$  que na estrutura da molécula de helvolato. Além disso, alguns dos sinais não integram por três. Portanto, conclui-se que a amostra encontra-se contaminada por alguma impureza ou trata-se de uma mistura de diferentes diastereoisômeros de helvolato. Neste caso, o somatório das áreas correspondendo ao mesmo grupo metila de diferentes diastereoisômeros deveria integrar por três como sendo a mesma área do sinal proporcional a concentração do diastereoisômero. Exemplos são os sinais a  $\delta$  0,752 e 0,698 ppm referente a  $\text{C}(18)\text{H}_3$ , confirmando a segunda possibilidade.

Devido a existência de quatro diastereoisômeros, os dois grupos metila  $\text{C}(34)\text{H}_3$  e  $\text{C}(36)\text{H}_3$ , vão produzir quatro sinais na faixa de  $\delta$  1,72-1,99 ppm no espectro de RMN- $^1\text{H}$ , os quais estarão integrando por 6,0.

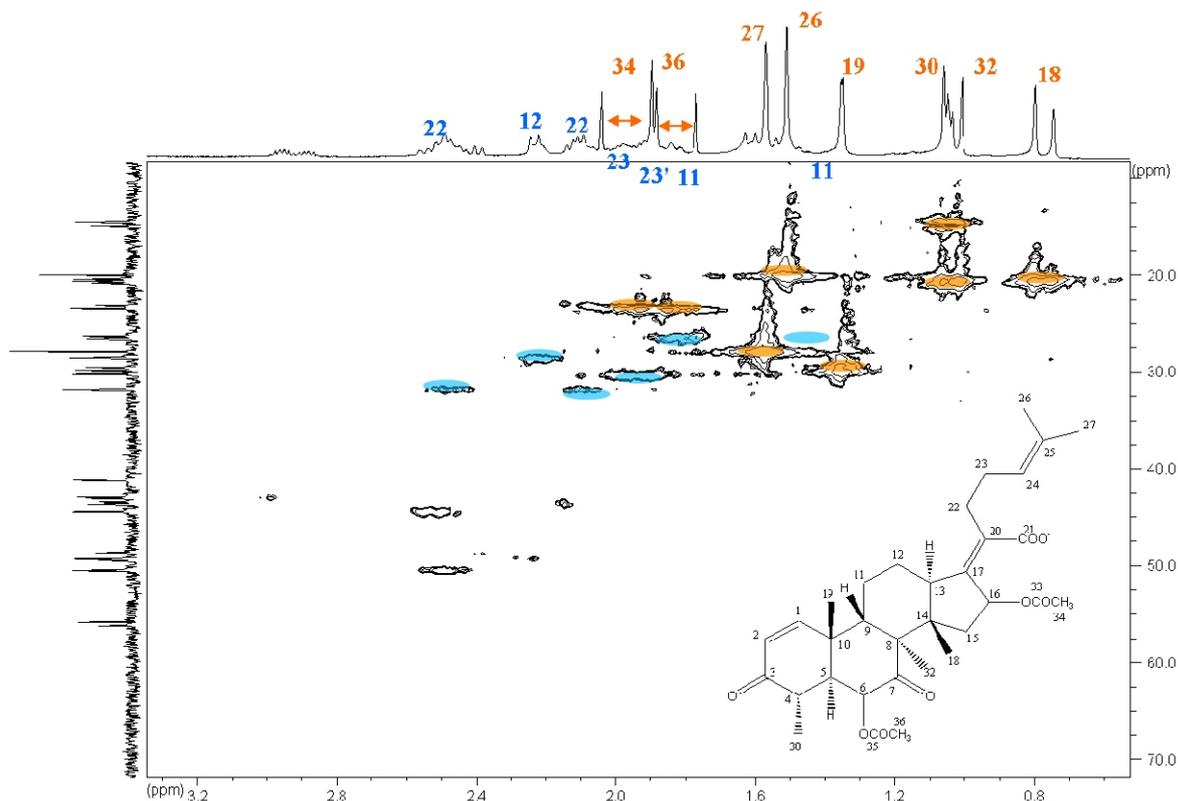
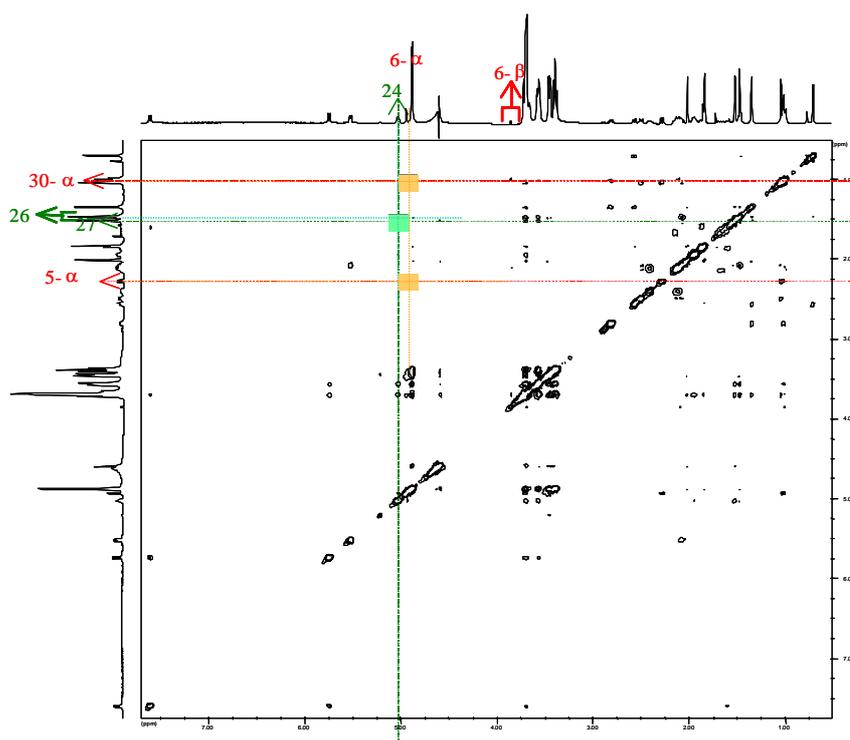


Figura 5.17 -Espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do Helvolato de potássio 10mM em  $\text{D}_2\text{O}$ .

### Espectro Bidimensional ROESY

A partir do experimento ROE é possível obter informações quanto a orientação do hidrogênio ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) através das interações espaciais e interações intranucleares como as que ocorrem com o H(4) e a metila C(19)H<sub>3</sub> em  $\delta$  1,307//1,301 ppm, metila C(19)H<sub>3</sub> com o hidrogênio em  $\delta$  7,465 ppm, confirmando o sinal correspondente ao H(1), assim como a metila C(34)H<sub>3</sub> em  $\delta$  1,849//1,992 ppm com os H(23) e H(15).

De acordo com modelos espaciais e com base no programa computacional “Brücker WINNMR 2D, são verificadas algumas interações intramoleculares conforme Figura 5.18, em que exemplifica interação da metila C(30)H<sub>3</sub> (posição  $\alpha$ ), com um dos epímeros H(6) que se encontra do mesmo lado e do mesmo modo, interação do H(6) com o H(5), confirmando a posição deste último na face  $\alpha$  da molécula (representação em cor laranja). Portanto, o espectro Roesy corrobora com a observação já verificada no  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Cosy para ambos epímeros H(6) nas posições  $\alpha$  e  $\beta$ . Pode-se também diferenciar as metilas C(26)H<sub>3</sub> e C(27)H<sub>3</sub> através da interação 27-24, posicionando a metila C(27)H<sub>3</sub> do mesmo lado do H(24), sendo representado em cor verde.



**Figura 5.18** -Espectro ROESY do complexo helvolato de potássio-  $\beta$ -CD 10mM, em  $D_2O$ , 500MHz.

Os assinalamentos dos carbonos quaternários foram obtidos a partir dos valores teóricos de deslocamento químico. Tabela 5.6 resume o assinalamento total da molécula do helvolato de potássio, com  $\delta$  de hidrogênios e carbonos de moléculas diastereoisômeras, as quais são representadas através de dupla barra (/).

Tabela 5.6 -Deslocamentos químicos dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do helvolato de potássio 10mM em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7,5.

Posição	$\delta$ - $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ - $^{13}\text{C}$ (ppm)
1	7,465	165,9
2	5,706	129,3
3	-	210,7 // 210,0
4 $\beta$	2,908 // 2,838	43,1 // 42,9
5 $\alpha$	2,348 // 2,187	49,3 // 48,6
6 $\alpha$	4,958 //	77,4 //
6 $\beta$	3,860	76,2
7	-	220,7 // 216,3
8	-	56,2
9 $\beta$	2,502 // 2,459	44,5
10	-	41,2
11	1,807 // 1,778	26,5 // 26,3
11	1,456 // 1,416	
12	2,169 // 2,186	28,6
12	1,582	
13 $\alpha$	2,444//2,459	50,5
14	-	55,8
15 $\beta$	1,559 // 1,486	43,6 // 43,4
15 $\alpha$	2,069	
16 $\alpha$	5,416	77,3 // 76,2
16 $\beta$		
17	-	140,8
18 $\beta$	0,752 // 0,698	20,5 // 20,4
19 $\beta$	1,307//1,301	29,8
20	-	138,0
21	-	182,3
22	2,405	31,8
22	2,046	
23	1,921 // 1,901	30,3
23	1,840	
24	5,073	126,8
25	-	136,7
26	1,462	20,0
27	1,523	27,9
30 $\alpha$	1,007	14,9 // 14,5
32 $\alpha$	0,961	20,9
33	-	175,8
34	1,992 // 1,849	23,2
35	-	177,6
36	1,836 // 1,723	23,5

O assinalamento total da molécula de helvolato de potássio através da espectroscopia de RMN, confirma a estrutura proposta por Iwasaki et al.<sup>173</sup> Em artigos anteriores,<sup>174, 175</sup> os autores propuseram uma mudança nos deslocamentos químicos dos grupos cetona e éster, os quais estariam localizados em C6 e C7, respectivamente. Se isto ocorresse, H(4) deveria somente interagir com H(5) e H(30) e o hidrogênio em C7 estaria rodeado por átomos de carbono quaternário.

### 5.2.2 - Fusidato de sódio

Os espectros do fusidato de sódio foram assinalados por Barber et al.<sup>176</sup> Realizou-se nova resolução dos espectros da molécula de fusidato de sódio, utilizando D<sub>2</sub>O como solvente e pH em torno de 7,0-8,0. O assinalamento dos sinais no presente trabalho leva a uma coincidência quase completa dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados tanto de <sup>1</sup>H como de <sup>13</sup>C com exceção dos H(6 $\beta$ ) e H(7 $\alpha$ ), intercambiados entre si. Pequenas variações nos valores de  $\delta$  comparados ao trabalho desenvolvido por Barber et al., deve-se provavelmente à diferença nos pH's em ambos os trabalhos, cujos valores usados foram de 9,3 ( $\delta$  <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e 7,1 ( $\delta$  <sup>1</sup>H e <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H).

#### *Espectro monodimensional de <sup>13</sup>C e DEPT*

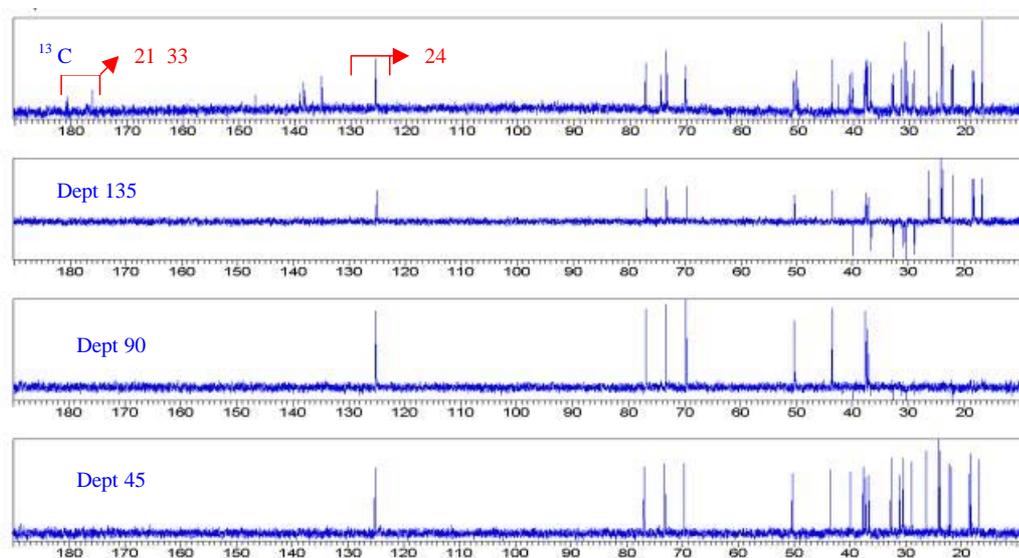
O experimento monodimensional desacoplado de <sup>13</sup>C (BB), unido aos DEPT 135, DEPT 90 e DEPT 45 (Figura 5.19), permite diferenciar entre carbonos primários, secundários, terciários e quaternários.

Tendo em vista os deslocamentos químicos teóricos de <sup>13</sup>C, pode-se assinalar alguns dos carbonos, como os 21 e 33, carbonos quaternários correspondentes aos grupos ácido e éster respectivamente, onde aparecem na região do espectro com deslocamentos entre 175-180 ppm, devendo ser o do grupo ácido, aquele que aparece a maiores deslocamentos. Também há outro bem definido que é o 24, localizando-se a maiores deslocamentos entre os terciários, já que está unido a uma dupla ligação com  $\delta$  em 125ppm.

#### *Espectro monodimensional de <sup>1</sup>H*

No espectro monodimensional de <sup>1</sup>H (Figura 5.20), pode-se assinalar alguns hidrogênios através da forma, integração e deslocamentos químicos dos sinais. Por exemplo, os correspondentes aos grupos metila que aparecem como singletes e integram por três. É o caso do 34 aparecendo a deslocamentos mais altos ( $\delta$  1,861 ppm) e 26 e 27 próximos a uma

dupla ligação e também a deslocamentos altos ( $\delta$  1,40-1,60 ppm). A metila 30 seria o dublete devido à proximidade do H(4), localizando-se a menores valores de deslocamento ( $\delta$  0.702 ppm). Igualmente estarão bem diferenciados os H(24) e H(16), situando-se em valores de  $\delta$  maiores que o resto dos hidrogênios no intervalo entre 5,0 e 5,5 ppm, devido à proximidade de uma dupla ligação e grupo éster, respectivamente. Os H(3) e H(11), por suas proximidades a grupos hidroxilas, vão estar localizados entre os H(24) e H(16) e os anteriores (entre 3,5 e 4,5 ppm).



**Figura 5.19** - Espectros monodimensionais do fusidato de sódio 10mM: (a)  $^{13}\text{C}$ ; (b) DEPT 135; (c) DEPT 90; (d) DEPT 45, em  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz.

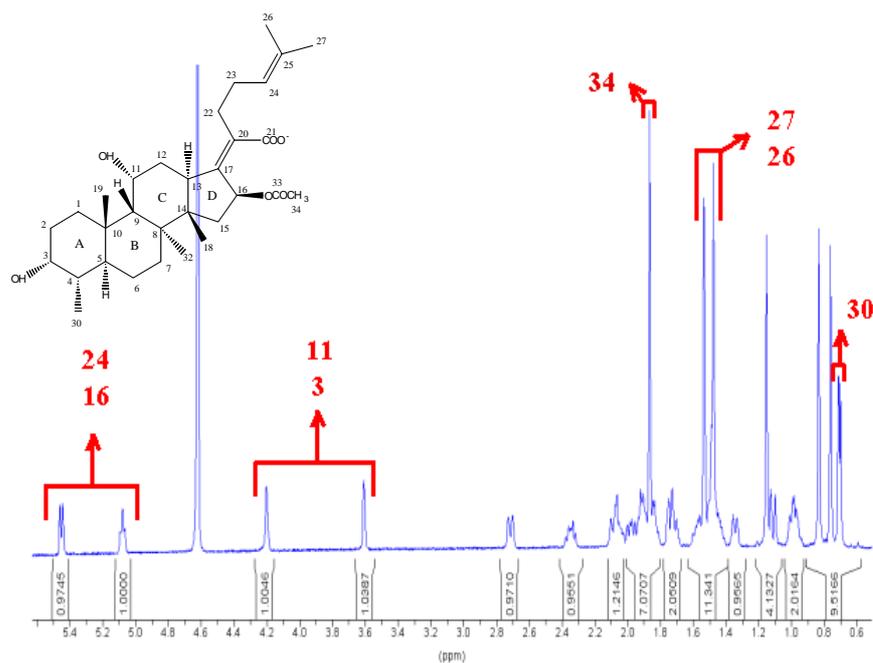


Figura 5.20 - Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  do fusidato de sódio 10mM, em  $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz.

### Espectro bidimensional $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$

Mediante o espectro bidimensional de  $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$  (Figuras 5.21 e 5.22), pode-se avaliar as relações que se estabelecem entre os diferentes hidrogênios, observando-se os acoplamentos que se estabelecem com seus vizinhos, sendo geminais ou vicinais e em certos casos, acoplamentos a longa distância.

Para efeito de estudo, a estrutura da molécula pode ser dividida em quatro fragmentos, os quais são separados por átomos de carbono quaternário C8, C10, C14, C17 e C20.

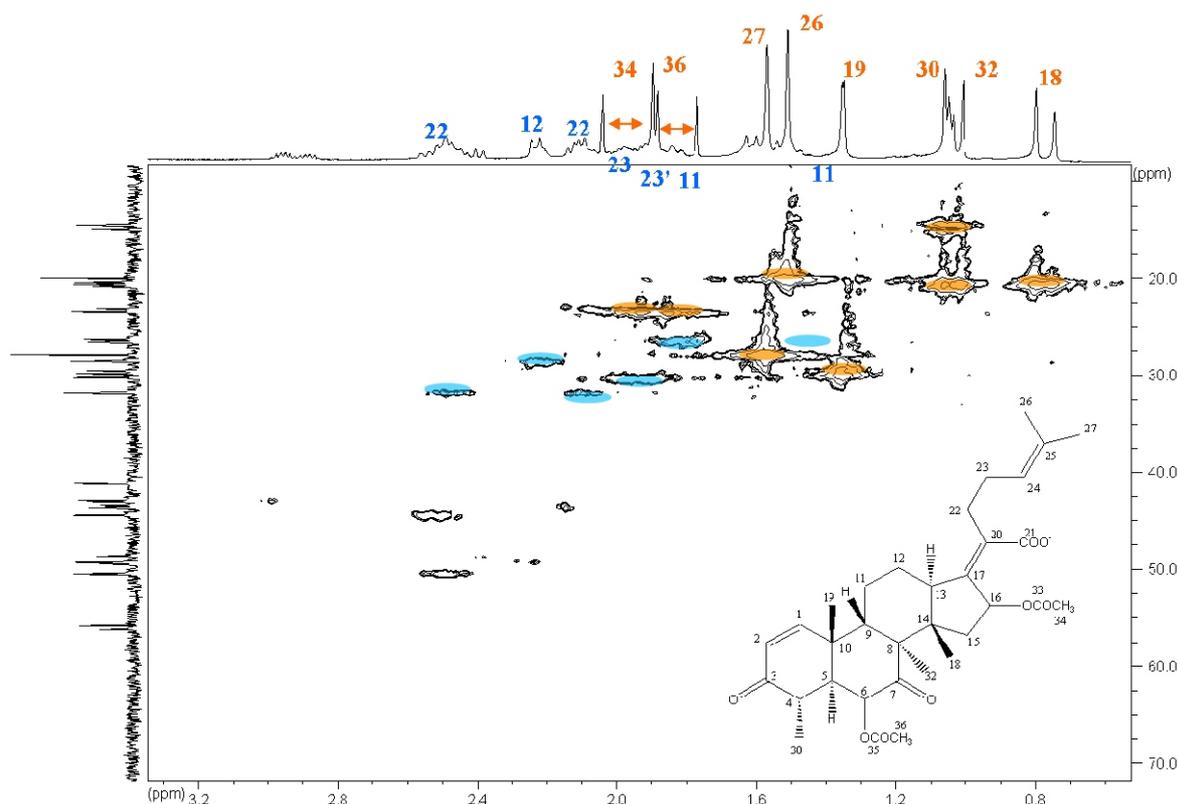


Figura 5.21 - Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY do fusidato de sódio 10mM, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Partindo-se do H(30) em  $\delta$  0,702 ppm (Figura 5.21), cujo sinal já havia sido assinalado através do espectro monodimensional, pode-se observar somente uma interação com outro hidrogênio, indicando o H(4) como vizinho em posição axial em  $\delta$  1,439 ppm. Este por sua vez, apresenta interação com o H(3) ( $\delta$  3,602 ppm) e H(5) ( $\delta$  1,832 ppm), estando o H(3) a maiores deslocamentos, já que antes havia sido observado tratar-se de um dos hidrogênios próximos a um dos grupos hidroxilas. Fixando-se por sua vez no H(3), observa-se que além da interação com o H(4), há outros dois vizinhos que são os H(2) em  $\delta$  1,509 e 1,722 ppm. Cada um por sua vez, interage com os H(1) em  $\delta$  1,336 e 1,848 ppm. A partir do H(5), seguindo a linha contínua vertical em  $\delta$  1,832 ppm, deveria ser demonstrado três interações, porém somente duas são observadas em  $\delta$  1,439 ppm (correspondendo ao H(4 $\beta$ )) e em  $\delta$  0,97-0,99 ppm. Este último sinal integra por dois no espectro de  $^1\text{H}$  e deveria corresponder aos H(6 $\alpha$ ) e H(6 $\beta$ ). Correlações destes hidrogênios são demonstradas através de uma linha contínua horizontal com os sinais em  $\delta$  1,561 e 1,457 ppm (linhas verticais pontilhadas), os quais devem corresponder aos H(7 $\beta$ ) e H(7 $\alpha$ ). Estas interações são visualizadas na Figura

5.22. O assinalamento das posições  $\alpha$  e  $\beta$  foram feitas a partir dos experimentos Noesy, os quais evidenciam interações entre a metila C(18)H<sub>3</sub> com o H(7) em  $\delta$  1,561 e o H(5) com o outro H(7) em  $\delta$  1,457 ppm. Partindo-se do H(11), observa-se em  $\delta$  4,195 ppm, interação com outros três sinais, correspondentes aos H(12) em  $\delta$  2,086 e 1,722 ppm e ao H(9) em  $\delta$  1,483 ppm. Dos H(12) se chega ao H(13) em  $\delta$  2,708 ppm (Figura 5.21).

O terceiro fragmento é representado pelos C15-C16, cuja posição deste segundo carbono é feita a partir do experimento J-resolvida (HOM2DJ), no qual permite a identificação das posições do H(16) em  $\delta$  5,445 e H(24) em  $\delta$  5,072 ppm. Uma vez definida estas posições, é possível então identificar os H(15) em  $\delta$  1,972 e 1,107 ppm.

No quarto fragmento, parte-se do H(24) já identificado, levando aos H(23) em  $\delta$  1,906 e 1,874 ppm e aos H(22) em  $\delta$  2,340 e 2,047 ppm. Assim como ocorre na molécula de helvolato, o H(24) apresenta acoplamento a quatro ligações com as metilas em C26 e C27 em  $\delta$  1,471 e 1,527 ppm, respectivamente. Estas interações são devido a presença de dupla ligação, fazendo com que estas metilas se localizem em distintas posições.

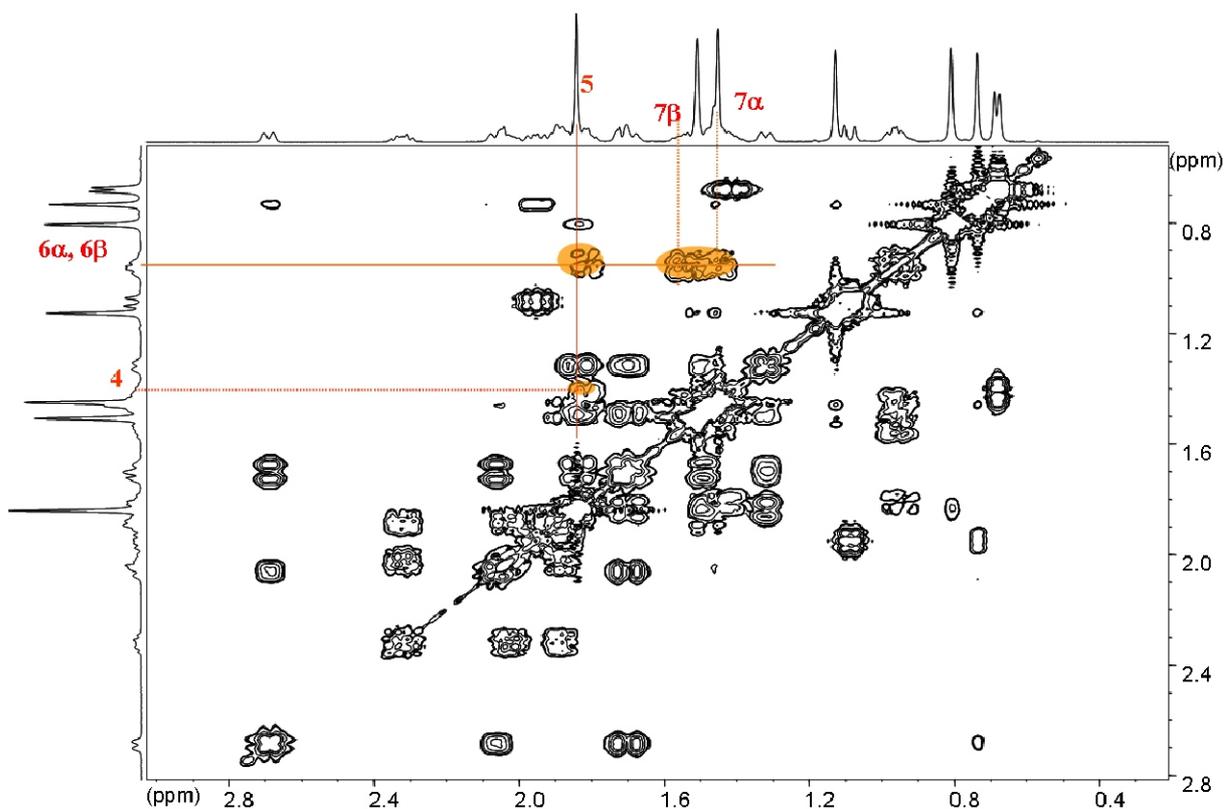
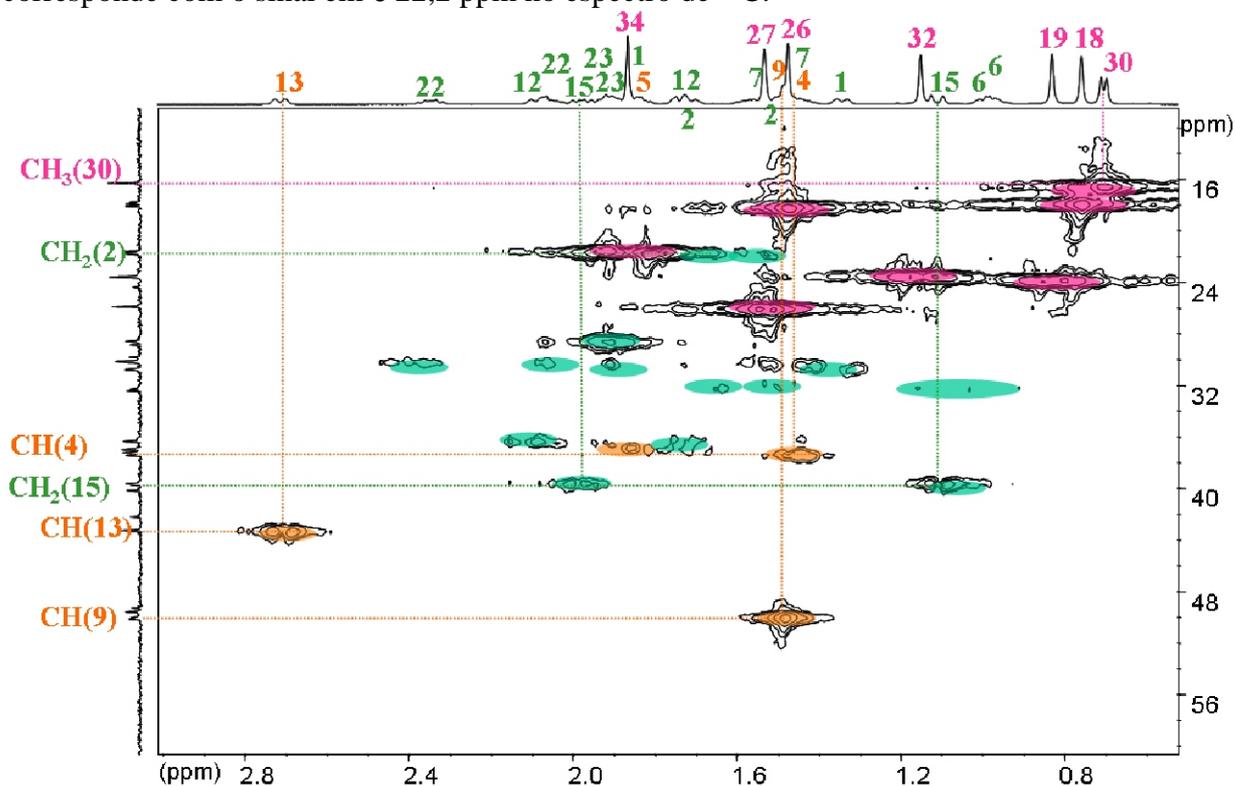


Figura 5.22 - Espectro bidimensional COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do fusidato de sódio 10mM, em D<sub>2</sub>O.

Para assinalamento das metilas restantes, as interações a mais de três ligações também foram avaliadas no espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. A metila C(18)H<sub>3</sub> é assinalada a partir das interações H(15)-H(18) e H(13)-(18), localizando-a em  $\delta$  0,756 ppm. A metila C(19)H<sub>3</sub> em  $\delta$  0,827 ppm pela interação H(1)-(19) e a C(32)H<sub>3</sub> em  $\delta$  1,147 ppm, a partir das interações H(7)-(32) e H(9)-(32).

### *Espectro bidimensional de correlação de deslocamentos heteronucleares $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$*

No espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Figura 5.23), é possível identificar facilmente os grupos metila, os quais aparecem na tonalidade rosa. Estão sendo representados também alguns dos carbonos secundários em verde e terciários em laranja. Como exemplos, a metila C(30)H<sub>3</sub> no espectro monodimensional de hidrogênio em  $\delta$  0,702 ppm, corresponde a um carbono primário, segundo os DEPT, com um deslocamento de 16.8 ppm. Da mesma forma, o H(4) em  $\delta$  1,439 ppm, relaciona-se com um sinal no espectro  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  37,9 ppm, correspondente a um carbono terciário. O C(2)H<sub>2</sub> em  $\delta$  1,509 e 1,722 ppm no espectro de  $^1\text{H}$ , corresponde com o sinal em  $\delta$  22,2 ppm no espectro de  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 5.23** - Espectro de correlação  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  do fusidato de sódio 10mM, em D<sub>2</sub>O.

*Espectro Bidimensional Homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (2D) J - resolvida (HOM2DJ)*

Através da representação dos deslocamentos químicos em um dos eixos e as multiplicidades dos sinais (acoplamentos J) em outro, é possível discernir entre aqueles sinais que ainda apresentam alguma dúvida. É o caso dos hidrogênios situados nos carbonos 16 e 24 (Figura 5.24).

Se analisar a vizinhança do H(16), tem-se como vizinhos os dois hidrogênios do C(15). Conforme os ângulos, vai mostrar uma constante de acoplamento (J) diferente com cada um. Terá uma constante (J) grande, ao redor de 8Hz, com o hidrogênio no qual forma um ângulo aproximado de  $20^\circ$  e uma constante pequena, por volta de 2Hz, com o que forma um ângulo em torno de  $90^\circ$ . Segundo a estrutura do fusidato de sódio, o H(16) pode apresentar somente uma interação com os hidrogênios H(22), os quais situam-se na cadeia lateral, o que dá lugar a uma constante (J) de aproximadamente 1 Hz. O sinal do H(16) deverá ser o dublete que aparece em primeiro lugar, sendo na realidade um dublete de quadriplete que não aparece bem definido. Descarta-se então que o primeiro sinal do espectro monodimensional de hidrogênio corresponde ao H(24), como nos indica os deslocamentos teóricos de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$ . Em uma mesma análise em relação à vizinhança do H(24), observa-se que vai interacionar com os H(23), com uma constante de acoplamento (J) entre 8-6 Hz, e com os hidrogênios do carbono 22 com um J em torno de 2Hz e outro ao redor de 1Hz. Portanto, pode-se concluir que o sinal que aparece em primeiro lugar, a um  $\delta$  de 5,445 ppm corresponde ao H(16) e o que aparece em  $\delta$  5,072 ppm ao H(24).

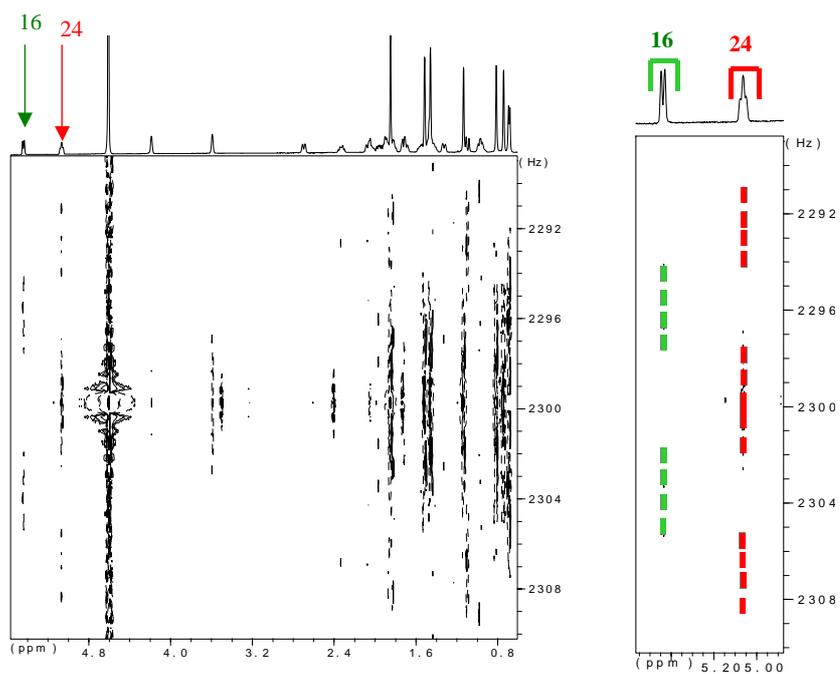


Figura 5.24 - Espectro J-resolvida do fusidato de sódio 10mM, em D<sub>2</sub>O.

### *Espectro bidimensional NOESY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H*

Este experimento permite o estudo das interações espaciais por proximidade entre os distintos hidrogênios de uma dada molécula. Pode-se diferenciar entre os hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  da molécula de fusidato de sódio, por exemplo para a metila C(18 $\beta$ )H<sub>3</sub> com 7( $\beta$ ) em  $\delta$  1,561 ppm e o H(5 $\alpha$ ) com 7( $\alpha$ ) em  $\delta$  1,457 ppm (Figura 5. 25).

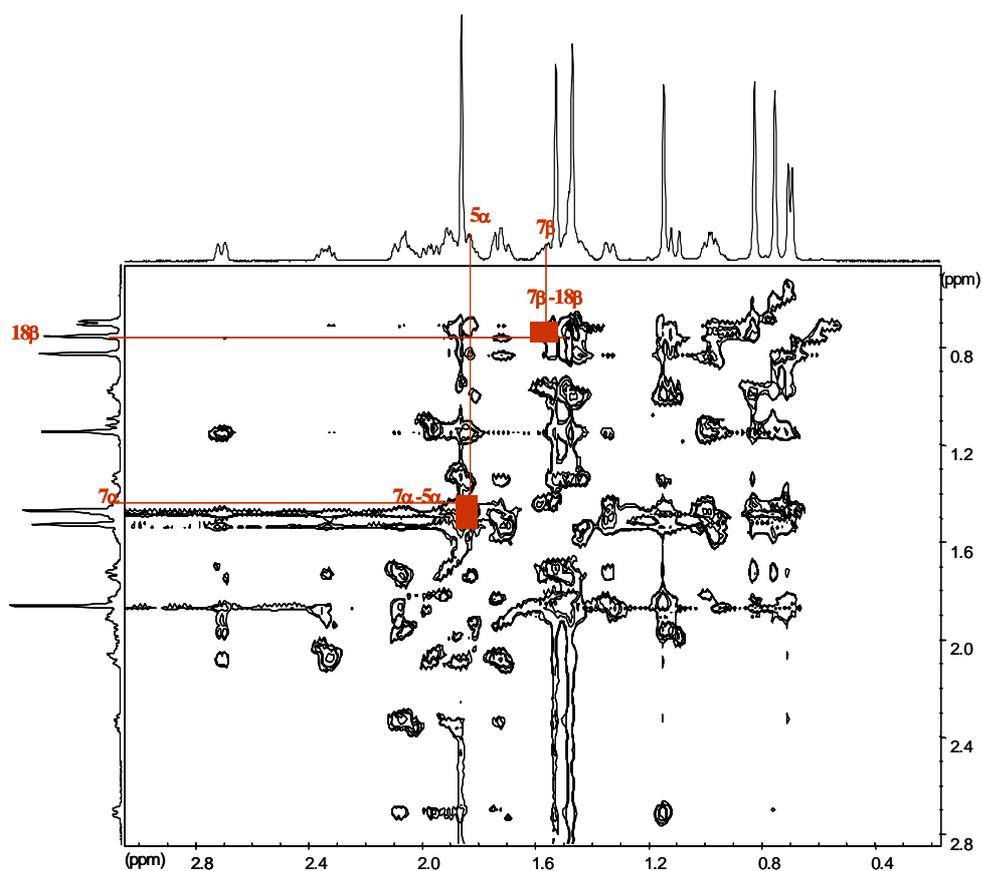


Figura 5.25 - Espectro Noesy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do fusidato de sódio 10mM, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

A partir dos experimentos de RMN monodimensionais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT e bidimensionais  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, de correlação  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , Noesy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e J-resolvida e segundo estimativas teóricas de deslocamento químico dos carbonos quaternários, pode-se realizar o assinalamento total da molécula de fusidato de sódio, sendo apresentados na Tabela 5.7.

**Tabela 5.7** - Deslocamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do Fusidato de sódio 10mM, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
1 $\alpha$	1,848	31,2
1 $\beta$	1,336	
2 $\alpha$	1,509	22,2
2 $\beta$	1,722	
3 $\beta$	3,602	73,3
4 $\beta$	1,439	37,9
5 $\alpha$	1,832	37,6
6 $\alpha$	0,988	32,8
6 $\beta$	0,977	
7 $\alpha$	1,457	32,7
7 $\beta$	1,561	
8	----	40,6
9 $\beta$	1,483	50,5
10	----	30,2
11 $\beta$	4,195	69,9
12 $\alpha$	2,086	36,8
12 $\beta$	1,722	
13 $\alpha$	2,708	43,7
14	----	49,9
15 $\alpha$	1,972	40,1
15 $\beta$	1,107	
16 $\beta$	5,445	77,1
17	----	147,0
18	0,756	18,4
19	0,827	24,0
20	---	138,3
21	---	180,6
22	2,340	30,6
	2,047	
23	1,906	28,9
	1,874	
24	5,072	125,4
25	-----	135,1
26	1,471	18,5
27	1,527	26,3
30	0,702	16,8
32	1,147	24,0
33	-----	176,1
34	1,861	22,0

### 5.2.3 - CHAPS

Tendo em vista as estimativas teóricas de  $^{13}\text{C}$  (Programa ChemOffice 6,0), pode-se assinalar alguns dos carbonos, como o C(24) pertencente ao grupo amida, com um valor de  $\delta$  teórico de 174,7 ppm. Os terciários C(3), C(7) e C(12), que por estarem localizados próximos a grupos hidroxilas, apresentam valores de  $\delta$  teóricos de 68,9, 71,9 e 82,0 ppm, respectivamente. Os secundários C(27) ( $\delta$  63,1) e C(28) ( $\delta$  64,0), e primários C(31) ( $\delta$  47,5) e C(32) ( $\delta$  47,5), pertencentes à cadeia lateral e próximos ao íon nitrônio, deslocando-os para campo baixo, por efeito de desblindagem eletrônica (Figura 5.26).

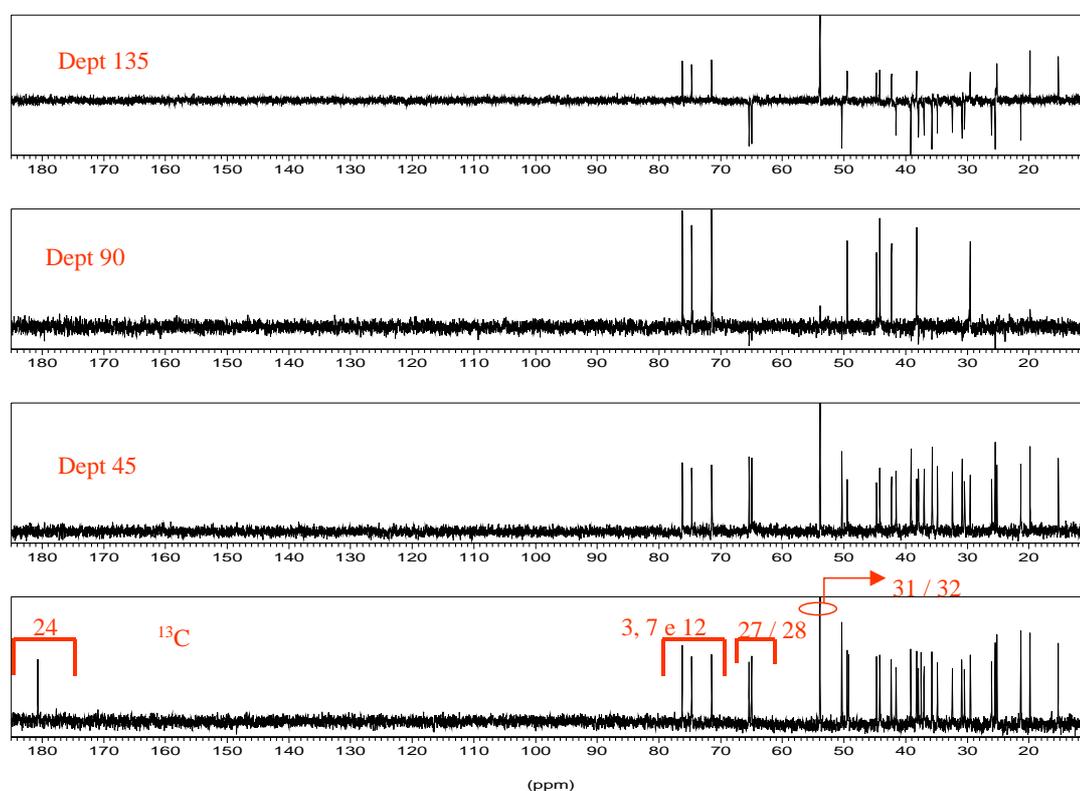


Figura 5.26 - Espectros monodimensionais do CHAPS 10mM: (a) DEPT 135; (b) DEPT 90; (c) DEPT 45; (d)  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz.

#### *Espectro Monodimensional de $^1\text{H}$*

Pelas estimativas teóricas de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (Programa ChemOffice 6.0), integração e acoplamentos, pode-se situar a posição de alguns hidrogênios, como o que se observa na Figura 5.27. Os H(3), H(7) e H(12) com  $\delta$  teóricos de 3,21, 3,20 e 3,19 ppm

respectivamente, localizando-os mais à esquerda do espectro por influência de grupos hidroxilas, estando um destes separado e coincidindo com algum pertencente à cadeia lateral. Os hidrogênios H(25) ( $\delta$  3,20), H(27) ( $\delta$  3,24), H(28) ( $\delta$  3,24), H(30) ( $\delta$  3,41), assim como as metilas C(31)H<sub>3</sub> ( $\delta$  3,30) e C(32)H<sub>3</sub> ( $\delta$  3,30) pertencentes à cadeia lateral e próximos aos grupos amida, sulfato e nitrônio, vão estar deslocados em campo baixo. Pela integração dos sinais, o que está em torno de 3,3 ppm, permite pensar que é um dos hidrogênios próximos ao grupo hidroxila e coincide com algum pertencente à cadeia lateral. As metilas C(18)H<sub>3</sub>, C(19)H<sub>3</sub> e C(21)H<sub>3</sub> com  $\delta$  teóricos de 1,16, 1,16 e 1,06 ppm respectivamente, com o dublete em torno de 0,80 ppm justifica os hidrogênios do C(21)CH<sub>3</sub>.

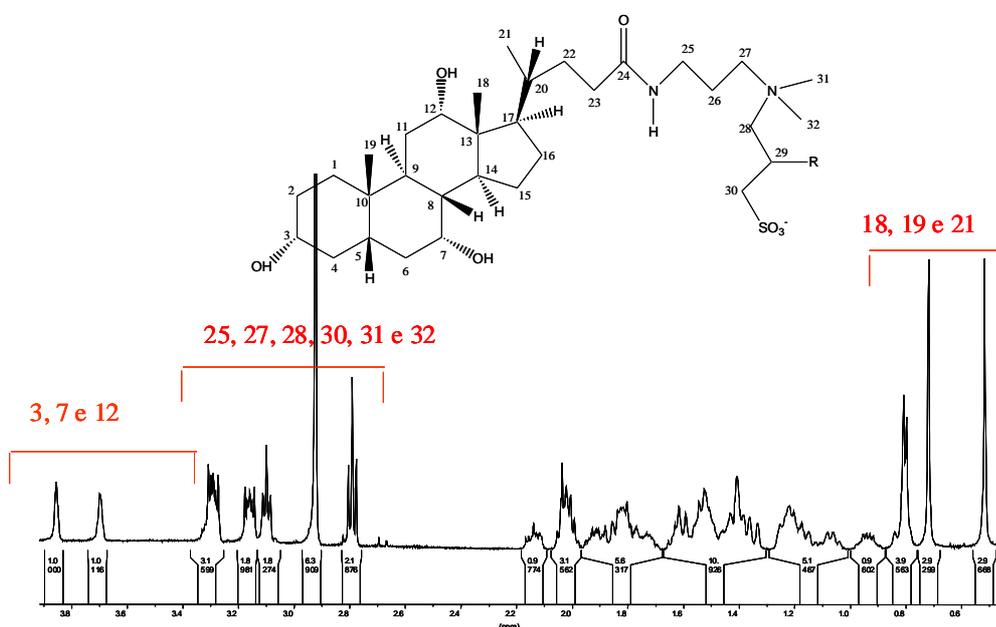


Figura 5.27 - Espectro de <sup>1</sup>H do CHAPS 10mM em D<sub>2</sub>O, 500 MHz.

### Espectro Bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY

Para efeito de estudo, a molécula é dividida em cinco fragmentos, dos quais o primeiro corresponde à porção constituída pelos C(12), C(11) e C(9). No espectro bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Figuras 5.28 e 5.29), observa-se que o H(12) em 3,855 ppm, apresenta apenas duas interações, os quais posicionam os H(11) em  $\delta$  1,383 e 1,415 ppm. Dos H(11) se vai ao H(9) com  $\delta$  em 1,922 ppm.

A segunda porção corresponde aos C(6), C(7) e C(8), onde a partir do H(7) em  $\delta$  3,697 ppm, vai posicionar os H(6) em  $\delta$  1,784 e 1,345 ppm e o H(8) em  $\delta$  1,408 ppm. Do H(6) se chega ao H(5) em  $\delta$  1,242 ppm.

O ponto de partida do terceiro fragmento em  $\delta$  3,302 ppm é o H(3), que parece coincidir com sinais pertencentes à cadeia lateral e teoricamente deveria conter quatro interações, os correspondentes aos H(2) e H(4). Dos quatro sinais de interação na direção do H(3), um corresponde à cadeia lateral e os outros aos H(2) em  $\delta$  1,161 e 1,452 ppm e aos H(4) em  $\delta$  1,502 e 1,868 ppm. Dos H(2) se vai aos H(1) em  $\delta$  1,601 e 0,820 ppm e dos H(4) se chega ao H(5) em  $\delta$  1,242 ppm, já identificado.

O quarto fragmento se origina do H(8) já assinalado em  $\delta$  1,408 ppm. No espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figura 5.29) observa-se que da interação 8-14 com o H(14) em  $\delta$  1,625 ppm, se chega aos H(15) em  $\delta$  1,521 e 0,935 ppm. Destes é possível localizar os H(16) em  $\delta$  1,728 e 1,073 ppm e o H(17) em  $\delta$  1,534 ppm. Das metilas com valores de estimativas teóricas de  $^1\text{H}$  à campo alto, estão as C(18)H<sub>3</sub>, C(19)H<sub>3</sub> e C(21)H<sub>3</sub>, onde esta última seria o dublete em  $\delta$  0,802 ppm. Do 21 se vai ao H(20) em  $\delta$  1,219 ppm e aos H(22) e H(23) respectivamente situados em  $\delta$  1,188 e 1,552 e 2,012 e 2,138 ppm. Uma interação a quatro ligações na direção do C(18)H<sub>3</sub> com o H(17), vai situar este último em  $\delta$  1,534 ppm, confirmando também a posição das metilas 18 ( $\delta$  0,516 ppm) e 19 ( $\delta$  0,719 ppm).

Para definição da cadeia lateral, primeiramente se faz uma importante observação, que é o fato de que a cadeia apresenta uma certa rigidez até o grupo amida e a partir do C(25) gira livremente, fazendo com que os hidrogênios dos C(25), C(26), C(27), C(28), C(29) e C(30) se situem numa mesma região. Por comparação com a molécula CHAPSO, pode-se definir distintamente dois grupos: C(25), C(26) e C(27) e outro constituído pelos C(28), C(29) e C(30). Para definição dos CH<sub>2</sub> 28 ou 30 e 25 ou 27, uma análise das estimativas teóricas de  $^{13}\text{C}$ , juntamente com os espectros de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY e correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -, definem os  $\delta$  dos CH<sub>2</sub> em 3,0990 ppm H(25), 1,821 ppm H(26), 3,159 ppm H(27), 3,290 ppm H(28), 2,021 ppm H(29) e 2,790 ppm H(30). As metilas C(31)H<sub>3</sub> e C(32)H<sub>3</sub> são representadas pelo singlete em  $\delta$  2,923 ppm, posição esta definida através das estimativas de  $^1\text{H}$  e integração. Os CH<sub>2</sub>

H(25), H(27), H(28) e H(30) pertencentes à cadeia lateral, assim como as metilas C(31)H<sub>3</sub> e C(32)H<sub>3</sub>, são visualizados no espectro de correlação <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (Figura 5.30).

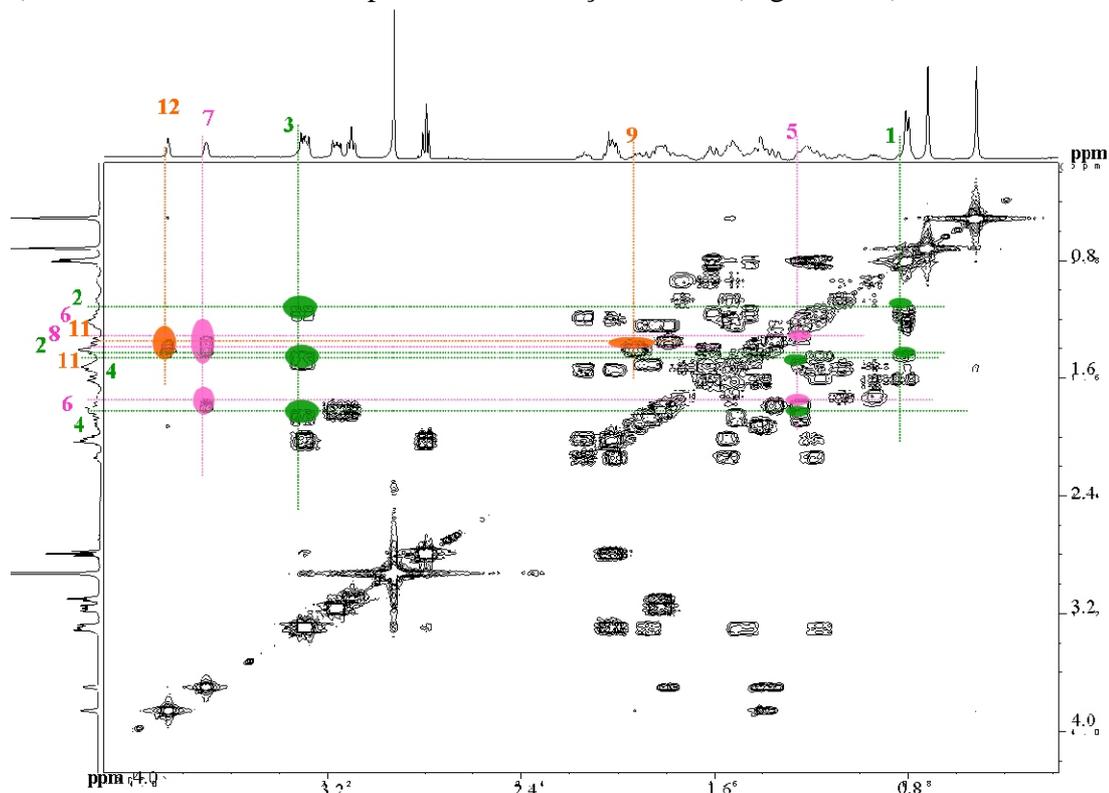


Figura 5.28 - Espectro bidimensional de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY do CHAPS 10mM, em D<sub>2</sub>O.

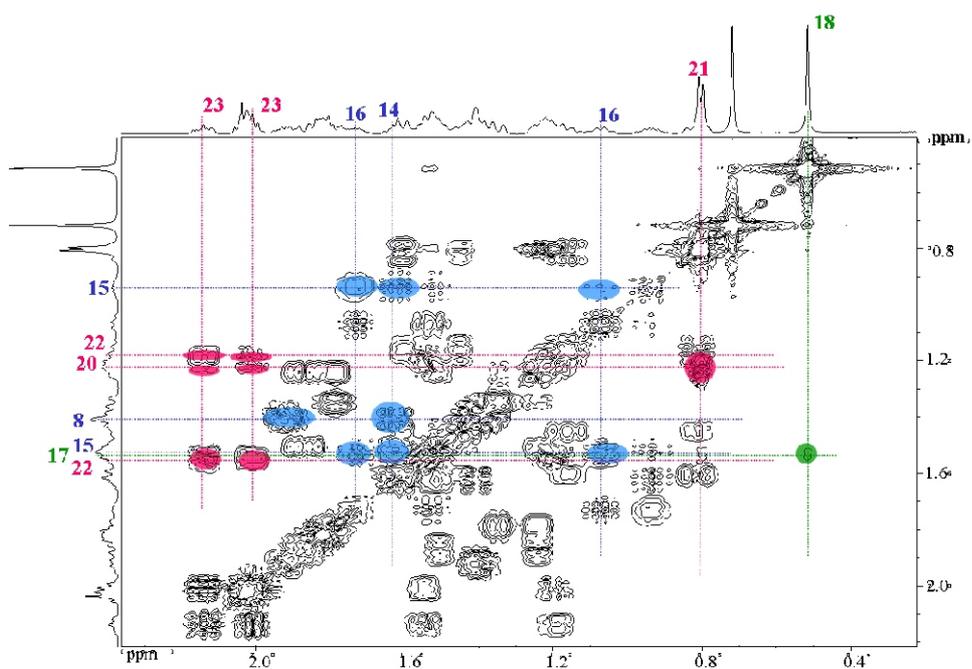
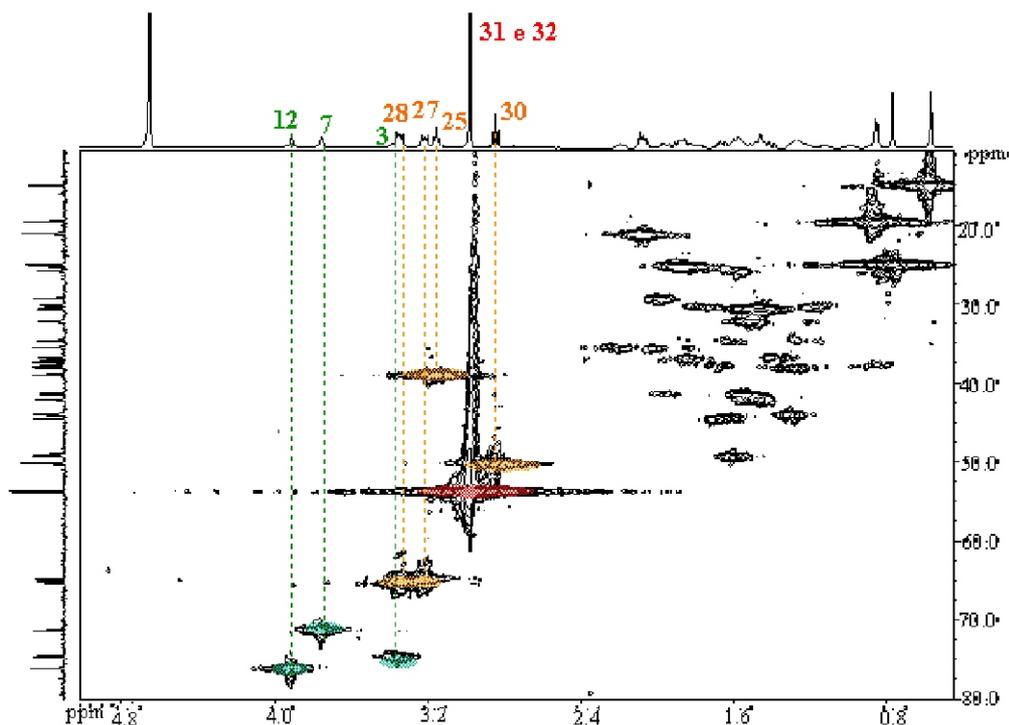


Figura 5.29 - Espectro parcial bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY do CHAPS 10mM, em D<sub>2</sub>O.

*Espectro bidimensional de correlação de deslocamentos heteronucleares  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ .*

Pode-se observar no espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Figura 5.30), se os sinais assinalados no espectro  $^1\text{H}$ -RMN, correspondem aos respectivos átomos de carbono, demonstrando assim tratar-se de carbono primário ( $\text{CH}_3$ ), secundário ( $\text{CH}_2$ ) ou terciário ( $\text{CH}$ ), como o que está sendo demonstrado para os grupos  $\text{CH}$  C(3), C(7) e C(12), os  $\text{CH}_2$  C(25), C(27), C(28) e C(30) e as metilas C(31) $\text{H}_3$  e C(32) $\text{H}_3$ .



**Figura 5.30** - Espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do CHAPS 10 mM, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

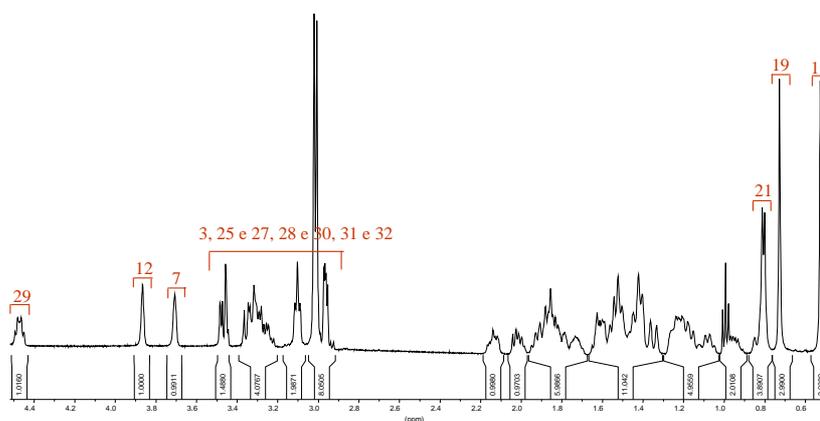
#### 5.2.4 - CHAPSO

*Espectros monodimensionais de  $^{13}\text{C}$ , DEPT e  $^1\text{H}$ .*

A diferença entre as moléculas CHAPS e CHAPSO, é que esta última apresenta em sua estrutura, um grupo hidroxila no C(29) pertencente à cadeia lateral. Isto faz com que apareça um novo sinal em campo baixo. No experimento monodimensional de  $^{13}\text{C}$  e DEPT, o

C(29) vai estar localizado em  $\delta$  65,7 ppm. Nesta mesma região do espectro, aparecem os sinais referentes aos carbonos C(3), C(7) e C(12), cujos valores de  $\delta$  são os mesmos em ambas moléculas, respectivamente em  $\delta$  74,6, 71,4 e 76,2 ppm. Os carbonos C(27) e C(28) também em campo baixo, apresentam alguma diferença nos valores de deslocamento químico, cujos  $\delta$  são 66,4 e 70,1 ppm, respectivamente.

O espectro monodimensional de  $^1\text{H}$  (Figura 5.31), mostra os H(3), H(7), H(12) e H(29) mais à esquerda do espectro, este último diferenciando-se dos outros devido à proximidade com o grupo hidroxila e outros grupos funcionais pertencentes à cadeia lateral, que o desloca para altos valores de deslocamento. Assim como na molécula CHAPS, os hidrogênios H(25), H(27), H(28) e H(30) e as metilas C(31)H<sub>3</sub> e C(32)H<sub>3</sub> pertencentes à cadeia lateral, também são levados em campo baixo. Porém, ocorrem certas variações no valor de  $\delta$ , principalmente nos próximos ao grupo hidroxila C(29), como é o caso dos hidrogênios H(28) e H(30). Diferente do que ocorre no CHAPS, a molécula de CHAPSO mostra desdobramento dos sinais referentes aos C(28)CH<sub>2</sub>, situando-os em distintas posições. Como na estrutura CHAPS, as metilas com valores de estimativa de  $^1\text{H}$  em campo alto, são as metilas C(18)H<sub>3</sub>, C(19)H<sub>3</sub> e C(21)H<sub>3</sub>, onde esta última seria o dublete em torno de 0,80 ppm.



**Figura 5.31** - Espectro monodimensional de  $^1\text{H}$  do CHAPSO 10mM, em D<sub>2</sub>O, 500 MHz.

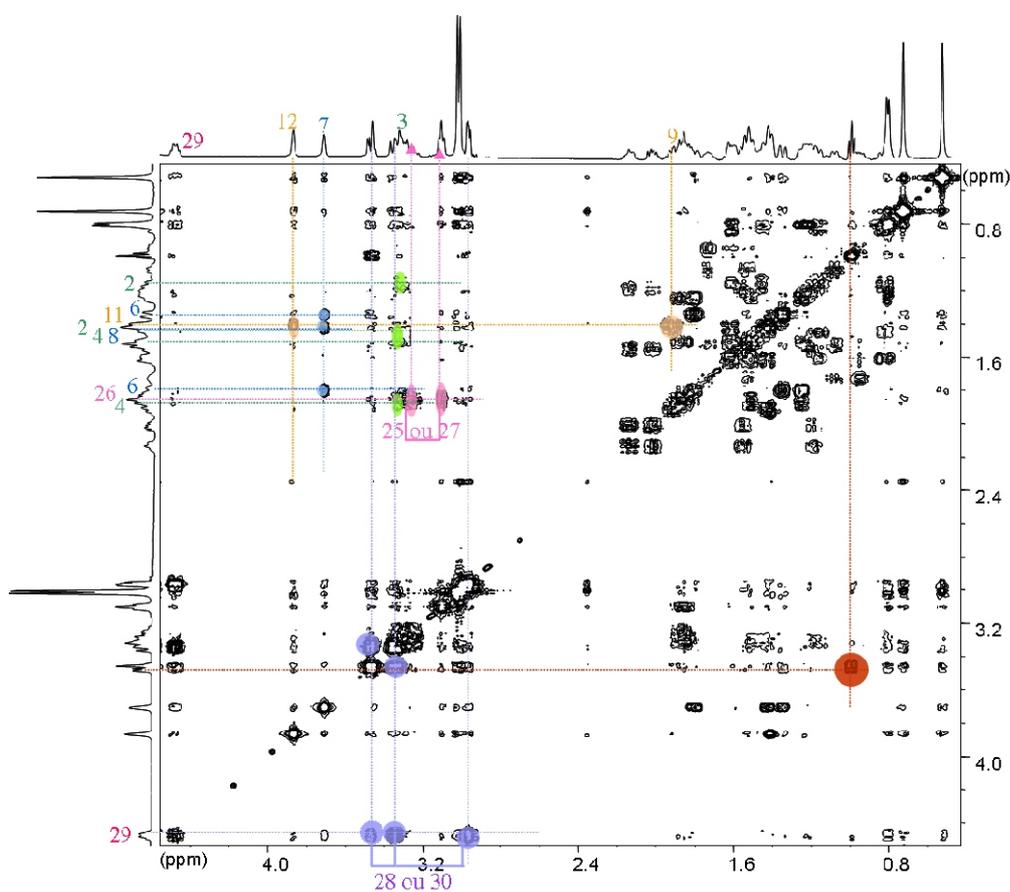
### *Espectro Bidimensional $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY*

O espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Figura 5.32) referente à molécula CHAPSO, apresenta sinais falsos, devido ao aparecimento de muito ruído. Por comparação com o espectro CHAPS, é possível identificar aquelas que são as verdadeiras interações, como o que se observa com os sinais referentes aos hidrogênios H(3), H(7), H(12) e H(29).

Na direção do H(12) em  $\delta$  3,865 ppm, identifica-se um sinal de interação significativo que poderá levar aos H(11), em  $\delta$  1,413 e 1,403 ppm, que por sua vez leva ao H(9) em  $\delta$  1,919 ppm. A interação H(11)-(9) coincide com a H(8)-(9), levando ao H(8) em  $\delta$  1,422 ppm.

O H(7) em  $\delta$  3,706 ppm, vai apresentar interação com os H(6) em  $\delta$  1,347 e 1,799 ppm e com o H(8), já identificado.

Aqui também ocorre sobreposição do H(3) com os hidrogênios pertencentes aos CH<sub>2</sub> da cadeia lateral. Em sua direção em  $\delta$  3,309 ppm, observam-se sinais de interação com os H(2) em  $\delta$  1,161 e 1,447 e com os H(4) em 1,864 e 1,503 ppm.



**Figura 5.32** - Espectro bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY do CHAPSO 10mM, em D<sub>2</sub>O.

A hidroxila no C29 na molécula CHAPSO, permite diferenciar dois grupos distintos: C(25), C(26) e C(27) e outro, constituído pelos C(28), C(29) e C(30). O novo sinal em campo baixo, que vai corresponder ao hidrogênio do C29(OH), vai apresentar interação com o segundo grupo. Por comparação, pode-se então definir perfeitamente a posição dos

hidrogênios pertencentes aos carbonos 29 ( $\delta$  4,473 ppm) e 26 ( $\delta$  1,854 ppm), os quais serão os pontos intermédios para cada um destes grupos (Figura 5.32).

Devido à proximidade do grupo –OH no C(29), os CH<sub>2</sub> C(25), C(27), C(28) e C(30) pertencentes à cadeia lateral, apresentam certa diferença nos valores de deslocamento químico quando comparados à molécula CHAPS, situando-se respectivamente em  $\delta$  3,103 H(25),  $\delta$  3,261H(27),  $\delta$  3,457 e 3,340 H(28) e  $\delta$  2,963 H(30) ppm. No caso dos H(28), o desdobramento em distintos sinais, se deve a maior proximidade com o grupo –OH, diferenciando-se da molécula CHAPS.

Entre 3,4 e 3,5 ppm e entre 0,9 e 1,0 ppm (Figura 5.32), têm-se sinais correspondentes a uma impureza de etanol, cujas integrações de 0,4 e 1,0 correspondem a um quadruplete (CH<sub>2</sub>) e a um triplete (CH<sub>3</sub>) desta molécula. As estimativas de <sup>1</sup>H confirmam as zonas de aparecimento destes sinais correspondentes ao CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> do etanol.

#### *Espectro bidimensional de correlação de deslocamentos heteronucleares <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H*

No espectro de correlação <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (Figura 5.33), procura-se identificar e confirmar os carbonos, os quais estão sendo representados alguns dos primários em azul, secundários em verde e terciários em rosa. Como exemplos, o C(15)H<sub>2</sub> no espectro monodimensional de hidrogênio em  $\delta$  0,950 e 1,515 ppm, corresponde a um carbono secundário, segundo os DEPT, com um deslocamento de 25,9 ppm. Da mesma forma, o C(16)H<sub>2</sub> em  $\delta$  1,731 e 1,080 ppm, relaciona-se com um sinal no espectro <sup>13</sup>C em  $\delta$  30,3 ppm. O CH(20) em  $\delta$  1,213 ppm no espectro de <sup>1</sup>H, corresponde com o sinal em  $\delta$  38,0 ppm no espectro de <sup>13</sup>C. Assim, os CH(14) e CH(17) respectivamente em  $\delta$  1,619 e 1,533 ppm no espectro de <sup>1</sup>H, correspondem com os sinais em  $\delta$  44,6 e 49,4 ppm respectivamente, no espectro de <sup>13</sup>C.

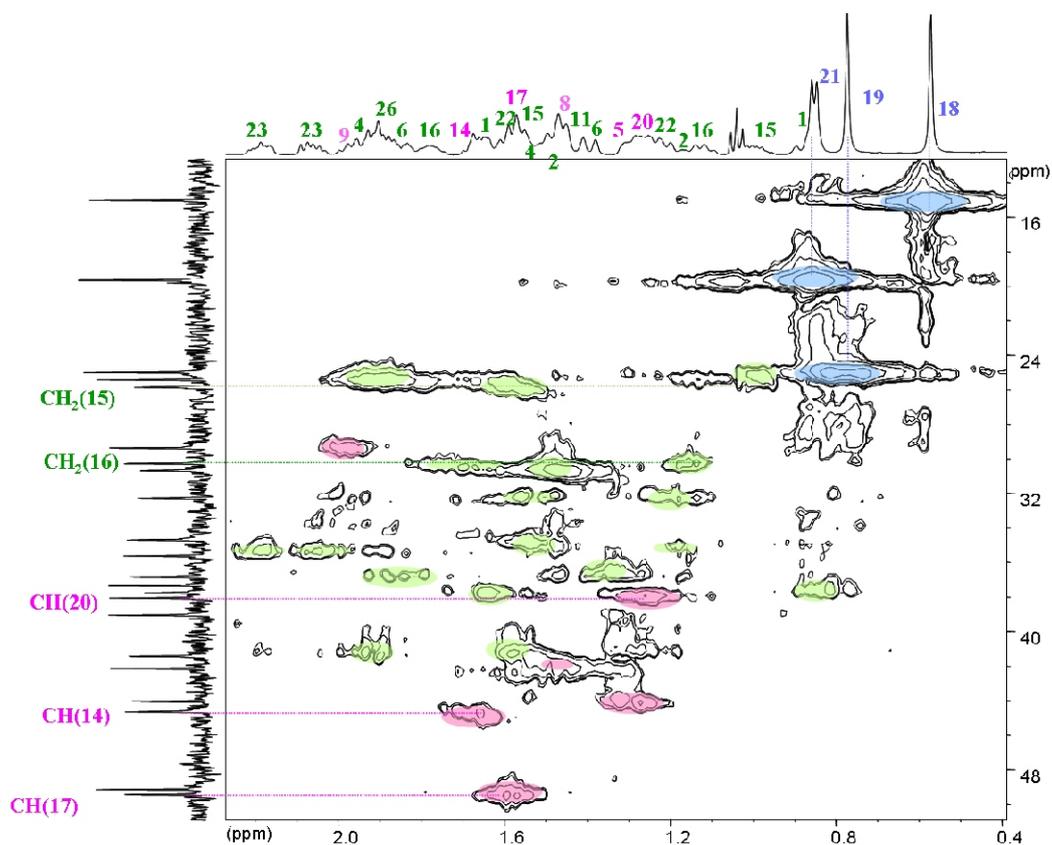


Figura 5.33 - Espectro de correlação  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  do CHAPSO 10mM, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

O assinalamento dos carbonos quaternários foram obtidos a partir dos  $\delta$  teóricos. A Tabela 5.8 traz os valores dos deslocamentos químicos dos compostos CHAPS e CHAPSO com os experimentos de RMN mono ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT) e bidimensionais ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY e de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).

**Tabela 5.8** - Deslocamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do CHAPS e CHAPSO 10mM, em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 5-6.

Localização	CHAPS		CHAPSO	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1 $\alpha$	1,601	37,8	1,608	37,7
1 $\beta$	0,820		0,832	
2 $\alpha$	1,161	32,3	1,161	34,7
2 $\beta$	1,452		1,447	
3 $\beta$	3,302	74,6	3,309	74,6
4 $\alpha$	1,868	41,4	1,864	41,4
4 $\beta$	1,502		1,503	
5 $\beta$	1,242	44,1	1,250	44,0
6 $\alpha$	1,345	36,9	1,347	36,8
6 $\beta$	1,784		1,799	
7 $\beta$	3,697	71,3	3,706	71,4
8 $\beta$	1,408	42,2	1,422	42,1
9 $\alpha$	1,922	29,4	1,919	29,4
10	---	37,4	---	37,3
11	1,383		1,403	
11	1,415	30,7	1,413	30,7
12 $\beta$	3,855	76,1	3,865	76,2
13	---	49,1	---	49,1
14 $\alpha$	1,625	44,6	1,619	44,6
15 $\alpha$	0,935	25,9	0,950	25,9
15 $\beta$	1,521		1,515	
16 $\alpha$	1,728	30,3	1,731	30,3
16 $\beta$	1,073		1,080	
17 $\alpha$	1,534	49,3	1,533	49,4
18	0,516	15,1	0,525	15,0
19	0,719	25,0	0,727	25,0
20	1,219	38,1	1,213	38,0
21	0,802	19,7	0,806	19,7
22	1,188		1,178	
22	1,552	34,7	1,554	32,3
23	2,012		2,020	
23	2,138	35,6	2,137	35,6
24	---	180,8	---	180,8
25	3,099	39,0	3,103	39,0
26	1,821	25,3	1,854	25,4
27	3,159	64,9	3,261	66,4
28	3,290	65,3	3,457	70,1
			3,340	
29	2,021	21,2	4,473	65,7
30	2,790	50,2	2,963	58,2
31	2,923		3,020	
31		53,8		55,1
32			3,006	54,9

### 5.2.5 - Espectros de RMN de $\beta$ - e $\gamma$ -CD

É importante conhecer-se os deslocamentos químicos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , tanto do hóspede (fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS ou CHAPSO) quanto

das ciclodextrinas ( $\beta$ - e  $\gamma$ -CD), para poder estudar a partir destes, os deslocamentos que sofrem uma e a outra molécula envolvidas no processo de complexação.

A forma do espectro da  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD são iguais, uma vez que são constituídas por unidades de glicopiranosose, com diferença apenas nas integrações, reflexo do número de unidades constituintes.

Para o assinalamento dos hidrogênios da ciclodextrina, faz-se uso do programa “Chem Office 6,0”, conforme estimativas teóricas dos deslocamentos químicos e forma dos sinais. De acordo com a Figura 5.34, observado para o caso da  $\beta$ -CD em presença de helvolato de potássio, o sinal que aparece em torno de  $\delta$  4,86 corresponde ao  $H_{CD1}$ , o qual se apresenta como um dublete.

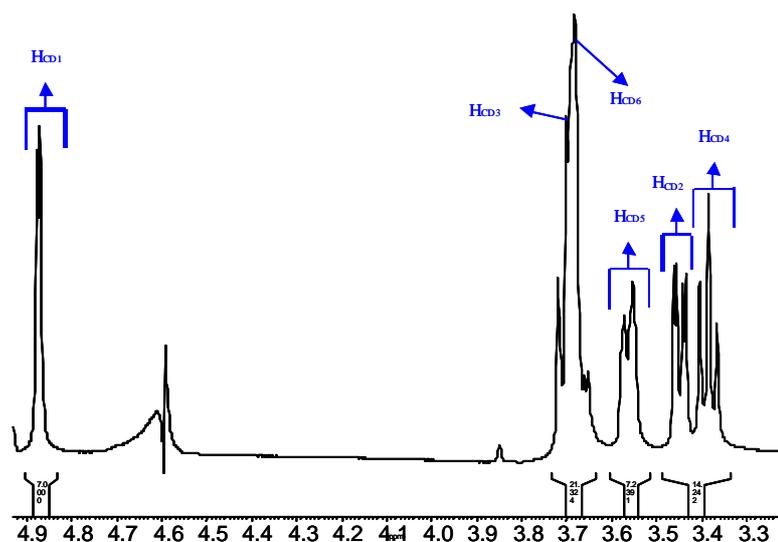
O  $H_{CD2}$  em torno de  $\delta$  3,43 e em posição axial, apresenta uma constante de acoplamento com o  $H_{CD1}$  em posição equatorial, diferente da constante de acoplamento com o  $H_{CD3}$  em posição axial. Portanto, o que se espera para este sinal é um duplo dublete, o qual integra por 1.

O  $H_{CD3}$  por volta de  $\delta$  3,73 e em posição axial, possui dois vizinhos ( $H_{CD4}$  e  $H_{CD2}$ ), ambos em posição axial, portanto as constantes de acoplamento são aproximadamente iguais e o sinal deveria aparecer como um triplete.

O  $H_{CD4}$  próximo de  $\delta$  3,47 e em posição axial, possui dois vizinhos na mesma situação ( $H_{CD3}$  e  $H_{CD5}$ ), portanto o sinal também se manifesta como um triplete, e que integra por 1. O  $H_{CD3}$  e  $H_{CD4}$  deveriam ambos apresentar-se como triplete, porém segundo estimativa teórica, o que está situado a valores mais baixos de deslocamento supõe-se tratar-se do  $H_{CD4}$ .

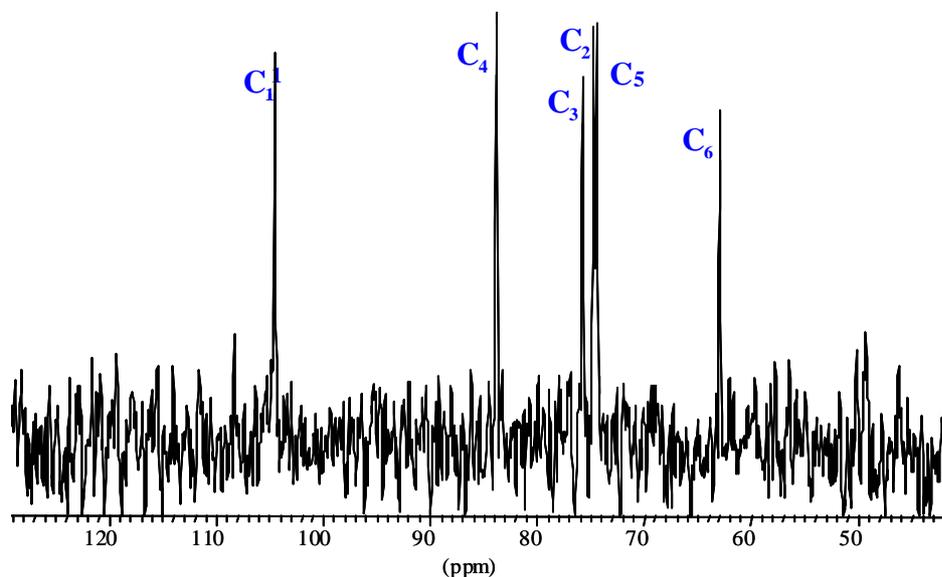
O  $H_{CD5}$  em torno de  $\delta$  3,55 e em posição axial, possui três vizinhos, sendo dois deles os  $H_{CD6}$  e o outro seria o  $H_{CD4}$ . Sendo distintas as constantes de acoplamento  $J^3H_5-H_6$  e  $J^3H_5-H_4$ , o sinal esperado seria um duplo dublete.

O  $H_{CD6}$  em torno de 3,67 apresenta somente um vizinho e estes integram por 2. Este sinal se encontra sobreposto com o sinal correspondente ao  $H_{CD3}$ , cujo conjunto integra por 3.



**Figura 5.34** - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da  $\beta$ -CD em solução (10mM),  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz, com supressão do solvente.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é bastante simples, correspondendo aos seis átomos de carbono da unidade de glicose da ciclodextrina em singletes bem definidos, conforme estimativas teóricas dos deslocamentos químicos e de acordo com os assinalamentos dos átomos de carbono apresentados na Figura 5.35.



**Figura 5.35** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -CD em  $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz.

### 5.3 - Estudo dos Complexos de Inclusão por RMN

A espectroscopia por RMN é considerada uma técnica de relevância nos estudos de complexação, por fornecer informações com relação a composição e estrutura, assim como parâmetros que caracterizam o processo de complexação.

A caracterização das interações hóspede-hospedeiro, através da determinação da estequiometria e da constante de formação do complexo, utiliza técnicas de RMN como uma das mais comuns. Consiste na análise dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) ou hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) pertencentes à molécula hóspede e ciclodextrina, em misturas de diferentes proporções [hóspede]/[CD]. As principais desvantagens no uso destas técnicas, se baseiam no pequeno número de amostras em cada experimento (fornecendo habitualmente menos de dez valores correspondentes a cada núcleo, carbono ou hidrogênio), necessidade de boa resolução devido aos valores de deslocamento químico observados muito próximos durante o processo de complexação e é aplicada somente a hóspedes com alta solubilidade.

Muitos autores têm conduzido à uma análise individual dos deslocamentos químicos de cada um dos núcleos, levando freqüentemente a valores inconsistentes das constantes de formação dos complexos. Deste modo, esta metodologia pode não ser efetiva no caso de misturas com estequiometrias 1:1 e 1:2. Geralmente a análise de apenas um núcleo, não permite a determinação de duas ou mais constantes de associação envolvidas em um único processo de complexação.

Para minimizar alguns destes problemas, faz-se uso da análise global dos dados a qual permite a obtenção de um único valor da constante de equilíbrio, através do estudo do conjunto de dados de todos os núcleos.<sup>160</sup> Esta análise pode ser realizada em um “software” comercial como “Origin 6.0”. A análise global de dados é especialmente relevante no caso de estequiometrias de maior ordem (1:2 ou mais), devido ao grande número de parâmetros e interdependências matemáticas.

### 5.3.1 - Complexos Fusidato de Sódio e Helvolato de Potássio : $\gamma$ -CD

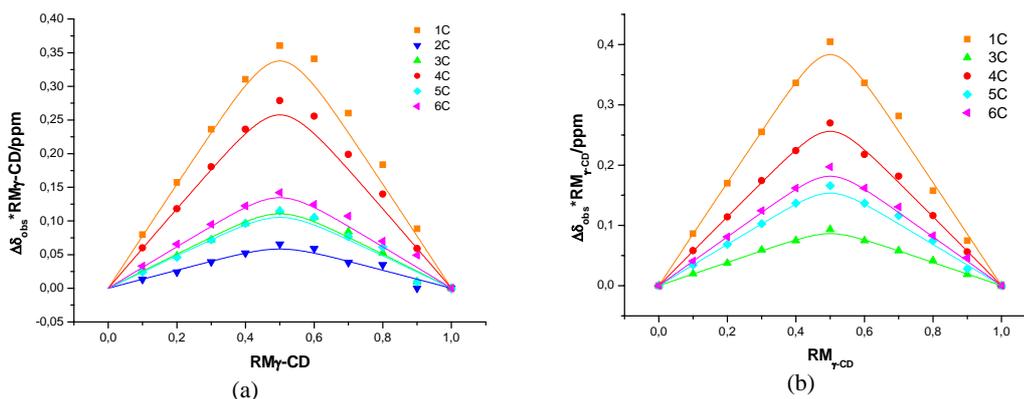
Uma grande variedade de substâncias pertencentes ao grupo dos surfactantes podem formar micelas quando em solução aquosa. Os antibióticos esteroidais, ácidos fusídico e helvólico, contendo estruturas anfifílicas semelhantes aos sais biliares, também possuem a propriedade de formar agregados micelares. Durante os estudos de complexação, é necessário garantir que não ocorra formação de micelas, caso contrário ocorrerão possíveis interferências na determinação da constante de formação do complexo. Para se evitar estas interferências, deve-se utilizar a concentração do esteróide abaixo da concentração micelar crítica (cmc).<sup>21</sup> Também é vantajoso trabalhar com excesso de concentração de um dos reagentes, o que não é possível neste caso. Por um lado, tem-se o limite de concentração do esteróide e por outro, a máxima concentração em solução de ciclodextrina, que também é limitada devido a solubilidade, sendo particularmente importante no caso da  $\beta$ -CD.

Estas restrições sugerem que o método da variação contínua<sup>156</sup> é o mais apropriado para estudo destes sistemas, cuja concentração total é igual a soma das concentrações das duas espécies presentes em solução (item 3).

#### *Determinação da Estequiometria e da constante de equilíbrio do complexo de inclusão*

Para a determinação da estequiometria dos complexos de inclusão formados entre a ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) e o hóspede (fusidato ou helvolato), foi utilizado o método de Job.

Experimentalmente, de uma série de 10 (dez) soluções, com variação da relação molar de ciclodextrina e hóspede (fusidato ou helvolato) no intervalo de 0 (zero) a 1 (um), e a partir dos espectros de RMN obtém-se a posição do sinal pertencente a um determinado núcleo de ciclodextrina.



**Figura 5.36** - Curva de Job obtida com os deslocamentos químicos dos carbonos da  $\gamma$ -CD para o complexo (a) helvolato: $\gamma$ -CD e (b) fusidato: $\gamma$ -CD; [helvolato/fusidato]<sub>0</sub> = [ $\gamma$ -CD]<sub>0</sub> = 10mM); 75 MHz.

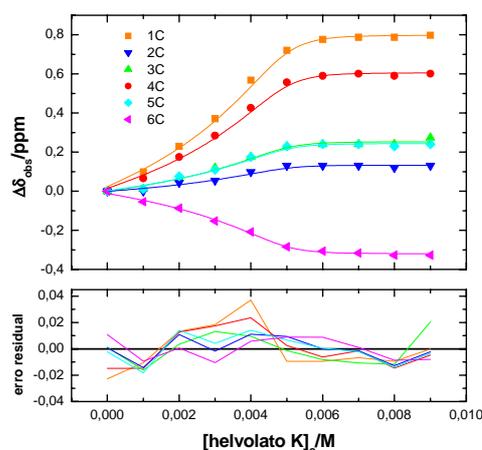
A Figura **5.36a** mostra a curva de Job para os seis carbonos de uma unidade de glicose de  $\gamma$ -CD para o complexo helvolato: $\gamma$ -CD. Os pontos representam os valores experimentais e as linhas são o resultado do cálculo referente aos teóricos deste tipo de representação, considerando o valor obtido a partir das constantes de associação e demais parâmetros. O máximo da curva é observado em um valor de 0,5, o que sugere a formação de complexo de estequiometria 1:1 (helvolato: $\gamma$ -CD).

No caso do fusidato de sódio, a representação de Job é feita com apenas cinco dos seis átomos de carbono de uma unidade de glicose da ciclodextrina, devido a pouca variação dos deslocamentos químicos do C2. A Figura **5.36b** demonstra a curva de Job para o complexo fusidato: $\gamma$ -CD. Neste caso, o máximo da curva também é observado em 0,5, o que sugere a formação de complexo de estequiometria 1:1 (Fusidato: $\gamma$ -CD).

Os valores das constantes de equilíbrio de formação dos complexos helvolato: $\gamma$ -CD e fusidato: $\gamma$ -CD foram calculados em um programa “Origin versão 6,0”, utilizando a equação 3.20 (item 3), através de um ajuste global por mínimos quadrados não linear para os átomos de carbono e estabelecendo a condição de um valor de  $K_{11}$  constante em todas as séries e diferentes valores de  $\Delta\delta_{\max}$  para cada átomo de carbono.

A Figura 5.37, mostra a variação dos deslocamentos químicos observados ( $\Delta\delta_{\text{obs}}$ ) dos átomos de carbono da  $\gamma$ -CD, em função da concentração inicial de helvolato de potássio ([helvolato K]<sub>0</sub>). Os pontos representam os dados experimentais e as linhas são o resultado do

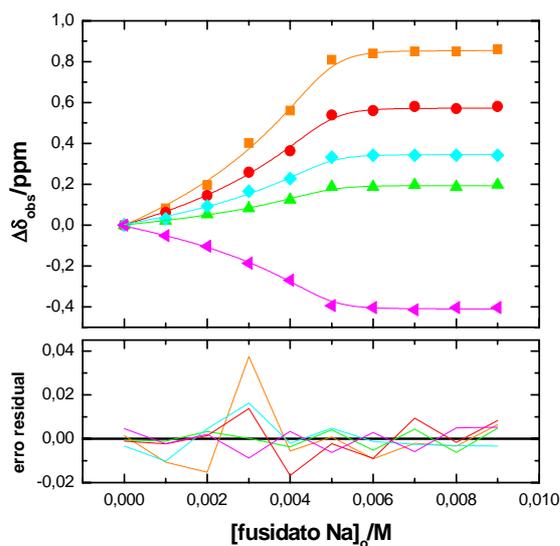
ajuste da equação (3.20). Para avaliação do ajuste teórico foi representado na parte inferior deste mesmo gráfico (Figura 5.37), uma análise dos erros residuais (diferença entre os valores de  $\Delta\delta$  experimentais e teóricos) para cada átomo de carbono, podendo demonstrar desvios sistemáticos ou erros aleatórios, dependendo do número de dados disponíveis, parâmetros de correlação e intervalos de confiança. Deduz-se então que o modelo proposto para a formação de um complexo 1:1 é considerado satisfatório, cujo valor obtido para a constante de associação do complexo helvolato de potássio:  $\gamma$ -CD é :  $K_{\text{helvolato}:\gamma\text{-CD}} = (22 \pm 9) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ .



**Figura 5.37** -  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  para diferentes átomos de carbono da  $\gamma$ -CD complexada com helvolato de potássio.  $[\text{helvato}]_0 = [\gamma\text{-CD}]_0 = 10\text{mM}$ .

A fim de comprovar a validade do modelo anterior, foram feitos cálculos supondo-se simultaneamente a existência de estequiometrias 1:1 e 1:2. Nesta última suposição, apesar de apresentar menores erros residuais, o valor da constante de  $K_{12}$  ( $\approx 0,1 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ) indicou que somente haveria formação de uma pequena fração de complexo 1:2.

De forma semelhante ao helvolato de potássio, foram realizados estudos de complexação por  $\gamma$ -CD com o fusidato de sódio. A Figura 5.38 mostra a variação dos deslocamentos químicos observados ( $\Delta\delta_{\text{obs}}$ ) dos átomos de carbono da  $\gamma$ -CD, em função da concentração inicial de fusidato de sódio ( $[\text{fusidato}]_0$ ). Os dados experimentais foram analisados conforme o que foi mostrado para o helvolato de potássio e de acordo com a equação 3.20 (item 3). Neste caso, o valor de  $K_{11}$  resultante é:  $K_{\text{fusidato}:\gamma\text{-CD}} = (60 \pm 24) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ .



**Figura 5.38** -  $\Delta\delta_{obs}$  para diferentes átomos de carbono de  $\gamma$ -CD complexada com fusidato sódico .  $[fusidato]_o = [\gamma\text{-CD}]_o = 10\text{mM}$ .

Estes valores estão entre as mais altas constantes de equilíbrio encontradas para complexos de inclusão de esteróides em ciclodextrinas do tipo 1:1. Estes valores são quase uma ordem de magnitude maior que para os sais biliares, refletindo a formação de complexos mais estáveis.<sup>21</sup>

A Tabela 5.9 apresenta os valores de  $\Delta\delta_{max}$  para os átomos de carbono da  $\gamma$ -CD resultantes da complexação de ambos os esteróides. Estes são relativamente altos e indicam uma forte interação hóspede - ciclodextrina, o que poderia justificar os elevados valores obtidos para as constantes de equilíbrio.

**Tabela 5.9** - Valores de  $\Delta\delta_{\max}$  obtidos para os átomos de carbono da  $\gamma$ -CD na complexação com fusidato de sódio e helvolato de potássio.

Átomo de C $\gamma$ -CD	$\Delta\delta_{\max}$ /ppm	
	fusidato de sódio	helvolato de potássio
C1	0.857 $\pm$ 0.008	0.78 $\pm$ 0.01
C2	0.193 $\pm$ 0.008	0.59 $\pm$ 0.01
C3	0.572 $\pm$ 0.008	0.26 $\pm$ 0.01
C4	0.343 $\pm$ 0.008	0.14 $\pm$ 0.01
C5	-0.406 $\pm$ 0.008	0.24 $\pm$ 0.01
C6		-0.31 $\pm$ 0.01

#### *Determinação da estrutura do complexo*

As estruturas dos complexos podem ser deduzidas a partir dos espectros ROESY, conforme será demonstrado para o complexo helvolato:  $\gamma$ -CD (Figura 5.39). A Tabela 5.10 mostra as interações intermoleculares observadas entre os respectivos hóspedes (fusidato ou helvolato) e a molécula hospedeira ( $\gamma$ -CD). A partir das observações obtidas dos experimentos ROE, é possível fazer algumas considerações:

- i) nenhum dos átomos de hidrogênio dos carbonos C1 a C7, localizados nos anéis esteroidais A e B, assim como o grupo metila C(30)H<sub>3</sub> localizado no C4 do anel A, apresentam interações com os átomos de hidrogênio da  $\gamma$ -CD.
- ii) as principais interações do H6 pertencente à  $\gamma$ -CD, são com os dos grupos metila C(26)H<sub>3</sub> e C(27)H<sub>3</sub> localizados na cadeia lateral, com os dos grupos metila C(32)H<sub>3</sub>, C(34)H<sub>3</sub> e C(18)H<sub>3</sub> e com os hidrogênios H11. No caso do ácido helvólico, os hidrogênios da metila C(19)H<sub>3</sub> também mostram uma fraca interação. A maior parte destes átomos de hidrogênio está localizada na parte central do esqueleto esteroidal.
- iii) H3 é sempre observado como um dos átomos de interação da  $\gamma$ -CD. As interações do H3 com os hidrogênios dos grupos metila pertencentes á cadeia lateral são particularmente fortes.
- iv) não são observadas interações intramoleculares entre a cadeia lateral e os núcleos esteroidais.

- v) presume-se que os esteróides incorporam-se na cavidade da  $\gamma$ -CD através da cadeia lateral, assim como ocorre com os sais biliares.<sup>21</sup> Porém, ao alcançar a região central, a ciclodextrina se afasta através da mesma região, observação procedente pela ausência de interação com os hidrogênios pertencentes ao anel A do esqueleto esteroidal.
- vi) a ausência de interação com os hidrogênios H22 e H23 se deve ao diâmetro da cavidade da  $\gamma$ -CD, que não possibilita desenvolver um efeito de blindagem suficiente. No entanto, algumas destas interações são observadas com a  $\beta$ -CD, devido ao menor diâmetro interno da cavidade da ciclodextrina.

**Tabela 5.10** - Experimento ROE com as interações entre os hidrogênios (Pn) do helvolato ou fusidato e os hidrogênios (Hn) das ciclodextrinas  $\beta$ - ou  $\gamma$ -CD.

Localização	C-atomo	$\gamma$ -CD						$\beta$ -CD					
		Fusidato			Helvolato			Fusidato			Helvolato		
		H-3	H-5	H-6	H-3	H-5	H-6	H-3	H-5	H-6	H-3	H-5	H-6
Anel A	P1							F	F				
	P2							m	F		m	f	f
	P3							F					
	P4							F	F				
Anel B	P30							F	F		m		
	P6										m		
Anéis B/C	P7							f					
	P9				f								
Anel C	P11	F	F	m	m	m	f	m					
Anéis C/D	P13	m			m								
Anel D	P15	m	m										
	P16	m			m								
Anéis C/D	P18	F	F	F	F	F	f	m	f				
Anéis A/B	P19	F	m		F	m	f	F	f		m	f	
Cadeia lateral	P22										m		
	P23	m						F	f		m		
	P24	m	f			m		F			m	m	
	P26	F	m	m	F	f	F	F	F	m	F	F	F
	P27	F	m	m	F	f	F	F	F	m	F	F	F
Anéis B/C	P32	F	F	m	F	F	m	F	f		m	f	
Ester	P34	F	f	f		F		F	F	f	f	f	
	P36										f		

**Representação:** Interações fracas (f), médias (m), fortes (F) e ausência de interações (em branco).

Das interações observadas no espectro ROESY (Figura 5.39), define-se a forma do complexo de inclusão helvolato: $\gamma$ -CD, baseado nos hidrogênios H3, H5 e H6 da  $\gamma$ -CD situados em direção à cavidade interior da ciclodextrina, com os hidrogênios da molécula de helvolato de potássio.

A partir dos dados analisados, propõe-se modelos espaciais teóricos para o complexo (helvolato)<sub>1</sub>:( $\gamma$ -CD)<sub>1</sub>, com vistas laterais (a) e (b) e frontais (c) e (d), conforme Figura 5.40.

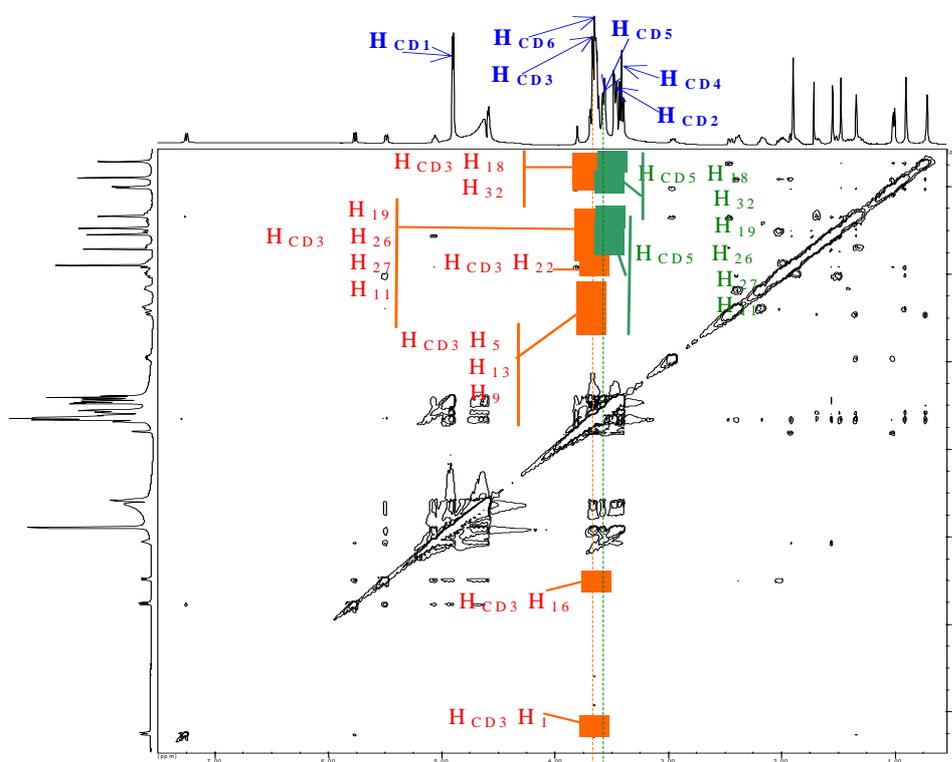
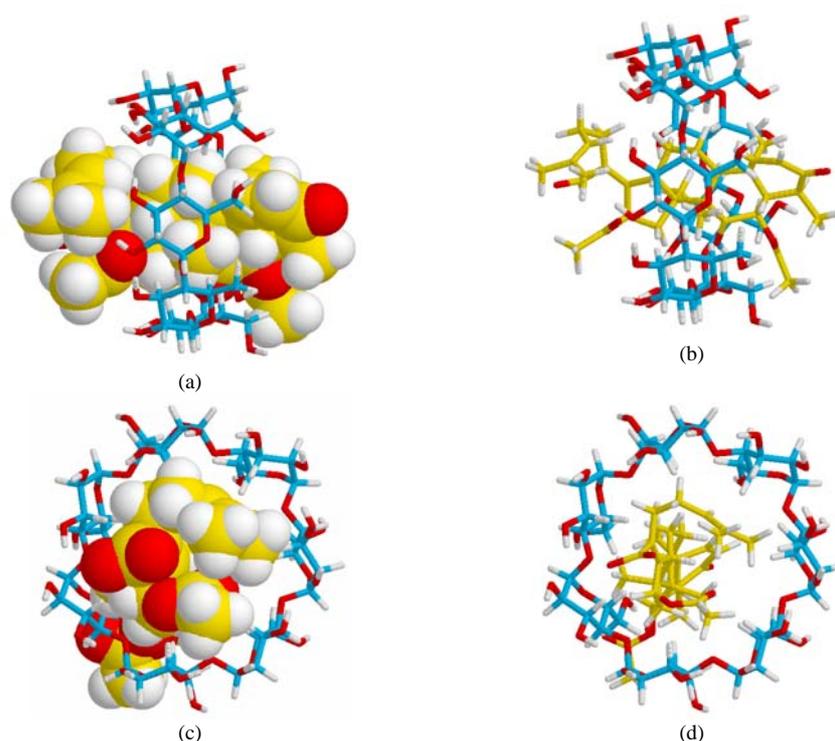


Figura 5.39 - Espectro ROESY referente ao complexo de inclusão helvolato: $\gamma$ -CD em D<sub>2</sub>O 10mM, 500 MHz.



**Figura 5.40** - Modelos espaciais teóricos do complexo (helvolato)<sub>1</sub> : (γ-CD)<sub>1</sub>, com vistas laterais (a) e (b) e frontais (c) e (d).

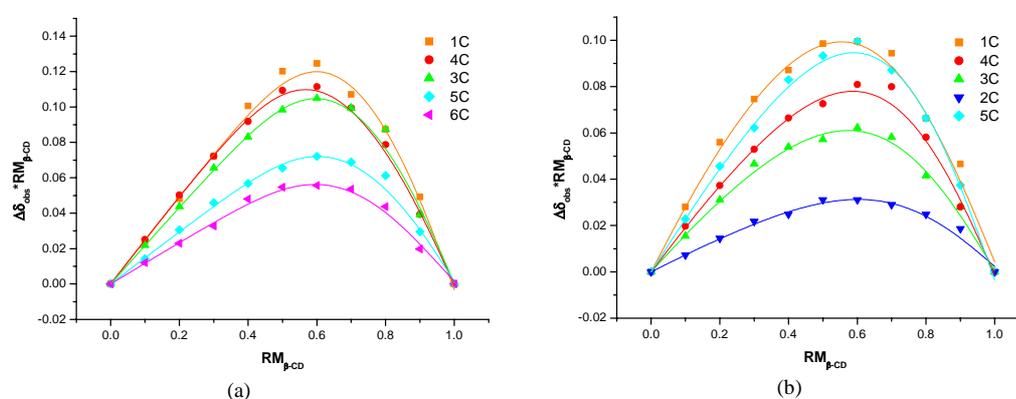
### 5.3.2 - Complexos Fusidato de Sódio e Helvolato de Potássio : β-CD

Os sais biliares formam complexos 1:1 com a γ-CD, enquanto que com a β-CD formam complexos de estequiometria 1:1 e 1:2. Portanto, estes esteróides comportam-se como hóspedes monotópicos e ditópicos respectivamente, se forem trihidroxílicos (por exemplo, colato de sódio) ou dihidroxílicos (no caso, desoxicolato de sódio).<sup>20, 21</sup> Com base nas estruturas do helvolato e fusidato e demonstrações experimentais, espera-se um comportamento similar aos sais biliares.

#### *Determinação da Estequiometria do complexo de inclusão*

Para a determinação da estequiometria dos complexos de inclusão formados entre a β-CD e o hóspede (fusidato ou helvolato), também foi utilizado o método de Job. A posição do máximo das curvas com valores maiores que 0.5 (Figura 5.41), sugere para ambos os

complexos helvolato: $\beta$ -CD e fusidato: $\beta$ -CD a existência de estequiometria 1:2, porém não descarta a existência de dois diferentes complexos 1:1. Neste caso, poderia existir duas constantes diferentes  $K_{11}$  e  $K_{12}$ , na qual  $K_{11}$  poderia representar a soma das constantes de associação destes complexos 1:1. De fato, a posição do máximo das curvas não alcança o valor de 0.67, o qual seria indicativo da existência de um único tipo de complexo 1:2 em solução. Estes resultados sugerem a formação de uma mistura em solução dos complexos 1:1 e 1:2.



**Figura 5.41** - Curva de Job para os cinco carbonos de uma unidade de glicose de  $\beta$ -CD para o complexo (a) helvolato:  $\beta$ -CD e (b) fusidato:  $\beta$ -CD.  $[\text{helvolato/fusidato}]_0 = [\beta\text{-CD}]_0 = 10\text{mM}$ , 75 MHz.

#### *Determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo*

Nos dois casos, tanto para o complexo helvolato: $\beta$ -CD quanto para o fusidato: $\beta$ -CD, tem-se a formação de complexo com estequiometria 1:2 juntamente com 1:1, como mostra a curva de Job representada na Figura 5.41. A equação que descreve a existência destes três tipos de complexos em solução, foram deduzidas no item 3 (3.27), cuja resolução implica em uma equação de terceiro grau para a obtenção das constantes  $K_{11}$  e  $K_{12}$ .<sup>160</sup> Foram realizadas análises globais não lineares para os deslocamentos químicos destes compostos com a  $\beta$ -CD em um programa Origin 6.0.

Helvolato :  $\beta$ -CD indica claramente uma mistura de estequiometrias 1:1 e 1:2. A Figura 5.42 mostra os dados experimentais (símbolos) e o ajuste global não linear (linhas) referente a equação 3.27. As Figuras 5.42 mostram a variação dos deslocamentos químicos

observados ( $\Delta\delta_{\text{obs}}$ ) dos átomos de carbono da  $\beta$ -CD frente a concentração inicial do helvolato de potássio ( $[\text{helvolato}]_0$ ). Os valores das constantes obtidas são:

$$K_{11}(\text{helv.}:\beta\text{-CD}) = (2,42 \pm 0,87) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$$

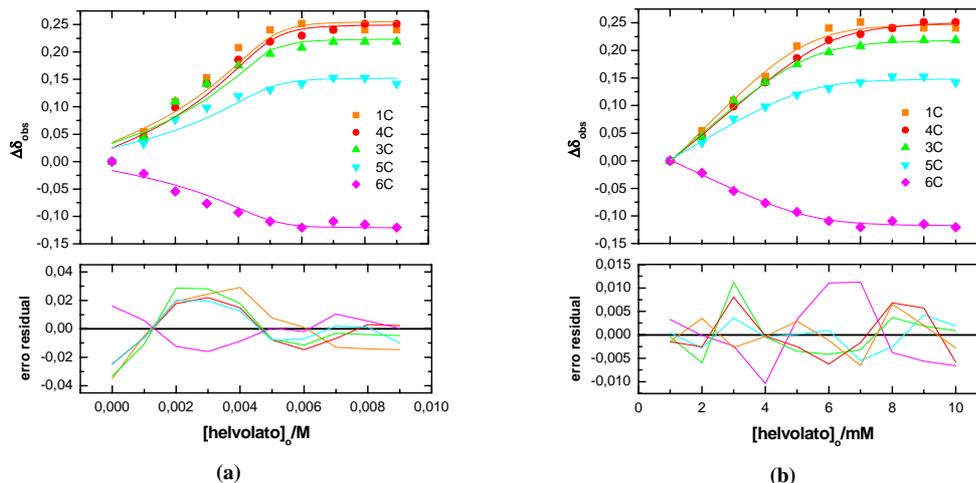
$$K_{12}(\text{helv.}:\beta\text{-CD}) = (0,06 \pm 0,09) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$$

O mesmo processo foi utilizado para o fusidato de sódio com a  $\beta$ -CD. A Figura 5.43 mostra a variação dos deslocamentos químicos observados ( $\Delta\delta_{\text{obs}}$ ) dos átomos de carbono da  $\beta$ -CD em função da concentração inicial do fusidato de sódio ( $[\text{fusidato}]_0$ ). Os pontos representam os dados experimentais e as linhas são o resultado do ajuste teórico baseando-se na equação 3.27 para complexos de estequiometria 1:2. Uma análise global não linear de todos os átomos de carbono, assumindo a formação de complexo 1:1 (Figura 5.43a), produz resíduos com desvios sistemáticos significativos. Para a mesma análise, também admitindo a formação de complexo 1:2, obtém-se um ajuste perfeito com os resíduos distribuídos aleatoriamente (Figura 5.43b).

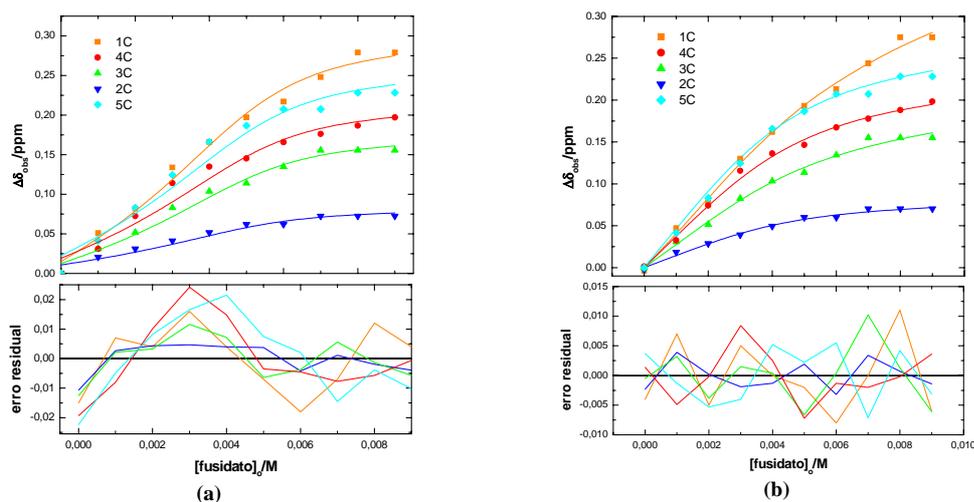
A fim de aumentar o número de núcleos analisados a partir da mesma amostra fusidato: $\beta$ -CD, foram considerados simultaneamente os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ -RMN dos H3 e H5 juntamente com os átomos de carbono C1, C3, C4 e C5 da  $\beta$ -CD. A formação de ambos os complexos 1:1 e 1:2 estão de acordo com o gráfico de Job com o máximo entre  $X_{\beta\text{-CD}} = 0,5$  (1:1) e  $X_{\beta\text{-CD}} = 0,67$  (1:2). O valor das constantes  $K_{11}$  e  $K_{12}$  são:

$$K_{11}(\text{fusid.}:\beta\text{-CD}) = (0,74 \pm 0,13) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$$

$$K_{12}(\text{fusid.}:\beta\text{-CD}) = (0,210 \pm 0,075) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$$



**Figura 5.42** -  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  para diferentes átomos de carbono da  $\beta$ -CD complexada com helvolato de potássio; (a) ajuste para complexo 1:1, (b) ajuste para complexo 1:2



**Figura 5.43** -  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  para diferentes átomos de carbono da  $\beta$ -CD complexada com fusidato de sódio; (a) ajuste para complexo 1:1, (b) ajuste para complexo 1:2.

Comentários importantes podem ser feitos para  $K_{11}$ . Os valores mais baixos de  $\Delta\delta_{\text{max,C11}}$  para os complexos formados entre fusidato (ou helvolato) e a  $\beta$ -CD, comparados com a  $\gamma$ -CD, sugere a existência de uma estreita relação entre os valores de  $K_{11}$  e  $\Delta\delta_{\text{max}}$ . Este fato se deve à mudança de ambiente eletrônico, devido à interação hóspede-hospedeiro ocorrida no processo de complexação com a  $\gamma$ -CD, levando a valores de  $K_{11}$  mais elevados. De forma análoga, esta avaliação também pode ser feita para os complexos formados entre fusidato (ou helvolato) e a  $\beta$ -CD, comparados com os sais biliares, evidenciando valores de

$\Delta\delta_{\max}$  mais baixos para àqueles complexos. Isto pode ser explicado através da análise das estruturas propostas a partir dos experimentos ROE. Nos sais biliares tem-se a cadeia lateral como uma parte da estrutura molecular facilmente flexível. Porém, no caso do helvolato e fusidato, tem-se esta parte da cadeia lateral como a mais rígida, devido a dupla ligação carbono-carbono. Portanto, a cadeia lateral dos sais biliares pode adquirir uma conformação dobrada dentro da cavidade da  $\beta$ -CD, permitindo que os anéis C (parcialmente) e D (totalmente) sejam incluídos dentro da cavidade.<sup>20</sup> Esta observação corrobora com o maior e significativo número de interações entre o esqueleto esteroidal e a cadeia lateral nos sais biliares com a cavidade da ciclodextrina, comparado aos dois antibióticos, levando a valores mais elevados de  $K_{11}$  para os complexos formados com os sais biliares.<sup>21</sup> Presume-se que a menor inclusão dos dois antibióticos esteroidais, fusidato e helvolato, para dentro da cavidade da  $\beta$ -CD comparados aos sais biliares, é provavelmente devido a existência do substituinte acetoxi no C16.

Comentários similares também são aplicáveis a  $K_{12}$ . Os valores de  $\Delta\delta_{\max, C12}$  para os complexos de sais biliares são quase duas vezes maior que com fusidato e helvolato e a segunda  $\beta$ -CD, mostrando um maior número de interações no espectro ROESY com os anéis A e B no complexo fusidato que no helvolato. Assim, os valores de  $K_{12}$  segue a seguinte ordem, sais biliares > fusidato > helvolato. A partir dos valores da constante de equilíbrio conclui-se que tanto o fusidato quanto o helvolato são considerados maus hóspedes ditópicos para a  $\beta$ -CD comparados aos sais biliares diidroxílicos,<sup>20</sup> e portanto irão conduzir a conglomerados supramoleculares mais fracos quando complexados por dímeros de  $\beta$ -CD.<sup>19, 20</sup>

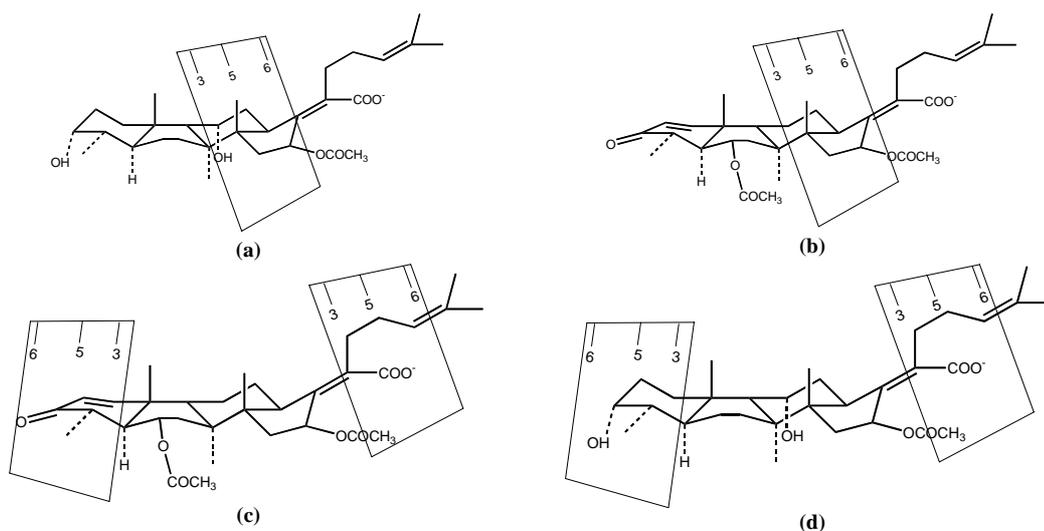
#### *Determinação da estrutura do complexo*

A Tabela 5.10 apresenta as interações intermoleculares observadas entre os respectivos hóspedes (fusidato ou helvolato) e a molécula hospedeira ( $\beta$ -CD). A partir das observações obtidas dos experimentos ROE, obtém-se algumas considerações:

- i) é possível observar ausência de interação com os hidrogênios da região central da estrutura molecular (anéis C e D)

- ii) são verificadas interações correspondentes a dois grupos localizados em distintas posições do núcleo esteroidal, àqueles correspondentes à região da cadeia lateral e os correspondentes aos anéis A e B. Esta análise sugere que duas moléculas de  $\beta$ -CD estão envolvidas no processo de complexação em diferentes regiões. Isto poderia corresponder à existência de dois complexos 1:1 diferentes ou formação de complexo 1:2, no qual duas moléculas de  $\beta$ -CD estariam simultaneamente complexando uma molécula hóspede.
- iii) praticamente não foi observada interação entre os hidrogênios dos anéis C e D do fusidato e helvolato
- iv) nenhuma interação foi observada no espectro ROESY entre a cadeia lateral e o esqueleto esteroidal dos respectivos antibióticos, sugerindo uma cadeia lateral rígida (não dobrada), diferente do que ocorre nos sais biliares
- v) interações importantes foram observadas entre a cadeia lateral rígida destes antibióticos e a primeira molécula de  $\beta$ -CD no complexo 1:2
- vi) através do espectro ROESY, foi demonstrado que a segunda molécula de  $\beta$ -CD mostra um maior número de interações com os anéis A e B no fusidato que no helvolato
- vii) para a  $\gamma$ -CD, H3 sempre aparece como um dos átomos de interação da  $\beta$ -CD, porém há uma notável ausência de interações com os hidrogênios H5 e H6. Isto sugere que os esteróides incorporam a cavidade da  $\beta$ -CD através de sua borda secundária, como ocorre com os sais biliares e a  $\gamma$ -CD.<sup>20, 21</sup>

A partir das considerações anteriores, deduz-se a estrutura dos complexos formados entre os dois antibióticos, fusidato e helvolato, na presença de  $\gamma$ - e  $\beta$ -CD, e estes estão representados esquematicamente na Figura 5.44.



**Figura 5.44** - Estruturas esquemáticas para os complexos formados entre (a) fusidato de sódio e  $\gamma$ -CD; (b) helvolato de potássio e  $\gamma$ -CD; (c) helvolato de potássio e  $\beta$ -CD; e (d) fusidato de sódio e  $\beta$ -CD.

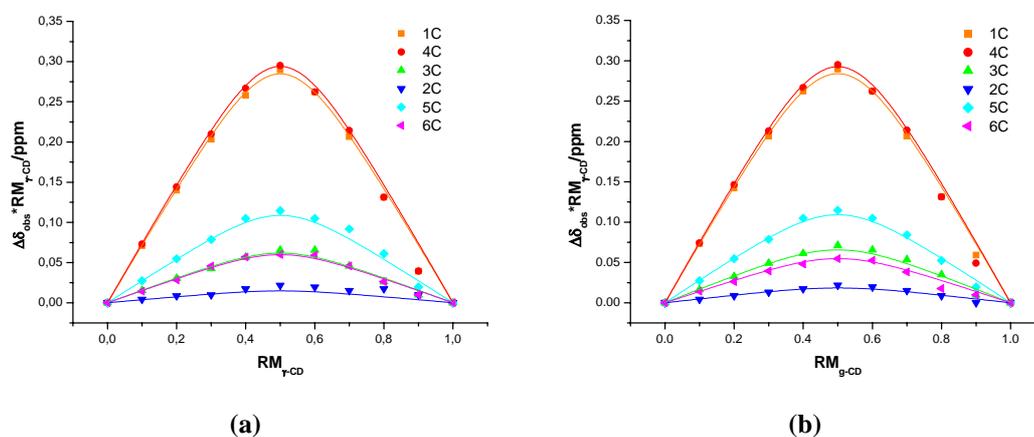
### 5.3.3 - Complexos CHAPS e CHAPSO: $\gamma$ -CD

Como já havia sido comentado anteriormente, CHAPS e CHAPSO são compostos com estruturas anfífilas semelhantes aos sais biliares, e também possuem a propriedade de formar agregados micelares. Devido as mesmas restrições mencionadas para o estudo dos complexos de inclusão dos antibióticos esteroidais, ácidos fusídico e helvólico, também é utilizado nestes experimentos o método da variação contínua (Job), como o mais apropriado para estudo destes sistemas.

#### *Determinação da Estequiometria do complexo de inclusão*

A Figura 5.45 mostra a curva de Job para os carbonos de uma unidade de glicose de  $\gamma$ -CD para o complexo CHAPS:  $\gamma$ -CD e CHAPSO:  $\gamma$ -CD. Os pontos representam os valores experimentais e as linhas são o resultado do ajuste matemático destes dados, para obter o valor da constante de equilíbrio de formação do complexo.

O máximo da curva é observado em 0,5, o que sugere a formação de complexo de estequiometria 1:1 para os dois complexos CHAPS: $\gamma$ -CD e CHAPSO: $\gamma$ -CD, sendo da mesma estequiometria que os antibióticos estudados anteriormente e os sais biliares.<sup>20, 21</sup>

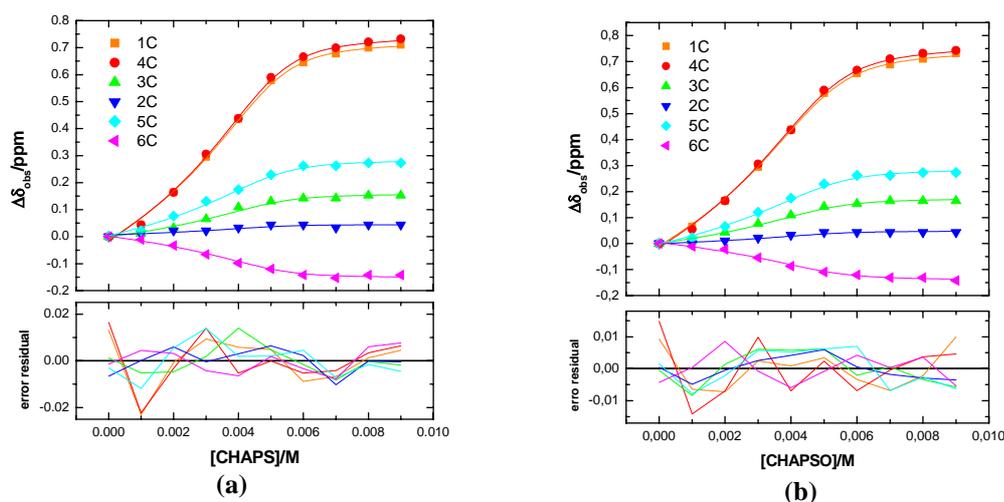


**Figura 5.45** - Curva de Job obtida com os deslocamentos químicos dos carbonos da  $\gamma$ -CD para o complexo (a) CHAPS: $\gamma$ -CD e (b) CHAPSO: $\gamma$ -CD. ( $[\text{CHAPS}] = [\text{CHAPSO}] = [\gamma\text{-CD}] = 10\text{mM}$ ; 75 MHz.

#### *Determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo*

Os valores das constantes de equilíbrio de formação dos complexos  $(\text{CHAPS})_1:(\gamma\text{-CD})_1$  e  $(\text{CHAPSO})_1:(\gamma\text{-CD})_1$  também foram calculados através do programa “Origin 6.0”, utilizando a equação (3.20), através de um ajuste global por mínimos quadrados não linear para os átomos de carbono e estabelecendo a condição de um valor de  $K_{11}$  constante em todas as séries e diferentes valores de  $\Delta\delta_{\text{max}}$  para cada série de átomos de carbono.

A Figura 5.46 mostra a variação dos deslocamentos químicos observados ( $\Delta\delta_{\text{obs}}$ ) dos átomos de carbono da  $\gamma$ -CD em função da concentração inicial de (a) CHAPS e (b) CHAPSO ( $[\text{CHAPS}]_0$  e  $[\text{CHAPSO}]_0$ ). Os dados experimentais são representados por pontos e as linhas, o resultado do ajuste da equação (3.20) como complexo de estequiometria 1:1.



**Figura 5.46** -  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  para diferentes átomos de carbono da  $\gamma$ -CD complexada com (a) CHAPS e (b) CHAPSO.

De acordo com a avaliação do ajuste teórico representado pela análise de erros residuais para cada átomo de carbono e análise global dos dados segundo modelo proposto para formação de complexos 1:1, é possível assumir ajustes satisfatórios para a estequiometria 1:1, com os seguintes valores da constante de equilíbrio:

$$K_{\text{CHAPS}:\gamma\text{-CD}} = (3,6 \pm 0,4) \times 10^3 \text{ L. mol}^{-1}$$

$$K_{\text{CHAPSO}:\gamma\text{-CD}} = (2,8 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ L. mol}^{-1}$$

Pode-se observar que os valores das constantes de equilíbrio são de mesma ordem de magnitude que os obtidos para os sais biliares.<sup>21</sup> Este fato sugere que o esqueleto esteroidal incorpora-se no interior da cavidade da ciclodextrina, já que esta é a parte comum da estrutura destes hóspedes. Esta suposição será confirmada através de estudos ROE.

A Tabela 5.11 mostra os valores obtidos para  $\Delta\delta_{\text{max}}$  para os carbonos da  $\gamma$ -CD. Destaca-se o erro pouco significativo nestes parâmetros, resultado de um bom ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto (complexo 1:1).

**Tabela 5.11** - Valores de  $\Delta\delta_{\max}$  obtidos para os átomos de carbono da  $\gamma$ -CD após complexação com CHAPS e CHAPSO.

Carbonos	CHAPS	CHAPSO
	$\Delta\delta_{\max}/\text{ppm}$	$\Delta\delta_{\max}/\text{ppm}$
C1	0.7440 $\pm$ 0.0095	0.7642 $\pm$ 0.0075
C2	0.0389 $\pm$ 0.0076	0.0498 $\pm$ 0.0058
C3	0.1616 $\pm$ 0.0077	0.1767 $\pm$ 0.0059
C4	0.7683 $\pm$ 0.0096	0.7870 $\pm$ 0.0076
C5	0.2842 $\pm$ 0.0079	0.2937 $\pm$ 0.0060
C6	-0.1564 $\pm$ 0.0077	-0.1473 $\pm$ 0.0058

#### *Determinação da estrutura do complexo*

Como nos casos anteriores, foram realizados espectros ROESY para determinação da estrutura do complexo, os quais são demonstrados nas Figuras 5.47 para o CHAPS e 5.48 para o CHAPSO. A análise segue a mesma sistemática já comentada para o fusidato de sódio e helvolato de potássio, o que torna desnecessária uma discussão mais detalhada, limitando-se à descrição das interações observadas (ver Tabela 5.12) e respectivas estruturas propostas (Figuras 5.49 para o CHAPS e 5.50 para o CHAPSO):

- i) As interações do H3 com os hidrogênios da cadeia lateral e os anéis C e D são particularmente fortes
- ii) Os hidrogênios da cadeia lateral somente interagem com os hidrogênios bastante próximos e não com os dos anéis da própria estrutura
- iii) Praticamente não foi observada interação dos hidrogênios da  $\gamma$ -CD com os do anel A. Assim, presume-se que os esteróides entram na cavidade da  $\gamma$ -CD através da cadeia lateral, assim como ocorre com os sais biliares, indo até o anel B e se afastam através da mesma região. Esta observação está justificada pela quase inexistência de interação com os hidrogênios pertencentes ao anel A do esqueleto esteroidal.
- iv) Os sinais pertencentes aos H(25) quando livres, tanto para o CHAPS quanto CHAPSO, aparecem com um único deslocamento químico, porém ocorre desdobramento devido ao fenômeno de complexação com a  $\gamma$ -CD, o que parece indicar uma certa rigidez da cadeia lateral.

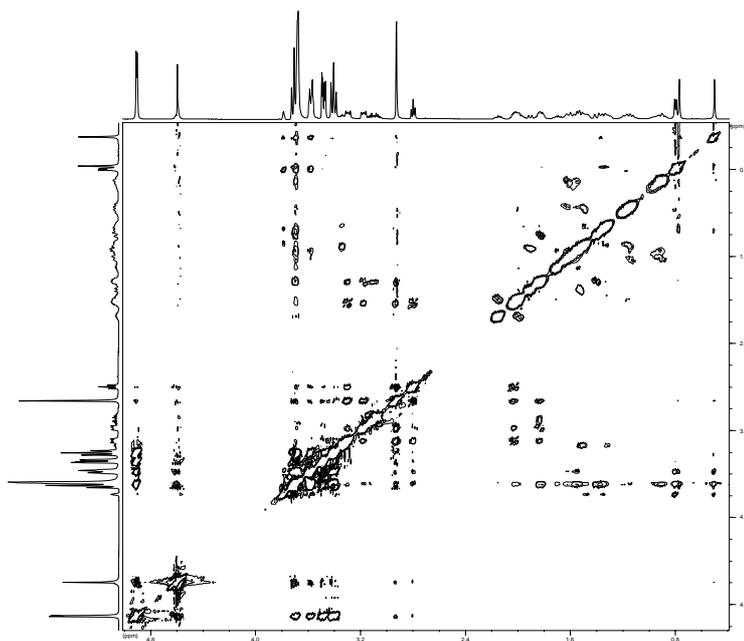


Figura 5.47 - Espectro ROESY do complexo CHAPS:γ-CD, em D<sub>2</sub>O, 500MHz.

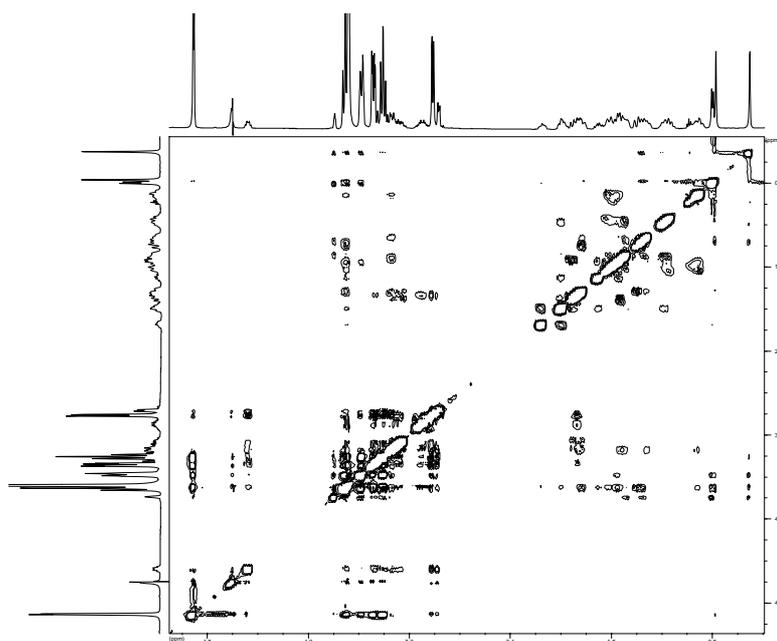


Figura 5.48 - Espectro ROESY do complexo CHAPSO:γ-CD, em D<sub>2</sub>O, 500 MHz.

**Tabela 5.12** - Interações observadas no ROESY (soluções 10 mM de  $\gamma$ -CD e 10mM de CHAPS ou CHAPSO, em D<sub>2</sub>O, pH natural ) entre hidrogênios (Pn) do CHAPS ou CHAPSO e hidrogênios (Hn) da  $\gamma$ -CD.

Localização	Átomo de C	$\gamma$ -CD					
		CHAPS			CHAPSO		
		H-3	H-5	H-6	H-3	H-5	H-6
Anel A	P-1						
	P-2						
	P-3						
	P-4						
Anel A/B	P-5						
Anel B	P-6	m			F		
	P-7						
Anel B/C	P-8						
	P-9	m					
Anel C	P-11	F			F		
	P-12	m	F		F	F	F
Anel C/D	P-13						
	P-14	F					
Anel D	P-15	F	F	m	F		m
	P-16	F			m		
	P-17	F	F		F		
Anel C/D	P-18	F	F	F	m	F	F
Anel A/B	P-19	F	F	F	F		
Cadeia lateral	P-20	f					
	P-21					F	F
	P-22	f			F	m	
	P-23	m			f		
	P-24						
	P-25	f		f	f		
	P-26	F			F		
	P-27			m			
	P-28	m	f		m	m	m
	P-29	m			m	m	
	P-30	F	F	F	m	f	m
	P-31	F	F	F	m	F	m
P-32	F	F	F	m	F	m	

**Representação:** interações fracas (f), médias (m), fortes (F) e ausência de interações (em branco).

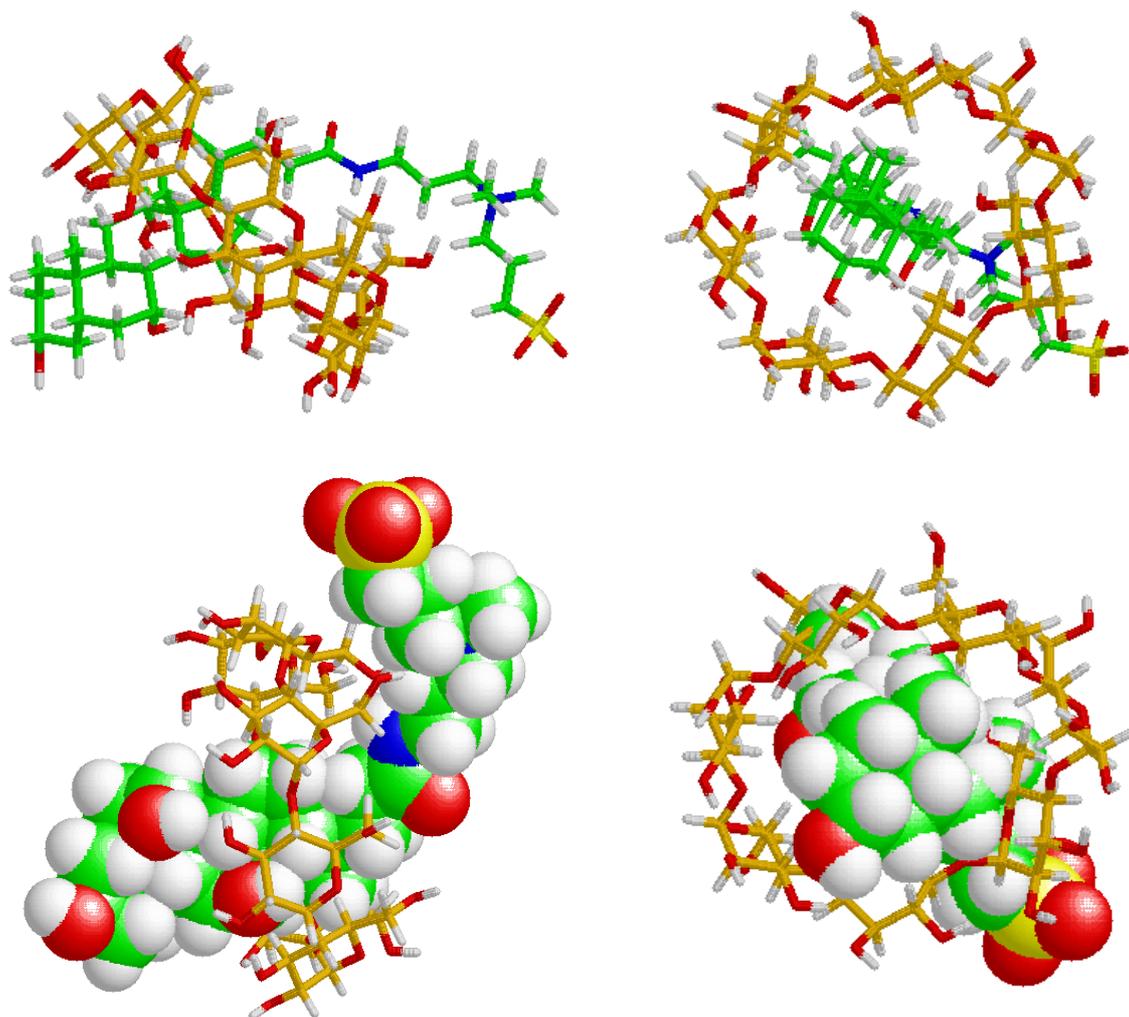


Figura 5.49 - Representação espacial do complexo CHAPS:γ-CD.

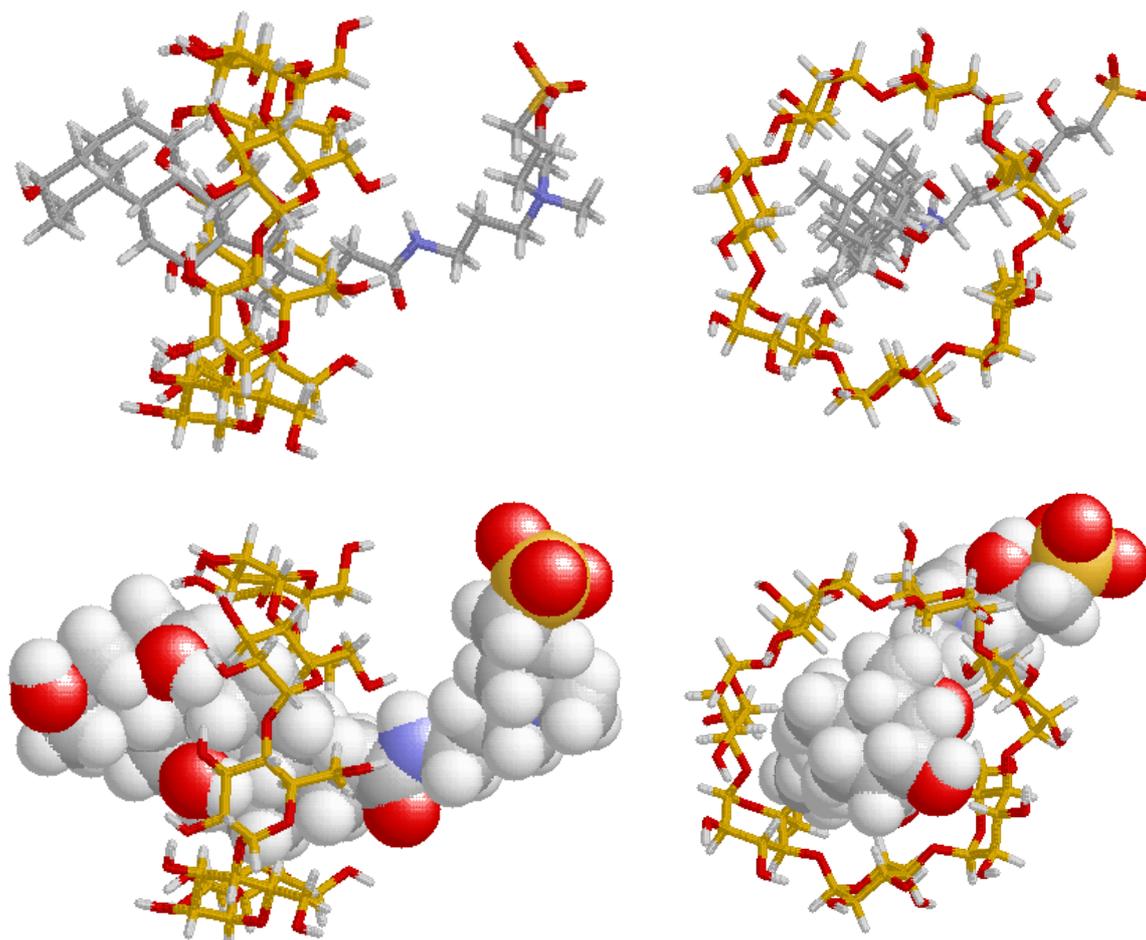


Figura 5.50 - Representação espacial do complexo CHAPSO:γ-CD.

#### 5.3.4 - Complexos CHAPS e CHAPSO: β-CD

No caso das substâncias CHAPS e CHAPSO, os estudos dos complexos de inclusão na presença de  $\gamma$ - e  $\beta$ -CD, demonstraram comportamentos diferenciados de intercâmbio do hóspede em relação à escala de tempo de RMN. Assim com a  $\beta$ -CD, como será visto a seguir, foi verificado um processo de intercâmbio lento da molécula hóspede (CHAPS ou CHAPSO), enquanto que com a  $\gamma$ -CD o intercâmbio é rápido. Portanto, antes de iniciar-se o estudo detalhado destes sistemas, é importante mencionar que :

- O sistema está sob regime de intercâmbio rápido, se o processo de entrada e saída da molécula hóspede for bastante rápido em comparação com a escala de tempo de RMN.

Neste caso, somente se detecta um único sinal, cuja posição será o ponto médio das espécies presentes em solução (ciclodextrina livre e complexada).<sup>154</sup>

- Por outro lado, o sistema está sob regime de intercâmbio lento, se o processo de entrada e saída da molécula hóspede for bastante lento em comparação com a escala de tempo de RMN. Aqui, a detecção do sinal é mais rápida que a entrada e saída do hóspede do interior da ciclodextrina. Neste caso, detecta-se no espectro de RMN dois estados bem diferenciados da ciclodextrina (livre e complexada). A intensidade relativa de ambos os sinais será proporcional à fração de cada uma das espécies presentes em equilíbrio.<sup>154</sup>

#### *Determinação da Estequiometria do complexo de inclusão*

Análises preliminares de espectros de  $^{13}\text{C}$  correspondentes a uma série de Job para determinação da estequiometria do complexo CHAPS ou CHAPSO e  $\beta$ -CD, mostraram alterações de alguns sinais pertencentes à molécula de  $\beta$ -CD. A Figura 5.51 mostra nitidamente desdobramento dos sinais correspondentes aos carbonos C1, C3 e C4 pertencentes à molécula de  $\beta$ -CD e não tão claramente por estarem bastante próximos, os C2 e C5 da  $\beta$ -CD.

Observa-se na Figura 5.51 um decréscimo gradual na intensidade dos sinais correspondentes à  $\beta$ -CD livre em solução à medida que diminui sua concentração e aumenta a de CHAPS ou CHAPSO. Ao contrário, observa-se um aumento gradual dos sinais dos carbonos da  $\beta$ -CD complexada com o esteróide na mesma sequência de concentrações. Portanto, o aparecimento de dois sinais para um mesmo carbono na série de Job, é indicativo de um processo de complexação por intercâmbio lento.

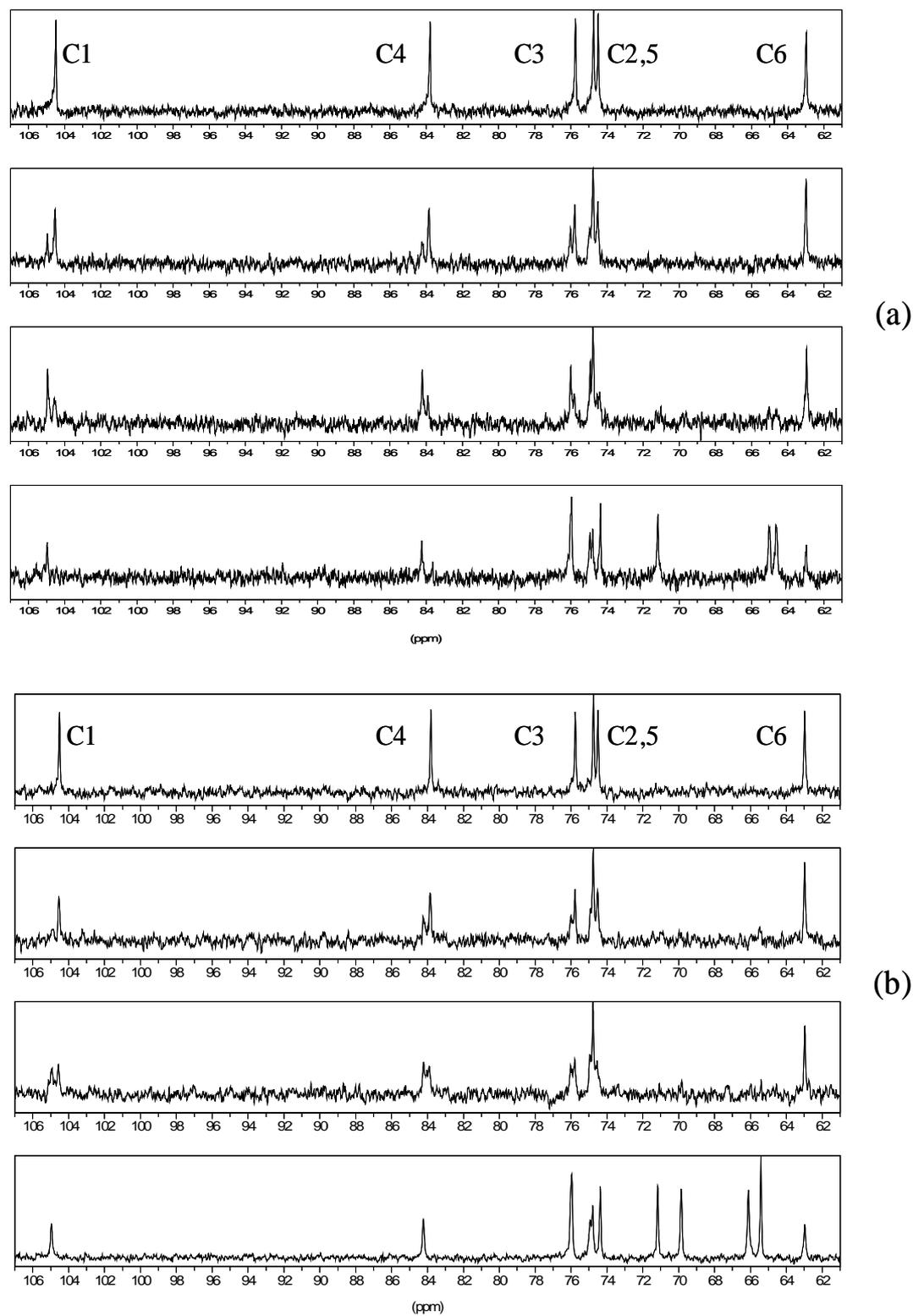
O aparecimento de dois sinais para um mesmo carbono na série de Job, deve-se a um intercâmbio lento na complexação. Como já foi mencionado, o intercâmbio lento se refere ao processo global de entrada e saída do hóspede do interior da molécula hospedeira ocorrer mais lentamente que os tempos de medida de RMN de  $^{13}\text{C}$ . No caso de um processo rápido, a observação seria feita através do aparecimento de um único sinal deslocando-se da posição referente à  $\beta$ -CD livre até a posição da  $\beta$ -CD complexada.

Deve-se eliminar também a possibilidade de que a duplicação de sinais seja resultado do efeito da micelização tanto do CHAPS como do CHAPSO. Para isto, foram realizados espectros de  $^1\text{H}$  (Figura 5.52) em diferentes concentrações dentro do intervalo de 2-10 mM de CHAPS ou CHAPSO em  $\text{D}_2\text{O}$  (sem a presença de  $\beta\text{-CD}$ ). Foi observado que o desdobramento dos sinais não é devido ao processo de auto-associação destas moléculas. Os espectros da Figura 5.52 mostram portanto, que não existe nenhum desdobramento dos sinais, como observado na presença de  $\beta\text{-CD}$ .

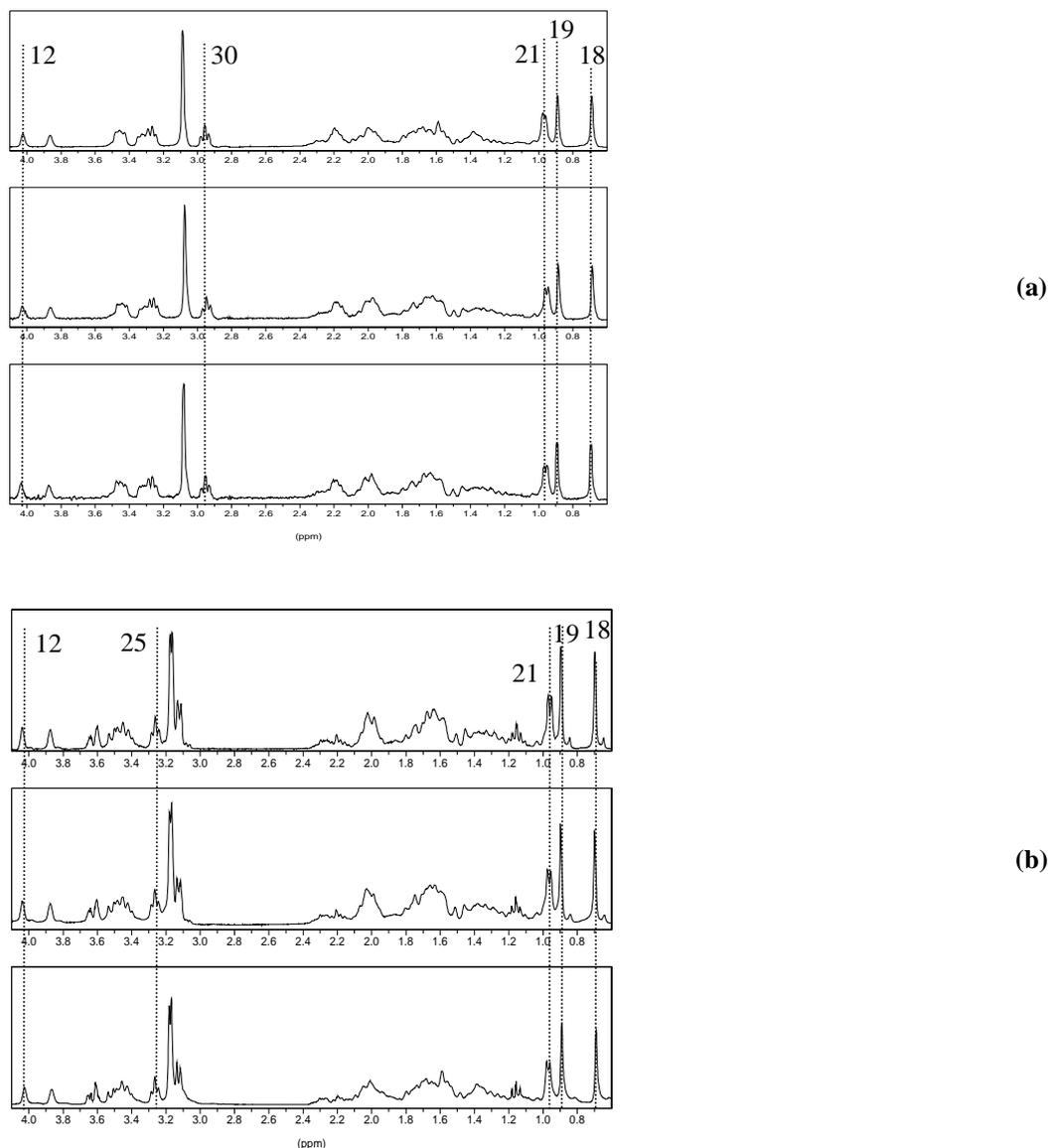
A Tabela 5.13 também demonstra através dos resultados, que não existem mudanças significativas dentro do intervalo das concentrações de 2-10mM dos compostos esteroidais. Esta análise foi baseada na relação entre as áreas dos sinais das metilas 18 e 19 com as situadas na cadeia lateral nas posições 31 e 32 (CHAPS), assim como nas áreas dos sinais das metilas 18 e 19 com relação ao 12 (CHAPSO). Estas considerações permitem descartar que o desdobramento seja devido à formação de auto-agregação (micelas) do CHAPS ou CHAPSO.

**Tabela 5.13** - Relação entre as áreas dos sinais das metilas nas posições 18 e 19 com a área dos hidrogênios situados na cadeia lateral do CHAPS (31 e 32) e CHAPSO (próton 12).

Concentração mM	Área relativa			
	CHAPS		CHAPSO	
	$A_{18}/A_{31-32}$	$A_{19}/A_{31-32}$	$A_{18}/A_{12}$	$A_{19}/A_{12}$
10	0.4836	0.4152	3.0702	3.0858
5	0.4984	0.4105	3.0030	2.7914
2	0.4963	0.4088	2.8559	2.7749



**Figura 5.51** - Espectros de  $^{13}\text{C}$  com diferentes concentrações de (a) CHAPS ou (b) CHAPSO e  $\beta$ -CD, na seguinte ordem: 10 mM  $\beta$ -CD e 0 mM CHAPS, 7 mM  $\beta$ -CD e 3 mM CHAPS, 5 mM  $\beta$ -CD e 5 mM CHAPS, 1 mM  $\beta$ -CD e 9 mM CHAPS; soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural (5,0-6,0), 75MHz.

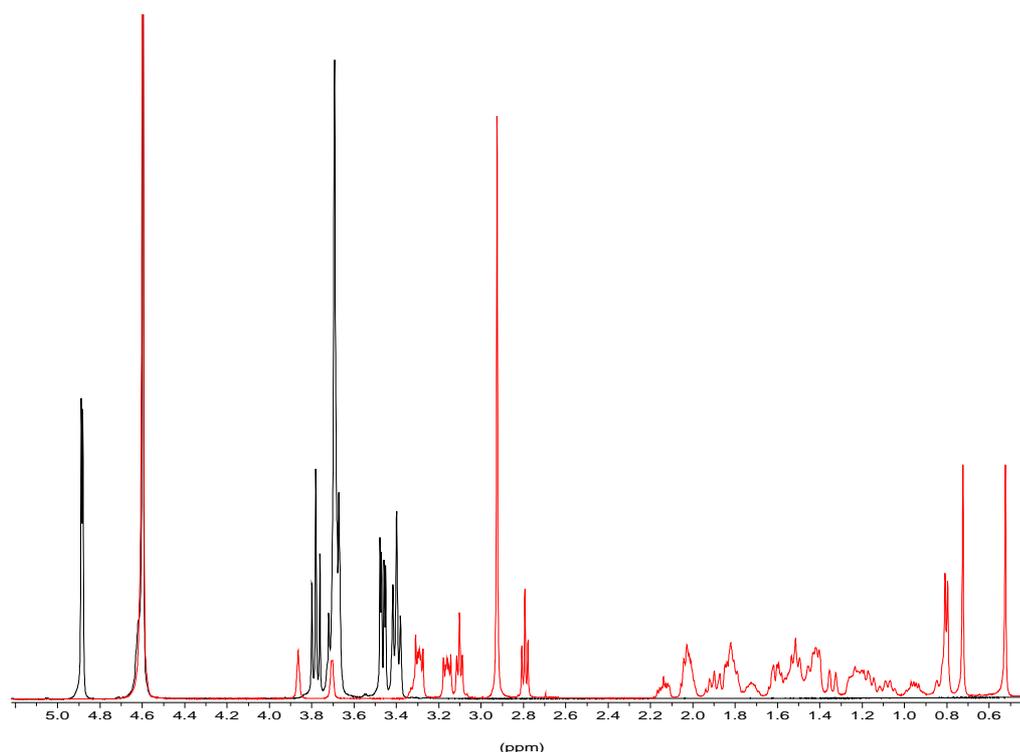


**Figura 5.52** - Espectros de  $^1\text{H}$  com diferentes concentrações de (a) CHAPS e (b) CHAPSO com concentrações nos espectros em ordem decrescente de 10mM, 5 mM e 2 mM; soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural (5,0-6,0), 300MHz.

No caso dos esteróides fusidato e helvolato, o parâmetro experimental utilizado para determinação da estequiometria e cálculo da constante de formação do complexo foi o deslocamento químico dos sinais de  $^{13}\text{C}$ , cuja propriedade é proporcional à concentração tanto de  $\beta\text{-CD}$  como de hóspede livres e complexados. Para os compostos CHAPS e CHAPSO na presença de  $\beta\text{-CD}$ , os espectros de  $^1\text{H}$  foram outra alternativa no estudo dos complexos, em que a área dos sinais seria a propriedade a ser considerada no caso de um intercâmbio lento.

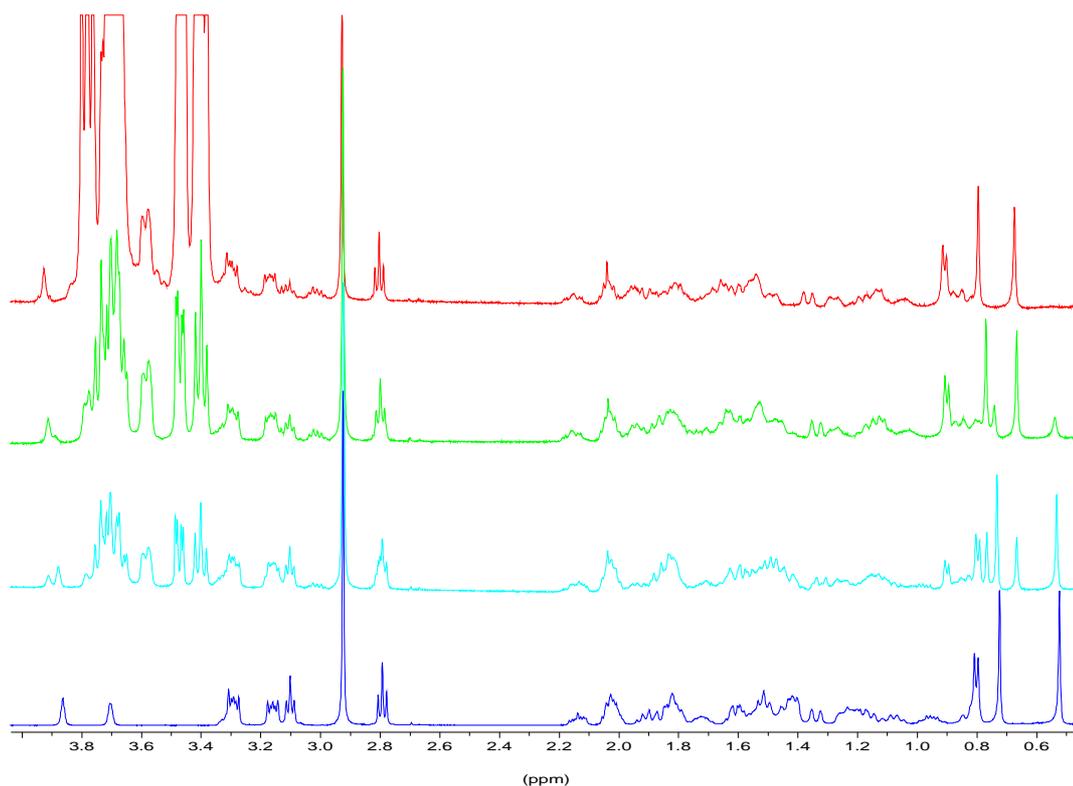
O passo seguinte consistiu em selecionar os hidrogênios, os quais são convenientes de serem avaliados através de suas áreas. Neste caso, para esta análise, deve-se levar em consideração alguns requisitos tais como: i) que os sinais correspondentes ao mesmo hidrogênio (da molécula associada com a  $\beta$ -CD e livre) apareçam suficientemente separadas no espectro; ii) que estes sinais não apareçam com o mesmo deslocamento químico que o sinal de outro hidrogênio da mesma molécula; iii) tendo em solução dois compostos, que a análise leve em consideração a não sobreposição com sinais dos hidrogênios da outra molécula.

Para ilustrar esta problemática, a Figura 5.53 mostra como exemplo, os espectros do CHAPS e a  $\beta$ -CD puros. A análise fornece uma idéia bastante clara dos sinais que podem ser descartados e os que devem ser considerados. É o caso do sinal do P-7 pertencente à molécula do CHAPS, que não pode ser utilizado em estudos quantitativos, por encontrar-se sobreposto aos sinais referentes aos H-3, H-6 e H-5 da  $\beta$ -CD.



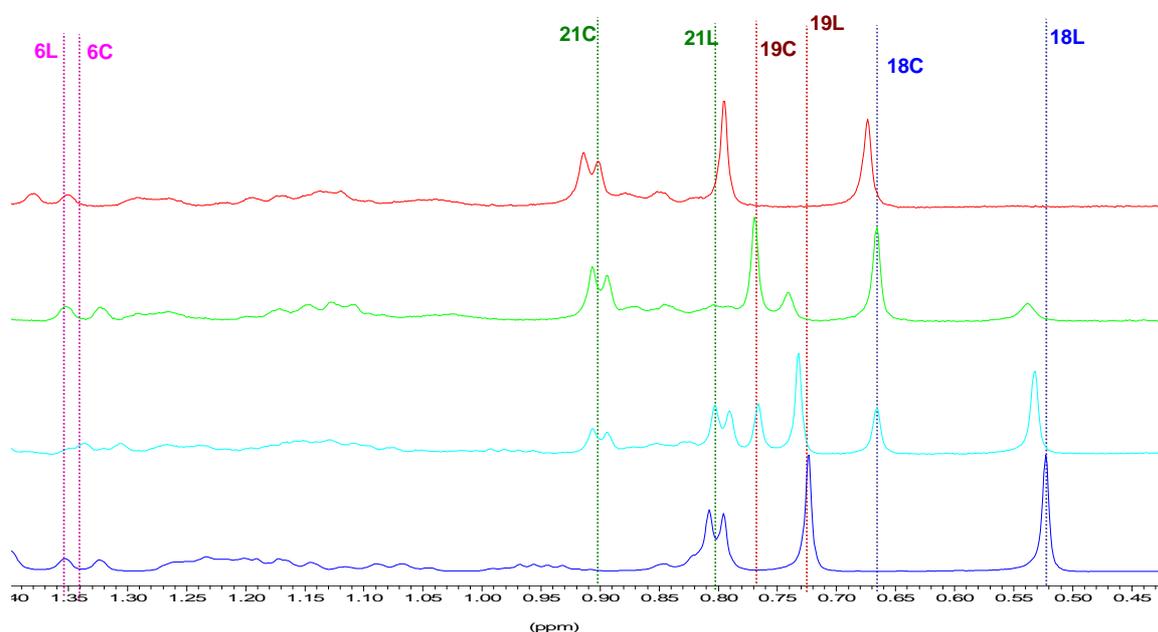
**Figura 5.53** - Espectros de  $^1\text{H}$  sobrepostos de CHAPS 10 mM (vermelho) em solução, com a  $\beta$ -CD 10 mM (preto) (soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural; 500 MHz).

Finalmente, a Figura 5.54 ilustra os sinais do hóspede que estão suficientemente separados entre si para serem analisados como independentes. Deduz-se então, que os únicos hidrogênios possíveis de análise para determinação da estequiometria e da constante de formação do complexo, são os dos carbonos 18, 19, 21, 25 e 12 do CHAPS e o 5 complexado da  $\beta$ -CD. Para o CHAPSO, o hidrogênio 25 (complexado) não poderá ser analisado, uma vez que aparece com o mesmo valor de deslocamento químico que os sinais correspondentes às metilas 31 e 32.

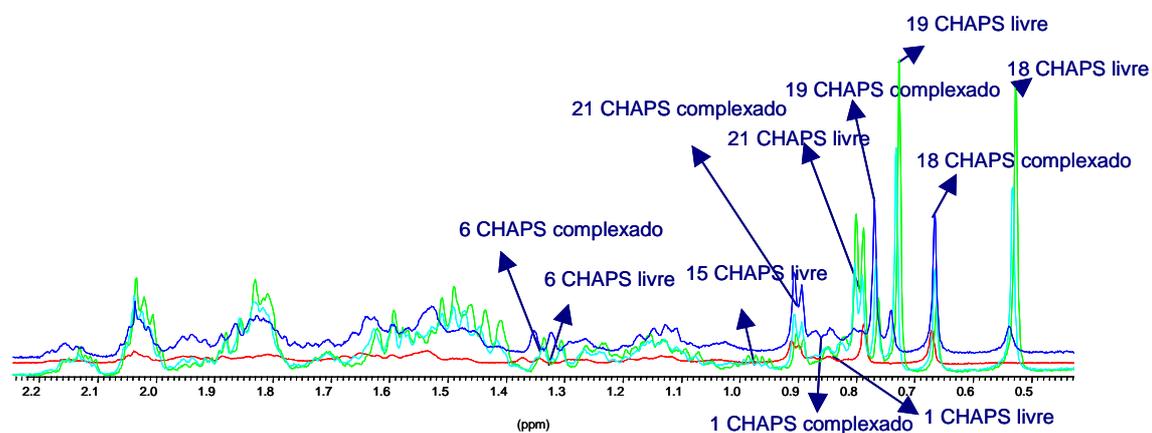


**Figura 5.54** - Espectros de  $^1\text{H}$  com diferentes concentrações de CHAPS e  $\beta$ -CD: azul escuro: 1 mM  $\beta$ -CD e 9 mM CHAPS; azul claro: 3 mM  $\beta$ -CD e 7 mM CHAPS, verde: 5 mM  $\beta$ -CD e 5 mM CHAPS; vermelho: 8 mM  $\beta$ -CD e 2 mM CHAPS. Soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 5-6 (natural da solução), 500 MHz.

A Figura 5.55 mostra claramente o desdobramento dos sinais referentes aos hidrogênios P-18, P-19 e P-21 e deslocamento químico dos H-6. Observa-se um decréscimo gradual dos sinais de CHAPS quando está livre em solução à medida que diminui a sua concentração e aumenta a de  $\beta$ -CD até seu completo desaparecimento. Por outro lado, observa-se um aumento gradual dos sinais do CHAPS quando se encontra complexado com a  $\beta$ -CD na mesma seqüência de concentrações. Ver também a Figura 5.56.



**Figura 5.55** - Espectros de  $^1\text{H}$  com diferentes concentrações de CHAPS 1mM e  $\beta$ -CD 9mM (vermelho), CHAPS 5 mM e  $\beta$ -CD 5 mM (verde), CHAPS 7 mM e  $\beta$ -CD 3 mM (azul claro) e CHAPS 10 mM (azul escuro). Soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural (5,0-6,0), 500 MHz. Os símbolos “L” indicam hidrogênios da substância livre e “C” complexada.



**Figura 5.56** - Espectros de  $^1\text{H}$  parciais sobrepostos de CHAPS 2 mM e  $\beta$ -CD 8 mM (vermelho), CHAPS 5 mM e  $\beta$ -CD 5 mM (azul escuro), CHAPS 7 mM e  $\beta$ -CD 3 mM (azul claro) e CHAPS 8mM e  $\beta$ -CD 2 mM (verde); soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural (5,0-6,0), 500 MHz.

Uma análise mais criteriosa demonstra que ocorreu sobreposição da base dos sinais, o que dificultou a utilização do sistema de integração normal oferecido pelos diferentes programas de análises dos espectros de RMN disponíveis comercialmente. Portanto, para obtenção de valores confiáveis a partir das áreas a serem analisadas, foi utilizado um programa em “Mathcad Profissional 2001”, cujo ajuste de dados de intensidade ( $I_{\text{RMN-ppm}}$ ) a uma função composta por Lorentzianas simula a zona do espectro de interesse para um conjunto de sinais. Este programa permite a obtenção de uma função global que melhor descreva a soma dos sinais, mediante um ajuste dos dados experimentais através do método de “Levenberg-Marquardt”. Uma vez obtidos os valores referentes aos parâmetros da função global, estes são separados em funções, os quais descrevem cada um dos sinais e que são passíveis de integração individual.

No Anexo B, é demonstrado um exemplo de ajuste de varias zonas do espectro. Portanto, a área dos sinais será a propriedade a ser considerada e relacionada com a concentração do complexo. Uma vez determinadas as áreas de cada sinal do espectro, é necessário buscar uma relação entre a área e a concentração do composto a ser avaliado, que neste caso é o complexo. Para esta análise, é necessária a escolha de um hidrogênio considerado como “referência”, cujo sinal não apresenta desdobramento e que a área esteja diretamente relacionada à concentração inicial do esteróide (CHAPS/CHAPSO) ou  $\beta$ -CD. Como hidrogênios de referência foram escolhidas as metilas 31 e 32 para o CHAPS e H-23 para o CHAPSO.

Deste modo, pode-se propor as equações 5.2-5.4 em que,

$$\text{área}_C = \text{cte}_1 [C] \quad (5.2)$$

$$\text{área}_A = \text{cte}_1 [A]_0 \quad (5.3)$$

$$\text{área}_C = \frac{\text{cte}}{[A]_0} [C] \quad (5.4)$$

Nestas equações, **A** se refere a um hidrogênio de referência ou padrão, **C** se refere ao complexo, e  $\text{área}_C$  representa a área de um hidrogênio que sofre influência no processo de formação do complexo, diferenciando-se os sinais correspondentes à molécula livre e à

complexada. Neste trabalho de tese foi analisado unicamente os sinais dos hidrogênios referentes à molécula complexada.

Finalmente, tendo a (5.4), transformam-se as equações referentes à concentração em função dos deslocamentos químicos, em equações as quais relacionam as áreas em função das concentrações e constante de associação, tanto para um complexo do tipo 1:1 como para 1:2. Estas podem ser reescritas como:

Complexo 1:1:

$$C_{11} = \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{K_{11}} + [CD]_0 + [H]_0 - \sqrt{\left( \frac{1}{K_{11}} + [CD]_0 + [H]_0 \right)^2 - 4[CD]_0[H]_0} \right\} \quad (5.5)$$

Complexo 1:2:

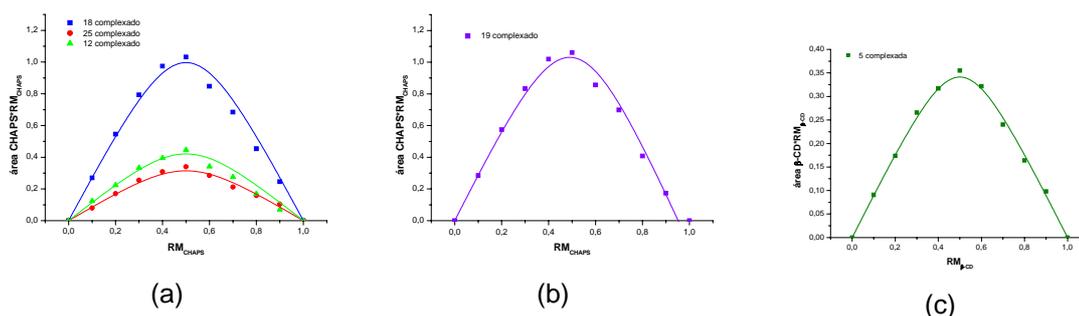
$$C_{11} = \frac{K_{11}[CD][H]_0}{1 + K_{11}[CD] + K_{11}K_{12}[CD]^2} \quad (5.6)$$

$$C_{12} = \frac{K_{11}K_{12}[CD]^2[H]_0}{1 + K_{11}[CD] + K_{11}K_{12}[CD]^2} \quad (5.7)$$

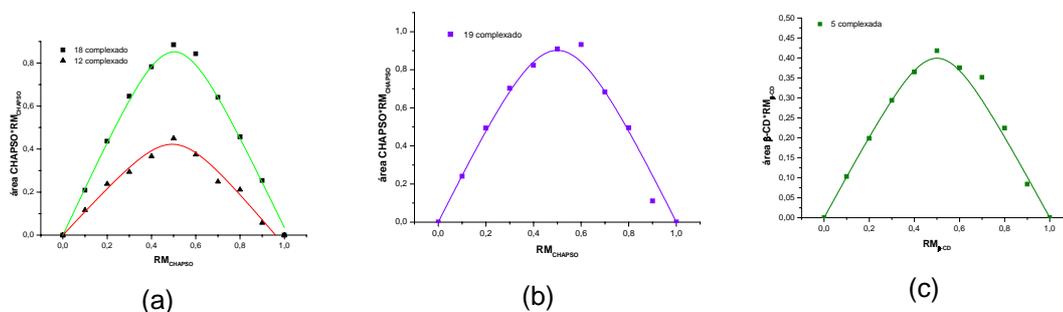
$$K_{11}K_{12}[CD]^3 + K_{11}\{2K_{12}[H]_0 - K_{12}[CD]_0 + 1\}[CD]^2 + \{K_{11}[H]_0 - K_{11}[CD]_0 + 1\}[CD] - [CD]_0 = 0 \quad (5.8)$$

Antes de prosseguir na obtenção das constantes de equilíbrio, é necessário conhecer a estequiometria dos complexos formados, utilizando-se para isto o método de Job e os experimentos ROE.

A Figura 5.57 mostra a curva de Job para a área dos hidrogênios da molécula de CHAPS em (a) 18, 25 e 12 complexados, (b) 19 complexado e (c) para o hidrogênio 5 complexado da  $\beta$ -CD. Os pontos representam os valores experimentais e as linhas são o resultado do ajuste matemático destes dados. De modo análogo, a Figura 5.58 mostra os resultados obtidos para o CHAPSO.

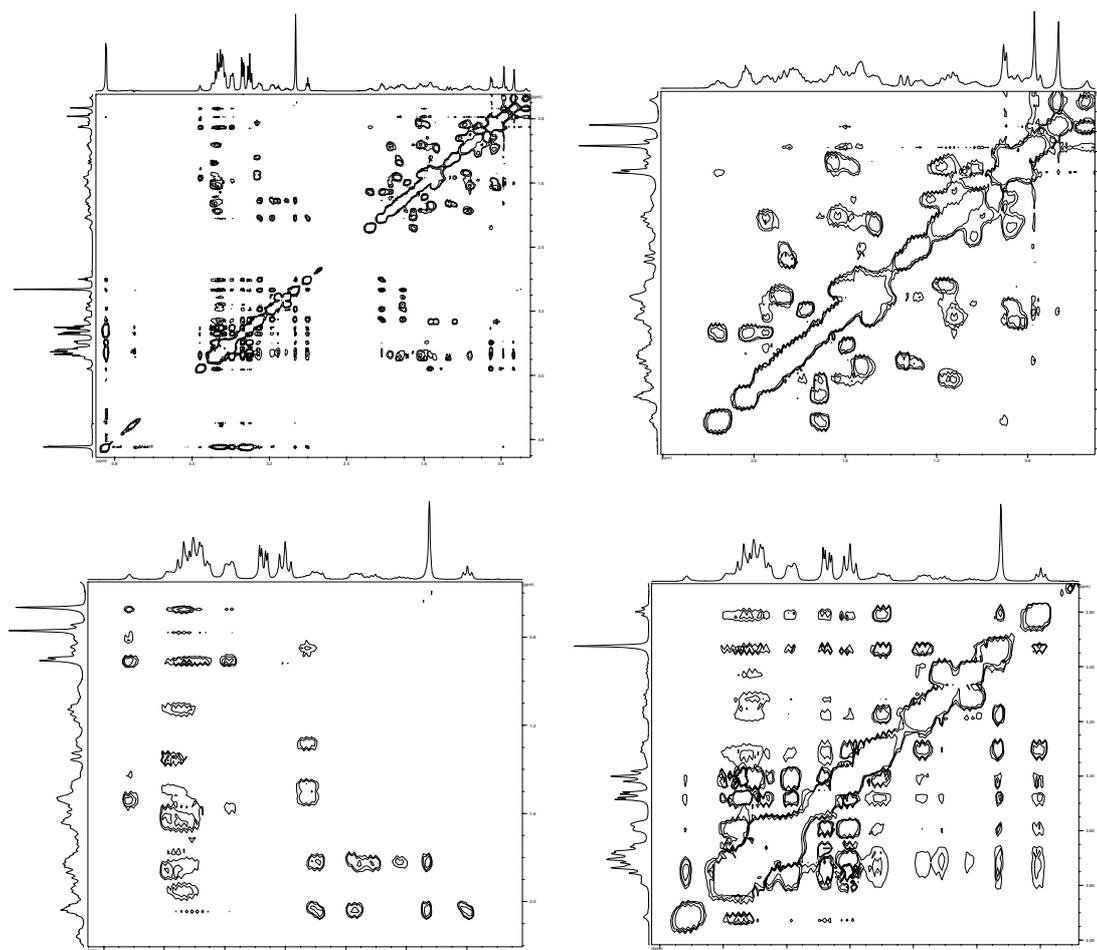


**Figura 5.57** - Curvas de Job das áreas dos hidrogênios de CHAPS (a) 18, 25 e 12 complexados, (b) 19 complexado e (c) 5 complexado da  $\beta$ -CD; soluções em D<sub>2</sub>O, pH natural, 500 MHz.

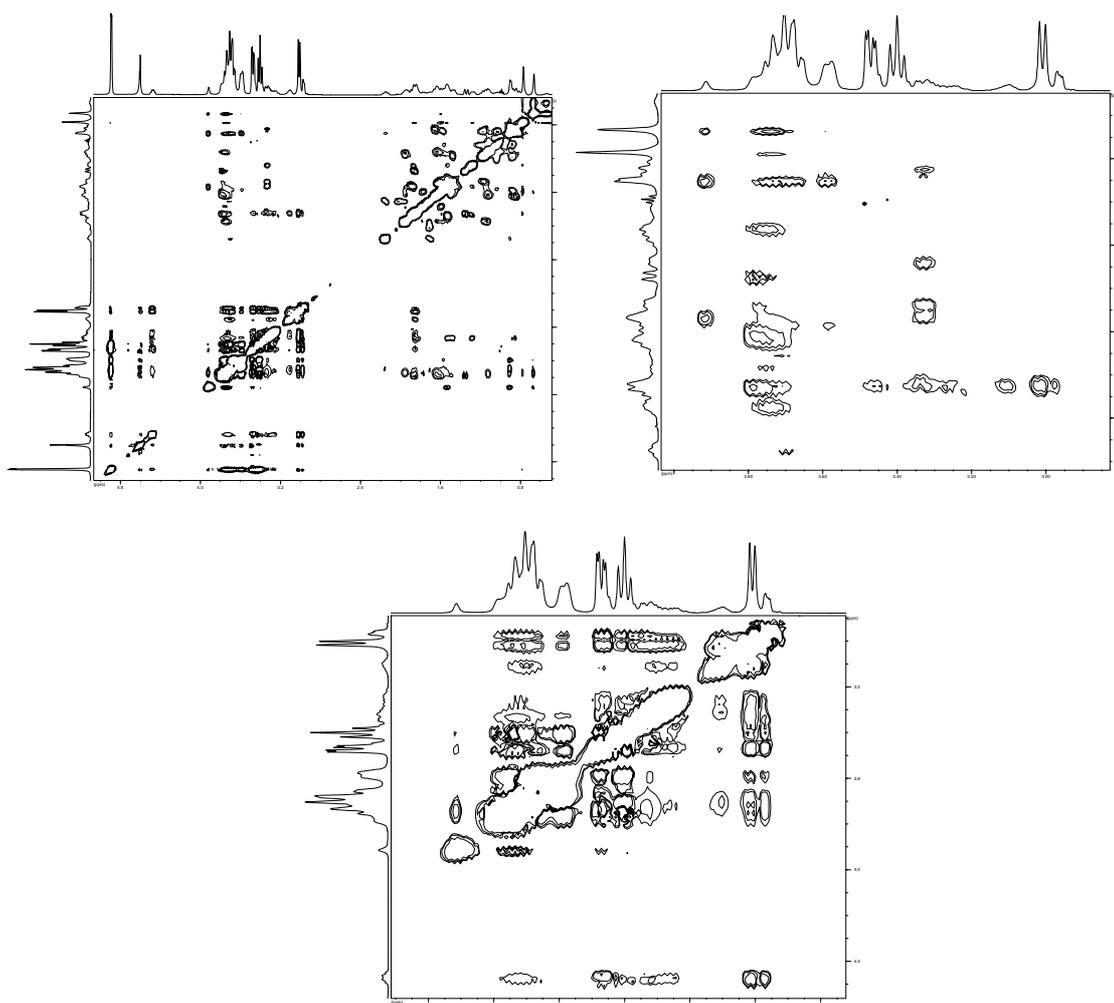


**Figura 5.58** - Curvas de Job das áreas dos hidrogênios de CHAPSO (a) 18 e 25 complexados, (b) 19 complexado e (c) 5 complexado da  $\beta$ -CD; soluções em D<sub>2</sub>O, pH natural, 500 MHz.

Os resultados anteriores sugerem que os complexos formados entre a  $\beta$ -CD e os compostos CHAPS e CHAPSO apresentam uma estequiometria do tipo 1:1. Como já foi mencionado, tanto os sais biliares dihidroxílicos,<sup>21</sup> como o fusidato de sódio e helvolato de potássio estudados nesta presente tese de doutorado, formam complexos do tipo 1:2. Para confirmar a estequiometria determinada pelo método de Job, foram analisados os espectros ROESY dos complexos, cujos resultados são visualizados nas Figuras 5.59 e 5.60 e Tabela 5.14.



**Figura 5.59** - ROESY de uma solução 10 mM de  $\beta$ -CD e 10mM de CHAPS (soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH natural ) 500 MHz.



**Figura 5.60** - ROESY de uma solução 10 mM de  $\beta$ -CD e 10mM de CHAPSO (soluções em D<sub>2</sub>O, pH natural); 500MHz.

**Tabela 5.14** - Interações observadas no espectro ROESY (solução em D<sub>2</sub>O, pH natural, 10 mM de  $\beta$ -CD e 10 mM de CHAPS/CHAPSO), entre hidrogênios (Pn) de CHAPS e CHAPSO e hidrogênios (Hn) da  $\beta$ -CD.

Localização	Átomo de C	$\beta$ -CD					
		CHAPS			CHAPSO		
		H-3	H-5	H-6	H-3	H-5	H-6
Anel A	P-1				m		
	P-2	m	m		F	f	
	P-3						
	P-4	m			m		
Anel A/B	P-5						
Anel B	P-6	m					
	P-7	m	m		m		
Anel B/C	P-8						
	P-9	F			F		
Anel C	P-11	m					
	P-12	F	f		F	f	
Anel C/D	P-13						
	P-14						
Anel D	P-15						
	P-16				f		
	P-17						
Anel C/D	P-18	F	f	f	F		f
Anel A/B	P-19	m			m		
Cadeia lateral	P-20	m					
	P-21	F	F	F	F	F	F
	P-22	F		m	F		
	P-23	f			f		
	P-24						
	P-25	F			F		f
	P-26	F			F		
	P-27	F					
	P-28	F	m	m	F	m	m
	P-29	f		f	m	f	
P-30	F	m	m	F	m	m	
P-31	F	F	F	F	F	F	
P-32	F	F	F	F	F	F	

**Representação:** interações fortes (F), médias (m), fracas (f) e ausência de interações (em branco).

A análise do espectro bidimensional ROESY, diferencia claramente dois grupos de sinais, àqueles correspondentes ao CHAPS/CHAPSO e à  $\beta$ -CD formando o complexo (possuindo correlações) e àqueles correspondentes tanto ao CHAPS/CHAPSO quanto à  $\beta$ -CD livres (este último grupo com ausência de interações). Os resultados obtidos conduzem a algumas considerações:

- i) Os sinais das metilas 19, 18 e 21 livres não apresentam interação com a  $\beta$ -CD.

- ii) Tanto para o CHAPS quanto para o CHAPSO, não existem interações intramoleculares entre os hidrogênios pertencentes à cadeia lateral e os dos anéis a partir do C23 inclusive, o que sugere uma cadeia lateral mais rígida e em sua forma estendida.
- iii) Os sinais pertencentes aos H-25 quando livres, tanto para o CHAPS quanto CHAPSO, aparecem com um único deslocamento químico. Porém se desdobram e mostram deslocamentos químicos e constantes de acoplamento distintos por ocorrência de uma certa rigidez desta região da cadeia, resultado do efeito da complexação com a  $\beta$ -CD.
- iv) A entrada de apenas uma molécula de  $\beta$ -CD pela região da cadeia lateral, não justifica o desdobramento da metila 19 em dois sinais distintos no processo de complexação, já que a  $\beta$ -CD não possui diâmetro suficiente para atingir a referida estrutura até metade destes anéis.

A partir das considerações, observa-se então que:

- i) Os gráficos de Job sugerem a formação de complexos 1:1
- ii) Os espectros ROESY parecem indicar que participam do processo de complexação duas moléculas de  $\beta$ -CD, uma através da região da cadeia lateral do esteróide e outra através do anel A, ambas pela parte mais larga da cavidade da  $\beta$ -CD. Isto quer dizer que estes espectros sugerem a existência de complexos 1:2.

Portanto, observa-se uma contradição entre ambos os experimentos.

Outra maneira de interpretar estes resultados, sem que ocorra contradição entre os dados obtidos dos espectros ROESY e a representação de Job seria considerar a possibilidade de formação de dois complexos 1:1 diferentes em solução. Os dados dos espectros ROESY seriam idênticos nos dois casos, tanto para complexo 1:2 (duas moléculas de  $\beta$ -CD para uma de esteróide), quanto para dois complexos 1:1 diferentes, com uma molécula de  $\beta$ -CD complexando através da região dos anéis em uma molécula de esteróide e outra  $\beta$ -CD através da cadeia lateral em outra molécula de esteróide.

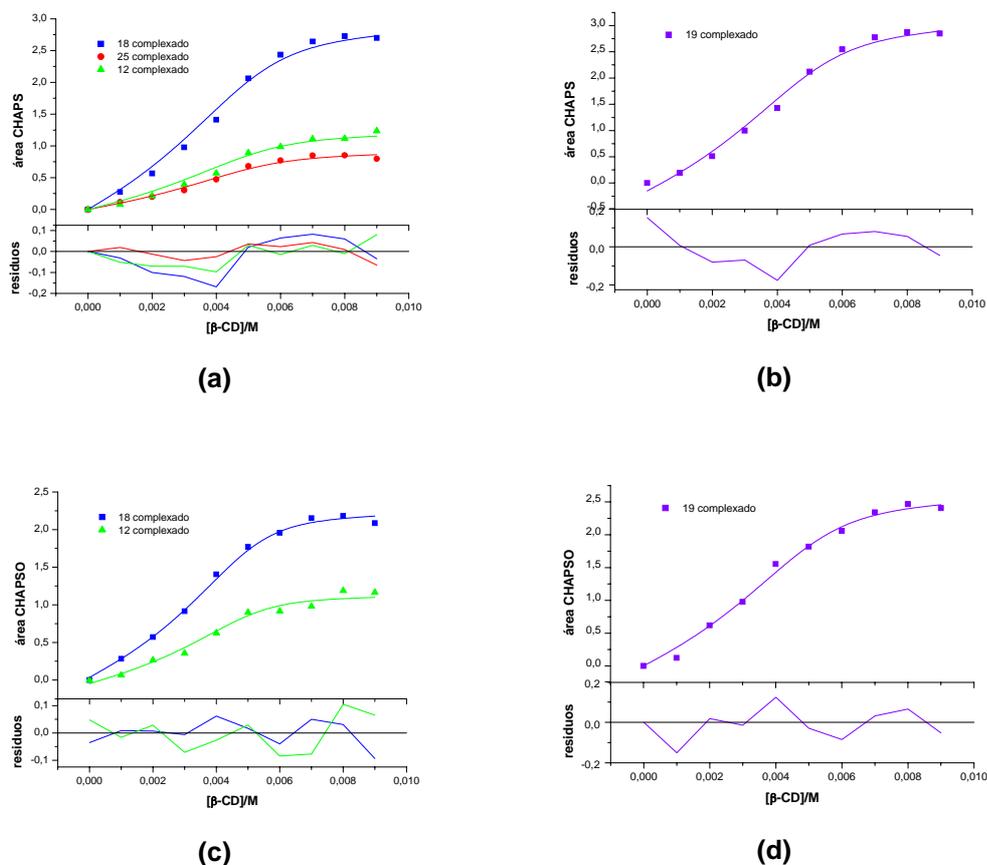
*Determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo*

A possibilidade de existência de dois complexos 1:1 diferentes em solução, conduz à divisão dos hidrogênios do esteróide em duas regiões distintas, os que se encontram próximos do anel A e os que se encontram na região da cadeia lateral. Assim, pode-se analisar separadamente as áreas das duas regiões de acordo com a equação (5.4) e obter valores distintos para cada uma das duas micro-constantes de associação que correspondem aos dois complexos separados. Estas constantes serão denominadas  $K_{11}^X$  e  $K_{11}^Y$ . Os hidrogênios analisados presentes nestas duas regiões são os H-12, H-18 e H-25, correspondentes à região da cadeia lateral, e o H-19 correspondente ao anel A do hóspede. Evidentemente esta análise somente se refere aos sinais dos hidrogênios do hóspede, já que a análise dos sinais da ciclodextrina conduzem à obtenção de uma macro-constante de equilíbrio.

Com os devidos ajustes em um programa “Origin 6,0” obtém-se através do método “Levenberg-Marquardt” os resultados apresentados na Tabela 5.15 e Figura 5.61.

**Tabela 5.15** - Resultados dos ajustes das áreas de hidrogênios do CHAPS e CHAPSO, no qual descreve um comportamento de complexo 1:1.

região		CHAPS	CHAPSO
Cadeia lateral	$10^3 K_{11}^X / M$	1,39±0,39	2,9±1,1
	$X^2$	0.0048	0.0038
	$R^2$	0.9944	0.9944
anel A	$10^3 K_{11}^Y / M$	1,34±0,59	1,48±0,67
	$X^2$	0.0116	0.0078
	$R^2$	0.9931	0.9932



**Figura 5.61** - Curvas experimentais e teóricas da área dos hidrogênios do CHAPS (a) e CHAPSO (c) região da cadeia lateral, CHAPS (b) e CHAPSO (d) região do anel A; soluções em D<sub>2</sub>O, pH natural.

No entanto, as áreas dos sinais dos hidrogênios da  $\beta$ -CD podem ser analisadas para obter relações entre as constantes. Neste caso, utilizam-se as equações de equilíbrio de formação (5.9) e (5.10) dos complexos  $X$  e  $Y$  e as de balanço de matéria (5.11) e (5.12),



$$[CD] = [CD]_o - [X] - [Y] \quad (5.11)$$

$$[H] = [H]_o - [X] - [Y] \quad (5.12)$$

sendo CD, a  $\beta$ -CD livre em solução; H, o esteróide (CHAPS ou CHAPSO) livres em solução; X e Y, os dois complexos 1:1 que se formam;  $[CD]_o$ , a concentração inicial de  $\beta$ -CD e  $[H]_o$ , a concentração inicial de CHAPS ou CHAPSO.

Os sinais dos hidrogênios da  $\beta$ -CD complexada, os quais correspondem ao complexo X e Y, podem ser observados em deslocamentos químicos diferentes e a equação que relaciona as áreas será obtida pela (5.13),

$$\text{área}_{\beta CD} = \frac{cte}{[CD]_o} ([X] + [Y]) \quad (5.13)$$

Neste caso, o ambiente eletrônico das duas  $\beta$ -CD, a que entra através da região do anel A e da cadeia lateral são tão semelhantes, que não existe diferença nos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios que correspondem a  $\beta$ -CD complexada, e os sinais que se observam no espectro correspondente a uma combinação dos dois complexos. Assim, a dedução das equações que leva à obtenção das constantes para um complexo de estequiometria 1:1 é obtida a partir das equações (5.14)-(5.16) para as concentrações de complexos X e Y e de  $\beta$ -CD livres em solução,

$$[X] = \frac{K_{11}^X [CD][H]_o}{1 + (K_{11}^X + K_{11}^Y)[CD]} \quad (5.14)$$

$$[Y] = \frac{K_{11}^Y [CD][H]_o}{1 + (K_{11}^X + K_{11}^Y)[CD]} \quad (5.15)$$

$$[CD]^2 + \left( [H]_o - [CD]_o + \frac{1}{K_{11}^X + K_{11}^Y} \right) [CD] - \frac{[CD]_o}{K_{11}^X + K_{11}^Y} = 0 \quad (5.16)$$

Considerando  $K_{11}^{XY} = K_{11}^X + K_{11}^Y$  e substituindo as equações (5.14) e (5.15) na equação (5.13), obtém-se a equação (5.17),

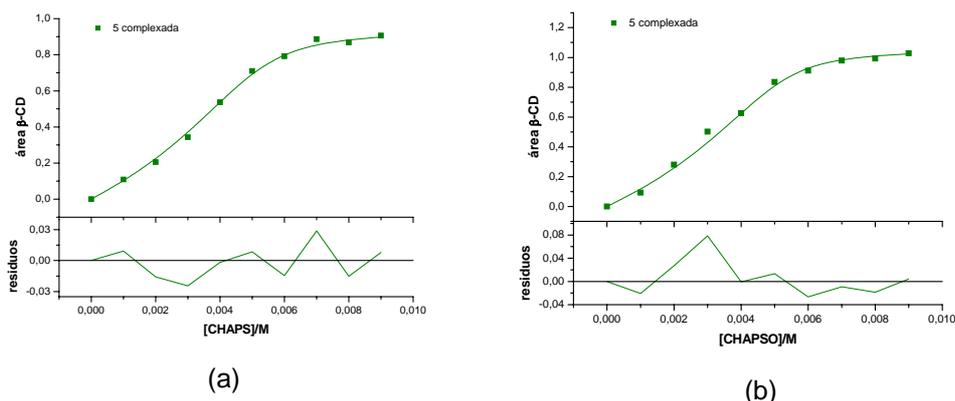
$$\text{área}_{\beta\text{CD}} = \frac{cte}{[\text{CD}]_o} \left[ \frac{K_{11}[\text{CD}][\text{H}]_o}{1 + K_{11}[\text{CD}]} \right] \quad (5.17)$$

A equação (5.17) indica que todo o conjunto comporta-se como um equilíbrio de um único pseudo-complexo. Porém neste caso, a obtenção da constante se dá através da soma das constantes dos equilíbrios dos complexos X e Y demonstrados anteriormente.

Resolve-se a equação de segundo grau e substitui-se a concentração de  $\beta$ -CD na equação (5.17). Os dados das áreas do sinal do hidrogênio 5 da  $\beta$ -CD complexada são ajustados através do Programa "Origin 6,0". Os resultados são mostrados na Tabela 5.16 e Figura 5.62.

**Tabela 5.16** - Resultados dos ajustes das áreas dos hidrogênios do CHAPS e CHAPSO na qual descreve comportamento do pseudo-complexo 1:1.

	CHAPS	CHAPSO
$10^3 (K_{11}^{XY} = K_{11}^X + K_{11}^Y) / M$	$2,20 \pm 0,60$	$2,9 \pm 1,5$
$\chi^2$	0.00033	0.00124
$R^2$	0.9979	0.9936

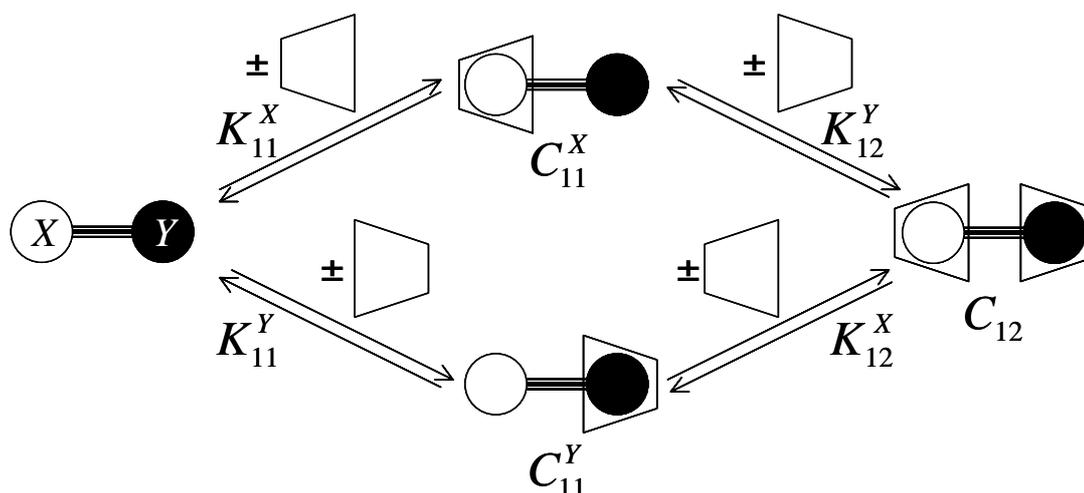


**Figura 5.62** - Curvas experimentais e teóricas da área do hidrogênio 5 da  $\beta$ -CD complexada com (a) CHAPS e (b) CHAPSO; soluções em  $D_2O$ , pH natural (5,0-6,0).

Considerando que os sais biliares, fusidato de sódio e helvolato de potássio formam complexos 1:2 com a  $\beta$ -CD, cabe neste momento perguntar as razões pela ausência de tal

complexo para o CHAPS e o CHAPSO? A seguir, estas questões interessantes serão analisadas.

Considerando a formação de dois complexos diferentes 1:1, uma possível formação de um complexo 1:2 requer a introdução de uma segunda unidade de ciclodextrina em qualquer dos complexos 1:1 indicados. De forma esquemática, esta situação pode ser representada na Figura 5.63 para qualquer hóspede ditópico com duas posições de complexação X e Y não equivalentes. Este sistema se assemelha aos equilíbrios de protonação de um aminoácido, os quais foram analisados por Alvarez Parrilla et al.<sup>153</sup> para a complexação do ácido 6-(p-toluidin) naftalen-2-sulfônico (TNS) (ver Figura 3.3).



**Figura 5.63** - Formação de um complexo 1:2 de um hóspede ditópico a partir de dois possíveis complexos 1:1.

Neste sistema, observa-se que,

$$K_{11}^X K_{12}^Y = K_{11}^Y K_{12}^X \quad (5.18)$$

Considerando que,

$$C_{11} = C_{11}^X + C_{11}^Y \quad (5.19)$$

pode-se definir as macro-constantes de equilíbrio  $K_{11}^{XY}$  e  $K_{12}^{XY}$ ,

$$K_{11}^{XY} = K_{11}^X + K_{11}^Y \quad (5.20)$$

$$K_{12}^{XY} = \frac{K_{12}^X K_{12}^Y}{K_{12}^X + K_{12}^Y} \quad (5.21)$$

em que as micro-constantes  $K_{11}^X$ ,  $K_{11}^Y$ ,  $K_{12}^X$  e  $K_{12}^Y$  são definidas a partir do esquema da Figura 5.63.

Definindo-se o parâmetro de cooperação  $\alpha_{XY}$ ,

$$\alpha_{XY} = \frac{K_{12}^X}{K_{11}^X} = \frac{K_{12}^Y}{K_{11}^Y} \quad (5.22)$$

a equação 5.21 pode ser reescrita como,

$$K_{12}^{XY} = \frac{\alpha_{XY} K_{11}^X K_{11}^Y}{K_{11}^{XY}} \quad (5.23)$$

O significado do parâmetro de cooperação introduzido por Connors et al.,<sup>22, 23</sup> é compreendido mais facilmente a partir de duas situações extremas. Em primeiro lugar, se a complexação de ambos os pontos se faz de forma independente (isto é, a presença de uma unidade de ciclodextrina não influencia na complexação da segunda posição), então  $K_{11}^X = K_{12}^X$  e  $K_{11}^Y = K_{12}^Y$  e portanto  $\alpha_{XY} = 1$ . Ao contrário, se a presença de uma unidade de ciclodextrina influencia na complexação da segunda posição até ao ponto de impedi-la, isto é,  $K_{12}^X = K_{12}^Y = 0$  e  $\alpha_{XY} = 0$ . Portanto, valores pequenos de  $\alpha_{XY}$  indicam que a formação do complexo 1:2 a partir de qualquer dos dois complexos 1:1 está bastante desfavorecida.

Os valores publicados para a complexação do TNS<sup>153</sup> permitem calcular um valor de  $\alpha_{XY}$  igual a 0,066 enquanto que Connors et al.,<sup>22, 23</sup> ao estudar a complexação de diversos derivados simétricos dissubstituídos do benzeno e bifenilas por  $\alpha$ -CD, obtiveram valores para este parâmetro, que se encontram nos intervalos de 11,7-0,071 e 33-0,5 para os derivados do benzeno e bifenilas, respectivamente.

A não observância de uma concentração significativa de complexo 1:2, sugere que o valor do parâmetro  $\alpha_{XY}$  para os sistemas aqui estudados deve ser muito pequeno. Utilizando os dados experimentais, tem sido feitas tentativas de otimização com base no esquema de equilíbrios representado na Figura 5.63. Os resultados obtidos sugerem que, efetivamente o valor do parâmetro  $\alpha_{XY}$  é bastante próximo a zero. Esta conclusão é concordante com a determinação das constantes microscópicas  $K_{11}^X$  e  $K_{11}^Y$ , bem como com a macroscópica  $K_{11}^{XY}$ , podendo comprovar a consistência do modelo proposto para estes sistemas. Efetivamente, os valores das constantes obtidas das Tabelas 5.15 e 5.16, mostram dentro do erro experimental, uma concordância excelente.

#### *Estrutura dos complexos*

A partir dos espectros ROESY, é possível propor a estrutura dos complexos de inclusão 1:1, que se formam entre o CHAPS e o CHAPSO com a  $\beta$ -CD. As mesmas são apresentadas nas Figuras 5.64 e 5.65.

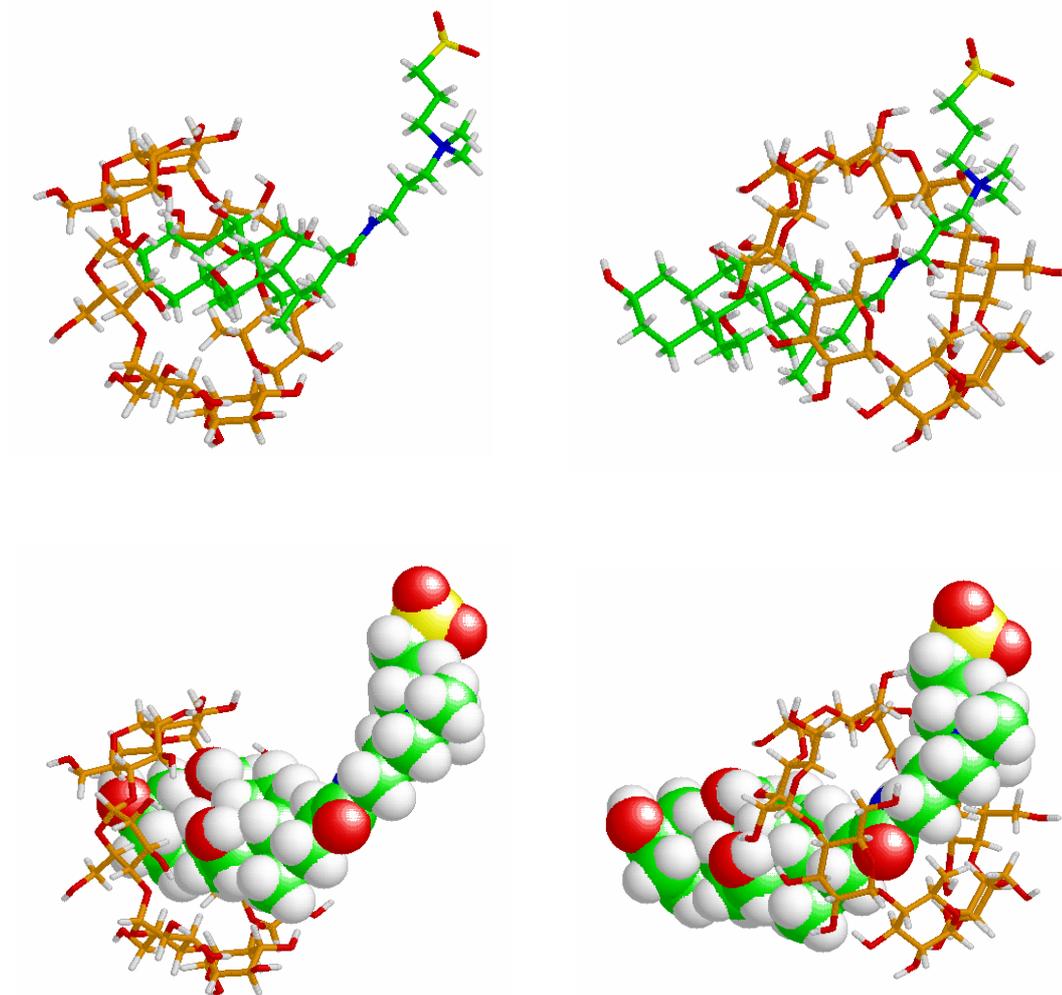
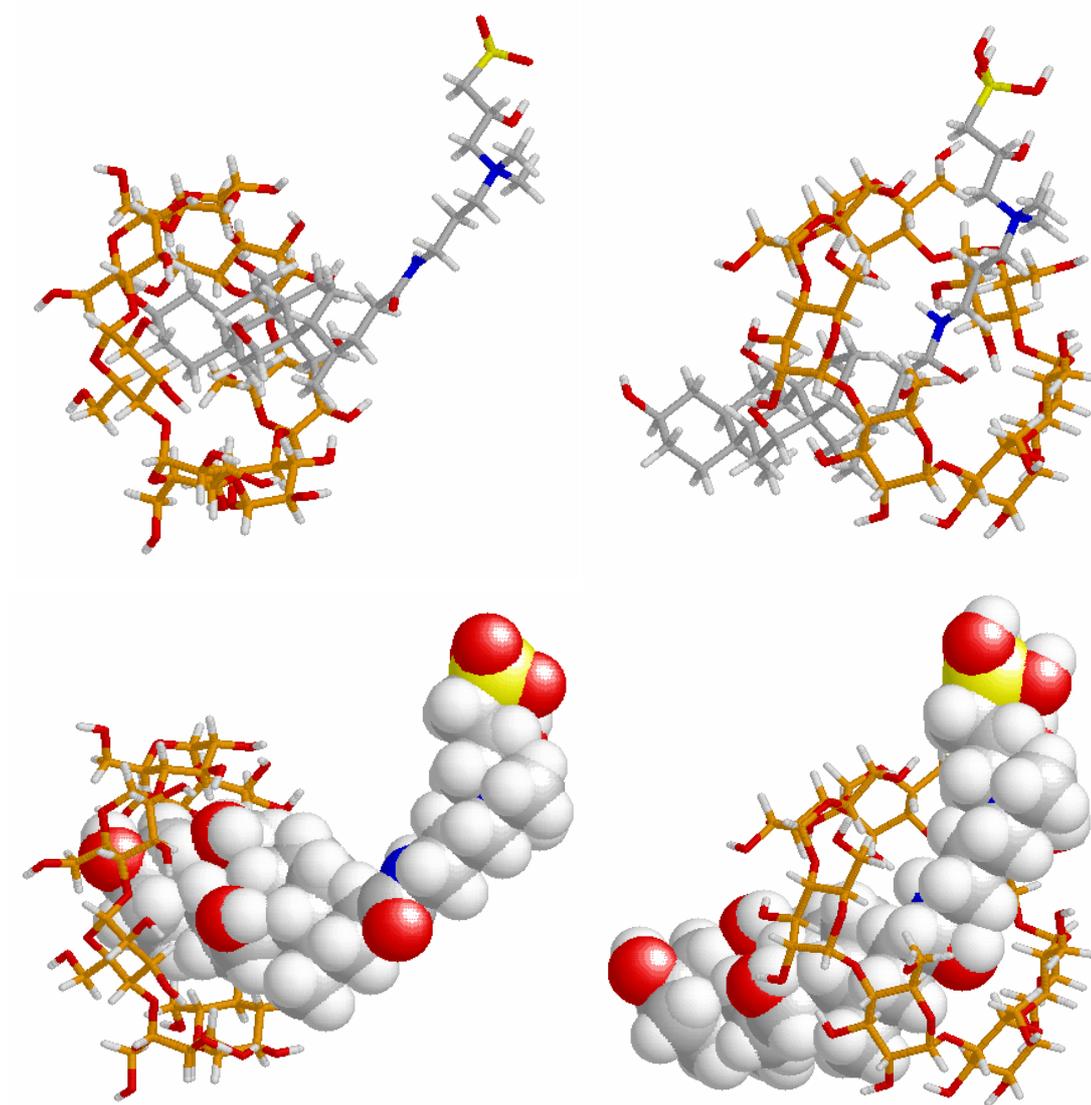


Figura 5.64 - Representação espacial do complexo CHAPS:β-CD.



**Figura 5.65** - Representação espacial do complexo CHAPSO:  $\beta$ -CD.

## 6 - CONCLUSÕES

Com relação aos estudos referentes ao furoato de diloxanida(FD), conclui-se que:

- A determinação do valor da constante de formação do complexo, através do método de solubilidade, segundo Higuchi et al., foi de  $427,4 \text{ M}^{-1}$  com um perfil do tipo Bs, coincidente com o estudo determinado por Nieto Reyes , cujo valor da constante foi de  $430,0 \text{ M}^{-1}$ .
- As condições experimentais pelas quais se desenvolve o método proposto por Higuchi et al., indicam que após 07 dias e a  $37^{\circ}\text{C}$ , observa-se hidrólise do FD.
- A diferença no valor obtido para a constante de equilíbrio ou de formação do complexo FD/ $\beta$ -CD através do método cinético com o valor de  $517,0 \text{ M}^{-1}$  comparado ao de solubilidade de  $427,4 \text{ M}^{-1}$ , pode ser explicado pela competição entre as reações de hidrólise e complexação. Isto faz com que diminua o valor da constante através do método de solubilidade e presume-se que o método cinético é o que apresenta maior confiabilidade.
- Considerando que no estudo da reação de hidrólise do FD, a  $\beta$ -CD promove inibição da reação com um perfil de cinética de saturação, enquanto que a  $\beta$ -CD sulfatada promove catálise, postula-se um comportamento característico de reações enzimáticas devido à existência de sítios reativos e/ou grupos catalíticos presentes na estrutura da ciclodextrina.
- Utilizando a equação de Lineweaver-Burk modificada, foram observadas relações lineares para a formação dos complexos FD/ $\beta$ -CD e FD/ $\beta$ -CD sulfatada, confirmando a formação de complexos 1:1, com valores de  $K_{1:1}$  de  $517,0$  e  $116,8 \text{ M}^{-1}$  respectivamente, para a  $\beta$ -CD e  $\beta$ -CD sulfatada.
- O maior valor da constante de formação do complexo para a  $\beta$ -CD em relação a  $\beta$ -CD sulfatada, pode ser explicado pela maior interação da  $\beta$ -CD com este fármaco, onde deve ocorrer uma maior proteção do grupo éster ao ataque da água, constatado através da inibição da reação de hidrólise.

- O estudo da influência da força iônica no processo de formação do complexo FD/ $\beta$ -CD na ausência de KCl, apresentou o valor da constante de 509,0 M<sup>-1</sup>.
- Não foi possível determinar a constante de formação do complexo FD/ $\beta$ -CD através da técnica de fluorescência, provavelmente devido à baixa solubilidade do FD em água e pouca fluorescência.
- Não foi possível verificar a formação do complexo FD/ $\beta$ -CD através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, provavelmente devido à baixa solubilidade do FD em água e as condições experimentais testadas.

Com relação aos estudos de formação dos complexos de inclusão dos compostos esteroidais: ácidos fusídico e helvólico, CHAPS e CHAPSO, através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, conclui-se que:

- O assinalamento das moléculas de fusidato de sódio, helvolato de potássio, CHAPS e CHAPSO foram feitas através das técnicas de RMN mono (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT) e bidimensionais (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H, NOESY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H e ROESY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H).
- Os dados obtidos referentes aos deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o assinalamento do fusidato de sódio são similares aos únicos dados publicados até o momento por Barber et al.
- Os estudos de formação dos complexos de fusidato de sódio e helvolato de potássio com  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD por RMN mono e bidimensionais e utilizando o método de Job, demonstraram estequiometria do tipo 1:1 com a  $\gamma$ -CD e 1:2 com a  $\beta$ -CD.
- Os valores das constantes de formação dos complexos fusidato de sódio e helvolato de potássio na presença de  $\gamma$ -CD são  $K_{11} = (60 \pm 24) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  e  $K_{11} = (22 \pm 9) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ , respectivamente.
- $\beta$ -CD forma complexos 1:1 e 1:2 com ambos os esteróides, fusidato de sódio e helvolato de potássio, com valores de  $K_{11}$  moderados e baixo  $K_{12}$ , sendo para o fusidato de sódio  $K_{11} = (0,74 \pm 0,13) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  e  $K_{12} = (0,210 \pm 0,075) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  e para o helvolato de potássio  $K_{11} = (2,42 \pm 0,87) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  e  $K_{12} = (0,06 \pm 0,09) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ .

- Ambos os esteróides, fusidato de sódio e helvolato de potássio, incorporam-se no interior da  $\gamma$ -CD através da cadeia lateral, atingindo a região central do esteróide (anéis C e D), permanecendo os anéis A e B (parcialmente) fora da cavidade.
- Na análise dos complexos fusidato de sódio e helvolato de potássio com  $\beta$ -CD, os espectros ROESY mostraram uma notável ausência de interações dos hidrogênios pertencentes aos anéis C e D, enquanto interações correspondentes aos anéis A e B e à cadeia lateral foram fortemente evidenciadas.
- Através da análise das estruturas propostas a partir dos experimentos ROE, presume-se que a menor inclusão dos dois antibióticos esteroidais, fusidato e helvolato para dentro da cavidade da  $\beta$ -CD comparado aos sais biliares, seja provavelmente devido à estrutura da cadeia lateral considerada como a parte mais rígida da molécula, devido à ligação dupla carbono-carbono e à presença do substituinte acetoxi no C16.
- A partir do valor da constante de equilíbrio ( $K_{12}$ ) é possível concluir que tanto o fusidato de sódio quanto o helvolato de potássio não são considerados bons hóspedes ditópicos para a  $\beta$ -CD, comparados aos sais biliares diidroxílicos.
- Os estudos dos complexos de inclusão dos compostos CHAPS e CHAPSO na presença de  $\gamma$ - e  $\beta$ -CD, demonstraram comportamentos diferenciados de intercâmbio do hóspede em relação à escala de tempo de RMN. Neste caso, foi verificado um processo de intercâmbio lento da molécula hóspede (CHAPS ou CHAPSO) na presença de  $\beta$ -CD e intercâmbio rápido para a  $\gamma$ -CD.
- Os estudos de formação dos complexos CHAPS e CHAPSO com a  $\gamma$ -CD por RMN monodimensional e utilizando o método de Job, demonstraram estequiometria do tipo 1:1, cujos valores são  $K_{11} = (3,6 \pm 0,4) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  e  $K_{11} = (2,8 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ , respectivamente.
- A formação de dois complexos distintos 1:1 entre CHAPS ou CHAPSO com a  $\beta$ -CD, permite explicar a contradição existente entre ambos os experimentos, método de Job e espectros ROESY, os quais sugerem estequiometrias 1:1 e 1:2 respectivamente.
- Espectros ROESY diferenciam claramente dois grupos de sinais, àqueles correspondentes ao CHAPS/CHAPSO e à  $\beta$ -CD formando o complexo (possuindo correlações), e àqueles correspondentes tanto ao CHAPS/CHAPSO quanto à  $\beta$ -CD livres (com ausência de interações).

- No estudo do complexo com  $\beta$ -CD, uma análise individual dos hidrogênios pertencentes às duas regiões da estrutura esteroidal (CHAPS/CHAPSO), os que se encontram próximos ao anel A e os que se encontram na região da cadeia lateral, conduzem a distintos valores da constante de associação (micro-constantes), os quais descrevem um comportamento de complexo 1:1. A análise das constantes se refere aos sinais dos hidrogênios do hóspede, as quais foram designadas por  $K_{11}^X$  e  $K_{11}^Y$ , cujos valores para o CHAPS e CHAPSO são respectivamente,  $(1,39\pm 0,39)\times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ,  $(2,9\pm 1,1)\times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  e  $(1,34\pm 0,59)\times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ,  $(1,48\pm 0,67)\times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ .
- No estudo do complexo dos esteróides CHAPS/CHAPSO com a  $\beta$ -CD, uma análise feita através dos sinais da ciclodextrina leva à obtenção de uma macro-constante de equilíbrio ( $K_{11}^{XY}$ ) igual a soma das micro-constantes, cujo valor para o CHAPS e CHAPSO são respectivamente,  $(2,20\pm 0,60)\times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  e  $(2,9\pm 1,5)\times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ .
- Os valores das constantes  $K_{11}^X$ ,  $K_{11}^Y$  e  $K_{11}^{XY}$ , mostram uma excelente concordância dentro do erro experimental aceitável, corroborando com a não observância de uma concentração significativa de complexo 1:2 (curvas de Job e espectros ROE) e com o modelo proposto para complexos distintos 1:1.

## 7 - PERSPECTIVAS DE TRABALHO

Em trabalhos de pesquisa, além da solução aos problemas inicialmente propostos, novas possibilidades de campo de atuação são estabelecidas no transcorrer da investigação científica, gerando novas perspectivas de trabalho e propostas a serem analisadas em um futuro próximo. O projeto de pesquisa desenvolvido nesta tese de doutorado aponta alguns aspectos a serem abordados como propostas de futuros temas, tais como:

- a) Estudar a catálise na hidrólise do furoato de diloxanida com a  $\beta$ -CD e  $\beta$ -CD sulfatada, assim como catalisadores básicos como proposta de modelo de catálise enzimática.
- b) Estudar o efeito das ciclodextrinas na estabilidade química de outras substâncias farmacêuticas de interesse em solução aquosa.
- c) Preparar os complexos de inclusão no estado sólido dos compostos esteroidais fusidato de sódio e helvolato de potássio, por técnicas de maceração, liofilização, coprecipitação, evaporação, etc.
- d) Caracterizar os complexos de inclusão no estado sólido através de análises térmicas, espectroscopia IV, raios X, RMN, etc.
- e) Utilizar derivados de ciclodextrinas, como os hidrofóbicos (alquiladas ou alciladas) ou hidrofílicos (hidroxi-propil-ciclodextrina ou sulfobutileter-ciclodextrina), a fim de obter informações com relação a formulações de liberação controlada e imediata, respectivamente.
- f) Aprofundar os estudos com relação a sistemas em ciclodextrinas contendo hóspedes ditópicos, a fim de determinar as constantes de equilíbrio microscópicas.

Conclui-se que um dos campos de futura atuação poderia ser a busca por hóspedes ditópicos que demonstrem participação ou não nos processos de cooperação. Estes servirão como modelos válidos para conhecimento das interações ligante-proteína (entendendo por ligante qualquer tipo de molécula neutra, íon ou radical). Neste sentido vale mencionar que a interação de esteróides em ciclodextrinas tem sido usada como modelo para as interações esteróide-proteína e para a resolução de sistemas biológicos mais complexos.

## REFERÊNCIAS

- 1- LOFTSSON, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs in aqueous solutions. **Drug Stability**, v.1, p.22-33, 1995.
- 2 - LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. **J. Pharm. Sci.**, v.85, n.10, p.1017-1025, 1996.
- 3 - STELLA, V.J.; RAJEWSKI, R.A . Cyclodextrins: Their Future in Drug Formulation and Delivery. **Pharm. Res.**, v.14, n.5, p.556-567, 1997.
- 4 - THOMPSON, D.O . Cyclodextrins- Enabling Excipients: Their Present and Future Use in Pharmaceuticals. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.14, n.1, p. 1-104, 1997.
- 5 - AMADO, C.A.B.; TANIGUCHI, S.F.; SUDO, L.S.; KIMURA, E.; OGA, S. Effect of Piroxicam  $\beta$ -cyclodextrin Complex on Experimental Inflammation. **General Pharmacology**, v.26, n.4, p.809-813, 1995.
- 6 - DOLCI, G.; RIPARI, M.; PACIFICI, L.; UMILE, A. Evaluation of piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin, piroxicam, paracetamol and placebo in post-operative oral surgery pain. **Int. J. Clin. Pharmacol. Res.**, v.14, p.185-191, 1994.
- 7 - KIMURA, E.; AMADO, B.C.A.; SUDO, L.S.; SANTOS, S.R.; OGA, S. Pharmacokinetic profile of piroxicam  $\beta$ -cyclodextrin, in rat plasma and lymph. **Gen. Pharmacol.**, v.28, n.5, p.695-698, 1997.
- 8 - LEE,C.R.; BALFOUR, J.A. Piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in rheumatic diseases and pain states. **Drugs**, v.48, n.6, p.907-929, 1994.

- 9 - WANG, D.; MILLER, R.; ZHENG, J.; HU, C. Comparative population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis for piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin and piroxicam. **J. Clin. Pharmacol.**, v.40, n.11, p.1257-1266, 2000.
- 10 - WARRINGTON, S. Effects of piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin on the gastrointestinal tract. **Eur. J. Rheumatol. Inflamm.**, v.12, n.4, p.29-37, 1993.
- 11 - WOODCOCK, B.G.; ACERBI, D.; MERZ, P.G.; RIETBROCK, S.; RIETBROCK, N. Supramolecular inclusion of piroxicam with  $\beta$ -cyclodextrin: pharmacokinetic properties in man. **Eur. J. Rheumatol. Inflamm.**, v.12, n.4, p.12-28, 1993.
- 12 - NIETO REYES, L. **Utilización de los complejos de inclusión con ciclodextrinas para mejorar la eficacia de algunos agentes antiparasitarios.** Santiago de Compostela, 1999. (Tese de Doutorado). Departamento de Farmácia e Tecnologia Farmacêutica. Faculdade de Farmácia. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Espanha.
- 13 - WILMSHURST, E.C.; CLIFFE, E.E. Absorption and Distribution of Amoebicides. **Absorption Distrib. Drugs, Symp.** London, p.191-198, 1963.
- 14 - CHRISTIANSEN, K. Fusidic acid adverse drug reactions. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.12, S3-S9, 1999.
- 15 - TSCHEN, J. S. M.; CHEN, L.L.; HSIEH, S.T.; WU, T.S. Isolation and phytotoxic effects of helvolic acid from plant pathogenic fungus *Sarocladium oryzae*. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v.38, p.251-256, 1997.
- 16 - AMITANI, R.; TAYLOR, G.; ELEZIS, E. N.; LLEWELLYN-JONES, C.; MITCHELL, J.; KUZE, F.; COLE, P. J.; WILSON, R. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. **Infect. Immun.**, v.63, p.3266, 1995.
- 17 - RAMOS CABRER, P. **Complejación de sales biliares di- y tri- hidroxílicas por ciclodextrinas. Estudio mediante RMN y tensión superficial.** Santiago de Compostela, 2000. (Tese de Doutorado). Departamentos de Química Física e Física

- Aplicada. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Espanha.
- 18 - ALVAREZ PARRILLA, E.; RAMOS CABRER, P.; AL-SOUFI, W.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J. Dendritic growth of a supramolecular complex. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v.39, p.2856, 2000.
- 19 - ALVAREZ PARRILLA, E.; RAMOS CABRER, P.; SINGH, A. P.; AL-SOUFI, W.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J. Supramolecular linear conglomerates formed by  $\beta$ -cyclodextrin dimers and sodium deoxycholate. **Supramol. Chem.**, v.14, p.397, 2002.
- 20 - RAMOS CABRER, P.; ALVAREZ PARRILLA, E.; MEIJIDE, F.; SEIJAS, J. A.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J. Complexation of Sodium Cholate and Sodium Deoxycholate by  $\beta$ -Cyclodextrin and Derivatives. **Langmuir**, v.15, p.5489-5495, 1999.
- 21 - RAMOS CABRER, P.; ALVAREZ PARRILLA, E.; AL-SOUFI, W.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J. Complexation of bile salts by natural cyclodextrins. **Supramol. Chem.**, v.15, p.33, 2003.
- 22 - CONNORS, K. A.; PENDERGAST, D. D. Microscopic Binding Constants in Cyclodextrin Systems: Complexation of  $\alpha$ -Cyclodextrin with Sym-1,4-Disubstituted Benzenes **J. Am. Chem. Soc.**, v.106, p.7607-7614, 1984.
- 23 - CONNORS, K. A.; PAULSON, A.; TOLEDO-VELASQUEZ, D. Complexing of  $\alpha$ -Cyclodextrin with Sym-4,4'-Disubstituted Biphenyls. **J. Org. Chem.**, v.53, p.2023-2026, 1988.
- 24 - KEMPFLE, M.A.; MUELLER, R. F.; PALLUK, R.; WINKLER, H. A. The binding of fluorescent 4,6,8(14)-triene-3-one steroids to cyclodextrins as a model for steroid-protein interactions. **Biochim. Biophys. Acta**, v.923, n.1,p.83-87, 1987.
- 25 - SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. In: **Chem. Rev.**,v.98, p.1743-1753, 1998.

- 26 - SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988.
- 27 - BENDER, M. L.; KOMIYAMA, M. **Cyclodextrin Chemistry**. Springer, Berlin, 1978.
- 28 - WANG, J.; WARNER, I. M. Studies of the Naproxen:  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex. **Microchem. J.**, v.48, p.229, 1993.
- 29 - CLAUDY, P.; LÉTOFFÉ, J. M.; GERMAIN, P.; BASTIDE, J. P.; BAYOL, A.; BLASQUEZ, S.; RAO, R. C.; GONZÁLEZ, B. Physicochemical characterization of cholesterol-beta cyclodextrin inclusion complexes. **J. Thermal Anal.**, v.37, p.2497, 1991.
- 30 - SZEJTLI, J. Industrial Applications of Cyclodextrins. In: **Inclusion Compounds**, London: Academic Press, v.3, 1984.
- 31 - FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. Preparation and Characterization of Cyclodextrin Complexes. In: **Cyclodextrins in Pharmacy**. Kluwer Academic Publishers, v.5, p.83, 1994.
- 32 - WENZ, G. Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.33, p.803, 1994.
- 33 - LIU, S.; GIBSON, H.W. Difunctional Blocking Groups for Rotaxanes and Polyrotaxanes. **Tetrahedron Letters**, v.35, n.46, p.8533-8536, 1994.
- 34 - ARMSPACH, D.; ASHTON, P. R.; BALLARDINI, R.; BALZANI, V.; GODI, A.; MOORE, C. P.; PRODI, L.; SPENCER, N.; STODDART, J. F.; TOLLEY, M. S.; WEAR, T. J.; WILLIAMS, D. J. Catenated Cyclodextrins. **Chem. Eur. J.**, v.1, p.33, 1995.
- 35 - HARADA, T.; OHSETO, F.; SHINKAI, S. Combined NMR Spectroscopy and Molecular Mechanics Studies of OH-Depleted Calix [4] arenes: On the Influence of OH Groups on the Relative Stability of Calix [4] arene Conformers. **Tetrahedron**, v.50, n.47, p.13377-13394, 1994.

- 36 - ASHTON, P.R.; BARTSCH, R.A.; CANTRILL, S.J.; HANES, R.E.; HICKINGBOTTOM, S.K.; LOWE, J.N.; PREECE, J.A.; STODDART, J.F.; TALANOV, V.S.; WANG, Z.H. Secondary Dibenzylammonium Ion Binding by [24] Crown-8 and [25] Crown-8 Macrocycles. **Tetrahedron Letters**, v.40, p.3661-3664, 1999.
- 37 - MICHELS, J.J.; BAARS, M.W.; MEIJER, E.W.; HUSKENS, J.; REINHOUDT, D.N. Well-defined assemblies of adamantly-terminated poly(propylene imine) dendrimers and beta-cyclodextrin in water. **J. Chem. Soc.- Perkin Trans. 2**, v.44, p.1470, 2000.
- 38 - NAGAI, T.; UEDA, H. Aspects of Drug Formulation with Cyclodextrins. In: **Comprehensive Supramolecular Chemistry (Part I)**, v.3, p.441-449, 1996.
- 39 - MOYANO, J. R.; ARIAS BLANCO, M.J.; GINES, J.M.; RABASCO, A.M.; MARTINEZ, J.I.P.; MOR, M.; GIORDANO, F. Nuclear Magnetic Resonance Investigations of the Inclusion Complexation of Gliclazide with  $\beta$ -cyclodextrin. **J. Pharm. Sci.**, v.86, p.72-75, 1997.
- 40 - TORRES LABANDEIRA, J.J.; ECHEZARRETA LOPEZ, M.; SANTANA PENIN, L.; VILA JATO, J.L. Glibornuride- $\beta$ -cyclodextrin Inclusion Complexes: Preparation, Structural Characterization and in vitro Dissolution Behaviour. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.39, n.6, p.255-259, 1993.
- 41 - DÍAZ, D.; BERNARD, M.J.B.; MORA, J.G.; LIANOS, C.M.E. Complexation and solubility behavior of Albendazole with some Cyclodextrins. **Pharm. Dev. Tech.**, v.3, n.3, p.395-403, 1998.
- 42 - DÍAZ, D.; BERNARD, M.J.B.; MORA, J.G.; LIANOS, C.M.E. Solubility,  $^1\text{H-NMR}$ , and Molecular Mechanics of Mebendazole with Different Cyclodextrins. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.25, n.1, p.111-115, 1999.
- 43 - OTERO, ESPINAR, F.J.; ANGUIANO IGEA, S.; GARCIA GONZALEZ, N.; VILA JATO, J.L.; BLANCO MENDEZ, J.; Oral bioavailability of naproxen- $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound. **Int. J. Pharm.**, v.75, p.37-44, 1991.

- 44 - AHN, H.J.; KIM, K.M.; CHOI, J.S.; KIM, C.K. Effects of Cyclodextrin Derivatives on Bioavailability of Ketoprofen. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, v.23, n.4, p.397-401, 1997.
- 45 - BETTINI, R.; SANTI, P.; CATELLANI, P.L.; MASSIMO, G.; BELLOTI, A.; BARTELEMY, C.; GUYOT HERMANN, A. M.; TRUBLIN, F.; COLOMBO, P. Permeation of piroxicam and piroxicam-  $\beta$ -cyclodextrin through artificial membranes. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.38, n.6, p.203-208, 1992.
- 46 - OTERO, ESPINAR, F.J.; ANGUIANO IGEA, S.; BLANCO MENDEZ, J.; VILA JATO, J.L. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. **Int. J.Pharm.**, v.70, p.35-41, 1991.
- 47 - RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. In Vivo Drug Delivery. **J. Pharm. Sci.** , v.85, n.11, p.1142-1168, 1996.
- 48 - MA, D.Q.; RAJEWSKI, R. A.; VELDE, D. V.; STELLA, V. J. Comparative Effects of (SBE)<sub>7m</sub>- $\beta$ -CD and HP- $\beta$ -CD on the Stability of Two Anti-neoplastic Agents, Melphalan and Carmustine. **J. Pharm. Sci.**, v.89, n.2, p.275-287, 2000.
- 49 - UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; WAKUDA, T.; OTAGIRI, M. Effects of Cyclodextrins on the Hydrolysis of Prostacyclin and its Methyl Ester in Aqueous Solution. **Chem. Pharm. Bull.**, v.29, n.1, p.213-219, 1981.
- 50 - BACKENFELD, T.; MÜLLER, B. W.; WIESE, M.; SEYDEL, J. K. Effect of Cyclodextrin Derivatives on Indomethacin Stability in Aqueous Solution. **Pharm. Res.**, v.7, p.484-490, 1990.
- 51 - BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T.; ESTES, K.S.; LIN, J.L.; FRIDRIKSDÓTTIR, H.; BODOR, N. Effect of various cyclodextrins on solution stability and dissolution rate of doxorubicinhydrochloride. **Int. J. Pharm.**, v.79, p.289-299, 1992.
- 52 - CHOUDHURY, S.; MITRA, A .K. Kinetics of Aspirin Hydrolysis and Stabilization in the Presence of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Pharm. Res.**, v.10, p.156-159, 1993.

- 53 - JARHO, P.; VELDE, D. V.; STELLA, V. J. Cyclodextrin-Catalysed Deacetylation of Spironolactone is pH and Cyclodextrin Dependent. **J. Pharm. Sci.**, v.89, p.241-249, 2000.
- 54 - LOFTSSON, T.; ÓLAFSDÓTTIR, B. J. Cyclodextrin-accelerated degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics in aqueous solutions. **Int. J. Pharm.**, v.67, p.R5-R7, 1991.
- 55 - UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in Drug Carrier Systems. In: **CRC Critical Review in Therapeutic Drug Carrier System**, v.3, p.1-40, 1987.
- 56 - SZEJTLI, J. Cyclodextrins in Drug Formulations: Part I. **Pharmaceutical Technology International**, p.15-24, 1991.
- 57 - **REMGINGTON'S** Pharmaceutical Sciences. 18 ed. Easton, Mack Publishing, 1990.
- 58 - GAL FÜZY, M.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J.; HARANQUI, J. Cyclodextrins–stabilizate volatile substance for inhalation therapy. **Pharmazie**, v.39, 1984.
- 59 - MIELCAREK, J. Studies on Inclusion Complexes of Felodipine with  $\beta$ -cyclodextrin. **J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.**, v.30, p.243-252, 1998.
- 60 - UEKAMA, K.; FUJINAGA, T.; HIRAYAMA, F.; OTAGIRI, M.; KURONO, Y.; IKEDA, K. Effects of cyclodextrins on the acid hydrolysis of digoxin. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.34, p.627, 1982.
- 61 - UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chem. Rev.**, v.98, p.2045-2076, 1998.
- 62 - MONTASSIER, P.; DUCHÊNE, D.; POELMAN, M.C. Inclusion Complexes of Tretinoin with Cyclodextrin. **Int. J. Pharm.** v.153, p.199-209, 1997.
- 63 - FRÖMMING, K.H.; FRIDRICH, R.; MEHNERT, W. Inclusion Compounds of Cholesterol and  $\beta$ - cyclodextrin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.39, n.4, p.148-152, 1993.
- 64 - IRIE, T.; UEKAMA, K.. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.**, v.86, n.2, p.147-162, 1997.

- 65 - SZEJTLI, J. Chemistry, Physical and Biological Properties of Cyclodextrins. In: **Comprehensive Supramolecular Chemistry** (Part I), v.3, p.5-40, 1996.
- 66 - SZENTE, L. Preparation of Cyclodextrin Complexes. In: **Comprehensive Supramolecular Chemistry** (Part II), v.3, p.243-252, 1996.
- 67 - ALBERS, E.; MULLER, B. W. Complexation of steroid hormones with cyclodextrins derivatives: substituent effects of the guest molecule on solubility and stability in aqueous solution. **J. Pharm. Sci.**, v.81, n.8, p.756-761, 1992.
- 68 - MARZONA, M.; CARPIGNANO, R.; QUAGLIOTTO, P. Quantitative structure-stability relationships in the inclusion complexes of steroids with cyclodextrins. **Ann. Chim.**, v.82, p.517, 1992.
- 69 - ASANUMA, H.; KAKAZU, M.; SHIBATA, M.; HISHIVA T.; KOMIVAMA, M. Molecularly imprinted polymer of  $\beta$ -cyclodextrin for the efficient recognition of cholesterol. **Chem. Commun.**, p.1971, 1997.
- 70 - BRESLOW, R.; ZHANG, B. Cholesterol Recognition and Binding by Cyclodextrin Dimers. **J. Am. Chem. Soc.**, v.118, p.8495-8496, 1996.
- 71 - FRIJLINK, H. W.; EISSENS, A. C.; HEFTING, N. R.; POELSTRA, K.; LERK, C. F.; MEIJER, D. K. F. The Effect of Parenterally Administered Cyclodextrins on Cholesterol Levels in the Rat. **Pharm. Res.**, v.8, p.9-16, 1991.
- 72 - KARUPPIAH, N.; KAUFMAN, P. B.; KAPUSTKA, S. A.; SHARMA, A. Use of Cyclodextrin-Cholesterol Complex as a Primary Standard in Cholesterol Analysis. **Microchem. J.**, v.47, p.325-329, 1993.
- 73 - RAVICHANDRAN, R.; DIVAKAR, S. Inclusion of Ring A of Cholesterol Inside the  $\beta$ -Cyclodextrin Cavity: Evidence from Oxidation Reactions and Structural Studies. **J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.**, v.30, p.253-270, 1998.
- 74 - SREENIVASAN, K. Solvent effect on the interaction of steroids with a novel methyl  $\beta$ -cyclodextrin polymer. **J. Appl. Polym. Sci.**, v.68, n.11, p.1857-1861, 1998.

- 75 - TANEVA, S.; ARIGA, K.; OKAHATA, Y.; TAGAKI, W. Association between Amphiphilic Cyclodextrins and Cholesterol in Mixed Insoluble Monolayers at the Air-Water Interface. **Langmuir**, v.5, p.111, 1989.
- 76 - TAN, X.; LINDENBAUM, S. Studies on complexation between  $\beta$ -cyclodextrin and bile salts. **Int. J. Pharm.**, v.74, p.127-135, 1991.
- 77 - ABADIE, C.; HUG, M.; KUBLI, C.; GAINS, N. Effect of cyclodextrins and undigested starch on the loss of chenodeoxycholate in the faeces. **Biochem. J.**, v.299, p.725-730, 1994.
- 78 - BOEHLER, N.; RIOTTOT, M.; FEREZOU, J.; SOUIDI, M.; MILLIAT, F.; SEROUGNE, C.; SMITH, J. L.; LUTTON, C. Antilithiasic effect of  $\beta$ -cyclodextrin in LPN hamster: comparison with cholestyramine. **J. Lipid Res.**, v.40, p.726-734, 1999.
- 79 - NAKANISHI, K.; MASADA, M.; NADAI, T. ; MIYAJIMA, K. Effect of the interaction of drug- $\beta$ -cyclodextrin complex with bile salts on the drug absorption from rat small intestinal lumen. **Chem. Pharm. Bull.**, v.37, p.211-214, 1989.
- 80 - ARMSTRONG, D. W.; DEMOND, W.; ALAK, A.; HINZE, W. L.; RIEHL, T. E.; BUI, K. H. Liquid Chromatographic Separation of Diastereomers and Structural Isomers on Cyclodextrin-Bonded Phases. **Anal. Chem.**, v.57, p.234, 1985.
- 81 - SHIMADA, K.; OE, T.; HIROSE, Y.; KOMINE, Y. Retention behavior of cardiac steroids using cyclodextrin in the mobile phase in high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v.478, n.2, p.339-347, 1989.
- 82 - SHIMADA, K.; NONAKA, M. Utility of cyclodextrin in mobile phase for high-performance liquid chromatographic separation of C21 steroids. **J. Liq. Chromatogr.**, v.14, n.11, p.2109-2117, 1991.
- 83 - AUMATELL, A.; WELLS, R. J. Enantiomeric differentiation of a wide range of pharmacologically active substances by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary chromatography using a bile salt. **J. Chromatography A**, v.688, p.329-337, 1994.

- 84 - CASTELNOVO, P.; ALBANESI, C. Determination of the enantiomeric purity of N-propionyl-6,7-dimethoxy-2-aminotetralin by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v.18, n.6, p.996-1001, 1997.
- 85 - OKAFO, G. N.; BINTZ, C.; CLARKE, S. E.; CAMILLERI, P. Micellar electrokinetic capillary chromatography in a mixture of taurodeoxycholic acid and  $\beta$ -cyclodextrin. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, 1189-1192, 1992.
- 86 - FLOOD, K. G.; REYNOLDS, E. R.; SNOW, N. H. Characterization of inclusion complexes of betamethasone-related steroids with cyclodextrins using high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v.903, p.49-65, 2000.
- 87 - FLOOD, K. G.; REYNOLDS, E. R.; SNOW, N. H. Determination of apparent association constants of steroid - cyclodextrin inclusion complexes using a modification of the Hummel-Dreyer method. **J. Chromatogr.**, v.913, p.261-268, 2001.
- 88 - SADLEJ-SOSNOWSKA, N. Inclusion complexes of steroid hormones with cyclodextrins studied by the Hummel-Dreyer method using reversed-phase liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.13, p.701-704, 1995.
- 89 - SADLEJ-SOSNOWSKA, N. Molecular complexation:  $\beta$ -cyclodextrin and steroid hormones inclusion complexes studied by high-performance liquid chromatography. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.3, n.1, p.1-5, 1995.
- 90 - SADLEJ-SOSNOWSKA, N. Influence of the structure of steroid hormones on their association with cyclodextrins: a high-performance liquid chromatography study. **J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.**, v.27, n.1, p.31-40, 1997.
- 91 - HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.36, n.1, p.125-141, 1999.
- 92 - PITHA, J.; HARMAN, S. M.; MICHEL, M. E. Hydrophilic cyclodextrin derivatives enable effective oral administration of steroidal hormones. **J. Pharm. Sci.**, v.75, n.2, p.165-167, 1986.

- 93 - UEKAMA, K.; OTAGIRI, M.; UEMURA, Y.; FUJINAGA, T.; ARIMORI, K.; MATSUO, N.; TASAKI, K.; SUGII, A. Improvement of oral bioavailability of prednisolone by  $\beta$ -cyclodextrin complexation in humans. **J. Pharmacobio-Dyn.**, v.6, p.124, 1983.
- 94 - YANO, H.; HIRAYAMA, F.; KAMADA, M.; ARIMA, H.; UEKAMA, K. Colon-specific delivery of prednisolone-appended  $\alpha$ -cyclodextrin conjugate: alleviation of systemic side effect after oral administration. **J. Controlled Release**, v.79, p.103-112, 2002.
- 95 - OTAGIRI, M.; FUJINAGA, T.; SAKAI, A.; UEKAMA, K. Effects of  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins on release of betamethasone from ointment bases. **Chem. Pharm. Bull.**, v.32, p.2401-2405, 1984.
- 96 - UEKAMA, K.; OTAGIRI, M.; SAKAI, A.; IRIE, T.; MATSUO, N.; MATSUOKA, Y. Improvement in the percutaneous absorption of beclomethasone dipropionate by  $\gamma$ -cyclodextrin complexation. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.37, p.532, 1985.
- 97 - UEKAMA, K.; ARIMORI, K.; SAKAI, A.; MASAKI, K.; IRIE, T.; OTAGIRI, M. Improvement in percutaneous absorption of prednisolone by  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin complexations. **Chem. Pharm. Bull.**, v.35, p.2910, 1987.
- 98 - WORTH, G. M.; THOMAS, M.; FARR, S. J.; TAYLOR, G. Steroid/cyclodextrin complexes for pulmonary delivery. **Proc. 24th Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.**, p.747-748, 1997.
- 99 - PITHA, J.; ANAISSIE, E. J.; UEKAMA, K.  $\gamma$ -Cyclodextrin: testosterone complex suitable for sublingual administration. **J. Pharm. Sci.**, v.76, n.10, p.788-790, 1987.
- 100 - OHVO, H.; SLOTTE, J. P. Cyclodextrin-Mediated Removal of Sterols from Monolayers: Effects of Sterol Structure and Phospholipids on Desorption Rate. **Biochemistry**, v.35, p.8018, 1996.
- 101 - YOSHIDA, A.; YAMAMOTO, M.; IRIE, T.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Some Pharmaceutical Properties of 3-Hydroxypropyl- and 2,3-Dihydroxypropyl- $\beta$ -

- cyclodextrins and Their Solubilizing and Stabilizing Abilities. **Chem. Pharm. Bull.**, v.37, p.1059, 1989.
- 102 - HOFMANN A. F. **Bile Acids. In The Liver: Biology and Pathobiology**, New York: Raven Press Ltd, Third Edition, p. 677-718, 1994.
- 103 - CAREY, M. C.; SMALL, D. M. Micelle Formation by Bile Salts. Physical -Chemical and Thermodynamic Considerations. **Arch. Intern. Med.**, v.130, p.506, 1972.
- 104 - COELLO, A.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J. Aggregation Behavior of Bile Salts in Aqueous Solution. **J. Pharm. Sci.**, v.85, p.9, 1996.
- 105 - SMALL, D. M. Size and Structure of Bile Salt Micelles. Influence of Structure, Concentration, Counterion Concentration, pH and Temperature. **Adv. Chem. Ser.** v.84, p.31, 1968.
- 106 - CAMPANELLI, A. R.; DE SANCTIS, S. C.; GIGLIO, E.; PAVEL, N. V.; QUAGLIATA, C. From Crystal to Micelle: a New Approach to the Micellar Structure. **J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.**, v.7, p.391, 1989.
- 107 - JOVER, A.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J.; CASTIÑEIRAS, A.; HOFMANN, A. F.; TON-NU, H.-T. Crystal structure of 3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid (iso-deoxycholic acid). **J. Mol. Struct.**, v.523, p.299, 2000.
- 108 - JOVER, A.; MEIJIDE, F.; SOTO, V. H.; VÁZQUEZ TATO, J.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; TON-NU, H.-T.; HOFMANN, A. F., Successful Prediction of the Hydrogen Bond Network of the 3-oxo-12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid Crystal from Resolution of the Crystal Structure of Deoxycholic Acid and its Three 3,12-dihydroxy **Epimers**, 2003 (In Press).
- 109 - CAREY, M. C. In: "**Sterols and Bile Acids**". DANIELSSON, H.; SJÖVALL, J. Amsterdam: Ed. Elsevier, p.345, 1985.

- 110 - CONNORS, K. A. Measurement of Cyclodextrin Complex Stability Constants. In: **Comprehensive Supramolecular Chemistry** (Part II) v.3, 205-241, 1996.
- 111 - UEKAMA, K.; IRIE, T. Pharmaceutical Use of Cyclodextrins in Various Drug Formulations. In: **Comprehensive Supramolecular Chemistry** (Part I), v.3, p.451-482, 1996.
- 112 - MARTINDALE: THE EXTRA PHARMACOPEIA. 31ed. London: The Pharmaceutical Society, 1996.
- 113 - BRITISH PHARMACOPEIA. London: HMSO, v.1, 1993.
- 114 - SENGUPTA, M.; DUTTA, H.; PAL, D. K.; DE, A. U.; SENGUPTA, C. Correlation of phospholipid loss in goat whole blood with solvchromic properties of antiamebics like emetine, metronidazole and diloxanide furoate. **Ind. J. Exp. Biol.**, v.31, p.21-25, 1993.
- 115 - DUTTA, H.; MEHTA, N. K.; GUPTA, M. S.; PAL, D. K.; GUPTA, C. S.; DE, A. U. Diloxanide furoate: studies on its interaction with blood phospholipids in relation to partition coefficients of related analogs. **Ind. J. Pharm. Sci.**, v.50, n.6, p.328-331, 1988.
- 116 - CASTRO HERMIDA, J.A.; ARES MÁZAS, E.; NIETO REYES, L.; OTERO ESPINAR, F.; BLANCO MÉNDEZ, J. Inhibition of Cryptosporidium infection in mice treated with a cyclodextrin inclusion complex with diloxanide furoate. **Parasitology Research**, v.87, n.6, p.449-452, 2001.
- 117 - SHINOHARA, C.; HASUMI, K.; ENDO, A. Inhibition of oxidized low-density lipoprotein metabolism in macrophage J774 by helvolic acid. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1167, p.303-306, 1993.
- 118 - VON DAEHNE, W.; GODTFREDSSEN, W. O.; RASMUSSEN, P. R. Structure-activity relationships in fusidic acid-type antibiotics. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.25, p.95, 1979.

- 119 - ROHOLT, I. Comparative efficacy of sodium fusidate ointment and two formulations of mupirocin ointment against experimentally induced wound infections in mice. **Current Therapeutic Res.**, v.51, p.390, 1992.
- 120 - CAREY, M.C.; MONTET J. C.; SMALL D.M. Surface and Solution Properties of Steroid Antibiotics: 3-Acetoxyfusidic Acid, Cephalosporin P1 and Helvolic Acid. **Biochemistry**, v.14, n.22, p.4896-4905, 1975.
- 121 - CAREY, M. C.; SMALL, D. M. Micellar properties of sodium fusidate, a steroid antibiotic structurally resembling the bile salts. **J. Lipid Res.**, v.12, p.604-613, 1971.
- 122 - RICHARD, A. J. Ultracentrifugal Study of Effect of Sodium Chloride on Micelle Size of Fusidate Sodium. **J. Pharm. Sci.**, v.64, p.873-875, 1975.
- 123 - SHAO, Z.; MITRA, A. K. Nasal Membrane and Intracellular Protein and Enzyme Release by Bile Salts and Bile Salt-Fatty Acid Mixed Micelles: Correlation with Facilitated Drug Transport. **Pharm. Res.**, v.9, p.1184, 1992.
- 124 - COLLIGNON, P.; TURNIDGE, J. Fusidic acid in vitro activity. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.12, S45-S58, 1999.
- 125 - WILKINSON, J. D. Fusidic acid in dermatology. **British J. Derm.**, v.139, p.37-40, 1998.
- 126 - LANGHOLZ, E.; BRYNSKOV, J.; BENDETZEN, K.; VILIEN, M.; BINDER, V. Treatment of Crohn's disease with fusidic acid: an antibiotic with immunosuppressive properties similar to cyclosporin. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.6, p.495-502, 1992.
- 127 - GOLLEDGE, C. Fusidic acid in other infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.12, S11-S15, 1999.
- 128 - THE MERCK INDEX. An encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals. 12 th ed. New York: Merck & Co. Inc., 1996.

- 129 - OKUDA, S.; NAKAYAMA, Y.; TSUDA, K. Studies on microbial products. I. Helvolic acid and related compounds. I. 7-desacetoxyhelvolic acid and helvolinic acid. **Chem. Pharm. Bull.**, v.14, p.436-441, 1966.
- 130 - OKUDA, S.; SATO, Y.; HATTORI, T.; WAKABAYASHI, M. Helvolic acid and related compounds. IV. Isolation and structural elucidation of 3-oxo-16 $\beta$ -acetoxyfusida-1,17(20)[16,21-cis], 24-trien-21-oic acid. **Tetrahedron Lett.**, p.4847, , 1968.
- 131 - VON DAEHNE, W.; LORCH, H.; GODTFREDSSEN, W. O. Microbiological transformations of fusidane-type antibiotics. A correlation between fusidic acid and helvolic acid. **Tetrahedron Lett.**, p.4843-4846, 1968.
- 132 - FREEMAN, B. A. **Microbiología de Burrows**. Madrid: Ed.Emalsa, 1986.
- 133 - CLADERA, J.; RIGAUD, J.L.; VILLA VERDE, J.; DUNACH, M. Liposome solubilization and membrane reconstitution using Chaps and Chapso. **Eur. J. Biochem.**, v.243, p.798-804, 1997.
- 134 - HJEKME LAND, L.M. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.77, n.11, p.6368, 1980.
- 135 - SUNDARI, N.S.; SRINIVAS, V.; GANESH, K.N.; BALASUBRAMANIAN, D. Micellar Properties of the zwitterionic detergents "chaps" and "chapso" used in membrane biochemistry. **J. Indian Chem. Soc.**, v.62, p.851-854, 1985.
- 136 - BUCKLEY, J.J.; WETLAUFER, D. B. Use of the surfactant 3-(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio propane sulfonate in hydrophobic interaction chromatography of proteins. **J. Chromatogr.**, v.464, p.61, 1989.
- 137 - BUCKLEY, J. J.; WETLAUFER, D. B. Surfactant-mediated hydrophobic interaction chromatography of proteins: gradient elution. **J. Chromatogr.**, v.518, p.99, 1990.
- 138 - CHATTO PADHYAY, A.; LONDON, E. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. **Anal. Biochem.**, v.139, p.408, 1984.

- 139 - FUNASAKI, N.; HADA, S.; NEYA, S. Micelle Formation of a Sulfobetaine Derivative of Cholic Acid. **Chem. Lett.**, p.1075-1078, 1990.
- 140 - FUNASAKI, N.; HADA, S.; NEYA, S. Odd-Even Alternation In the Aggregation Number Dependence of Stepwise Aggregation Constants. **J. Phys. Chem.**, v.95, p.1846, 1991.
- 141 - HJEKMELAND, L. M.; NEBERT, D. W.; OSBORNE, J. C. Sulfobetaine Derivatives of Bile Acids: Nondenaturing Surfactants for Membrane Biochemistry. **Anal. Biochem.**, v.130, p.72, 1983.
- 142 - SCHURHOLZ, T.; KEHNE, J.; GIESELMANN, A.; NEUMANN, E. Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor by CHAPS dialysis depends on the concentrations of salt, lipid, and protein. **Biochemistry**, v.31, p.5067, 1992.
- 143 - SCHURHOLZ, T. Critical dependence of the solubilization of lipid vesicles by the detergent CHAPS on the lipid composition. Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor into preformed vesicles above the critical micellization concentration. **Biophys. Chem.**, v.58, p.87, 1996.
- 144 - STARK, R. E.; LEFF, P. D.; MILHEIM, S. G.; KROPF, A. Physical Studies of CHAPS, a New Detergent for the Study of Visual Pigments. **J. Phys. Chem.**, v.88, p.6063, 1984.
- 145 - TANFORD, C. **The Hydrophobic Effect: Formation of micelles and Biological Membranes**, New York: Wiley, 1973.
- 146 - LILLIENAU, J; SCHTEINGART, C.D.; HOFMANN, A. F. Physicochemical and physiological properties of cholylsarcosin potential replacement detergent for bile acid deficiency states in the small intestine. **J. Clin. Invest.**, v.89, n.2, p.420-431, 1992.
- 147 - NATOWICZ, M.R.; EVANS, J.E. Abnormal bile acids in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. **Am. J. Med. Genet.**; v.50, n.4, p.364-367, 1994.
- 148 - VADERPAS, J. Congenital deficiencies in bile acid synthesis: from diagnosis to treatment. **Rev. Med. Brux.**, v.14, n.4, p.110-115, 1993.

- 149 - HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A.. Phase-solubility techniques. In: **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**. New York: Wiley, v.4, p.117-212, 1965.
- 150 - BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry**. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1993.
- 151 - FRIEBOLIN, A. **Basic One and Two- Dimensional NMR Spectroscopy**. Germany: VCH, 1993.
- 152 - INOUE, Y. **Studies of the structure and properties of cyclodextrins and their inclusion complexes**. Academic Press Limited, p.59-101, 1993.
- 153 - ALVAREZ-PARRILLA, E.; AL-SOUFI, W.; RAMOS CABRER, P.; NOVO, M.; VÁZQUEZ TATO, J. Resolution of the Association Equilibria of 2-(p-Toluidinyl)-naphthalene-6-sulfonate (TNS) with  $\beta$ -Cyclodextrin and a Charged Derivative. **J. Phys. Chem. B.**, v.105, p.5994, 2001.
- 154 - DJEDAINI, F.; PERLY, B. Nuclear Magnetic Resonance of Cyclodextrins, Derivatives and Inclusion Compounds. In: **New Trends in Cyclodextrins and Derivatives**. Paris: Ed. Santé, p.215-246, 1991.
- 155 - GIL, V. M. S.; OLIVEIRA, N. C. On the Use of the Method of Continuous Variations. **J. Chem. Educ.**, v.67, p.473-478, 1990.
- 156 - JOB, P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. **Ann. Chim.**, v.9, n.113, 1928.
- 157 - NAKANO, M.; NAKANO, N. I.; HIGUCHI, T. Calculation of Stability Constants of Hydrogen-Bonded Complexes from Proton Magnetic Resonance Data. Interactions of Phenol with Dimethylacetamide and Various Ketones. Solvent Effect. **J. Phys. Chem.**, v.71, p.3954, 1967.
- 158 - SCOTT, R. L. Some Comments on the Benesi-Hildebrand Equation. **Trav. Chim. Pays-Bas.**, v.75, p.787, 1956.

- 159 - TSUKUBE, H.; FURUTUA, H.; TAKEDA, Y.; KUDO, Y.; INOUE, Y.; LIU, Y.; KIMURA, K.. In: **Comprehensive Supramolecular Chemistry**, cap.10, v.8, p.425, 1996.
- 160 - AL-SOUFI, W.; RAMOS CABRER, P.; JOVER, A.; BUDAL, R. M.; VÁZQUEZ TATO, J. Determination of second order association constants by global analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts. Application to the complexation of sodium fusidate and potassium helvolate by  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin. **Steroids**, v.68, n.1, p.43-53, 2003.
- 161 - JENCKS, W. P.. **Catalysis in Chemistry and Enzymology**. New York: Dover Publications Inc., 1969.
- 162 - LOFTSSON, T.; BALDVINSDÓTTIR, J.; SIGURDARDÓTTIR, A. M. The effect of cyclodextrins on the solubility and stability of medroxyprogesterone acetate and megestrol acetate in aqueous solution. **Int. J. Pharm.**, v.98, p.225-230, 1993.
- 163 - BEKERS, O.; BEIJNEN, J. H.; VIS, B. J.; SUENAGA, A.; OTAGIRI, M.; BULT, A.; UNDERBERG, W. J. M. Effect of cyclodextrin complexation on the chemical stability of doxorubicin and daunorubicin in aqueous solutions. **Int. J. Pharm.**, v.72, p.123-130, 1991.
- 164 - JONES, S.P.; GRANT,D.J.W.; HADGRAFT,J.; PARR, G. D. Cyclodextrins in the Pharmaceutical Sciences. Part II: Pharmaceutical, Biopharmaceutical, Biological and Analytical Aspects and Applications of Cyclodextrins and its Inclusion Compounds. **Acta Pharm. Tech.**, v.30, p.263-277, 1984.
- 165- FERNANDEZ, M.A.; de ROSSI, R.H. pH Dependent Effect of  $\beta$ -Cyclodextrin on the Hydrolysis Rate of Trifluoroacetate Esters. **J.Org.Chem.**, v.62, p.7554-7559, 1997.
- 166- FERNANDEZ, M.A.; de ROSSI, R.H.; CERVELLÒ, E.; JAIME, C. Effect of  $\beta$ -Cyclodextrin on the Hydrolysis of Trifluoroacetate Esters. **J. Org. Chem.**,v. 66, p. 4399-4404, 2001.

- 167- GADOSY, T.A.; TEE, O.S. Acyl Transfer Reactions Mediated by Cyclodextrins. The Reaction of External Nucleophiles with Encapsulated Alkanoate Esters of Varying Chain Length. **J. Chem. Soc., Perkin Trans 2**, p.71-76, 1995.
- 168- DAL MAGRO, J. **Estudos de Modelos Miméticos e Não-miméticos de Catálise Enzimática**. Florianópolis, 2000. (Tese de Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 169- BRANDÃO, T.A.S. **Estudos das Hidrólises de Anidrido Benzóico e Alcanoatos de p-Nitrofenila na Presença das  $\beta$ -ciclodextrinas Nativa e Sulfatada**. Florianópolis, 2003. (Tese de Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 170- HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin Inclusion Catalysis in the Isomerization of Prostaglandin A<sub>1</sub>. **Chem. Pharm. Bull.**, v.27, n.2, p.435-441, 1979.
- 171 - PERDOMO LÓPEZ, I.; ECHEZARRETA LÓPEZ, M.; ESCLUSA DÍAZ, T.; POSE VILARNOVO, B.; VILAJATO, J.L.; TORRES LABANDEIRA, J.J. Characterization of the inclusion complex between salbutamol and cyclodextrins by high-field NMR techniques and molecular modelling. In: "The 10<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium CD 2000", **Resumos...** University of Michigan, Ann. Arbor, Michigan, USA, 2000.
- 172 - POSE VILARNOVO, B.; SCHROTH PARDO, P.; ECHEZARRETA LÓPEZ, M.; GLEMET, C.; PEREZ MARCOS, B.; TORRES LABANDEIRA, J.J. Characterization and dissolution behavior of sulphamethizole- $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. In: "The 10<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium CD 2000". **Resumos..** University of Michigan, Ann. Arbor, Michigan, USA, 2000.
- 173 - IWASAKI, S.; SAIR, M.I.; IGARASHI, H.; OKUDA, S. Revised structure of helvolic acid. **J. Chem. Soc. D.**, p.1119-1120, 1970.

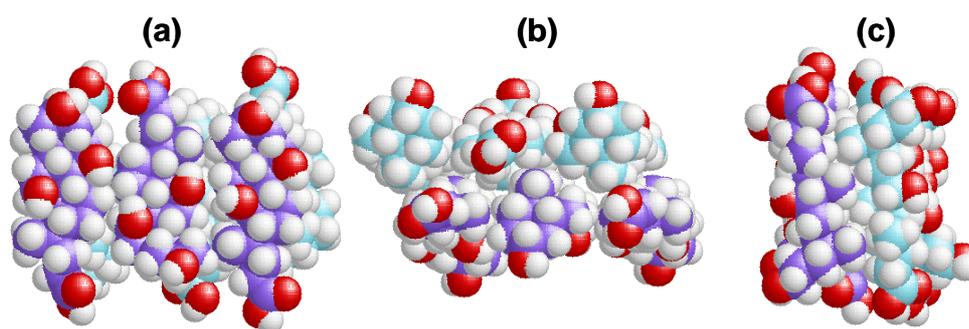
- 174 - OKUDA, S.; IWASAKI, S.; SAIR, M. I.; MACHIDA, Y.; INOUE, A.; TAUDA, K. Stereochemistry of helvolic acid. **Tetrahedron Lett.**, v.24, p.2295-2302, 1967.
- 175 - OXLEY, P. Cephalosporin P1 and Helvolic acid. **Chem. Commun.**, v.20, p.729-730, 1966.
- 176 - BARBER, J.; LIAN, L.; MORRIS, G.A.; TEHRANI, M.H. Full Assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of Sodium Fusidate in Organic and Aqueous Media. **Magn. Res. Chem.**, v.27, p.740-747, 1989.

## **ANEXOS**

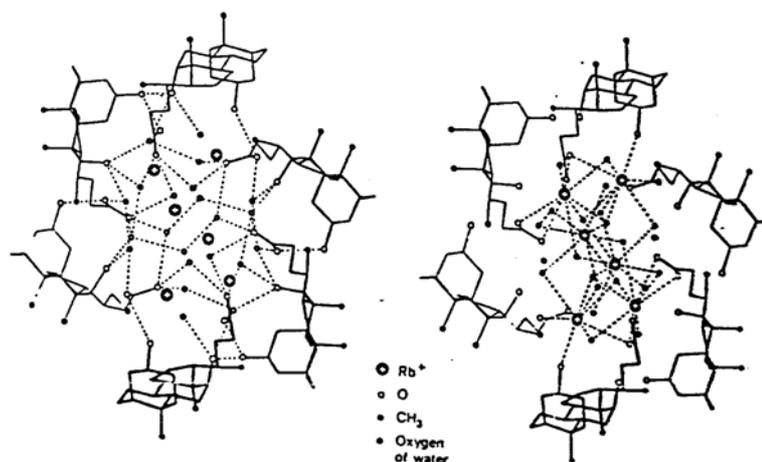
## ANEXO A - OUTROS ESTUDOS SOBRE AGREGAÇÃO DE SAIS BILIARES

Outros estudos em relação à agregação de sais biliares estão sendo realizados há pelo menos 50 anos, em especial colato (NaC) e desoxicolato de sódio (NaDC) e seus conjugados, com os aminoácidos glicina e taurina. Tem sido empregado nestes estudos, diversas técnicas experimentais invasivas e não invasivas, tais como espectrofotometria, condutividade, calorimetria, cromatografia, densidade, ultracentrifugação, ressonância de spin, fluorescência, tensão superficial e interfacial, osmometria de membrana, crioscopia, ressonância magnética nuclear, potenciometria, solubilização, difusão, viscosidade, pressão de vapor, raios-X, etc (Carey, 1972; Coello, 1993, 1996; Conte, 1984; D'Alagni, 1985; Esposito, 1983, 1987; Giglio, 1988; Kawamura, 1989; Kratochvill, 1984, 1986; Small, 1968; Zana, 1978). Todavia, existem controvérsias com relação a aspectos fundamentais na estrutura e número de agregação. Em relação ao número de agregação, Kawamura (1989) defende um “modelo tipo disco”, baseado no proposto por Small, onde os sais biliares formam agregados pequenos com a face apolar em direção ao interior e a polar voltada para o sistema aquoso (Figura 1.1).

Por outro lado, Giglio (1988) propõe aos agregados uma estrutura helicoidal estabilizada por interações polares. A superfície externa é definida pela parte apolar dos monômeros e em direção ao interior estão dispostos os grupos polares (Figura 1.2).



**Figura 1.1-** Agregado de um sal biliar segundo “modelo tipo disco” de Kawamura e col; a) vista frontal, b) vista superior, c) vista lateral.



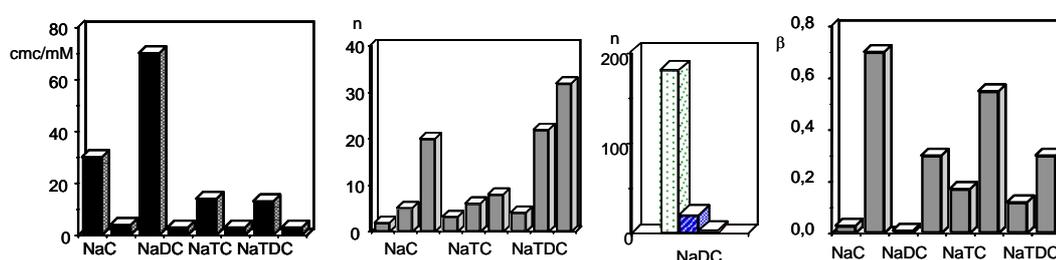
**Figura 1.2-** Estrutura helicoidal do RbDC segundo Giglio. As linhas descontínuas representam ligações de hidrogênio (direita) e interações íon-íon e íon-dipolo (esquerda).

A determinação da fração de contra-íons associada aos agregados e a elucidação do ambiente (hidrófobo ou hidrófilo) no interior dos mesmos, permite declinar a favor de um ou outro dos modelos aqui mencionados. O modelo de Giglio estabelece uma fração de contra-íons igual a 1, o que sugere agregados eletricamente neutros. Os valores publicados são relativamente baixos (tanto para os sais di- como trihidroxílicas), já que estão compreendidas entre os valores de 0 e 0,3 (Coelho, 1993 e 1996; Gustavsson, 1975; Jana, 1991; Lindheimer, 1981; Lindman, 1976, 1980 e 1984; Murata, 1987; Small, 1969). Somente em duas referências são constatados valores consideravelmente maiores, como o de 0,7 para o NaC (Sugihara, 1982) e o de 0,54 para o NaTC (Simers, 1993). Na primeira referência se faz uso de um método de determinação questionável, enquanto que na segunda, o parâmetro é avaliado a partir de dados de tensão superficial, indicando os próprios autores que o valor obtido é superior ao real. Estes parâmetros mostram evidências a favor do modelo de Kawamura, ao menos para agregados de pequeno tamanho.

Por outro lado, a relação de intensidade  $I_1/I_3$  do primeiro e terceiro sinais do espectro de fluorescência do pireno, é uma medida da polaridade do microambiente em que se encontra (Malliaris, 1988). Assim, por exemplo, a referida relação toma o valor de 1,96 em água (Hashimoto, 1984; Vethamuthu, 1982) e 0,54-0,61 em ciclohexano (Hashimoto, 1984; Meyerhoffer, 1991; Zana, 1985). Todos os valores publicados para o pireno no interior dos

agregados de sais biliares são inferiores a unidade (Jover, 1996; Li, 1994; Matsuzaki, 1989; Meyerhoffer, 1991; Ueno, 1987; Vethamutu, 1982; Zana, 1985), reforçando o modelo proposto por Kawamura, no qual a molécula de pireno está no interior da micela formada pelo ácido biliar, em um ambiente de caráter marcadamente apolar.

A controvérsia também se estende a outros parâmetros como o número de agregação e a concentração micelar crítica (cmc). Vázquez Tato e col. (Coelho, 1996), realizaram uma completa revisão dos valores publicados, os quais estão sendo apresentados na Figura 1.3. Entre as razões que justificam as discrepâncias observadas entre os diversos autores, cabe citar a pouca pureza dos sais biliares utilizados nos experimentos. Do mesmo modo, o pH apresenta uma importância fundamental, já que nem sempre se trabalha em condições em que o ácido biliar está totalmente ionizado. Os valores de pKa destes sais são os seguintes: cólico, 4,98; desoxicólico, 5,3; glicólico, 3,95; glicodesoxicólico, 4,69; taurocólico, 1,85 e taurodesoxicólico, 1,93.



**Figura 1.3-** Valores máximos e mínimos publicados para a cmc, número de agregação (n), e fração de contra-íons para os sais biliares: colato de sódio (NaC), desoxicolato de sódio (NaDC), taurocolato de sódio (NaTC) e taurodesoxicolato de sódio (NaTDC).

**REFERÊNCIA**

- CAREY, M. C.; SMALL, D. M. Micelle Formation by Bile Salts. Physical -Chemical and Thermodynamic Considerations. **Arch. Intern. Med.**, v.130, p.506, 1972.
- COELLO, A.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J. Aggregation Behavior of Sodium Cholate in Aqueous Solution. **J. Phys. Chem.**, v.97, p.10186, 1993.
- COELLO, A.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J. Aggregation Behavior of Bile Salts in Aqueous Solution. **J. Pharm. Sci.**, v.85, p.9, 1996.
- CONTE, G.; DI BLASI, R.; GIGLIO, E.; PARETTA, A.; PAVEL, N. V. Nuclear Magnetic Resonance and X-ray Studies on Micellar Aggregates of Sodium Deoxycholate. **J. Phys. Chem.**, v.88, p.5720, 1984.
- D'ALAGNI, M.; FORCELLESE, M. L.; GIGLIO, E. Study of the interaction between an optical probe and micelles of sodium deoxycholate. **Colloid Polym. Sci.**, v.263, p.160, 1985.
- ESPOSITO, G.; GIGLIO, E.; PAVEL, N. V.; ZANOBI, A. Size and Shape of Sodium Deoxycholate Micellar Aggregates. **J. Phys. Chem.**, v.91, p.356, 1983.
- ESPOSITO, G.; ZANOBI, A.; GIGLIO, E.; PAVEL, N. V.; CAMPBELL, I. D. Intermolecular interactions in sodium deoxycholate micelles: an NMR study involving a spin-labeled cholestane. **J. Phys. Chem.**, v.91, p.83, 1987.
- GIGLIO, E.; LORETI, S.; PAVEL, N.V. EXAFS: A New Approach to the Structure of Micellar Aggregates. **J. Phys. Chem.**, v.92, p.2858, 1988.
- GUSTAVSSON, H.; LINDMAN, B. Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Interaction between Alkali Ions and Micellar Aggregates. **J. Am. Chem. Soc.**, v.97, p.3923, 1975.
- HASHIMOTO, S.; THOMAS, J. K. Photophysical Studies of Pyrene in Micellar Sodium Taurocholate at High Salt Concentrations. **J. Colloid Int. Sci.**, v.102, p.152, 1984.
- JANA, P.K.; MOULIK, S.P. Interaction of Bile Salts with Hexadecyltrimethylammonium Bromide and Sodium Dodecyl Sulfate. **J. Phys. Chem.**, v.95, p.9525, 1991.
- JOVER, A.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ TATO, J.; MOSQUERA, M.; RODRÍGUEZ PRIETO, F. Unusual Pyrene Excimer Formation during Sodium Deoxycholate Gelation. **Langmuir**, v.12, p.1789, 1996.
- KAWAMURA, H.; MURATA, Y.; YAMAGUCHI, T.; IGINI, H ; TANAKA, M.; SUGIHARA, G.; KRATOHVILL, J. P. Spin-Label Studies of Bile Salt Micelles. **J. Phys. Chem.**, v.93, p.3321, 1989.
- KRATOHVIL, J. P. Size of Bile Salt Micelles: Techniques, Problems and Results. **Hepatology**, v.4, 85S, 1984.
- KRATOHVILL, J. P.; HSU, W. P.; KWOK, D. I. How Large Are the Micelles of Di-a-hydroxy Bile Salts at the Critical Micellization Concentrations in Aqueous Electrolyte Solutions? Results for Sodium Taurodeoxycholate and Sodium Deoxycholate. **Langmuir**, v.2, p.256, 1986.
- LI, G.; MCGOWN, L. B. Model for Bile Salt Micellization and Solubilization from Studies of a "Polydisperse" Array of Fluorescent Probes and Molecular Modeling. **J. Phys. Chem.**, v.98, p.13711, 1994.
- LINDHEIMER, M.; MONTET, J. C.; MOLENAT, J.; BONTEMPS, R.; BRUN, B. Ionic Self-diffusion of various bile salts. **J. Chem. Phys.**, v.78, p.447, 1981.

LINDMAN, B.; KAMENKA, K.; FABRE, H.; ULMIUS, J.; WIELOCH, T. Aggregation, Aggregate Composition and Dynamics in Aqueous Sodium Cholate Solutions. **J. Colloid Int. Sci.**, v.73, p.556, 1980.

LINDMAN, B.; KAMENKA, N. BRUN, B. Translational Motion and Association in Aqueous Sodium Cholate Solutions. **J. Colloid Int. Sci.**, v.56, p.328, 1976.

LINDMAN, B.; PUYAL, M. C.; KAMENKA, N.; RYMDEN, R.; STILBS, P. Micelle Formation of Anionic and Cationic Surfactants from Fourier Transform Hydrogen-1 and Lithium-7 Nuclear Magnetic Resonance and Tracer Self-Diffusion Studies. **J. Chem. Phys.**, v.88, p.5048, 1984.

MALLIARIS, A. Fluorescence probing in aqueous micellar systems: an overview. **Int. Rev. Phys. Chem.**, v.7, p.95, 1988.

MATSUZAKI, K.; YOKOHAMA, I.; KOMATSU, H.; HAUDA, T.; MIYAJIMA, K. A fluorescent probing study on microenvironments in bile salt micelles and bile salt/phosphatidylcholine mixtures in the absence or presence of cholesterol. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.980, p.371, 1989.

MEYERHOFFER, S. M.; MCGROWN, L. B. Microenvironments of Fluorescence Probes in Sodium Taurocholate and Sodium Taurodeoxycholate Bile Salt Media. **Anal. Chem.**, v.63, p.2082, 1991.

MURATA, Y.; OKAWANCHI, M.; KAWAMURA, H.; SUGIHARA, G.; TANAKA, M. Interaction between ionic detergents and a protein. In: **"Surfactants in Solution"**, New York: Plenum Press, v.5, 1987.

SMALL, D. M. Size and Structure of Bile Salt Micelles. Influence of Structure, Concentration, Counterion Concentration, pH and Temperature. **Adv. Chem. Ser.** v.84, p.31, 1968.

SMALL, D.M.; ADMIRAND, W. H. Solubility of bile salts. **Nature**, v.221, p.265, 1969.

Simers, A.V.; Pertsov, A.V. **Colloid J. Phys. Acad. Sci.**, 1993, 55, 749.

SUGIHARA, G.; YAMAKAWA, K.; MURATA, Y.; TANAKA, M. Effects of pH and temperature on Micelle Formation and Solubilization of Cholesterol in Aqueous Solutions of Bile Salts. **J. Phys. Chem.**, v.86, p.2784, 1982.

UENO, M.; KIMOTO, Y.; IKEDA, Y.; MOMODE, H.; ZANA, R. Study on the Aggregation Number of Mixed Micelles in Aqueous Binary Mixtures of the Bile Salts and Nonionic Surfactant. **J. Colloid Int. Sci.**, v.117, p.179, 1987.

VETHAMUTU, M. S.; ALMGREN, M.; MUKHTAR, E.; BAHADUR, P. Fluorescence Quenching Studies of the Aggregation Behavior of the Mixed Micelles of Bile Salts and Cetyltrimethylammonium Halides. **Langmuir**, v.8, p.2396, 1982.

ZANA, R. Comments on the paper "The Role of Hydrogen Bonding in the Formation of Bile Salt Micelles". **J. Phys. Chem.**, v.82, p.2440, 1978.

ZANA, R.; GÜVELI, D. Fluorescence Probing Study of the Association of Bile Salts In Aqueous Solutions. **J. Phys. Chem.**, v.89, p.1687, 1985.

## Integración de las señales 18 y 19, 25 y 12 del tubo 7 de la serie CHAPS- $\beta$ -CD

Estos son los ficheros del espectro completo

I:= READPRN("espectro completo chaps bCD tubo 7.txt")

ppm := READPRN("espectro completo chaps bCD tubo 7 ppm.txt")

I =	0	0
	1	9.1
	2	9.099
	3	9.098
	4	9.097
	5	9.096
	6	9.095
	7	9.094
	8	9.093
	9	9.091
	10	9.09
	10	9.089

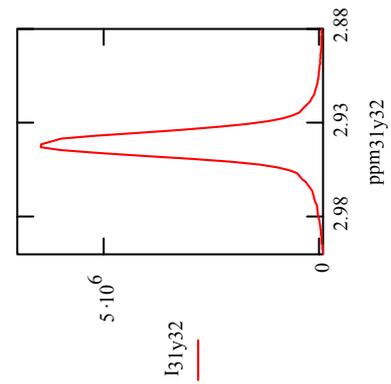
ppm =

## Señal de referencia 31 y 32

Aquí acortamos el espectro para la señal 31 y 32, los ppm que nos interesan que es entre 2.879 y 2.957 ppm, esta será la señal de referencia para las integraciones, equivaldrá a 6 protones. Además se invierte el orden de los dos ficheros por si existe algún problema a la hora de integrar.

I31y32 := submatrix(I, 5658, 5587, 0, 0)

ppm31y32 := submatrix(ppm, 5658, 5587, 0, 0)

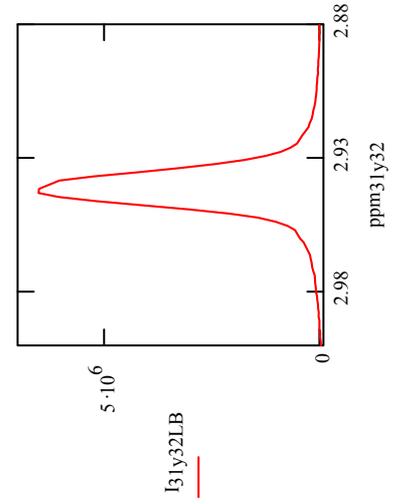


ppm31y32 =	0	2.879
	1	2.88
	2	2.881
	3	2.882
	4	2.883
	5	2.884
	6	2.886
	7	2.887
	8	2.888
	9	2.889
	10	2.89

Tenemos que hacer una corrección de la línea base, se busca el mínimo valor de Y y se le resta a todos los demás valores.

I31y32LB := I31y32 - min(I31y32)

min(I31y32LB) = 0



El siguiente paso sería ajustar a una lorentziana para integrar esta función entre los límites 2.879 y 2.957 ppm.

**NON LINEAR LEAST SQUARES:**

1. se definen los subíndices para los errores  $n := \text{last}(\text{ppm31y32})$   $i := 0..n$

2. ecuación del singlete 31 y 32 libre y complejo (31y32)

$$\text{singlete31y32}(\text{ppm31y32}, A31y32, w31y32, \text{max31y32}) := \frac{\pi}{w31y32^2 + 4 \cdot (\text{ppm31y32} - \text{max31y32})^2} \cdot 2 \cdot A31y32 \cdot w31y32$$

3. suma de los cuadrados de los errores a minimizar

$$\text{SSE}(A31y32, w31y32, \text{max31y32}) := \sum_i (I31y32LB_i - \text{singlete31y32}(\text{ppm31y32}_i, A31y32, w31y32, \text{max31y32}))^2$$

4. Bloque de solución

a. Estimadas iniciales

altura =  $2A/w\pi$       anchura a media altura      posición del máximo

$A31y32 \approx 60000$

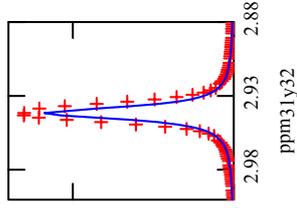
$w31y32 \approx 0.0065$

$\text{max31y32} \approx 2.919$

$I31y32LB$

+

singlete31y32(ppm31y32, A31y32, w31y32, max31y32)



se dejan libres todos los parámetros (según el tipo de letra: libres user 1, fijos variable)

b. Se abre el bloque de solución

Given  $\text{SSE}(A31y32, w31y32, \text{max31y32}) = 0$

d. Se cierra el bloque de solución

$$\begin{pmatrix} A31y32 \\ w31y32 \\ \text{max31y32} \end{pmatrix} := \text{MinErr}(A31y32, w31y32, \text{max31y32})$$

c. Se dan condiciones adicionales

$A31y32 \geq 0$        $w31y32 \geq 0$        $\text{max31y32} \geq 0$

**SOLUCIONES DEL AJUSTE**

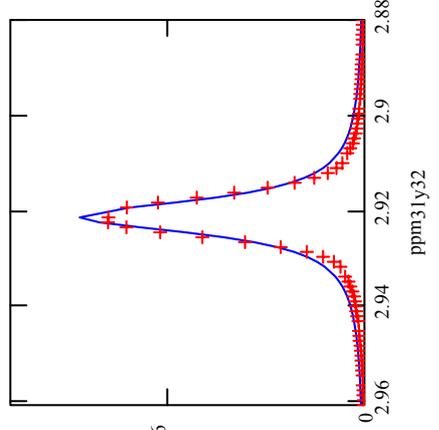
$A31y32 = 9.242 \times 10^4$        $\text{max31y32} = 2.919$

$w31y32 = 8.129 \times 10^{-3}$

$\text{singlete31y32}(\text{ppm31y32}, A31y32, w31y32, \text{max31y32}) \cdot 5 \cdot 10^6$

$I31y32LB$

+

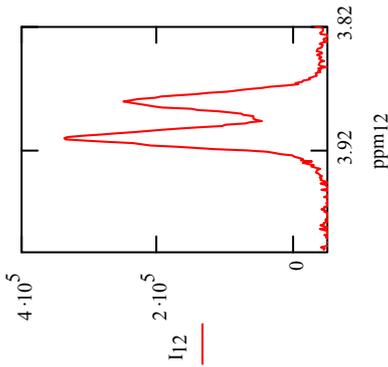


### Señal 12

Aquí acortamos el espectro para la señal 12, los ppm que nos interesan que es entre 3.998 y 3.816 ppm. Además se invierte el orden de los dos ficheros por si existe algún problema a la hora de integrar.

```
I12 := submatrix(I, 4806, 4640, 0, 0)
```

```
ppm12 := submatrix(ppm, 4806, 4640, 0, 0)
```

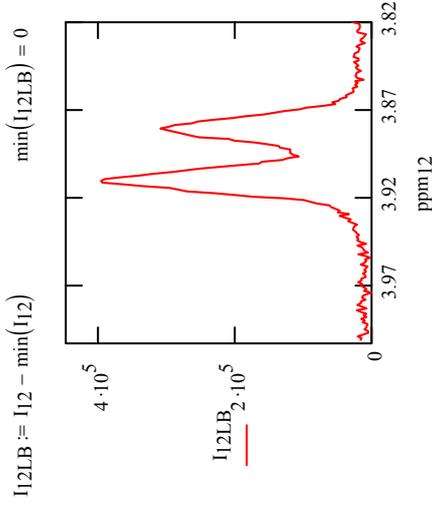


	0
0	-3.241 · 10 <sup>4</sup>
1	-4.236 · 10 <sup>4</sup>
2	-4.416 · 10 <sup>4</sup>
3	-4.379 · 10 <sup>4</sup>
4	-4.316 · 10 <sup>4</sup>
5	-3.981 · 10 <sup>4</sup>
6	-4.069 · 10 <sup>4</sup>
7	-5.295 · 10 <sup>4</sup>
8	-4.893 · 10 <sup>4</sup>
9	-4.502 · 10 <sup>4</sup>
10	-4.498 · 10 <sup>4</sup>

$I_{12} =$

$ppm_{12} =$

	0
0	3.816
1	3.817
2	3.818
3	3.819
4	3.82
5	3.821
6	3.822
7	3.823
8	3.825
9	3.826
10	3.827



$I_{12LB} := I_{12} - \min(I_{12})$

$\min(I_{12LB}) = 0$

Tenemos que hacer una corrección de la línea base, se busca el mínimo valor de Y y se le resta a todos los demás valores.

El siguiente paso sería ajustar a una lorentziana para integrar esta función entre los límites 3.998 y 3.816 ppm.

### NON LINEAR LEAST SQUARES:

1. se definen los subíndices para los errores  $n := \text{last}(ppm_{12})$   $i := 0..n$

2. ecuación del singlete 12 libre y complejojado (12)

$$\text{singletes}_{12}(ppm_{12}, A_{12I}, w_{12I}, \max_{12I}, A_{12c}, w_{12c}, \max_{12c}) := \frac{2 \cdot A_{12I} \cdot w_{12I}}{\pi} \frac{1}{w_{12I}^2 + 4 \cdot (ppm_{12} - \max_{12I})^2} + \dots + \frac{2 \cdot A_{12c} \cdot w_{12c}}{\pi} \frac{1}{w_{12c}^2 + 4 \cdot (ppm_{12} - \max_{12c})^2}$$

$$\text{singlete}_{12I}(ppm_{12}, A_{12I}, w_{12I}, \max_{12I}) := \frac{2 \cdot A_{12I} \cdot w_{12I}}{\pi} \frac{1}{w_{12I}^2 + 4 \cdot (ppm_{12} - \max_{12I})^2}$$

$$\text{singlete}_{12c}(ppm_{12}, A_{12c}, w_{12c}, \max_{12c}) := \frac{2 \cdot A_{12c} \cdot w_{12c}}{\pi} \frac{1}{w_{12c}^2 + 4 \cdot (ppm_{12} - \max_{12c})^2}$$

3. suma de los cuadrados de los errores a minimizar

$$SSE(A_{12I}, w_{12I}, \max_{12I}, A_{12c}, w_{12c}, \max_{12c}) := \sum_i (I_{12LB_i} - \text{singletes}_{12}(ppm_{12}, A_{12I}, w_{12I}, \max_{12I}, A_{12c}, w_{12c}, \max_{12c}))^2$$

4. Bloque de solución

a. Estimadas iniciales

altura= $2A/w\pi$	anchura a media altura	posición del máximo
$A_{12l} \equiv 6000$	$w_{12l} \equiv 0.012$	$\max_{12l} \equiv 3.877$
$A_{12c} \equiv 8000$	$w_{12c} \equiv 0.012$	$\max_{12c} \equiv 3.907$

se dejan libres todos los parámetros (según el tipo de letra: libres user 1, fijos variable)

b. Se abre el bloque de solución

Given  $SSE(A_{12l}, w_{12l}, \max_{12l}, A_{12c}, w_{12c}, \max_{12c}) = 0$

c. Se dan condiciones adicionales

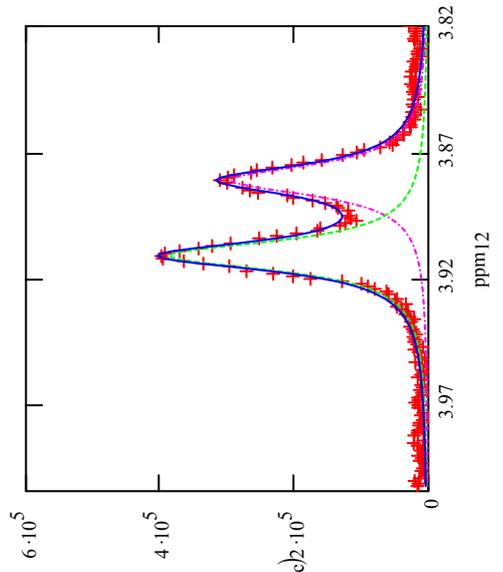
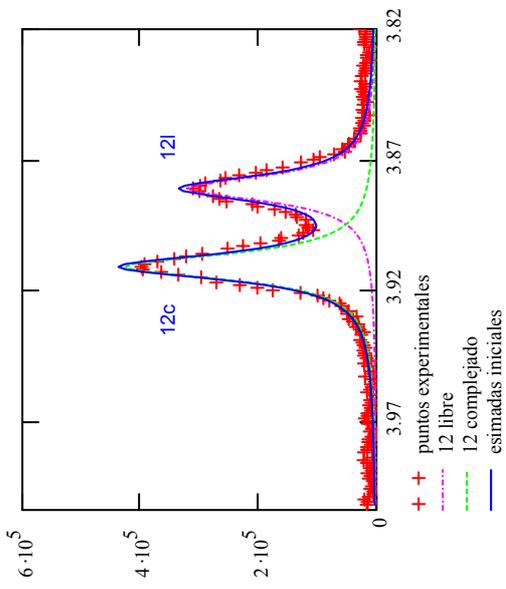
$A_{12l} \geq 0$     $w_{12l} \geq 0$     $\max_{12l} \geq 0$   
 $A_{12c} \geq 0$     $w_{12c} \geq 0$     $\max_{12c} \geq 0$

d. Se cierra el bloque de solución

$$\begin{pmatrix} A_{12l} \\ w_{12l} \\ \max_{12l} \\ A_{12c} \\ w_{12c} \\ \max_{12c} \end{pmatrix} := \text{MinErr}(A_{12l}, w_{12l}, \max_{12l}, A_{12c}, w_{12c}, \max_{12c})$$

SOLUCIONES DEL AJUSTE

$A_{12l} = 6.824 \times 10^3$     $\max_{12l} = 3.877$   
 $A_{12c} = 8.621 \times 10^3$     $\max_{12c} = 3.907$   
 $w_{12l} = 0.015$   
 $w_{12c} = 0.014$



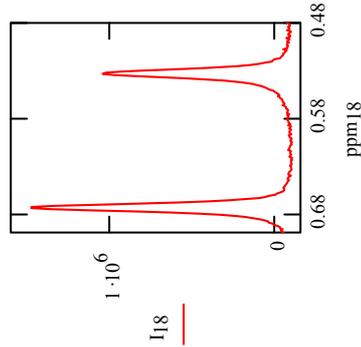
$I_{12LB}$   
 $+$     $+$     $+$   
 single12l(ppm12, A12l, w12l, max12l)  
 single12c(ppm12, A12c, w12c, max12c)  
 single12(ppm12, A12l, w12l, max12l, A12c, w12c, max12c) · 10<sup>5</sup>

### Señal 18

Aquí acortamos el espectro para las señal 18, los ppm que nos interesan que es entre 0.685 y 0.479 ppm. Además se invierte el orden de los dos ficheros por si existe algún problema a la hora de integrar.

```
I18 := submatrix(1, 7841, 7653, 0, 0)
```

```
ppm18 := submatrix(ppm, 7841, 7653, 0, 0)
```



I18 =

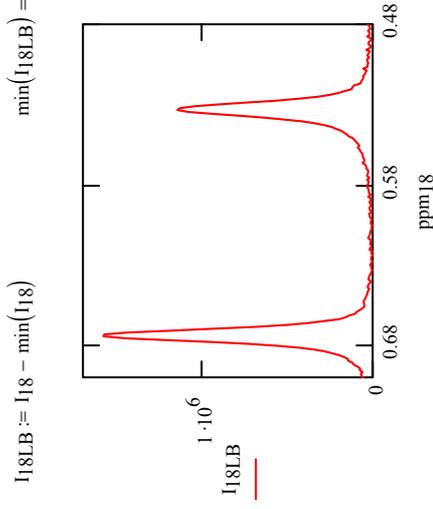
	0
0	-6.534·104
1	-7.925·104
2	-8.568·104
3	-8.779·104
4	-7.539·104
5	-8.453·104
6	-8.402·104
7	-6.98·104
8	-9.442·104
9	-9.134·104
10	-7.924·104

ppm18 =

	0
0	0.479
1	0.48
2	0.481
3	0.482
4	0.483
5	0.484
6	0.485
7	0.486
8	0.487
9	0.488
10	0.49

Tenemos que hacer una corrección de la línea base, se busca el mínimo valor de Y y se le resta a todos los demás valores.

$$I_{18LB} := I_{18} - \min(I_{18})$$



El siguiente paso sería ajustar a dos lorentzianas para integrar esta función entre los límites 0.685 y 0.479 ppm.

### NON LINEAR LEAST SQUARES:

1. se definen los subíndices para los errores  $n := \text{last}(\text{ppm18})$   $i := 0..n$

2. ecuación del singlete 18 libre y complejo (18)

$$\text{singlete18}(\text{ppm18}, A181, w181, \text{max181}, A18c, w18c, \text{max18c}) := \frac{2 \cdot A181 \cdot w181}{\pi} \frac{1}{w181^2 + 4 \cdot (\text{ppm18} - \text{max181})^2} + \dots + \frac{2 \cdot A18c \cdot w18c}{\pi} \frac{1}{w18c^2 + 4 \cdot (\text{ppm18} - \text{max18c})^2}$$

$$\text{singlete18}(\text{ppm18}, A181, w181, \text{max181}) := \frac{2 \cdot A181 \cdot w181}{\pi} \frac{1}{w181^2 + 4 \cdot (\text{ppm18} - \text{max181})^2}$$

$$\text{singlete18c}(\text{ppm18}, A18c, w18c, \text{max18c}) := \frac{2 \cdot A18c \cdot w18c}{\pi} \frac{1}{w18c^2 + 4 \cdot (\text{ppm18} - \text{max18c})^2}$$

3. suma de los cuadrados de los errores a minimizar

$$SSE(A_{18l}, w_{18l}, \max_{18l}, A_{18c}, w_{18c}, \max_{18c}) := \sum_i (I_{18LB}_i - \text{singletes}_{18}(\text{ppm}_{18}, A_{18l}, w_{18l}, \max_{18l}, A_{18c}, w_{18c}, \max_{18c}))^2$$

4. Bloque de solución

a. Estimadas iniciales

altura= 2A/wπ	anchura a media altura	posición del máximo
A <sub>18l</sub> ≡ 15000	w <sub>18l</sub> ≡ 0.008	max <sub>18l</sub> ≡ 0.529
A <sub>18c</sub> ≡ 20000	w <sub>18c</sub> ≡ 0.008	max <sub>18c</sub> ≡ 0.661

se dejan libres todos los parámetros (según el tipo de letra: libres user 1, fijos variable)

b. Se abre el bloque de solución

Given  $SSE(A_{18l}, w_{18l}, \max_{18l}, A_{18c}, w_{18c}, \max_{18c}) = 0$

c. Se dan condiciones adicionales

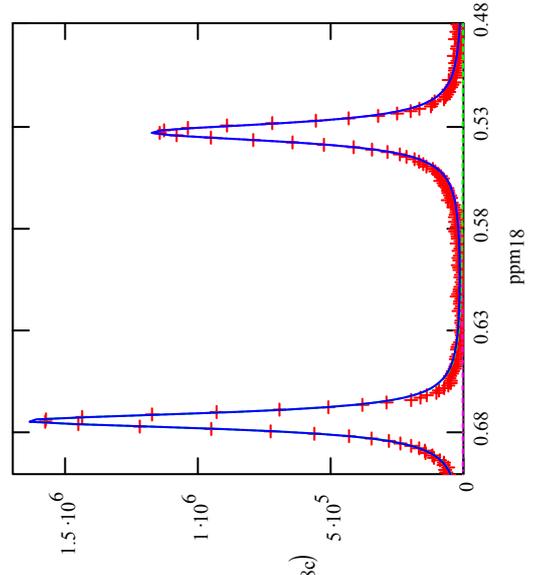
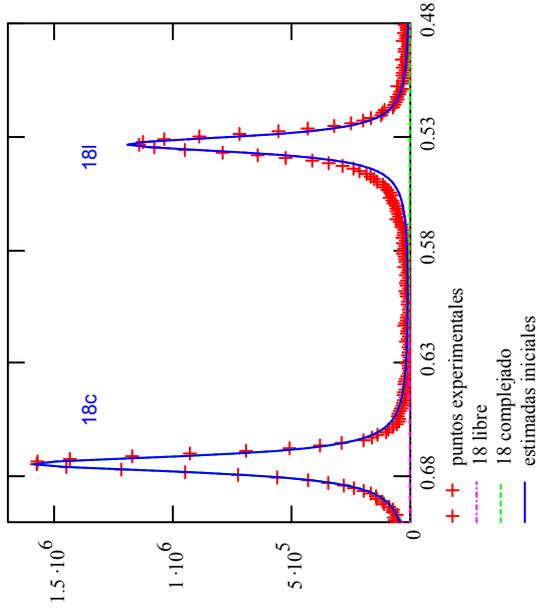
A<sub>18l</sub> ≥ 0    w<sub>18l</sub> ≥ 0    max<sub>18l</sub> ≥ 0  
 A<sub>18c</sub> ≥ 0    w<sub>18c</sub> ≥ 0    max<sub>18c</sub> ≥ 0

d. Se cierra el bloque de solución

$$\begin{pmatrix} A_{18l} \\ w_{18l} \\ \max_{18l} \\ A_{18c} \\ w_{18c} \\ \max_{18c} \end{pmatrix} := \text{MinErr}(A_{18l}, w_{18l}, \max_{18l}, A_{18c}, w_{18c}, \max_{18c})$$

SOLUCIONES DEL AJUSTE

A<sub>18l</sub> = 1.826 × 10<sup>4</sup>    w<sub>18l</sub> = 9.897 × 10<sup>-3</sup>    max<sub>18l</sub> = 0.529  
 A<sub>18c</sub> = 2.162 × 10<sup>4</sup>    w<sub>18c</sub> = 8.333 × 10<sup>-3</sup>    max<sub>18c</sub> = 0.661



I<sub>18LB</sub>  
 + singlete<sub>18l</sub>(ppm<sub>18</sub>, A<sub>18l</sub>, w<sub>18l</sub>, max<sub>18l</sub>)  
 + singlete<sub>18c</sub>(ppm<sub>18</sub>, A<sub>18c</sub>, w<sub>18c</sub>, max<sub>18c</sub>)  
 + singletes<sub>18</sub>(ppm<sub>18</sub>, A<sub>18l</sub>, w<sub>18l</sub>, max<sub>18l</sub>, A<sub>18c</sub>, w<sub>18c</sub>, max<sub>18c</sub>)

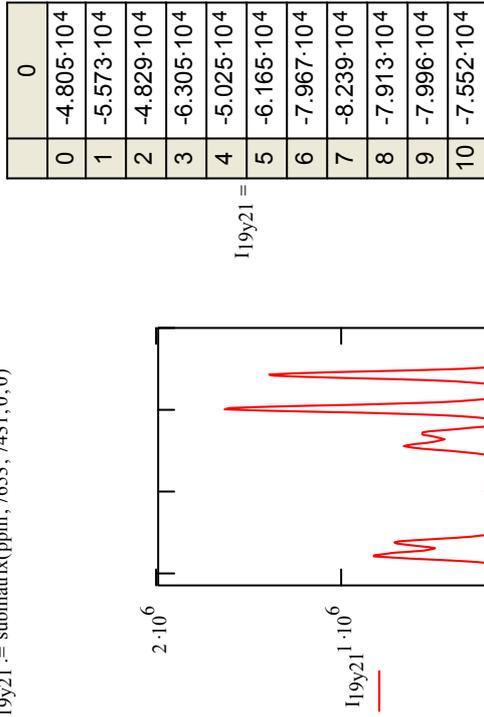
chaps integración señales chaps bCD tubo 7. mcd

## Señales 19 y 21

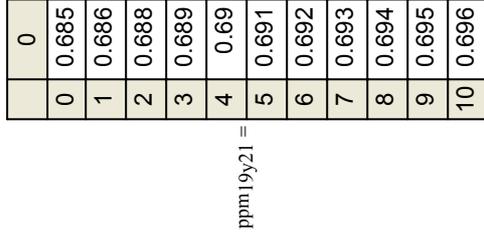
Aquí acortamos el espectro para las señales 19 y 21, los ppm que nos interesan que es entre 0.929 y 0.685 ppm. Además se invierte el orden de los dos ficheros por si existe algún problema a la hora de integrar.

`I19y21 := submatrix(I, 7653, 7431, 0, 0)`

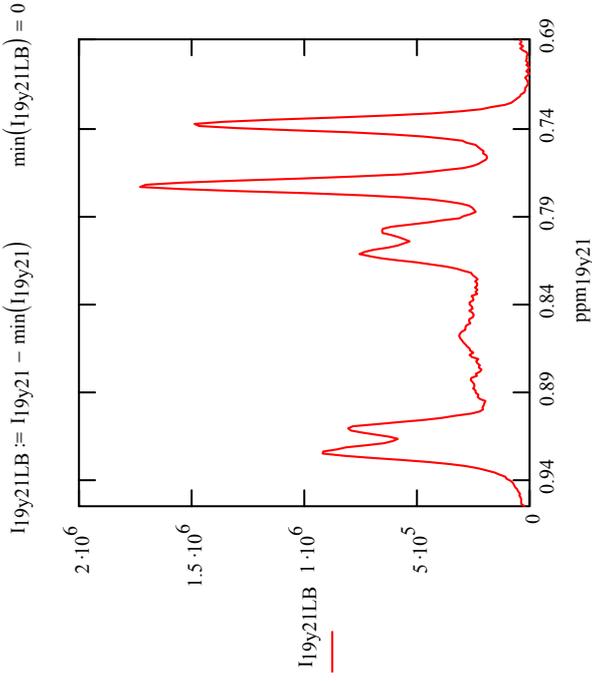
`ppm19y21 := submatrix(ppm, 7653, 7431, 0, 0)`



$I_{19y21} =$



$ppm_{19y21} =$



Tenemos que hacer una corrección de la línea base, se busca el mínimo valor de Y y se le resta a todos los demás valores.

El siguiente paso sería ajustar a una función que es una serie de lorentzianas que incluya un singlete para el 19 complejo, un doblete para el 21 complejo y un triplete para el 1 complejo. Después de ajustarla se integrará la función entre los límites 0.929 y 0.685 ppm.

## GENERAMOS LA FUNCIÓN GLOBAL

Ecuación del singlete 19 libre (19l)

$$singlete19l(ppm19y21, A19l, w19l, max19l) := \frac{2 \cdot A19l \cdot w19l}{\pi} \frac{1}{w19l^2 + 4 \cdot (ppm19y21 - max19l)^2}$$

↓  
posición del máximo

Ecuación del singlete 19 complejo (19c)

$$singlete19c(ppm19y21, A19c, w19c, max19c) := \frac{2 \cdot A19c \cdot w19c}{\pi} \frac{1}{w19c^2 + 4 \cdot (ppm19y21 - max19c)^2}$$

↓  
posición del máximo

**Ecuación del doblete 21 libre (21I)****primera lorentziana (21Ia):**

$$L_{21Ia}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{21Ia}, w_{21Ia}, \text{max } 21Ia) := \frac{2 \cdot A_{21Ia} \cdot w_{21Ia}}{\pi} \frac{1}{w_{21Ia}^2 + 4(\text{ppm } 19y_{21} - \text{max } 21Ia)^2}$$

**segunda lorentziana (21Ib):**

$$L_{21Ib}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{21Ib}, w_{21Ib}, J_{21I}, \text{max } 21Ia) := \frac{2 \cdot A_{21Ib} \cdot w_{21Ib}}{\pi} \frac{1}{w_{21Ib}^2 + 4[\text{ppm } 19y_{21} - (\text{max } 21Ia + J_{21I})]^2}$$

**doblete 21 libre (21I):**

posición del pico a menor desplazamiento  
 doblete<sub>21I</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>21Ia</sub>, w<sub>21Ia</sub>, J<sub>21I</sub>, max 21Ia) := L<sub>21Ia</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>21Ia</sub>, w<sub>21Ia</sub>, max 21Ia) ...  
 + L<sub>21Ib</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>21Ib</sub>, w<sub>21Ib</sub>, J<sub>21I</sub>, max 21Ia)

**Ecuación del triplete 1 libre (1I)****primera lorentziana (1Ia):**

$$L_{1Ia}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{1Ib}, w_{1Ib}, J_{1I}, \text{max } 1Ib) := \frac{A_{1Ib} \cdot w_{1Ib}}{\pi} \frac{1}{w_{1Ib}^2 + 4[\text{ppm } 19y_{21} - (\text{max } 1Ib - J_{1I})]^2}$$

**segunda lorentziana (1Ib):**

$$L_{1Ib}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{1Ib}, w_{1Ib}, \text{max } 1Ib) := \frac{2 \cdot A_{1Ib} \cdot w_{1Ib}}{\pi} \frac{1}{w_{1Ib}^2 + 4(\text{ppm } 19y_{21} - \text{max } 1Ib)^2}$$

**Ecuación del triplete 1 complejo (1c)****primera lorentziana (1ca):**

$$L_{1ca}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{1cb}, w_{1cb}, J_{1c}, \text{max } 1cb) := \frac{A_{1cb} \cdot w_{1cb}}{\pi} \frac{1}{w_{1cb}^2 + 4[\text{ppm } 19y_{21} - (\text{max } 1cb - J_{1c})]^2}$$

**segunda lorentziana (1cb):**

$$L_{1cb}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{1cb}, w_{1cb}, \text{max } 1cb) := \frac{2 \cdot A_{1cb} \cdot w_{1cb}}{\pi} \frac{1}{w_{1cb}^2 + 4(\text{ppm } 19y_{21} - \text{max } 1cb)^2}$$

**Ecuación del doblete 21 complejo (21c)****primera lorentziana (21ca):**

$$L_{21ca}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{21ca}, w_{21ca}, \text{max } 21ca) := \frac{2 \cdot A_{21ca} \cdot w_{21ca}}{\pi} \frac{1}{w_{21ca}^2 + 4(\text{ppm } 19y_{21} - \text{max } 21ca)^2}$$

**segunda lorentziana (21cb):**

$$L_{21cb}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{21ca}, w_{21ca}, J_{21c}, \text{max } 21ca) := \frac{2 \cdot A_{21ca} \cdot w_{21ca}}{\pi} \frac{1}{w_{21ca}^2 + 4[\text{ppm } 19y_{21} - (\text{max } 21ca + J_{21c})]^2}$$

**doblete 21 complejo (21c):**

posición del pico a menor desplazamiento  
 doblete<sub>21c</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>21ca</sub>, w<sub>21ca</sub>, J<sub>21c</sub>, max 21ca) := L<sub>21ca</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>21ca</sub>, w<sub>21ca</sub>, max 21ca) ...  
 + L<sub>21cb</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>21ca</sub>, w<sub>21ca</sub>, J<sub>21c</sub>, max 21ca)

**tercera lorentziana (11c):**

$$L_{11c}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{1Ib}, w_{1Ib}, J_{1I}, \text{max } 1Ib) := \frac{A_{1Ib} \cdot w_{1Ib}}{\pi} \frac{1}{w_{1Ib}^2 + 4[\text{ppm } 19y_{21} - (\text{max } 1Ib + J_{1I})]^2}$$

**triplete 1 libre (1I):**

triplete<sub>1I</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>1Ib</sub>, w<sub>1Ib</sub>, J<sub>1I</sub>, max 1Ib) := L<sub>1Ia</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>1Ib</sub>, w<sub>1Ib</sub>, J<sub>1I</sub>, max 1Ib) ...  
 + L<sub>1Ib</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>1Ib</sub>, w<sub>1Ib</sub>, max 1Ib) ...  
 + L<sub>1Ic</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>1Ib</sub>, w<sub>1Ib</sub>, J<sub>1I</sub>, max 1Ib)

**tercera lorentziana (1cc):**

$$L_{1cc}(\text{ppm } 19y_{21}, A_{1cb}, w_{1cb}, J_{1c}, \text{max } 1cb) := \frac{A_{1cb} \cdot w_{1cb}}{\pi} \frac{1}{w_{1cb}^2 + 4[\text{ppm } 19y_{21} - (\text{max } 1cb + J_{1c})]^2}$$

**triplete 1 complejo (1c):**

triplete<sub>1c</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>1cb</sub>, w<sub>1cb</sub>, J<sub>1c</sub>, max 1cb) := L<sub>1ca</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>1cb</sub>, w<sub>1cb</sub>, J<sub>1c</sub>, max 1cb) ...  
 + L<sub>1cb</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>1cb</sub>, w<sub>1cb</sub>, max 1cb) ...  
 + L<sub>1cc</sub>(ppm 19y<sub>21</sub>, A<sub>1cb</sub>, w<sub>1cb</sub>, J<sub>1c</sub>, max 1cb)

**Función global**

CHAPS19y21(ppm19y21, A19l, w19l, max19l, A19c, w19c, max19c, A21la, w21la, J21l, max21la, A21ca, w21ca, J21c, max21ca, A1lb, w1lb, J1l, max1lb, A1cb, w1cb, J1c, max1cb) :=  
 + singlete19(ppm19y21, A19l, w19l, max19l, A19c, w19c, max19c) ...  
 + singlete19c(ppm19y21, A19c, w19c, max19c) ...  
 + doblete21l(ppm19y21, A21la, w21la, J21l, max21la) ...  
 + doblete21c(ppm19y21, A21ca, w21ca, J21c, max21ca) ...  
 + triplete1l(ppm19y21, A1lb, w1lb, J1l, max1lb) ...  
 + triplete1c(ppm19y21, A1cb, w1cb, J1c, max1cb)

**NON LINEAR LEAST SQUARES:**

1. se definen los subíndices para los errores
2. ecuación de las señales 19 y 21 (19y21)

$$n := \text{last}(\text{ppm19y21}) \quad i := 0..n$$

CHAPS19y21(ppm19y21, A19l, w19l, max19l, A19c, w19c, max19c, A21la, w21la, J21l, max21la, A21ca, w21ca, J21c, max21ca, A1lb, w1lb, J1l, max1lb, A1cb, w1cb, J1c, max1cb) :=  
 + singlete19(ppm19y21, A19l, w19l, max19l, A19c, w19c, max19c) ...  
 + singlete19c(ppm19y21, A19c, w19c, max19c) ...  
 + doblete21l(ppm19y21, A21la, w21la, J21l, max21la) ...  
 + doblete21c(ppm19y21, A21ca, w21ca, J21c, max21ca) ...  
 + triplete1l(ppm19y21, A1lb, w1lb, J1l, max1lb) ...  
 + triplete1c(ppm19y21, A1cb, w1cb, J1c, max1cb)

**3. suma de los cuadrados de los errores a minimizar**

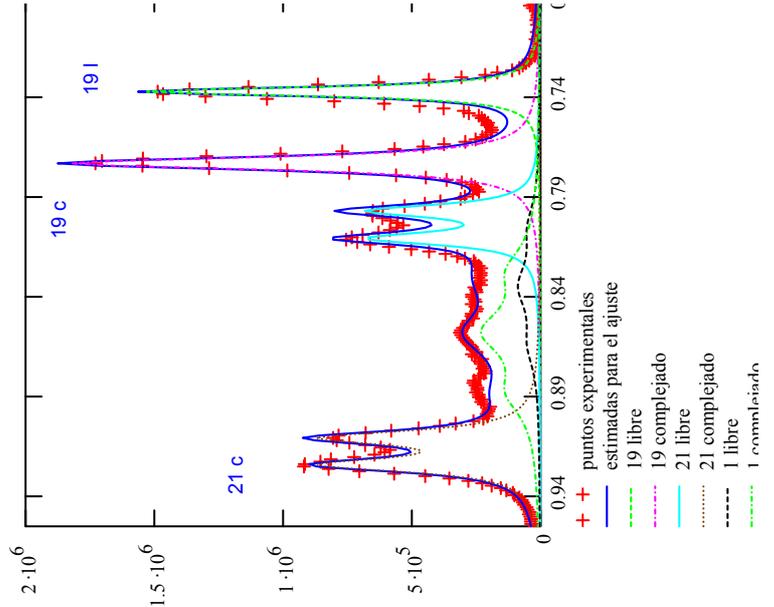
$$\text{SSE}(A19l, w19l, A19c, w19c, A21la, w21la, A21ca, w21ca, A1lb, w1lb, A1cb, w1cb) := \sum_i (19y21LB_i - \text{CHAPS19y21}(\text{ppm19y21}_i, A19l, w19l, \text{max19l}, A19c, w19c, \text{max19c}, A21la, w21la, J21l, \text{max21la}, A21ca, w21ca, J21c, \text{max21ca}))^2$$

**4. Bloque de solución**

**a. Estimadas iniciales**

anchura a media altura	altura= 2A/wr	anchura a media altura	posición del máximo	constante de acoplamiento
singlete 19 libre	A19l = 12000	w19l = 0.005	max19l = 0.7293	
triplete 1 libre	A1lb = 3000	w1lb = 0.026	max1lb = 0.819	J1l = 0.027
doblete 21 libre	A21la = 7000	w21la = 0.007	max21la = 0.7842	J21l = 0.0127
singlete 19 complejo	A19c = 20000	w19c = 0.007	max19c = 0.7623	
triplete 1 complejo	A1cb = 8000	w1cb = 0.026	max1cb = 0.84	J1c = 0.028
doblete 21 complejo	A21ca = 10000	w21ca = 0.008	max21ca = 0.8887	J21c = 0.0125

se dejan libres las alturas y anchuras a media altura y fijos la posición del máximo y la constante de acoplamiento (según el tipo de letra: libres user 1, fijos variable)



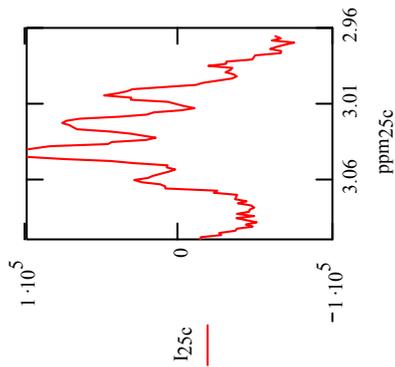


### Señal 25

Aquí acortamos el espectro para la señal 25, los ppm que nos interesan que es entre 3.06 y 2.964 ppm. Además se invierte el orden de los dos ficheros por si existe algún problema a la hora de integrar.

```
I25c := submatrix(I, 5581, 5493, 0, 0)
```

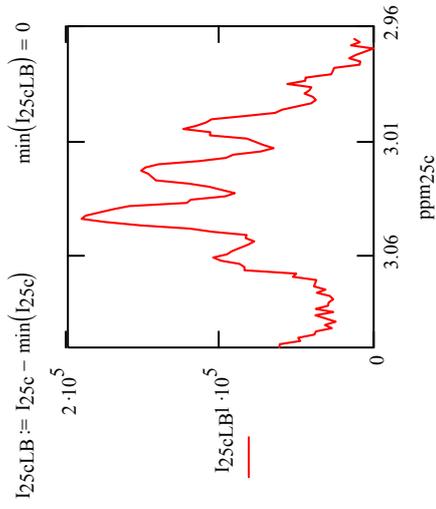
```
ppm25c := submatrix(ppm, 5581, 5493, 0, 0)
```



	0
I25c =	-6.274 · 10 <sup>4</sup>
	-6.636 · 10 <sup>4</sup>
	-6.051 · 10 <sup>4</sup>
	-7.523 · 10 <sup>4</sup>
	-6.916 · 10 <sup>4</sup>
	-6.353 · 10 <sup>4</sup>
	-5.943 · 10 <sup>4</sup>
	-6.661 · 10 <sup>4</sup>
	-6.622 · 10 <sup>4</sup>
	-4.955 · 10 <sup>4</sup>
	-4.77 · 10 <sup>4</sup>

	0
ppm25c =	2.964
	2.965
	2.966
	2.967
	2.968
	2.969
	2.97
	2.971
	2.972
	2.973
	2.975

Tenemos que hacer una corrección de la línea base, se busca el mínimo valor de Y y se le resta a todos los demás valores.



El siguiente paso sería ajustar a cinco lorentzianas para integrar esta función entre los límites 3.06 y 2.964 ppm.

### NON LINEAR LEAST SQUARES:

1. se definen los subíndices para los errores  $n := \text{last}(\text{ppm25c})$   $i := 0..n$
2. ecuación del multiplete (5 picos) 25 complejo (25c)

$$\text{multiplete25c}(\text{ppm25c}, A_{25ca}, A_{25cb}, A_{25cc}, A_{25cd}, A_{25ce}, w_{25c}, \text{max25ca}, \text{max25cb}, \text{max25cc}, \text{max25cd}, \text{max25ce}) :=$$

$$\frac{2 \cdot A_{25ca} \cdot w_{25c}}{\pi} + \frac{2 \cdot A_{25cb} \cdot w_{25c}}{\pi} + \frac{2 \cdot A_{25cc} \cdot w_{25c}}{\pi} + \frac{2 \cdot A_{25cd} \cdot w_{25c}}{\pi} + \dots$$

$$+ \frac{w_{25c}^2 + 4 \cdot (\text{ppm25c} - \text{max25ca})^2}{2 \cdot A_{25ca} \cdot w_{25c}} + \frac{w_{25c}^2 + 4 \cdot (\text{ppm25c} - \text{max25cb})^2}{2 \cdot A_{25cb} \cdot w_{25c}} + \dots$$

$$+ \frac{w_{25c}^2 + 4 \cdot (\text{ppm25c} - \text{max25cc})^2}{2 \cdot A_{25cc} \cdot w_{25c}} + \frac{w_{25c}^2 + 4 \cdot (\text{ppm25c} - \text{max25cd})^2}{2 \cdot A_{25cd} \cdot w_{25c}} + \dots$$

$$+ \frac{w_{25c}^2 + 4 \cdot (\text{ppm25c} - \text{max25ce})^2}{2 \cdot A_{25ce} \cdot w_{25c}} + \dots$$

En esta ecuación no se definieron las relaciones que existen entre las diferentes lorentzianas en un multiplete de cinco señales por que en determinados tubos no las cumple.

3. suma de los cuadrados de los errores a minimizar

$$SSE(A_{25ca}, A_{25cb}, A_{25cc}, A_{25cd}, A_{25ce}, A_{25ce}, w_{25c}) := \sum_i \left( I_{25cl} B_i - \text{multiplete}_{25c}(\text{ppm}_{25c}, A_{25ca}, A_{25cb}, A_{25cc}, A_{25cd}, A_{25ce}, w_{25c}, \text{max}_{25cb}, \text{max}_{25ca}, \text{max}_{25cc}, \text{max}_{25cd}, \text{max}_{25ce}) \right)^2$$

4. Bloque de solución

a. Estimadas iniciales

altura= 2A/w <sub>pt</sub>	anchura a media altura	posición del máximo
A <sub>25ca</sub> ≡ 1200	w <sub>25c</sub> ≡ 7.925 × 10 <sup>-3</sup>	max <sub>25ca</sub> ≡ 3.032
A <sub>25cb</sub> ≡ 2200		max <sub>25cb</sub> ≡ 3.019
A <sub>25cc</sub> ≡ 1600		max <sub>25cc</sub> ≡ 3.005
A <sub>25cd</sub> ≡ 1300		max <sub>25cd</sub> ≡ 2.992
A <sub>25ce</sub> ≡ 600		max <sub>25ce</sub> ≡ 2.978

se dejan libres las alturas y anchuras a media altura y se fijó la posición de los máximos (según el tipo de letra: libres user 1, fijos variable)

b. Se abre el bloque de solución

Given SSE(A<sub>25ca</sub>, A<sub>25cb</sub>, A<sub>25cc</sub>, A<sub>25cd</sub>, A<sub>25ce</sub>, w<sub>25c</sub>) = 0

c. Se dan constraints

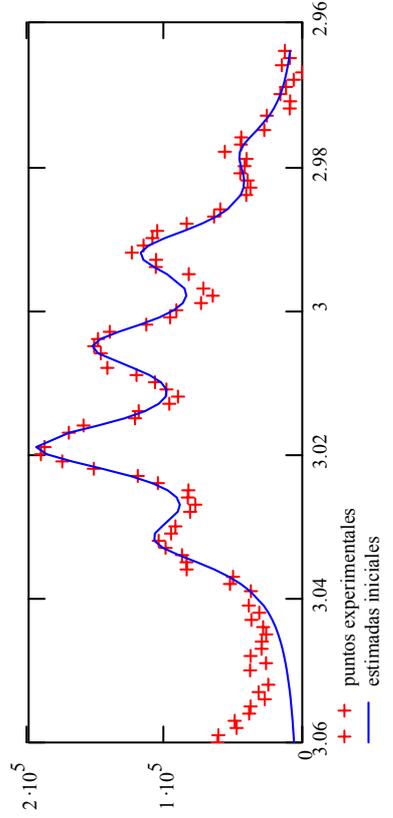
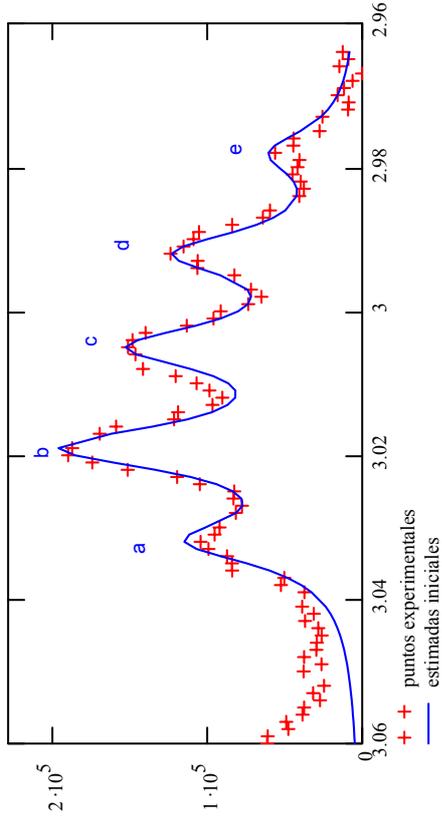
A<sub>25ca</sub> ≥ 0    A<sub>25cb</sub> ≥ 0    A<sub>25cc</sub> ≥ 0    A<sub>25cd</sub> ≥ 0    A<sub>25ce</sub> ≥ 0  
w<sub>25c</sub> ≥ 0

d. Se cierra el bloque de solución

$$\begin{pmatrix} A_{25ca} \\ A_{25cb} \\ A_{25cc} \\ A_{25cd} \\ A_{25ce} \\ w_{25c} \end{pmatrix} := \text{MinErr}(A_{25ca}, A_{25cb}, A_{25cc}, A_{25cd}, A_{25ce}, w_{25c})$$

**SOLUCIONES DEL AJUSTE**

A<sub>25ca</sub> = 1.226 × 10<sup>3</sup>    A<sub>25cb</sub> = 2.486 × 10<sup>3</sup>  
A<sub>25cc</sub> = 1.792 × 10<sup>3</sup>    A<sub>25cd</sub> = 1.394 × 10<sup>3</sup>  
A<sub>25ce</sub> = 433.508    w<sub>25c</sub> = 9.347 × 10<sup>-3</sup>



## INTEGRACIONES TUBO 7

En este paso se hallan las áreas de cada señal que nos interesa a partir de los valores de los ajustes.

### 1. singlete 31 y 32 libre y complejo

$$n := \text{last}(\text{ppm31y32}) \quad i := 0..n$$

$$\text{área31y32} := \int_{\text{ppm31y32}_0}^{\text{ppm31y32}_n} \text{singlete31y32}(\text{ppm31y32}, A_{31y32}, w_{31y32}, \text{max31y32}) \text{dppm31y32}$$

$$\text{área31y32} = 8.6311 \times 10^4$$

### 2. singlete 12 libre

$$n := \text{last}(\text{ppm12}) \quad i := 0..n$$

$$\text{área12i} := \int_{\text{ppm12}_0}^{\text{ppm12}_n} \text{singlete12i}(\text{ppm12}, A_{12i}, w_{12i}, \text{max12i}) \text{dppm12}$$

$$\text{área12i} = 6.432 \times 10^3$$

### 3. singlete 12 complejo

$$\text{área12c} := \int_{\text{ppm12}_0}^{\text{ppm12}_n} \text{singlete12c}(\text{ppm12}, A_{12c}, w_{12c}, \text{max12c}) \text{dppm12}$$

$$\text{área12c} = 8.194 \times 10^3$$

### 4. singlete 18 libre

$$n := \text{last}(\text{ppm18}) \quad i := 0..n$$

$$\text{área18i} := \int_{\text{ppm18}_0}^{\text{ppm18}_n} \text{singlete18i}(\text{ppm18}, A_{18i}, w_{18i}, \text{max18i}) \text{dppm18}$$

$$\text{área18i} = 1.751 \times 10^4$$

### 5. singlete 18 complejo

$$\text{área18c} := \int_{\text{ppm18}_0}^{\text{ppm18}_n} \text{singlete18c}(\text{ppm18}, A_{18c}, w_{18c}, \text{max18c}) \text{dppm18}$$

$$\text{área18c} = 2.031 \times 10^4$$

### 6. singlete 19 libre

$$n := \text{last}(\text{ppm19y21}) \quad i := 0..n$$

$$\text{área19i} := \int_{\text{ppm19y21}_0}^{\text{ppm19y21}_n} \text{singlete19i}(\text{ppm19y21}, A_{19i}, w_{19i}, \text{max19i}) \text{dppm19y21}$$

$$\text{área19i} = 1.685 \times 10^4$$

chaps integración señales chaps bCD tubo 7. mcd

## 7. singlete 19 complejoado

$$\text{área}19c := \int_{\text{ppm}19y21_0}^{\text{ppm}19y21_n} \text{singlete}19c(\text{ppm}19y21, A19c, w19c, \text{max}19c) \text{dppm}19y21$$

$$\text{área}19c = 2.053 \times 10^4$$

## 8. doblete 21 libre

$$\text{área}21i := \int_{\text{ppm}19y21_0}^{\text{ppm}19y21_n} \text{doblete}21i(\text{ppm}19y21, A21ia, w21ia, J21i, \text{max}21ia) \text{dppm}19y21$$

$$\text{área}21i = 1.509 \times 10^4$$

## 9. doblete 21 complejoado

$$\text{área}21c := \int_{\text{ppm}19y21_0}^{\text{ppm}19y21_n} \text{doblete}21c(\text{ppm}19y21, A21ca, w21ca, J21c, \text{max}21ca) \text{dppm}19y21$$

$$\text{área}21c = 2.053 \times 10^4$$

## 10. multiplete 25 complejoado

$$n := \text{last}(\text{ppm}25c) \quad i := 0..n$$

$$\text{área}25c := \int_{\text{ppm}25c_0}^{\text{ppm}25c_n} \text{multiplete}25c(\text{ppm}25c, A25ca, A25cb, A25cc, A25cd, A25ce, w25c, \text{max}25ca, \text{max}25cb, \text{max}25cc, \text{max}25cd, \text{max}25ce) \text{dppm}25c$$

$$\text{área}25c = 6.814 \times 10^3$$

Sólamante queda relacionar las áreas de las señales que nos interesan con el área de referencia para así poder comparar entre sí las áreas de los diferentes tubos de la serie. Además de esta forma obtenemos unos números que nos dan idea del número de protones que se encuentran libres y complejados.

Se define un factor f que se usará para referenciar todas las áreas de este tubo

$$f := \frac{6}{\text{área}31y32} \quad f = 6.9516 \times 10^{-5} \quad \text{área}31y32 := \text{área}31y32 \cdot f \quad \text{área}31y32 = 6$$

Ahora se calculan las áreas corregidas de cada señal en función de este factor

$$\text{área}corregida12i := \text{área}12i \cdot f \quad \text{área}corregida12i = 0.447$$

$$\text{área}corregida12c := \text{área}12c \cdot f \quad \text{área}corregida12c = 0.57$$

$$\text{área}corregida18i := \text{área}18i \cdot f \quad \text{área}corregida18i = 1.217$$

$$\text{área}corregida18c := \text{área}18c \cdot f \quad \text{área}corregida18c = 1.412$$

$$\text{área}corregida19i := \text{área}19i \cdot f \quad \text{área}corregida19i = 1.171$$

$$\text{área}corregida19c := \text{área}19c \cdot f \quad \text{área}corregida19c = 1.427$$

$$\text{área}corregida21i := \text{área}21i \cdot f \quad \text{área}corregida21i = 1.049$$

$$\text{área}corregida21c := \text{área}21c \cdot f \quad \text{área}corregida21c = 1.427$$

$$\text{área}corregida25c := \text{área}25c \cdot f \quad \text{área}corregida25c = 0.474$$

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA (período ago/1997-2003)

### Participações em Congressos

- 1- BUDAL, R.M.; BRIGHENTE, I.C.; VÁZQUEZ TATO, J.; YUNES, R.A.  
Utilização de  $\beta$ -ciclodextrina sulfatada no estudo da hidrólise do furoato de diloxanida em solução aquosa. In: VI Encontro de Química da Região Sul- SBQ/Sul, Maringá-PR, 1998.
- 2- BUDAL, R.M.; DAL MAGRO, J.; BRIGHENTE, I.C.; VÁZQUEZ TATO, J.; YUNES, R.A. Estudo Comparativo entre as Constantes de Associação do Furoato de Diloxanida com  $\beta$ -ciclodextrina e  $\beta$ -ciclodextrina sulfatada. In: 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química/SBQ, Poços de Caldas- MG, 2000.
- 3- BUDAL, R.M.; JOVER RAMOS, A.; NASCIMENTO, M. G.; YUNES, R.A.; VÁZQUEZ TATO, J. Estudos de Formação dos Complexos de Inclusão de Fusidato de sódio e Helvolato de potássio em  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . In: 25<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química/SBQ, Poços de Caldas- MG, 2002.
- 4- BUDAL, R.M.; JOVER RAMOS, A.; NASCIMENTO, M. G.; YUNES, R.A.; VÁZQUEZ TATO, J. Estudos de Formação dos Complexos de Inclusão CHAPS e CHAPSO em  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . In: 26<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química/SBQ, Poços de Caldas- MG, 2003.

### Artigos Publicados

1- AL-SOUFI, W.; RAMOS CABRER, P.; JOVER, A.; BUDAL, R.M.; VÁZQUEZ TATO, J. Determination of second-order association constants by global analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts. Application to the complexation of sodium fusidate and potassium helvolate by  $\beta$ - and  $\gamma$ - cyclodextrin. **Steroids**, 68, 43-53, 2003.

2- JOVER, A.; BUDAL, R.M.; AL-SOUFI, W.; MEIJIDE, F.; VÁZQUEZ TATO, J.; YUNES, R.A. Spectra and structure of complexes formed by sodium fusidate and potassium helvolate with  $\beta$ - and  $\gamma$ - cyclodextrin. **Steroids**, 68, 55-64, 2003.

3- BUDAL, R.M.; NASCIMENTO, M.G.; DAL MAGRO, J.; VÁZQUEZ TATO, J.; YUNES, R.A. Studies on the Inclusion Complex of Diloxanide Furoate-  $\beta$ -Cyclodextrin (Em elaboração).